



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

PEDRO IVO DA GRAÇA FAGUNDES

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE DENTES INDICADOS AO
RETRATAMENTO ENDODÔNTICO POR MOTIVO PROTÉTICO
OU DEVIDO A PRESENÇA DE PERIODONTITE APICAL**

Piracicaba
2023

PEDRO IVO DA GRAÇA FAGUNDES

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE DENTES INDICADOS AO
RETRATAMENTO ENDODÔNTICO POR MOTIVO PROTÉTICO
OU DEVIDO A PRESENÇA DE PERIODONTITE APICAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica na área de Endodontia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Coorientadora: Dr^a Juliana Delatorre Bronzato

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO PEDRO IVO DA GRAÇA FAGUNDES E ORIENTADA PELA PROF^a. DR^a. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES COORIENTADA PELA DR^a. JULIANA DELATORRE BRONZATO

Piracicaba

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

F139a Fagundes, Pedro Ivo da Graça, 1992-
Análise microbiológica de dentes indicados ao retratamento endodôntico por motivo protético ou devido a presença de periodontite apical / Pedro Ivo da Graça Fagundes. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
Coorientador: Juliana Delatorre Bronzato.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Reação em cadeia da polimerase. 2. Periodontite periapical. 3. Retratamento. 4. *Enterococcus faecalis*. 5. *Candida albicans*. 6. Endodontia. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida, 1961-. II. Bronzato, Juliana Delatorre, 1991-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Microbiological analysis of teeth indicated for endodontic retreatment for prosthetic reason or due to the presence of apical periodontitis

Palavras-chave em inglês:

Polymerase chain reaction

Periapical periodontitis

Retreatment

Enterococcus faecalis

Candida albicans

Endodontics

Área de concentração: Endodontia

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes [Orientador]

Adriana de Jesus Soares

Marcos Sergio Endo

Data de defesa: 27-02-2023

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-9243-3142>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/9505280509358090>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 27 de fevereiro de 2023, considerou o candidato PEDRO IVO DA GRAÇA FAGUNDES aprovado.

PROF^a. DR^a. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

PROF. DR. MARCOS SERGIO ENDO

PROF^a. DR^a. ADRIANA DE JESUS SOARES

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Adalberto e Pricila, por todo carinho, amor, atenção, dedicação e companheirismo. Sem vocês a concretização desse sonho não seria possível.

À minha irmã Ana Carolina, por toda amizade, carinho e por ser um exemplo a ser seguido, mesmo quando distante.

Aos meus avós Alvaro (in memoriam), Antonieta(in memoriam), João (in memoriam) e Lydia que assim como os outros se mostra cada dia mais um exemplo de Luz e resistência.

Ao meu querido sobrinho Davi, que é a minha inspiração e meu companheiro de altas aventuras.

À minha querida e amada Nathalia, que me ensina cada dia mais e mais a ser uma pessoa melhor, me inspirando e me mostrando como a vida é linda, aproveitando o privilégio e a benção de estarmos vivos.

À querida Cristina e Fernando, por estarem sempre presentes, dando amor e carinho, sempre prontos a ajudar.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes. Agradeço por toda confiança e ensinamentos e por me estimular a ser cada vez mais. Obrigado por todo apoio e dedicação. Sinto-me honrado e grato por ter a senhora como professora orientadora.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas na pessoa de seu magnífico reitor Prof. Dr. Antônio José de Almeida Meirelles e à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa de seu diretor Prof. Dr. Flavio Henrique Baggio Aguiar e da Diretora Associada Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz, por oferecer-me suas instalações e quadro pessoal que ocupam posições de destaque no cenário nacional e internacional.

Ao Prof. Dr. Valentim Adelino Ricardo Barão, coordenador do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica. Agradeço pelo espaço científico ofertado para realização das atividades acadêmicas.

À CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001.

Aos professores da área de Endodontia, Prof^a. Dra. Adriana de Jesus Soares, Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia (in memoriam), Prof^a. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz, Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida e Prof^a. Dra. Mariana Angélica Marciano da Silva pelos seus ensinamentos e por participarem de minha trajetória acadêmica.

Aos funcionários Ana Godoy, Maria Helídia Neves Pereira e Janaína Leite por estarem sempre presentes e me ajudarem.

Ao funcionário e amigo Maicon Ricardo Zieberg Passini, obrigado por todos os ensinamentos transmitidos, por ser sempre atento e solícito e pela amizade construída.

À Ana Paula Carone, Claudinéia Prata Pradela, Érica A. Pinho Sinhoreti, Leandro Vigano, Raquel Q. Marcondes Cesar, profissionais da secretaria da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

,Aos meu colegas que ja moraram comigo e se fazem presentes como irmãos até hoje, me ajudando e me ensinando muito Ederaldo Pietrafesa de Godoi Jr e Lauter Eston Pelepenko.

Às minha amigas Beatriz Safady Lopes, e Erica Lopes a quem ja estou devendo muitos almoços e jantares, por me ensinarem tanto também, muito obrigado.

Aos colegas de mestrado da Endodontia, Ana Beatriz Safady Lopes, David Saldanha de Brito Alencar, Leandro Bueno Gobbo e Leticia Tank Oliveira.

Aos colegas de doutorado, Antonio Airton L. de Moura Filho, Ederaldo, Pietrafesa de Godoi Junior, Esdras Gabriel Alves, Arthur Barroso Pimentel, Emelly de Aveiro, Ezequiel Gabrielli, Fernanda M. Antonialli, Jéssika Jeuken Teixeira, Lauter Eston Pelepenko Teixeira, Lidiane Mendes Louzada, Maria Eunice da Silva Davidian, Tamares Andrade e Silva, Thiago Bessa, Tamires F. Mello, Walbert Vieira, Ricardo Honda, Rodolfo Figueiredo , Vito Madio Chiarelli Neto, Yanna de Omena Soares.

Aos pós-doutorandos Aline Gomes Matta, Érica Mendes Lopes, Juliana Delatorre Bronzato e Rodrigo Arruda-Vasconcelos.

À minha co-orientadora Juliana Delatorre Bronzato, muito obrigada por estar sempre presente.

RESUMO

Existe uma forte relação entre a presença de microrganismos e seus fatores de virulência com o insucesso do tratamento endodôntico (TE). Estes, através da estimulação de resposta inflamatória periapical podem levar ao desenvolvimento de sintomatologias clínicas e lesões periapicais. O objetivo deste trabalho foi detectar microrganismos específicos presentes em canais radiculares (CR) de dentes com necessidade de retratamento endodôntico, devido a presença de periodontite apical crônica (Grupo CL) ou por motivos protéticos (Grupo SL). Foram selecionados 10 pacientes de cada grupo e amostras microbiológicas foram coletadas dos CR dentes envolvidos. O DNA extraído foi submetido a reação em cadeia de polimerase (PCR) para detecção das espécies bacterianas *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*; e de fungos tais como *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* antes e depois do preparo químico-mecânico (PQM) e depois do uso de medicação intracanal (MIC). Os dados obtidos foram devidamente tabulados e estatisticamente analisados através do SPSS 23 para Windows. Os microrganismos mais detectados nos CRs do Grupo PA foram *E. faecalis* (9/10), *S. mutans* (7/10), *C. albicans* (10/10), *C. dubliniensis* (10/10) e *C. glabrata* (10/10). Os microrganismos mais detectados nos CRs do Grupo MP foram *S. Mutans* (7/10), *E. faecalis* (6/10), *C. dubliniensis* (9/10). Concluiu-se que a comunidade microbiana associada aos dois grupos apresenta uma microbiota diversificada de bactérias e fungos.

Palavras-chave: Endodontia. Periodontite periapical. Retratamento. *Enterococcus faecalis*. *Candida albicans*. Reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

There is a strong relationship between the presence of microorganisms and their virulence factors with endodontic treatment (ET) failure. These, by stimulating the periapical inflammatory response, can lead to the development of clinical symptoms and periapical lesions. The objective of this work is to detect specific microorganisms present in root canals (RC) of teeth in need of endodontic retreatment, due to the presence of chronic apical periodontitis (Group CL) or for prosthetic reasons (Group SL). Ten patients from each group were selected and microbiological samples were collected from the CR involved teeth. The extracted DNA was submitted to PCR to detect the bacterial species *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*; and fungi such as *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* before and after chemo-mechanical preparation (CMP) and after the use of intracanal medication (ICM). The data obtained were duly tabulated and statistically analyzed using SPSS 23 for Windows. The microorganisms most detected in Group 1 were *E. faecalis* (9/10), *S. mutans* (7/10), *C. albicans* (10/10), *C. dubliniensis* (10/10) and *C. glabrata* (10/10). The microorganisms most detected in Group MP were *S. mutans* (7/10), *E. faecalis* (6/10), *C. dubliniensis* (9/10). It was concluded that the microbial community associated with both groups presents a diverse microbiota of bacteria and fungi.

Keywords: Endodontics. Periapical periodontitis. Retreatment. *Enterococcus faecalis*. *Candida albicans*. Polymerase chain reaction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 -	Resumo das amostras realizadas ao longo dos procedimentos endodônticos e suas respectivas siglas	49
Tabela 2 -	Primers para detecção de <i>Candida</i> por PCR tradicional e Nested -PCR	52
Tabela 3 -	Primers para detecção de <i>S. Mutans</i>	52
Tabela 4 -	Primers complementares a metodologia descrita por Haynes e Westerneng (1996)	54
Tabela 5 -	Sequências dos primer espécie-específico utilizados nas reações de PCR	61
Tabela 6 -	Descrição das características clínicas e radiográficas detectadas nos pacientes pertencentes ao grupo portador de periodontite apical crônica (CL)	65
Tabela 7 -	Descrição das características clínicas e radiográficas detectadas nos pacientes pertencentes ao grupo de pacientes indicados ao retratamento por motivo protético SL	67
Tabela 8 -	Características clínicas e radiográficas dos pacientes submetidos a tratamento endodôntico de acordo com os grupos estudados	68/ 69
Tabela 9 -	Frequência e porcentagem dos resultados positivos obtidos nos grupos CL e SL detectados através do Nested-PCR nos diferentes tempos de coleta	70
Figura 1 -	Espécies Bacterianas X Frequência de Detecção(Periodontite Apical-CL)	72
Figura 2 -	Espécies Fúngicas X Frequência de Detecção(Periodontite Apical- CL)	72
Figura 3 -	Espécies Bacterianas X Frequência de Detecção(Motivos Protético- SL)	74
Figura 4 -	Espécies Fúngicas X Frequência de Detecção(Motivos Protético- SL)	74
Tabela 10 -	Correlações positivas entre a presença de bactérias e sinais e sintomas clínicos e/ou radiográficos apresentados pelos pacientes	75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Índice de sucesso da intervenção e da reintervenção endodôntica	20
2.2 Etiologia do insucesso e do retratamento endodôntico	23
2.3 Perfil microbiológico de dentes associados às infecções secundárias/persistentes	25
2.3.1 Presença de bactérias	26
2.3.2 Presença de fungos	32
2.4 O método de cultura microbiana no estudo das infecções endodônticas secundárias	34
2.5 O método de Nested-PCR no estudo das infecções associadas a dentes tratados endodonticamente	36
2.6 Justificativa do retratamento sem lesão	38
2.7 A importância do preparo químico-mecânico e da medicação intracanal na redução dos microrganismos do interior dos canais radiculares	38
2.8 A importância do tratamento restaurador no sucesso da terapia endodôntica	41
3 PROPOSIÇÃO	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Autorização para realização da pesquisa	45
4.2 Local da pesquisa	45
4.3 Seleção dos voluntários da pesquisa	45
4.4 Exame clínico, aspectos clínicos e radiográficos	45
4.5 Coletas das amostras	47
4.6 Detalhamento das coletas	47
4.6.1 Coletas microbiológicas (CM)	47
4.7 Procedimentos iniciais	47
4.8 Procedimentos endodônticos e coleta das amostras	48
4.8.1 Primeira sessão de atendimento	48
4.8.2 Segunda sessão de atendimento	49
4.9 Procedimentos Laboratoriais	49
4.9.1 Fluxograma metodológico	49
4.9.2 Seleção de primers para detecção de <i>Candida</i> spp. e <i>Streptococcus mutans</i>	50

4.9.2.2. Estudo in-silico para desenho de óligos específicos para <i>Candida spp</i>	53
4.9.2.3. Obtenção de amostras de DNA das cepas de referência	55
4.9.2.4. Determinação da especificidade de primers e condições para a reação de PCR	55
4.9.2.5. Validação dos primers em controles e amostras clinicas	56
4.9.3. Detecção de <i>Candida ssp.</i> por meio de Nested PCR em amostras clínicas e controles	57
4.9.4 Detecção de <i>Streptococcus mutans</i> por PCR e <i>Enterococcus faecalis</i> por meio de Nested PCR	58
4.9.4.1. Detecção de <i>Streptococcus mutans</i> por PCR	58
4.9.4.2. Detecção de <i>Enterococcus faecalis</i> por Nested-PCR	59
4.9.5. Forma de análise dos resultados	61
5 RESULTADOS	63
5.1 Características gerais dos casos selecionados no estudo	63
5.2 Sinais clínicos e radiográficos dos casos indicados ao retratamento pela presença de periodontite apical crônica (Grupa- CL)	63
5.3 Sinais clínicos e radiográficos dos casos indicados ao retratamento somente por motivo protético, livres de qualquer alteração periapical (Grupo- SL)	66
5.4 Perfil microbiológico dos grupos com indicação de retratamento por periodontite apical crônica (CL) e por motivos protéticos (SL)	70
5.5 Perfil microbiológico dos casos do grupo com indicação de retratamento por apresentarem periodontite apical crônica (CL)	71
5.6 Perfil microbiológico dos casos do grupo com indicação de retratamento por motivos protéticos (SL)	73
5.7 Associação entre a presença de microrganismos no interior dos canais radiculares e sinais e sintomais clínicos e radiográficos nas amostras	75
6 DISCUSSÃO	76
7 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	82
ANEXOS	99
Anexo 1 – Verificação de Originalidade e Prevenção de Plágio	99
Anexo 2 - Comitê de Ética em Pesquisa	100

1 INTRODUÇÃO

Bactérias e seus subprodutos desempenham um papel etiológico primário no desenvolvimento e perpetuação das lesões pulpares e periapicais (Takehashi et al., 1965).

Os microrganismos presentes na cavidade oral podem chegar à polpa por diferentes vias de acesso, sendo a mais comum através da lesão cáriosa. A polpa após os ataques bacterianos sucessivos é capaz de se recuperar e continuar a exercer suas funções vitais. Contudo, se houver um grande aumento no número e virulência dos microrganismos e diminuição da resistência do hospedeiro, a injúria pulpar será mais severa (Gomes et al., 1994ab). Quanto maior a duração deste estímulo nocivo, maior o efeito deletério para o tecido pulpar, que pode variar de uma inflamação como pulpite reversível ou inflamação transitória até uma pulpite irreversível, progredindo para a necrose, sendo assim, necessário o tratamento endodôntico. Uma vez que a polpa se torna necrótica, as defesas pulpares passam a não atingir o interior do sistema de canais radiculares e a polpa necrótica torna-se habitada por microrganismos (Endo et al., 2012). Porém após o tratamento endodôntico, pode ocorrer casos de insucesso, com desenvolvimento, permanência ou aumento da lesão periapical.

Dentre os fatores mais comuns que podem levar a reinfecção dos canais radiculares estão: falha no controle asséptico, acesso coronário mal executado, canais radiculares não encontrados, instrumentação insuficiente, irrigação e utilização de substância química auxiliar ineficiente, obturação e restauração deficiente (Ray e Trope, 1995; Sundqvist et al., 1998; Siqueira et al., 2001; Gomes et al., 2008ab; Endo et al., 2013; Estrela et al., 2014; Barbosa-Ribeiro et al., 2020a,b). A microinfiltração coronária devido a falta de um selamento satisfatório é uma fonte constante de agentes infecciosos da saliva, que podem iniciar e manter a infecção periapical levando ao insucesso do tratamento endodôntico (Dos Santos et al., 2014).

A reintervenção endodôntica está indicada não apenas para os casos de insucesso endodôntico mas também por finalidade protética, para aqueles dentes que apesar de não apresentarem lesão periapical aparente, apresentam condições insatisfatórias de obturação e restauração (Maníglia-Ferreira et al., 2007; Bícigo-

Pereira et al. 2020). Sabe-se que a guta-percha se degrada com o passar do tempo, perdendo sua habilidade de selamento, o que favorece a microinfiltração e o crescimento bacteriano no sistema de canais radiculares (SCR), comprometendo a longevidade do tratamento endodôntico (Maníglia-Ferreira et al., 2007).

Bícego-Pereira et al. (2020), analisando amostras provenientes de canais radiculares que não tinham alterações periapicais indicados ao retratamento endodôntico por motivos protéticos observaram através da cultura, crescimento bacteriano em 100% das amostras, reafirmando a necessidade da reintervenção endodôntica visando uma maior redução bacteriana e conseqüentemente uma maior previsibilidade do tratamento protético a ser realizado.

Quando analisados por técnicas moleculares não dependentes das técnicas de cultura, a diversidade das infecções secundárias ou persistentes também apresenta uma grande diversidade, como as infecções primárias.

Nesse meio ambiente as bactérias mais presentes são anaeróbias facultativas gram-positivas (Molander et al. 1998; Pinheiro et al., 2003), dentre elas, *Enterococcus* spp tem sido frequentemente detectada (Hancock et al., 2001; Gomes et al., 2006 ab; Ozbek et al., 2009; Wang et al., 2012). Espécies de fungos, como a *Candida albicans* também têm sido identificadas (Egan et al., 2002). Entretanto, a microbiota residente de canais radiculares indicados ao retratamento endodôntico por motivos exclusivamente protéticos é pouco descrita na literatura atual (Sundqvist et al., 1998; Bícego-Pereira et al., 2020).

A cárie dentária, primária ou secundária (devido a microinfiltração das restaurações) afeta aproximadamente 90% da população mundial. *Streptococcus mutans* é uma das principais espécies bacterianas associadas a esta doença (Lima et al., 2021).

Embora a composição da microbiota das infecções endodônticas secundárias / persistentes seja diferente em número e diversidade de espécies, quando comparada às infecções primárias, *S. mutans* pode ser encontrado em ambos os tipos de infecções. Seus fatores de virulência consistem na capacidade de formar biofilmes e tolerar condições adversas, como baixo pH e estresse oxidativo (Lima et al., 2021). Cepas de *S. mutans* que apresentam os fatores de virulência Cnm/Cbn

(ambos CBPs) podem causar danos ao hospedeiro devido a sua ligação ao colágeno, capacidade de invasão de células cardíacas em pacientes debilitados, capacidade de causar endocardite bacteriana, microsangramento cerebral e doenças renais (Misaki et al., 2016; Inenaga et al., 2018; Lima et al., 2021).

Enterococcus faecalis são frequentemente encontrados nos casos de insucesso endodôntico, pois podem aderir nas paredes de canais radiculares, gutapercha, cimento endodôntico, o que possibilita a formação de biofilme resistente. Sua alta prevalência no insucesso endodôntico, e o fato de apresentarem diversos fatores de virulência reforça a necessidade de investigar mais profundamente esta espécie. Seus fatores de virulência favorecem a aderência dos microrganismos às paredes do canal radicular, dificultando sua remoção durante o preparo químico-mecânico. Entre seus genes de virulência destacam-se *esp*, *ace*, *asa*, *gelE*, *efaA*, *CylA* (Francisco et al., 2021).

As infecções fúngicas são comuns na mucosa oral, mas seu papel em outros locais bucais é mal definido. Nas últimas décadas, inúmeros estudos relataram a presença de fungos, principalmente espécies de *Candida* em infecções endodônticas (Mergoni et al., 2018; Alberti et al., 2021), embora em número relativamente pequeno em comparação ao bacterioma anaeróbio predominante.

O microbioma humano fúngico, denominado micobioma, tem numerosos constituintes, predominando o gênero *Candida*. Dentre mais de 200 espécies com patogenicidade humana, as espécies de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* ocupam o topo da pirâmide. Dentre elas, *C. albicans* é a espécie intraoral mais predominante, presente em 30-45% nos adultos saudáveis (Mergoni et al., 2018; Alberti et al., 2021).

A transição de *Candida* de comensal oral inofensivo para patógeno oportunista depende de uma série de condições predisponentes, incluindo funcionalidade imunológica, distúrbios endócrinos, dentaduras mal ajustadas, higiene oral deficiente, uso de antibióticos de amplo espectro, corticosteroides, agentes imunossupressores e medicamentos que podem induzir neutropenia e xerostomia (Mergoni et al., 2018; Albert et al., 2021).

As espécies de *Candida*, em geral, possuem um arsenal de fatores de

virulência que, atuando em conjunto, podem causar candidíase em indivíduos vulneráveis. Estes fatores incluem: i) adesão e formação de biofilme nas superfícies bióticas e abióticas do hospedeiro, mediada por moléculas de superfície; ii) produção de enzimas hidrolíticas, proteinases, fosfolipases, e hemolisinas que degradam proteínas da matriz extracelular dos tecidos do hospedeiro; iii) timotropismo; iv) troca fenotípica e conseqüente adaptabilidade ambiental; v) evasão do sistema imunológico do hospedeiro, através da degradação de IgG1, IgA1 e IgA2 e supressão das funções de neutrófilos polimorfonucleares; e vi) imunomodulação através da estimulação de síntese de citocinas pró-inflamatórias e ativação da cascata do complemento (Mergoni et al., 2018; Albert et al., 2021).

Bactérias e fungos têm demonstrado notável capacidade de resistência e adaptação ao meio ambiente, incluindo o desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antimicrobianos. As infecções graves causadas por bactérias com resistência aos antibióticos (R_ATB) comumente usados são um grande problema de saúde global. Vários estudos têm demonstrado a R_ATB de bactérias, muitos deles envolvendo espécies isoladas de infecções orais.

Tradicionalmente a microbiota dos canais radiculares foi identificada por métodos de cultura, que envolve isolamento, crescimento e identificação bacteriana através de morfologia microbiana, requerimentos gasosos e testes bioquímicos (Sundqvist, 1989; Gomes et al., 2004ab). Entretanto, as infecções endodônticas são mistas e polimicrobianas, podendo haver microrganismos de difícil ou mesmo impossível cultivo (Vianna et al., 2005; Gomes e Montagner, 2010). Métodos moleculares de identificação microbiana são mais sensíveis que a cultura, podendo inclusive detectar microrganismos incultiváveis, levando a uma caracterização mais acurada da microbiota (Siqueira Jr, 2003). O emprego de tais métodos podem ser útil para o diagnóstico, prognóstico, determinação da terapia a ser utilizada, e até mesmo na avaliação da suscetibilidade a doenças (Gomes e Montagner, 2010).

O método molecular Nested-PCR é uma variação da reação em cadeia de polimerase (PCR) que possui alta reprodutibilidade, confiabilidade, especificidade além de ser capaz de detectar microrganismos, mesmo quando estes estão presentes em baixas concentrações na amostra, sendo um método eficaz para a identificação bacteriana (Gomes et al., 2007; Gomes et al., 2008a,b; Louzada et al., 2020; Barbosa-

Ribeiro et al., 2020).

O Nested PCR consiste na realização subsequente de duas reações de polimerase em cadeia (PCR), a primeira reação, nomeada como universal, é realizada com objetivo de amplificar o gene 16S (para bactérias) e 18S (para fungos) presente no código genético obtido através da extração do DNA da amostra. O produto da reação deve ser submetido a uma segunda reação, chamada específica, onde primers específicos para cada espécie de microrganismo são utilizados visando promover a amplificação de uma região do gene 16S, exclusiva para cada espécie (Willis et al., 1999; Siqueira et al., 2004; Gomes et al., 2008ab).

O melhor e mais seguro método utilizado para descontaminar o canal radicular é a criteriosa limpeza do conteúdo séptico-necrótico (Schilder, 1974), uma vez que, ali, os microrganismos não podem ser alcançados pelas células de defesa do hospedeiro (Takahashi et al., 1998). Baseado nesta premissa que é o tratamento endodôntico, ao utilizar métodos químico-mecânicos, busca romper o equilíbrio do ecossistema microbiano, a fim de promover a desinfecção do sistema de canais radiculares.

Somente o preparo mecânico com o uso de uma substância inerte como o soro fisiológico reduz as células bacterianas de 10^4 - 10^6 para 10^2 - 10^3 células (53.3%) (Bystrom e Sundqvist, 1981). Entretanto, as complexidades anatômicas dos canais radiculares limitam a desinfecção mecânica (Biff e Rodrigues, 1989). Dessa forma, a limpeza do canal radicular depende também da ação de soluções irrigadoras que lubrificam o canal durante a ação de corte dos instrumentos endodônticos, auxiliam na remoção de *smear layer*, além de terem potencial germicida e ação solvente sobre exsudato, tecido pulpar necrosado e pré-dentina; auxiliando significativamente na redução (cerca de 80%) das células bacterianas dos canais radiculares (Bystrom e Sundqvist, 1983).

Porem, apesar do preparo químico-mecânico do canal radicular reduzir significativamente os microrganismos, algumas espécies ainda irao sobreviver, não somente pela incapacidade do preparo químico-mecânico em removê-los das complexidades anatômicas, mas também porque alguns nutrientes capazes de favorecer o crescimento destes microrganismos residuais, irão, inevitavelmente, ali permanecer (Gomes et al, 1996ab; Siqueira e Lopes, 1999a)

Desta forma, é provável que se os microrganismos permanecerem em

número suficiente e em ambiente favorável, estes poderão multiplicar-se e restabelecer a contaminação clínica do espaço pulpar (Bystrom et al,1985; Ando e Hoshino, 1990; Bystrom e Sundqvist et al, 1981).

Bystrom e Sundqvist (1981,1983), Bystrom et al. (1985) e Sjogren et al. (1990) mostraram a necessidade do emprego de medicação intracanal a fim de impedir que as bactérias sobreviventes ao preparo químico mecânico se multipliquem no intervalo entre as sessões do tratamento.

Diante destas considerações torna-se notória a necessidade de manter-se a desinfecção do canal obtida pelo preparo químico-mecânico, o que parece ser possível através da utilização de uma medicação intracanal adequada (Sjogren et al., 1991; Chong e Pitt Ford, 1992; Estrela et al., 1994), da correta obturação do sistema de canais radiculares e de um bom selamento coronário (Friedman et al.,1986).

Apesar de vários estudos no passado terem mostrado a presença de fungos nos canais radiculares, o objetivo deste estudo é detectar através da reação de PCR, espécies como *S.mutans* e pelo método Nested-PCR *E.faecalis* e *Candida* spp em dentes com presença de lesão periapical e de dentes sem lesão periapical, mas indicados ao retratamento por motivos exclusivamente protéticos, partindo-se da hipótese de que existem diferenças qualitativas e/ou quantitativas entre a microbiota associada aos quadros clínicos avaliados no presente estudo. Visa também correlacionar os resultados encontrados com os sinais e sintomas clínicos e os achados radiográficos encontrados nos diferentes grupos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Índice de sucesso da intervenção e da reintervenção endodôntica

O tratamento endodôntico visa a redução da carga microbiana presente no interior do sistema de canais radiculares (SCR), a remissão dos sinais e sintomas apresentados pelo paciente, e a reintegração do órgão dental ao sistema estomatognático através do restabelecimento de suas funções (Siqueira., 2001).

Os índices de sucesso do tratamento endodôntico estão relacionados a fatores diversos inerentes ao grau de conhecimento, recurso e experiência do operador; ao grau de dificuldade do tratamento; e ao diagnóstico e planejamento do caso selecionado (Holland et al., 1983; Imura et al., 2007; Torabinejad et al., 2009).

Da mesma forma o “fracasso e sucesso” tem suas pontualidades em características clínicas e radiográficas/ tomográficas. Mesmo com todas as características se faz importante uma avaliação clínica bem como radiográfica/ tomográfica de tempos em tempos (proservação) dos casos para seu tratamento endodôntico ser considerado sucesso ou fracasso (Tabassum 2016). Os sinais e sintomas clínicos que determinam o sucesso do tratamento endodôntico são: a ausência de dor, exsudato e fístula nos casos em que esses se fizerem presentes previamente ao tratamento, e o reestabelecimento da função mastigatória. Radiograficamente, o sucesso é avaliado através da remissão de radioluscências periapicais e do reestabelecimento de continuidade da lâmina dura em um período de 6 a 24 meses após o tratamento endodôntico (Prada et al., 2019).

Os fatores relevantes que podemos considerar como insucesso seriam: persistência de bactérias (intra e extra-canal); obturação inadequada (instrumentação inadequada); extensões excessivas de preenchimento radicular; Microinfiltração coronária; canais não localizados e não tratados; iatrogenias e complicações (perfurações, desvios, zips, erros em acessos)(Tabassum 2016).

(Gorni et al., 2004), avaliaram o retratamento endodôntico de 452 pacientes, durante um período de 24 meses (follow-up de 2 anos). Todos os dentes (254 molares, 107 pré-molares e 91 uniradiculares) que foram divididos em dois grupos de dentes modificados anatomicamente no tratamento endodôntico anterior (morfologia alterada), e dentes que não foram feitas alterações anatômicas no

tratamento anterior (respeitada a morfologia do canal radicular). Embora o sucesso tenha sido 69,03%. O sucesso clínico de um retratamento endodôntico dependerá se houveram alterações no tratamento prévio.

Sjögren et al., 1990, avaliaram os índices de sucesso da intervenção endodôntica primária e da reintervenção endodôntica não cirúrgica em 356 dentes. Os índices de sucessos encontrados foi de 98% para os casos de dentes indicados ao tratamento endodôntico devido a necrose pulpar; 86% para dentes com necrose pulpar associada a periodontite apical crônica; e de 62% para dentes com insucesso do tratamento endodôntico prévio, evidenciado pela presença de lesão periapical respectivamente.

Ng et al., 2008, investigaram as características dos estudos nas taxas de sucesso relatadas de lesões secundárias/persistentes ou retratamento do canal radicular; e também os efeitos de fatores clínicos no sucesso do retratamento endodôntico obtendo uma taxa de sucesso nas lesões secundárias/persistentes de 77%. A presença de lesão periapical pré-operatória com sua diminuição, extensão apical da obturação radicular e qualidade da restauração coronária foram fatores que contribuíram para um prognóstico de sucesso.

Ng et al., 2011. investigaram a probabilidade e os fatores que contribuem para a sobrevida dos dentes com tratamento de lesões primárias e secundárias. Uma preservação de 2 a 4 anos onde o n das lesões primárias foi de 759 dentes, com um índice de sucesso de 572 dentes, já nas lesões secundárias de 858 dentes, 642 indivíduos obtiveram sucesso e uma sobrevida do dente no período de 4 anos. Dentre destes dados, pode-se observar que o estudo obteve sucesso em 95% em ambas as situações clínicas, todas as preservações foram avaliadas com testes clínicos e radiográficos durante todo este período, Os autores também relataram a influência de fatores como existência prévia de periodontites apicais crônicas, tamanho da rarefação óssea presente, presença de fístula, patência do canal radicular, comprimento de trabalho do tratamento executado, limite de obturação, uso de EDTA durante a irrigação final, no índice de sucesso dos tratamentos endodônticos.

Imura et al., 2007, acompanharam 2000 casos indicados ao tratamento e retratamento endodôntico por razões diversas, sendo os procedimentos realizados por um único especialista. Observaram um índice de sucesso de 94% nas intervenções endodônticas; e 85,9% nas reintervenções endodônticas. A ausência de um

selamento coronário definitivo mostrou-se um fator com alto grau de impacto desfavorável ao sucesso do tratamento endodôntico, assim como a ocorrência de acidentes durante a execução do procedimento. O grupo dental envolvido também foi capaz de afetar o índice de sucesso da reintervenção endodôntica, sendo que incisivos e pré-molares obtiveram maiores índices de sucesso, quando comparados aos molares.

Estrela et al., 2014, visaram avaliar o sucesso do tratamento endodôntico convencional e do associado a cirurgia periapical. 57 dentes foram analisados, destes 26 foram diagnosticados com infecção primária e submetidos ao tratamento endodôntico convencional, 31 dentes associados a infecção endodôntica secundária foram submetidos a reintervenção via cirúrgica. O tratamento endodôntico convencional mostrou-se bem sucedido em 19/26 casos (73%), apresentando remissão completa da periodontite apical, além de outros 5/26 casos (19%) que apresentaram remissão parcial da lesão. Para os casos tratados cirurgicamente, foram detectadas eficácias terapêuticas em 10/31 (32,25%) casos com a cura completa da periodontite apical e 10/31 (32,25%) com cura parcial da patologia. Os índices de sucesso foram similares entre as duas modalidades.

Davies et al., 2016, conduziram um estudo clínico prospectivo objetivando avaliar a taxa de sucesso da reintervenção endodôntica avaliando os resultados do tratamento através do uso de radiografias periapicais e TCFC. Os tratamentos foram realizados por especialistas em Endodontia e por alunos de especialização sob supervisão. A preservação de 98 casos foi realizada e avaliada por dois especialistas após 01 ano da reintervenção, para avaliar a remissão, aumento ou formação de novas radioluscências periapicais. 93% (91/98) dos casos foram avaliados como sucesso pela análise de radiografias periapicais. Quando os casos foram analisados através do uso de TCFC, o índice de sucesso caiu para 77% (75/98), havendo diferença significativa entre o índice de sucesso obtido através da análise das imagens radiográficas e tomográficas.

Assim, é importante destacar que, mesmo que o percentual de insucessos seja baixo nos dias atuais, os tratamentos estão sujeitos a falhas, mesmo quando executados por profissionais capacitados, sob padrões rigorosos (Imura et al., 2007; Ng et al., 2011; Estrela et al., 2014; Davies et al., 2016).

2.2 Etiologia do insucesso e do retratamento endodôntico

Apesar dos altos índices de sucesso descritos em estudos contemporâneos, o fracasso do tratamento endodôntico ainda encontra-se presente (Siqueira et al., 2014; Estrela et al., 2014).

Takehashi et al., 1965, comprovaram através de seu estudo utilizando ratos germ-free a importância da contaminação do SCR por microrganismos para o desenvolvimento e perpetuação das patologias pulpares e periapicais. A importância de seus achados foi expressada em estudos posteriores (Moller et al., 1981; Gomes et al., 1994a,b; Gomes et al., 1996b).

O tratamento endodôntico é realizado para manter o dente em função na cavidade oral. Mesmo com tantas tecnologias na área da endodontia o insucesso endodôntico pode vir a aparecer, seja por falta de uma instrumentação efetiva, deixando assim bactérias remanescentes no canal; seja por falta de uma irrigação também efetiva; uma obturação não satisfatória ; ou a extensão excessiva ou insuficiente do selamento marginal, podendo causar microinfiltração marginal e contaminação dos canais (Tabassum e Khan, 2016).

O preparo químico-mecânico nos tratamentos endodônticos tem por objetivo principal a eliminação ou redução de bactérias no interior dos canais radiculares, quando ocorrem falhas durante o procedimento podem surgir lesões periapicais pós-tratamento, ou seja, o insucesso do tratamento endodôntico. Podendo este ser caracterizado pela permanência de microrganismos ou pela recontaminação do sistema de canais radiculares (Siqueira e Rôças, 2008; Siqueira et al., 2014; Francisco et al., 2017).

Existem estudos que usam diferentes métodos para detecção de falhas em tratamentos endodônticos, estes detectaram que outros fatores, além dos que já foram citados, podem contribuir para o insucesso, como a anatomia interna, trincas apicais, fenestração apical e iatrogenias (Qian et al., 2015).

O insucesso pode ser resultado de uma terapia anterior mal conduzida. Os problemas mais comuns que podem levar ao insucesso endodôntico são: controle asséptico inadequado, abertura coronária mal delineada, canais endodônticos não

detectados, anatomia radicular que foge a normalidade, instrumentação insuficiente e infiltração advindas de restaurações temporárias e permanentes (Sundqvist e Figdor, 1998, Francisco 2017).

Siqueira et al., (2014) verificaram em uma revisão da literatura, que teve como um de seus objetivos estudar as causas do insucesso, que a periodontite pós-tratamento também pode ser observada em alguns casos de dentes aparentemente bem tratados e seguindo protocolos delineados, isto devido a questões da complexa anatomia radicular, ocorrendo em 5-15% dos casos com lesão periapical pré-operatória.

Segundo Siqueira et al., 2014, a classificação das periodontites apicais crônicas que acometem os dentes já tratados endodonticamente são: **persistentes**, nos casos em que a terapia realizada apesar de se mostrar radiograficamente adequada e o dente bem restaurado, não conseguiu reverter o processo patológico em presente, contendo microrganismos nos túbulos dentinários e suas ramificações; **secundária**, nos casos onde após a resolução da patologia inicial o elemento dentário foi acometido novamente pela doença, sendo geralmente relacionada à microinfiltração das restaurações e presença de cárie; e **emergente**, nos casos onde o processo patológico periapical encontrar-se ausente no momento da terapia endodôntica inicial e vier a se desenvolver após a execução do tratamento (Ray e Trope 1995; Siren et al., 1997; Molander et al., 1998; Sundqvist et al., 1998; Hancock et al., 2001; Roças et al., 2004; Ricucci et al., 2009; Siqueira et al., 2014 Delboni et al., 2017).

Embora a infecção intra-radicular persistente, ou oriunda da recontaminação do SCR seja o principal agente etiológico do insucesso do tratamento endodôntico (Gomes et al., 2008b; Rôças et al., 2008), trabalhos demonstram a capacidade de algumas espécies microbianas de invadir e colonizar os tecidos periapicais, estabelecendo uma infecção extrarradicular, realizando a formação de biofilme na superfície apical da raiz dentária, e até disseminando-se no interior do corpo da lesão formando colônias coesas (Sunde et al., 2002; Siqueira e Roças 2003; Ricucci e Siqueira 2008).

A infecção extrarradicular pode ser caracterizada como dependente ou

independente da infecção intra-radicular.

Infecções extrarradiculares dependentes são aquelas que, quando a infecção intra-radicular for controlada, ela também desaparece. É o caso dos abscessos apicais agudos, reafirmando a importância da descontaminação intraradicular (Ricucci and Siqueira, 2008)

Infecções extrarradiculares independentes são aquelas capazes de se perpetuar mesmo após a efetiva erradicação da infecção presente no interior do SCR, perpetuando, dessa maneira, o processo inflamatório. Sugere-se que as principais espécies capazes de ocasionar infecções extrarradiculares independentes são as bactérias do gênero *Actinomyces* e *Propionibacterium propionicum*, sendo a infecção denominada como actinomicose apical (Sundqvist e Reuterving, 1980; Sundqvist et al., 1998; Ricucci & Siqueira, 2008).

Os fatores etiológicos responsáveis por gerar o insucesso do tratamento endodôntico são: A) A presença de infecção intra-radicular em zonas de comunicação com o periodonto; B) Contaminação da superfície radicular externa com formação de biofilme periapical (Actinomicose apical); C) Presença de cistos verdadeiros; D) Ocorrência de reação de corpo estranho a materiais de origem exógena utilizados durante o tratamento, por exemplo, fibras de celulose e materiais obturadores, ou de origem endógena (cristais de colesterol).

Observando os relatos da literatura endodôntica, observa-se que a infecção intraradicular é o principal agente causal do insucesso do tratamento endodôntico (Molander et al., 1998; Nair et al., 1999; Siqueira et al., 2001; Gomes et al., 2008ab; Endo et al., 2013; Prada et al., 2019).

2.3 Perfil microbiológico de dentes associados às infecções secundárias/persistentes

Sabe-se a relação de causa e efeito entre a presença de microrganismos no interior do sistema de canais radiculares e o desenvolvimento das patologias pulpares e periapicais, torna-se impreterível o conhecimento do perfil da comunidade microbiana residente no interior do SCR de dentes endodonticamente comprometidos,

para o desenvolvimento de substâncias, técnicas e recursos capazes de otimizar o índice de sucesso da intervenção e da reintervenção endodôntica (Kakehashi et al., 1965; Sundqvist et al., 1998; Molander et al., 1998; Siqueira et al., 2001; Gomes et al., 2008b; Barbosa-Ribeiro et al., 2016; Prada et al., 2019).

A microbiota presente no SCR já tratados anteriormente se difere em relação aos canais que apresentam infecções primárias, e o tratamento endodôntico vem para modificar as condições ambientais e seleciona os microrganismos residuais. Esses microrganismos conseguem sobreviver em ambientes inóspitos, escassos de nutrientes, em que as interações ecológicas são mínimas, e que se mantem capazes de permanecer em um estado de latência em longos períodos com falta e de se reativarem na presença de nutrientes. (Sundqvist et al., 1992; 1998; Siren et al., 1997; Molander et al., 1998; Hancock 2001; Roças et al., 2008; Gomes et al., 2008ab; 2013; Ricucci e Siqueira 2011; Endo et al., 2013; Prada et al., 2019).

O perfil das infecções secundárias quando analisadas por métodos dependentes de cultura, mostrou-se diferente das características das infecções primárias, que são polimicrobianas, predominantemente compostas por bactérias anaeróbias estritas, contendo bactérias Gram-negativas e positivas (Haapasalo., 1989; Gomes et al., 1994ab, 2004ab).

2.3.1 Presença de bactérias

Em 1998, Molander et al. avaliaram, através de técnicas da cultura, o conteúdo microbiológico presente em 100 dentes com presença de periodontite apical crônica pós-tratamento; e de 20 dentes indicados ao retratamento pela existência de falhas técnicas e sem envolvimento periapical. No grupo com lesão periapical a presença de microrganismos foi detectada em 68% dos casos. No grupo sem lesão, as bactérias foram recuperadas dos canais radiculares em 45% dos casos. Foi constatada a predominância de bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas que representaram 70% do total de cepas isoladas. Pode ser observada uma baixa variedade de microrganismos nesses casos, com a grande maioria dos casos representadas por infecções compostas por uma ou duas espécies exclusivamente, sendo o *Enterococcus faecalis* a espécie bacteriana mais frequentemente associada

a esses casos em ambos os grupos. O perfil das infecções secundárias mostrou-se diferente do característico das infecções primárias, que são polimicrobianas, predominantemente compostas por bactérias anaeróbias estritas, contendo bactérias Gram-negativas e positivas (Haapasalo., 1989; Gomes et al., 1994ab, 2004ab)

Hancock et al., 2001, ao avaliarem a microbiota relacionada ao insucesso detectaram um perfil microbiológico semelhante ao já descrito anteriormente (Sundqvist et al., 1998; Molander et al., 1998). Entretanto, ao correlacionarem a quantidade de microrganismos presentes no SCR ao limite de obturação apical do tratamento prévio, houve uma correlação diretamente proporcional entre o tamanho da porção apical não tratada e a diversidade microbiana presente no interior dos canais. Quanto maior o tamanho da zona apical livre de material obturador, maior a diversidade microbiana presente no interior dos canais radiculares, o que posteriormente pode ser confirmado em 2004 através dos estudos de Siqueira et al.

Peciulienė et al., 2001, coletaram amostras microbiológicas de 40 dentes tratados endodonticamente com periodontite apical crônica e as analisaram através do método de cultura, valendo-se da identificação fenotípica e de testes bioquímicos para identificação microbiana. Microrganismos foram detectados em 33 das 40 amostras. *E. faecalis* estava presente em 21 amostras, sendo o microrganismo detectado com maior frequência. A espécie fúngica *Candida albicans* foi detectada em 6 casos, concordando com a literatura (Waltimo et al., 1997; Molander et al., 1998). Bacilos Gram-negativos foram detectados em apenas 3 casos, estando sempre associados a presença de *E. faecalis*. O autor ressalta a maior prevalência de bactérias sobre outros microrganismos no interior de canais associados ao insucesso do tratamento endodôntico prévio e destaca o importante papel ecológico do *E. faecalis* no desenvolvimento e estabelecimento das infecções secundárias/persistentes.

Chavez de Paz et al., 2003, analisaram a comunidade bacteriana relacionada a 200 casos de insucesso do tratamento endodôntico, evidenciado pela persistência de periodontite apical crônica. O cultivo bacteriano foi positivo em 55% das amostras. Os autores relataram a presença de diferentes espécies durante as etapas do tratamento endodôntico e sugeriram que mesmo após o preparo químico-mecânico o sistema de canais radiculares ainda fornece os requisitos mínimos

necessários para sobrevivência e crescimento de microrganismos.

Pinheiro et al., 2003a, analisaram, através do método de cultura, o conteúdo microbiológico presente em 60 dentes endodonticamente tratados com presença de periodontite apical crônica. Os autores relataram a presença de 83,3% de bactérias Gram-positivas e 57,4% de anaeróbios facultativos, sendo o *E. faecalis* a espécie encontrada com maior frequência nestes casos (45%). Os autores destacaram a presença de espécies anaeróbias estritas, sendo o gênero *Peptostreptococcus* o mais frequentemente isolado.

Outro estudo dos mesmos autores (Pinheiro et al., 2003b) avaliou a microbiota relacionada as infecções endodônticas secundárias em 30 casos de periodontite apical crônica pós-tratamento através dos métodos de cultura e avaliar a susceptibilidade dos microrganismos detectados a antibióticos. Um total de 55 bactérias foram isoladas, sendo destas 80% (44/55) Gram-positivas e 58% (32/55) anaeróbias facultativas. Os gêneros isolados com maior frequência foram *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Peptostreptococcus*, concluindo que a microbiota associada a esses casos é predominantemente Gram-positiva e anaeróbia facultativa.

Com o objetivo de investigar a comunidade microbiana associada aos casos de infecções primárias e secundárias/persistentes, Gomes et al., 2004ab analisaram através do método de cultura o conteúdo microbiológico presente em 41 dentes com polpas necrosadas e 19 dentes associados ao insucesso do tratamento endodôntico. Os autores concluíram que a microbiota presente nas infecções secundárias se difere daquela encontrada nas infecções primárias tanto em diversidade quanto em abundância de espécies.

Siqueira et al., 2004, analisaram, através da técnica molecular de Polymerase Chain Reaction (PCR), a presença de 19 espécies bacterianas presentes em canais radiculares encaminhados ao retratamento devido a infecção secundária/persistente. Ao analisarem o conteúdo bacteriano de 22 dentes, houve a predominância do microrganismo *E. faecalis* (77% dos casos). Constatou-se também a presença de bactérias Gram-negativas, anaeróbias estritas de difícil cultivo como *Pseudoramibacter* (52%), *Propionibacterium propionicum* (52%) *Dialister pneumosintes* (48%), *Filifactor alocis* (48%), destacando a importância da associação

entre as técnicas da microbiológica clássica e a análise molecular do conteúdo microbiológico de dentes tratados endodonticamente.

Kuffman et al., 2005, analisaram amostras obtidas de 58 dentes, sendo 36 indicados a reintervenção devido ao insucesso do tratamento endodôntico prévio e 22 dentes, sem periodontite crônica radiográfica, indicados ao retratamento pela presença de falhas técnicas, ou microinfiltração, através do método de PCR. Das 36 amostras provenientes de dentes associados à periodontite apical, bactérias foram detectadas em 35 amostras. Das 22 amostras sem periodontite apical, bactérias foram detectadas em 17 casos, sugerindo uma maior prevalência de bactérias em casos associados a periodontite apical.

Gomes et al. 2006a, avaliaram o conteúdo microbiológico presente em 100 dentes, sendo 50 portadores de polpa necrótica e periodontite apical crônica e 50 dentes tratados endodonticamente e com periodontite apical crônica. A técnica utilizada foi a do Nested-PCR, com primers espécie-específicos para a detecção de *Filifactor alocis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*. Os autores detectaram *F. alocis* e *T. forsythia* com prevalências estatisticamente maiores nos casos associados a infecção endodôntica primária. Associações significantes foram encontradas entre a presença das bactérias estudadas e os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes.

Em 2006, Stuart et al. publicaram uma revisão de literatura incluindo 12 trabalhos que haviam estudado a microbiota associada ao insucesso do tratamento endodôntico. Foi discutida a prevalência do *E. faecalis* nesses casos, suas características morfológicas, fatores relacionados a sua virulência e a sua capacidade de sobreviver em dentes tratados endodonticamente, e quais os melhores métodos para erradicação deste microrganismo. Os autores elegeram o *E. faecalis* como a bactéria detectada com maior frequência nos casos associados ao insucesso endodôntico, destacando sua capacidade de agir na manutenção das patologias periapicais através de seus fatores de virulência que incluem enzimas catalíticas, citolisinas, adesinas e ácido lipoteicóico. Destacaram que, além dos diversos fatores de virulências apresentados pela bactéria, o microrganismo também possui capacidade de se organizar em forma de biofilme, infectar túbulos dentinários, de sobreviver e se multiplicar no ambiente desfavorável criado pelo tratamento

endodôntico e permanecer em estado latente por longos períodos escassos de nutrientes.

Com objetivo de investigar a prevalência de *E. faecalis* nas infecções endodônticas primárias e secundárias, através da cultura e de PCR, Gomes et al., 2006b, analisaram amostras microbiológicas de 50 dentes portadores de polpas necróticas e 50 dentes tratados endodonticamente portadores de periodontite apical crônica. *E. faecalis* mostrou alta prevalência tanto nos casos de infecção primária quanto secundária.

Os métodos moleculares, diferentemente da cultura, revelaram que nos insucessos endodônticos existe a presença de uma microbiota de caráter misto, com presença de bactérias Gram-positivas e negativas, anaeróbias estritas e facultativas, sugerindo um perfil polimicrobiano (Gomes et al., 2008b; Roças et al., 2008; Sakamoto et al., 2008; Schirrmeister et al., 2009; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2020; Machado et al., 2020).

Gomes et al., 2008ab, ao avaliarem, através do método de Nested PCR, o conteúdo presente no SCR de 45 dentes indicados ao retratamento endodôntico pela presença de periodontite apical crônica, observaram que *E. faecalis* foi o microrganismo mais detectado. Além disso, os autores relatam que microrganismos Gram-negativos anaeróbios estritos comumente encontrados em casos de infecção primária como *T. denticola*, *P. nigrescens*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* também estão presentes em alguns casos de infecção secundária e podem ter relação com a sintomatologia.

Através do PCR, Roças et al., 2012, analisaram o conteúdo microbiano de 42 dentes tratados endodonticamente há pelo menos dois anos, portadores de periodontite apical crônica. As bactérias mais detectadas foram *E. faecalis*, *F. nucleatum* e *P. alactolyticus*.

Através dos métodos de cultura microbiológica e contagem de UFC, Barbosa-Ribeiro et al., 2016, analisaram a comunidade bacteriana presente nos casos de infecção secundária e a suscetibilidade desta comunidade à reintervenção endodôntica em 20 dentes já tratados endodonticamente acometidos por periodontite apical crônica. Os autores notaram eficiência significativa do tratamento endodôntico

na redução da carga microbiana presente nos casos de insucesso do tratamento endodôntico.

Com o objetivo de analisar a eficiência da reintervenção endodôntica não cirúrgica e a comunidade microbiana presente nos casos de infecção secundária, Barbosa-Ribeiro et al., 2020b avaliaram através da contagem de UFC e do Nested-PCR o conteúdo microbiológico de 20 dentes indicados ao retratamento endodôntico. Foram realizadas coletas logo após o acesso ao canal radicular(Inicial), após a execução do preparo químico-mecânico (Pós-PQM) e, após o uso de medicação intracanal, a base de hidróxido de cálcio por 30 dias (Pós-MIC). Os autores relataram uma redução de 99,4% na contagem de UFC obtida a partir das amostras Pós-PQM e Pós-MIC em relação à coleta inicial. As bactérias detectadas com maior frequência nas amostras iniciais foram *E. faecalis* (20/20), *P. gingivalis* (20/20) e *F. nucleatum* (17/20). Pode-se concluir que o tratamento endodôntico é eficaz em reduzir a carga bacteriana presente no interior do sistema de canais radiculares nos casos de insucesso do tratamento endodôntico primário. Além disso, a infecção secundária possui um perfil polimicrobiano, tendo alta prevalência de *E.faecalis* e *P. gingivalis* durante todas as etapas do tratamento endodôntico, o que evidencia a grande resistência destas espécies.

Enterococcus foi o gênero detectado em maior abundância por Bícigo-Pereira et al., 2020, ao avaliarem as amostras obtidas do interior do SCR de 20 dentes encaminhados a reintervenção endodôntica exclusivamente por motivos protéticos, sem falhas de selamento coronário. Foi detectada a presença de bactérias em 100% dos casos através do Checkerboard DNA-DNA hybridization. Os autores também relataram maior prevalência de microrganismos nos terços médio e cervical dos canais radiculares em comparação ao terço apical.

Técnicas avançadas de identificação molecular como por exemplo o Next Generation Sequencing mostraram a presença de bactérias em 100% dos casos estudados de dentes tratados endodonticamente associados ao insucesso pela evidência de periodontite apical crônica (Siqueira et al., 2016; Sánchez- Sanhueza et al., 2018).

Em 2016, Siqueira et al., investigaram o conteúdo infeccioso associado às

lesões periapicais, coletando amostras do terço apical e das lesões periapicais presentes em 10 casos indicados ao retratamento endodôntico cirúrgico. A análise das amostras através do Next Generation Sequencing (NGS) revelou a presença de microrganismos pertencentes a 11 filos e 103 gêneros distintos, compostos de 538 OTUs distintas. O filo predominante foram as Proteobactérias (6/10). Os gêneros detectados em maior frequência foram *Fusobacterium* e *Pseudomonas*. *Enterococcus* foi detectado em baixas concentrações e em apenas 4/10 amostras.

Sánchez-Schueza et al., 2018, coletaram amostras dos canais radiculares de 24 dentes indicados a reintervenção endodôntica devido a presença de periodontite apical crônica através do NGS. Foram detectadas 86 OTUs distintas nas amostras analisadas, sendo que a maior parte dos microrganismos eram pertencentes ao filo Proteobacteria. Os autores correlacionaram a presença simultânea de um maior número de microrganismos no interior do SCR a casos sintomáticos e a maiores níveis de destruição periapical.

Um estudo de Singh et al. 2020 avaliou a associação dos microrganismos do complexo vermelho do canal radicular e *E. faecalis* com sinais e sintomas clínicos endodônticos por meio da reação em cadeia da polimerase. Através do DNA extraído das amostras realizadas com cones de papel absorvente apirogênicos foram analisados patógenos endodônticos usando primers específicos da espécie. O complexo vermelho representou 94% dos casos associados à sensibilidade à percussão na infecção primária, enquanto 86% dos casos associados à infecção secundária com associação estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Os autores concluíram que a prevalência de bactérias do complexo vermelho e *E. faecalis* sugeriu uma associação entre infecções sintomática e doenças perirradiculares.

2.3.2 Presença de fungos

Candida em infecções endodônticas tem sido investigada em um grande número de estudos, mas seu papel como patógeno endodôntico ainda é discutível. Embora os fungos geralmente não tenham sido encontrados na microbiota inicial de infecções do canal radicular, sua presença é mais comum em infecções persistentes após o preparo do canal radicular, provavelmente como resultado de contaminação

durante o tratamento, ou em casos de dentes obturados com resistência à terapia. lesões periapicais (Nair et al. 1999).

Waltimo et al. (1999) mostraram que *Candida* spp. são altamente resistentes a antissépticos e desinfetantes comumente usados como irrigantes e medicamentos endodônticos. Esses microorganismos foram isolados em culturas puras de infecções do canal radicular, fato que pode indicar que eles são patogênicos na periodontite apical (Waltimo et al. 1997).

Peciulienė et al. (2001) encontraram *Candida albicans* em 6 dos 40 dentes estudados.

Pinheiro et al. (2003) utilizando técnicas avançadas de cultura microbiana, isolaram *Candida* spp. em 2 de 60 casos investigados, concordando com Sundqvist et al. (1998) e Molander et al. (1998) que encontraram respectivamente a presença deste microrganismo em 2 de 54 dentes, e em 3 de 100 dentes examinados.

Pourhajibagher M., et al. 2017, coletaram amostras de 36 pacientes com infecção endodôntica primária e 14 pacientes com história de tratamento endodôntico. Através de testes bioquímicos e sequenciamento do gene do RNA ribossômico 16S para identificação dos microrganismos. *Enterococcus faecalis* (36,6%) foi o microrganismo mais predominante nas infecções endodônticas secundárias, seguido por *Candida albicans*, *Propionibacterium acnes* e *V. parvula* com frequências de 20%, 2% e 2%, respectivamente. Concluiu-se que *V. parvula* e *E. faecalis* foram os mais frequentemente encontrados em infecções endodônticas primárias e secundárias, respectivamente.

Alberti et al., 2021, revisaram o bioma fúngico de infecções endodônticas primárias e secundárias, com referência particular à prevalência e comportamento de espécies de *Candida*. A meta-análise dos dados disponíveis indicou que a prevalência média ponderada geral (WMP) de espécies fúngicas em infecções endodônticas é de 9,11% (de um total cumulativo de 2.003 amostras), com 9,0% em infecções primárias (n = 1.341) e 9,3% em infecções secundárias (n = 662). A espécie fúngica mais prevalente foi *Candida* spp. A alta heterogeneidade na prevalência fúngica relatada sugere a necessidade de amostragem padronizada e métodos de especificação. O

advento das novas plataformas analíticas de biologia molecular, como o sequenciamento de próxima geração (NGS) e a espectrometria de massa por tempo de voo por ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF), que permite a identificação e quantificação de um amplo espectro de organismos até então desconhecidos em infecções endodônticas devem alterar radicalmente nossa compreensão do microbioma endodôntico no futuro. *Candida* spp. parece ser co-patógeno com bactérias em aproximadamente 01 em cada 10 pacientes com infecções endodônticas. Contudo, os clínicos devem compreender a importância e o papel dos fungos nas infecções endodônticas e estarem cientes da necessidade de erradicar bactérias e fungos para uma terapia bem-sucedida.

2.4 O método de cultura microbiana no estudo das infecções endodônticas secundárias

Segundo Dahlén, 2002, a cultura microbiana é o padrão ouro no estudo da microbiota das infecções endodônticas. Mesmo com inúmeras técnicas de cultivo e isolamento microbiano registradas na literatura endodôntica, nenhuma possibilita a identificação de todos os microrganismos presentes no SCR (Socransky et al., 1963). Acredita-se que 60% dos microrganismos que colonizam o sistema de canais radicular ainda sejam incultiváveis (Gomes et al., 2015; Gomes e Herrera 2018).

A presença de células bacterianas viáveis é indispensável para o crescimento de microrganismos através dos métodos de cultura. Para possibilitar a identificação bacteriana através de métodos fenotípicos (cultura) seja realizada, a cultura deve apresentar crescimento microbiano e a concentração de células microbianas deve ser suficientemente alta (Munson et al., 2002; Peters et al., 2004; Vianna et al., 2004; Barbosa-Ribeiro et al., 2020b).

Sundqvist et al., 1998, analisaram o conteúdo microbiológico de 45 amostras de dentes associados ao insucesso do tratamento endodôntico através da cultura microbiológica. A predominância foi de monoinfecções caracterizadas pela maioria de bactérias anaeróbias facultativas, Gram-positivas, sendo o *E. faecalis* a espécie mais comum isolada dos canais radiculares. Esses resultados estão de acordo com a literatura (Molander et al., 1998; Pinheiro et al., 2003; Gomes et al.,

2004ab, 2006b).

Endo et al., 2013, investigaram microbiologicamente 15 canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico e com presença de periodontite apical crônica, com a preservação mínima de 2 anos do tratamento endodôntico primário. As amostras microbiológicas foram analisadas através dos métodos de cultura, em que foram realizadas a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e a identificação microbiana a partir de métodos fenotípicos, e do método molecular de PCR. Os autores relataram uma redução estatisticamente significativa na contagem de UFC após o PQM, ressaltando a eficiência da reintervenção endodôntica por vias convencionais. Notou-se uma maior prevalência de espécies Gram-positivas nas amostras. Os autores levantaram a importância do uso de métodos moleculares no estudo da comunidade bacteriana presente nos casos associados ao insucesso, visto que a aplicação dos métodos genéticos foi eficaz na detecção de espécies anaeróbicas estritas Gram-negativas, como as pertencentes aos gêneros *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Tannerella* e *Treponema*, não detectadas através do cultivo microbiano.

A contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) é um método confiável e amplamente empregado para verificar a suscetibilidade de microrganismos a antimicrobianos e técnicas aplicadas na endodontia (Gomes et al., 1996ab; Barbosa-Ribeiro 2020b). Entretanto, o método da cultura quando comparado com os métodos moleculares possui suas limitações. (Endo et al., 2013).

Replicar ambiente propício para reprodução de microrganismos ainda é um obstáculo enfrentado (Endo et al., 2013; Gomes e Herrera 2018). Sendo assim, o conteúdo microbiológico presente nas infecções endodônticas pode ser subestimado quando analisado somente pelo cultivo bacteriano e pelos métodos bioquímicos e fenotípicos de identificação bacteriana (Gomes et al., 2004ab; Gomes et al., 2008ab; Barbosa-Ribeiro et al., 2020a,b).

A diversidade bacteriana e a contagem de microrganismos obtidas através dos métodos de cultura são geralmente subestimados. Dessa maneira, um resultado negativo na cultura não necessariamente está associado a ausência completa de microrganismos no SCR, visto que 60% dos microrganismos capazes de colonizar o

sistema de canais radiculares ainda não são passíveis de cultivo. A ausência de microrganismos no meio de cultura pode representar inúmeras limitações inerentes a coleta microbiológica e as condições (ambientais) como nutricionais, gasosas e de temperatura. Uma cultura negativa pode ainda significar que existem microrganismos presentes em concentrações abaixo das necessárias para que sejam detectados através da cultura (Jacinto et al., 2003; Gomes et al., 1994a,b, 2004ab, 2005., 2008ab; Endo et al., 2013)

Mesmo existindo pontos positivos e negativos em relação à cultura microbiológica nos estudos de monitoramento das infecções endodônticas, devemos considerá-la como um método importante e confiável para a detecção de microrganismos viáveis, além de fornecer a sua concentração através das UFC.

2.5 O método de Nested-PCR no estudo das infecções associadas a dentes tratados endodonticamente

Na tentativa de superar e obter mais informações, frente as limitações apresentadas pelo método de cultura, métodos moleculares têm sido largamente empregados por possuírem uma maior sensibilidade, especificidade e agilidade na identificação bacteriana quando comparados aos métodos de cultura, podendo detectar também os microrganismos fastidiosos e incultiváveis (Siqueira e Roças 2003; Gomes et al., 2008ab; Barbosa-Ribeiro et al., 2020a,b). Porém, podem não distinguir se o alvo detectado é um microrganismo viável ou não (Endo et al., 2013).

O uso concomitante de métodos moleculares e métodos de cultura proporcionou uma opção maior de conhecimento da microbiota associada às infecções endodônticas, sendo indispensável para uma maior compreensão do ecossistema habitante do sistema de canais radiculares associado às patologias pulpares e periapicais (Gomes et al., 2006ab; Aw., 2016).

A sensibilidade da técnica do Nested-PCR é maior (10 células) em comparação aos métodos de PCR convencional (10^2 células) e da cultura ($10^4 - 10^5$ células) (Spratt 2004), sendo muito utilizada na detecção de espécies encontradas nos canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico (Gomes

et al. 2008b, Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al. 2020a,b). Entretanto, possui algumas limitações como a possibilidade de contaminação da amostra durante as diversas etapas da reação, a existência de resultados falso-positivos por reações cruzadas, e falhas no desenho dos primers utilizados na reação (Singh et al., 2006; Gomes et al., 2008b).

Nested-PCR é uma técnica molecular que envolve a realização de duas reações de polimerase em cadeia (PCR), sendo assim mais sensível e específico que a reação de PCR convencional. A primeira reação de PCR objetiva amplificar o gene 16S rRNA a partir do DNA bacteriano extraído das amostras clínicas (Song et al., 2005). O produto da primeira reação é submetido a uma reação subsequente que utiliza um primer bacteriano espécie-específico, resultando no anelamento de uma sequência de DNA presente no interior do primeiro amplicon (Singht et al., 2006; Barbosa-Ribeiro2020a,b).

Ao analisarem concomitantemente o conteúdo infeccioso presente associado aos casos de infecção endodôntica secundária através dos métodos de cultura microbiana e do Nested-PCR, buscando detectar a presença de *E. faecalis*, Gomes et al., 2004ab, relataram que o método molecular revelou maiores frequências de detecção do microrganismo.

Em 2020, Barbosa-Ribeiro et al. encontraram uma alta incidência das espécies *E. faecalis* e *P. gingivalis* ao analisarem o conteúdo infeccioso presente em 20 dentes tratados endodonticamente portadores de periodontite apical crônica através dos métodos de Nested-PCR e do sequenciamento genético. Foram realizadas coletas imediatamente após a etapa de acesso aos canais radiculares (Inicial), após a execução do preparo químico-mecânico (Pós-PQM) e após a colocação de uma medicação a base de hidróxido de cálcio no interior do conduto radicular por 30 dias (Pós-PQM). Os autores concluíram que a comunidade microbiana associada ao insucesso endodôntico é polimicrobiana e heterogênea. A presença de *P. gingivalis* e *E. faecalis* durante todas as etapas da terapia endodôntica sugere que esses microrganismos possuem mecanismos de resistência, que favorecem sua sobrevivência ao tratamento endodôntico. Relataram também a eficiência da reintervenção endodôntica em alterar a composição da microbiota associada as infecções intra-radiculares.

Desta forma, pode ser observada que a microbiota dos dentes com insucesso do tratamento é mista e polimicrobiana, suportando microrganismos com diversos tipos de requerimentos nutricionais e gasosos

2.6 Justificativa do retratamento sem lesão

De acordo com Friedman e Stabholtz, em 1986, no planejamento de uma nova reabilitação protética, diante de casos de sucesso do tratamento endodôntico, com ausência de imagem radiográfica de lesão periapical, mas com obturação insatisfatória, deve-se indicar o retratamento endodôntico convencional.

Além disso, o tempo da realização do tratamento endodôntico inicial influencia o selamento do canal radicular, visto que ocorre a degradação do material obturador ao longo do tempo. Foi reportado que após 15 anos já existe a redução da capacidade de selamento da guta-percha, comprometendo a longevidade do tratamento (ManigliaFerreira et al., 2007).

2.7 A importância do preparo químico-mecânico e da medicação intracanal na redução dos microrganismos do interior dos canais radiculares

O preparo químico mecânico tem por objetivo promover a limpeza, modelagem e ampliação do canal radicular, através do emprego de instrumentos endodônticos e de substâncias químicas auxiliares. A desinfecção do sistema de canais radiculares visa à máxima eliminação de micro-organismos, seus subprodutos e tecido pulpar vivo ou necrosado, criando um ambiente propício para a reparação dos tecidos perirradiculares. A carga microbiana pode, portanto, ser significativamente reduzida após o preparo químico mecânico (Ferreira et al., 2015). No entanto, a ação mecânica dos instrumentos é incapaz de promover a completa desinfecção do sistema de canais radiculares, devido às complexidades anatômicas presentes em determinadas áreas (Byström *et al.*, 1985; Gomes et al., 1996a,b,c). Assim, a redução ou eliminação de micro-organismos e subprodutos do sistema de canais radiculares é auxiliada pelo emprego de substâncias químicas auxiliares e soluções irrigadoras, e complementada pela ação da medicação intracanal (Sundqvist, 1992; Gomes et al., 1996b; Siqueira *et*

al., 1998; Lima *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2004; Valera *et al.*, 2009).

As substâncias irrigadoras, utilizadas durante o preparo químico-mecânico, devem ter amplo espectro de ação antimicrobiana, além da capacidade de dissolver tecidos e inativar endotoxinas, ausência de citotoxicidade, auxiliar na lubrificação do canal radicular, durante a ação de corte dos instrumentos, e na remoção de smear layer, através das substâncias quelantes, entre outras propriedades (Spangberg, 1982; Byström e Sundqvist, 1983; Silva *et al.*, 2002; Zehnder, 2006; Martinho e Gomes, 2008,). As mais largamente utilizadas na Endodontia são a clorexidina e hipoclorito de sódio. O hipoclorito por sua poderosa ação antimicrobiana e capacidade de dissolver tecidos, e a clorexidina devido ao seu amplo espectro de ação antimicrobiana, substantividade e baixa citotoxicidade. No entanto, essas substâncias não eliminam totalmente a carga microbiana e o conteúdo endotóxico dos canais radiculares.

Vários estudos demonstraram a importância do uso de uma medicação intracanal, com o objetivo de potencializar a sanificação do sistema de canais e túbulos dentinários e impedir que os micro-organismos se multipliquem no intervalo entre sessões de tratamento (Byström e Sundqvist, 1981, 1983; Byström *et al.*, 1985), sendo sua eficácia dependente da vulnerabilidade das espécies envolvidas na infecção (Gomes *et al.*, 1996 c). Portanto, o uso de uma medicação intracanal com atividade antimicrobiana tem sido recomendada, entre as sessões do tratamento endodôntico, com o intuito de eliminar possíveis micro-organismos persistentes (Ferreira *et al.*, 2015). Além disso a medicação intracanal é utilizada para: a) eliminar quaisquer bactérias remanescentes após a instrumentação do canal; b) reduzir a inflamação dos tecidos periapicais e remanescentes pulpares; c) tornar o conteúdo do canal inerte e neutralizar os detritos teciduais; d)) atuar como uma barreira contra vazamentos do preenchimento temporário; e) ajudar a secar canais persistentemente úmidos. No debridamento e preparo adequados do canal são mais importantes que a MIC no controle da infecção, uma vez que a remoção mecânica é uma das fases mais importantes para eliminação e desorganização de microrganismos. (Chong *et al.*, 1992).

O hidróxido de cálcio têm sido utilizado como medicação intracanal pelas suas destacadas propriedades físicas e antimicrobianas. Entretanto, a lenta difusão de íons hidroxila através da dentina infectada, ou mesmo a capacidade tampão da dentina, podem impedir sua ação (Haapasalo *et al.*, 2000). Por isso, a associação do hidróxido

de cálcio com a clorexina tem sido recomendada. A clorexidina apresenta atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Greenstein et al., 1986; Gomes et al. 2012). Além disso, apresenta substantividade que está relacionada com a capacidade das moléculas interagirem com a dentina (White et al., 1997, Mohammadi e Abott , 2009). Portanto, essa associação permite que se tenha uma medicação intracanal com as seguintes propriedades: capacidade de induzir mineralização dos tecidos, barreira física, amplo espectro antibacteriano, ação residual, baixa toxicidade aos tecidos e difusão pelos túbulos dentinários (Gomes et al., 2012).

Barbosa-Ribeiro et al., 2019, realizaram um estudo in vivo para avaliar os efeitos da medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio (MIC) nos níveis de bactérias, citocinas pró-inflamatórias (PICs) e metaloproteinases de matriz (MMPs) em canais radiculares e tecidos perirradiculares de dentes com insucesso no tratamento endodôntico e periodontite apical. Os autores concluíram que as medicações intracanaís à base de hidróxido de cálcio tiveram um efeito positivo na redução microbiana, diminuindo os níveis de PICs e MMPs. Ambas as substâncias químicas auxiliares utilizadas (clorexidina gel 2% e NaOCl 6%) apresentaram efeitos semelhantes quando o hidróxido de cálcio foi usado como medicação intracanal.

Ao avaliarem as bactérias cultiváveis de amostras coletadas de vinte dentes unitários obturados com periodontite apical pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), Barbosa-Ribeiro et. Al., 2020, mostraram que a microbiota de dentes com infecção endodôntica persistente consiste em uma comunidade polimicrobiana com espécies Gram-positivas e Gram-negativas, bacilos e cocos, anaeróbios facultativos e estritos. *E. faecalis* e *P. gingivalis* foram frequentemente detectados em todas as etapas do retratamento do canal radicular, evidenciando sua grande resistência aos procedimentos endodônticos. Além disso, os procedimentos endodônticos foram eficazes na redução dos níveis de bactérias dos dentes com infecção endodôntica persistente/secundária.

Barbosa-Ribeiro et al., 2021, coletaram amostras de vinte canais radiculares infectados, antes do preparo químico-mecânico (PQM) (S1), após o PQM (S2) e após 30 dias de medicação intracanal (MIC) (S3). Os resultados mostraram que a microbiota da infecção persistente é polimicrobiana com predominância de *E. faecalis* e *P. gingivalis* em todas as fases do retratamento endodôntico, independentemente do método utilizado para identificação microbiana. Além disso, foi encontrado

associações entre bactérias específicas e características clínicas e radiográficas.

Apesar do hidróxido de cálcio ser amplamente utilizado como medicação intracanal, certos microorganismos são ainda detectados, mesmo após seu uso, como *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*.

E. faecalis é um coco Gram positivo que possui um mecanismo inibidor da bomba de prótons para tolerar a alcalinidade de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Pode resistir a uma ampla faixa de pH (pH 11,5), sendo assim resistentes a esta medicação. Além disso pode também suprimir a atividade dos linfócitos, invadir os túbulos dentinários, formar biofilme e se ligar ao colágeno presente nos líquidos teciduais.

C. albicans é outro microorganismo que tem sido relatado em periodontite apical pós-tratamento persistente. Um importante fator de virulência de *C. albicans* é a capacidade de alternar entre a forma de blastosporo e hifal. Isso permite que ela invada o tecido hospedeiro e impedindo sua fagocitose pelos macrófagos. O tigmotropismo permite que *C. albicans* penetre em profundidade túbulos dentinários. *C. albicans* pode formar biofilme em 48 horas. Pode sobreviver em uma ampla faixa de pH, em ambiente altamente alcalino (como a do hidróxido de cálcio) e condições ecologicamente adversas, que lhe permitem *causar infecção*.

2.8 A Importância do tratamento restaurador no sucesso da terapia endodôntica

Ray e Trope, 1995, investigaram radiograficamente 1010 dentes tratados endodonticamente e restaurados com material definitivo. Foi avaliada a relação entre a qualidade de selamento coronário e da obturação endodôntica com a presença de evidências radiográficas de periodontite apical crônica. As taxas de sucesso encontradas foram de 30,2% em dentes com restauração coronária deficiente e de 48,6% de dentes com obturação deficiente. As piores taxas de sucesso foram observadas quando a restauração insatisfatória estava associada a uma obturação insatisfatória (18,1%). Os autores concluíram através de seu estudo que o material obturador presente no SCR não é uma barreira eficiente contra a microinfiltração, sendo o selamento coronário um fator crítico para o sucesso da terapia endodôntica.

Diversos estudos apontam uma relação positiva entre o índice de sucesso do

tratamento endodôntico e uma boa qualidade de obturação e selamento coronário (Ray e Trope 1995; Tronstad et al., 2000; Siqueira et al., 2005; Moreno et al., 2013). Dessa maneira, sugere-se que o planejamento do tratamento a ser executado deve ser realizado de maneira reversa, avaliando-se sempre a possibilidade de reabilitação adequada do dente a ser submetido à intervenção endodôntica. A restauração deve ser finalizada com urgência após o tratamento dos canais radiculares (Siqueira et al., 2014).

Pinheiro et al., 2003a, relataram a presença de restaurações coronárias deficientes e cáries recorrentes em 75% dos dentes indicados à reintervenção endodôntica. Os autores ressaltam que a infiltração coronária pode ser um fator modulatório determinante sobre a comunidade microbiana residente nos casos de insucesso.

Gomes et al., 2006ab, analisaram a microbiota presente no SCR de 50 dentes portadores de necrose pulpar e periodontite apical crônica 50 dentes associados às infecções secundárias e periodontite apical crônica. Os autores também relataram alta prevalência de restaurações coronárias deficientes e ressaltaram o papel da microinfiltração no desenvolvimento e perpetuação da doença periapical.

Siqueira et al., 2005, analisaram o status periapical de 2051 dentes tratados endodonticamente correlacionado à presença de periodontite apical crônica com a qualidade de obturação e selamento coronário do dente analisado. Os autores relataram que a presença de um selamento coronário adequado é determinante para o sucesso do tratamento endodôntico. Dentes com ausência de selamento coronário apresentaram lesões periapicais em 52% dos casos, mesmo quando o tratamento endodôntico apresentava-se adequado. Entretanto, discordando dos achados de Ray e Trope, 1995, os autores observaram que a qualidade de obturação do sistema de canais radiculares é o fator de maior impacto sobre o índice de sucesso do tratamento endodôntico.

Wang et al., 2012, analisaram simultaneamente o conteúdo microbiológico de dentes indicados ao retratamento endodôntico e da saliva. Os autores concluíram que a cavidade oral é a fonte mais provável dos microrganismos colonizadores do SCR. Na maior parte dos casos onde *E. faecalis* fora encontrado no canal radicular, foi

também encontrado na saliva, evidenciando uma relação entre a presença do microrganismo em ambos os sítios.

Delboni et al., 2017, avaliaram a diversidade genotípica de *E. faecalis* isolados de diversos sítios da cavidade oral (saliva, canal radicular e câmara pulpar), em casos indicados à reintervenção endodôntica devido ao insucesso do tratamento endodôntico prévio evidenciado pela presença de periodontite apical crônica através das técnicas moleculares de PCR e AP-PCR. Os autores relataram a detecção de 7 diferentes genótipos de *E. faecalis*. Ressaltaram também que, em 80% dos casos, o genótipo detectado na amostra proveniente do SCR também foi detectado em amostras da câmara pulpar ou da saliva do paciente. Concluíram que os genótipos de *E. faecalis* encontrados nos três sítios estudados da cavidade bucal são semelhantes, ressaltando a teoria de que a microinfiltração coronária possa ocasionar uma comunicação entre o SCR e a cavidade oral, sendo uma possível causa de insucesso do tratamento endodôntico.

Observando a literatura, pode-se observar que, além da realização de um tratamento endodôntico adequado, o tratamento reabilitador definitivo deve ser realizado logo após o término da terapia endodôntica, visando inviabilizar o acesso de microrganismos presentes na cavidade oral ao SCR (Siqueira et al., 2005; Song et al., 2014; Landys et al., 2015; Delboni et al., 2017).

Reverendo a literatura foi observado a necessidade de trabalhos que verificassem a presença de *Candida* spp em dentes com necessidade de retratamento endodôntico nas diversas etapas do tratamento endodôntico. A presença concomitante de *E. faecalis* e *S. mutans* com os achados de *Candida* também deve ser investigada.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivos:

Objetivo Geral

A pesquisa teve como principal objetivo detectar microrganismos específicos presentes em canais radiculares de dentes com necessidade de retratamento endodôntico devido a presença de periodontite apical crônica ou por motivos protéticos.

Objetivos Específicos

Detectar e comparar tanto nos casos de insucesso do tratamento endodôntico evidenciados pela presença da lesão periapical persistente, como nos casos de canais radiculares sem lesão submetidos ao retratamento endodôntico por indicação protética:

- a) A suscetibilidade da microbiota ao preparo químico-mecânico e ao uso de medicação intracanal por 30 dias através do Nested- PCR.
- b) Detectar através do PCR bactérias como *Streptococcus mutans*, e através de Nested-PCR bactérias como *Enterococcus faecalis* e fungos como *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*.
- c) Correlacionar os resultados laboratoriais com os sinais e sintomas clínicos e achados radiográficos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Autorização para realização da pesquisa

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP). Para participação deste estudo, os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, conforme as normas vigentes no referido Comitê de Ética em pesquisa envolvendo seres humanos.

4.2 Local da pesquisa

Inicialmente foram analisadas as fichas dos pacientes disponíveis na Área de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP) dos Cursos de Atualização e Especialização.

4.3 Seleção dos voluntários da pesquisa

Foram selecionados apenas os casos de retratamento endodôntico, a partir das fichas com radiografias. Após avaliação clínica prévia, 10 dentes com presença de lesão periapical e 10 dentes indicados ao retratamento por razões protéticas, foram incluídos no presente estudo. Fatores que pudessem interferir na microbiota do canal radicular foram excluídos: tratamento endodôntico inferior a 2 anos; uso de antifúngicos e antibióticos (< 3 meses); doença periodontal; dentes com fratura radicular; dentes com impossibilidade de isolamento absoluto e introdução do cone de papel em seu comprimento de trabalho; e dentes com exposição da câmara pulpar em contato com o meio bucal. Deve-se reforçar que todos os pacientes participantes da pesquisa receberam tratamento endodôntico adequado.

4.4 Exame clínico, aspectos clínicos e radiográficos

Foram anotados dados pessoais dos pacientes tais como idade e gênero, história médica e dentária (incluindo o tempo que foi realizado o tratamento

endodôntico anterior). Durante o exame clínico foram registradas informações sobre o dente a ser retratado e sua condição atual segundo Pinheiro et al. (2003ab), em relação à qualidade e tipo da restauração ou coroa, à presença de cáries, infiltrações coronárias e fraturas. Quanto à sintomatologia foi verificada a presença ou ausência de dor, natureza da dor, história de dor prévia, dor à percussão (horizontal e vertical) e à palpação. Dados como: presença ou ausência de edema dos tecidos periapicais, fístulas, mobilidade dental e bolsa periodontal também foram avaliados. No processo de coleta o aspecto físico do canal radicular também foi registrado.

Todas essas características clínicas referentes ao dente investigado foram devidamente relatadas na ficha clínica de cada paciente. Na radiografia periapical foram avaliados os seguintes aspectos:

- a. Presença de imagem de cárie sob a restauração sugerindo uma infiltração coronária. Restauração boa quando bem adaptada, e ruim quando há falhas na margem e presença de espaços vazios entre o material restaurador e o substrato;
- b. Limite da obturação dos canais radiculares, divididos em intervalos de ≤ 2 mm e > 2 mm do ápice e sobre-obturados;
- c. Qualidade do tratamento endodôntico: considerado bom quando a guta-percha estiver bem compactada e não se observar áreas radiolúcidas na obturação ou entre o material obturador e a parede do canal, com limite da obturação entre 0-2 mm do ápice. Considerado ruim quando houver a presença de falhas radiolúcidas na obturação, guta-percha mal compactada, indicando um selamento deficiente ou espaços vazios na obturação ou entre o material obturador e a parede do canal, ou com limite da obturação maior que 2 mm do ápice radiográfico;
- d. Presença e tamanho da lesão periapical relacionado ao dente tratado endodonticamente (≤ 5 mm e > 5 mm);
- e. Presença ou ausência de pino intra-radicular;
- f. Espaço entre o pino e o material obturador medido em mm;
- g. Presença ou ausência de prótese definitiva ou provisória.

4.5 Coletas das amostras

As coletas clínicas dos canais radiculares foram realizadas na Clínica de Especialização da FOP/UNICAMP, e as amostras processadas no Laboratório de Microbiologia Endodôntica. Foram coletadas amostras iniciais, após o preparo químico-mecânico e após a medicação intracanal dos canais radiculares. Parte do método que foi utilizado neste estudo já foi descrito previamente em detalhes por Gomes et al. (1994a,b; 1996) e Vianna et al. (2008).

4.6 Detalhamento das coletas

4.6.1 Coletas microbiológicas (CM)

Para as coletas microbiológicas, 2 cones de papel absorvente esterilizados, um de cada vez, foram introduzidos no interior dos canais, permanecendo em posição por 60s. Estes foram transferidos para um tubo contendo 1,0 mL de Tris Buffer, que foi congelado em freezer -20°C para análise molecular (CM).

4.7 Procedimentos iniciais

Antes da intervenção, foi realizada a descontaminação da face externa do paciente com clorexidina 2% gel e anestesia local na região do dente envolvido. O dente objeto da pesquisa recebeu um polimento coronário com pedra pomes, seguido de isolamento absoluto com vedamento da interface coroa-lençol com auxílio do cianoacrilato (Super Bonder, Loctite, São Paulo, SP) para evitar uma possível infiltração salivar. Posteriormente, foi finalizada a desinfecção do campo operatório, que compreende a descontaminação do grampo, lençol de borracha, arco e da porção coronária do dente com swabs estéreis e umedecidos, em água oxigenada 30% (v/v), NaOCl 2,5% por 30 segundos cada e subsequente neutralização com solução estéril de tiosulfato de sódio 5%.

A abertura coronária foi realizada em alta rotação com sistema de irrigação do equipo fechado, dessa forma para reduzir o aquecimento da ponta esférica

diamantada (#1012, #1014 ou #1016) foi utilizado soro fisiológico 0,9% estéril. Ao adquirir a forma de contorno e conveniência da abertura coronária, utilizando a broca tronco-cônica #3082, o campo operatório e a câmara pulpar foram descontaminados novamente, com as mesmas soluções descritas anteriormente, e neutralizados.

4.8 Procedimentos endodônticos e coleta das amostras

4.8.1 Primeira sessão de atendimento

Finalizada a abertura coronária, foi realizada a remoção da guta percha sem solventes, utilizando lima Reciproc R25 (VDW, Munich, Germany). Quando uma lima K #15 (Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça) alcançou o comprimento do canal radicular determinado na radiografia pré-operatória, foi utilizado o localizador apical (Novapex, Forum Technologies, Rishon le-zion, Israel) para confirmar a patência (desobstrução apical) e obter o comprimento de trabalho equivalente a posição zero no localizador apical. Com auxílio do microscópio clínico (Opto Eletrônica S.A., São Carlos, SP) e uma tomada radiográfica periapical foi verificada a remoção do material obturador.

Foi realizada, então, a primeira coleta microbiológica (CM1). Em casos de dentes bi ou trirradiculares a coleta foi realizada no canal radicular mais amplo, de maneira a confinar o exame microbiológico em um único ambiente ecológico.

O PQM em todos os dentes foi realizado utilizando a lima R40 do sistema Reciproc (VDW, Munich, Germany), montada em motor VDW Gold (VDW, Munich, Germany), seguindo as recomendações do fabricante. Durante todo o preparo químico-mecânico foi utilizada clorexidina 2% gel como substância química auxiliar e abundante irrigação com soro fisiológico 0,9%, uma lima de pequeno calibre foi utilizada para manter a patência do canal. Após a instrumentação, foi confirmado a patência com a LAF e os canais foram irrigados com clorexidina 2% gel e soro fisiológico. Foram inseridos 5,0 ml de EDTA 17% no interior do canal radicular por 3 minutos sob agitação ultra-sônica com a finalidade de remover a camada residual.

Após a finalização do preparo químico mecânico, os canais foram irrigados

com 5 mL de água destilada estéril/apirogênica e 5 mL de solução Tween a 0,5% + lecitina de soja a 0,07%, (neutralizante específico da clorexidina) por 60 s, e somente então foi realizada a segunda coleta, microbiológica (CM2). Após o término das coletas, os canais foram preenchidos com medicação intracanal composta por hidróxido de cálcio e clorexidina 2% gel. Posteriormente as cavidades de acesso foram restauradas com resina composta.

4.8.2 Segunda sessão de atendimento

Após 30 dias da instrumentação inicial, a MIC foi removida utilizando água destilada estéril/apirogênica e as últimas coletas foram realizadas (CM3), seguindo o descrito anteriormente. Todas as coletas estão resumidas na tabela 1. Os dentes foram, então, re-instrumentados, secos e obturados. Na embocadura do canal radicular foi colocado um plug de aproximadamente 2 mm de Coltosol e em seguida os dentes foram restaurados com resina composta.

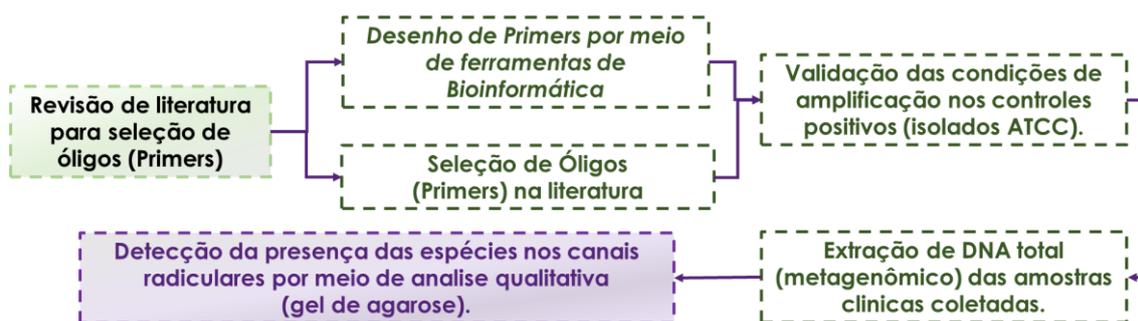
Tabela 1 - Resumo das amostras realizadas ao longo dos procedimentos endodônticos e suas respectivas siglas

Amostras	Quantidade pontas de papel absorvente	Altura da coleta	Coletas		
			1ª Sessão Inicial	2ª Sessão PQM	2ª Sessão MIC
Microbiológica (molecular)	2	Forame apical	CM1	CM2	CM3

4.9 Processamentos laboratoriais

4.9.1 Fluxograma Metodológico

As etapas de desenvolvimento deste projeto podem ser visualizadas no fluxograma metodológico abaixo:



4.9.2. Seleção de primers para detecção de *Candida* spp., *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis*

4.9.2.1. Seleção de oligos depositados na literatura

Para seleção de primers (oligos) foi realizada uma busca sistemica na literatura em duas etapas:

A primeira etapa foi a busca nas plataformas PubMed, Biblioteca Virtual de saúde (BVS), e Medline. Usando o descritor, em inglês: “Detection of *Candida* spp. by PCR in clinical samples”, “Detection of *Candida* spp. by nested PCR in clinical samples”, “Detection of *Streptococcus mutans* by PCR in root canals”, “Detection of *Streptococcus mutans* by nested PCR in root canals” e “Detection of *Streptococcus mutans* by nested PCR in clinical samples”, em português: “Detecção de *Candida* spp. por PCR em amostras clínicas”, “Detecção de *Streptococcus mutans* por PCR em canais radiculares”. Não houve filtro de recorte temporal, pois a técnica de PCR apresenta ampla aplicação desde de sua criação.

Após a obtenção do resultado de busca, foi feita a leitura de título e resumo de todos os estudos. Como critérios de inclusão os trabalhos deveriam citar a sequência dos primers de detecção, tamanho de amplicon e bem como as condições de amplificação do gene por PCR, descritas de forma completa e detalhada. Já como critérios de exclusão: estudos que não apresentavam informações parciais, ou que se tratasse de outras técnicas de biologia molecular como PCR em tempo real.

Considerando as palavras chaves descritas acima foram encontradas 134

publicações científica para *Candida* spp. Após a leitura dos resumos e da metodologia, considerando nossos critérios de inclusão (presença da sequência de nucleotídeos do *primer*, tamanho do amplicon e condições de amplificação) um total de cinco artigos se encaixaram, sendo que três consistiam em primers para detecção de *Candida* por PCR tradicional e dois por nested PCR como pode ser visto na tabela 2.

Por PCR tradicional foram encontrados primers para *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* (Baumgartner et al., 2000; Donnelly et al., 1999; Kang et al., 2008).

Para o Nested-PCR, tendo o 18S rRNA como primer universal (primeira amplificação) encontramos primers específicos para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (Haynes e Westerneng, 1996). Adicionalmente foram desenhados óligos complementares e específicos para *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* descrito no item 4.9.3 , utilizando a região 18S, contudo não conseguimos detectar essas espécies.

A partir do descrito acima, uma outra busca literária foi realizada visando identificar a região mais adequada para a detecção de *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*. A partir de um estudo de clinica médica realizado por Than et al. (2012) observamos que a subunidade ribossomal (ITs) e primers complementares (segunda reação) para *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* eram os mais adequados para identificação destas espécies.

Tabela 2 - Primers para detecção de *Candida* por PCR tradicional e Nested -PCR

Primers (PCR) – Detecção direta					
Primers		Sequence	Product size (bp)	T melting °C	Reference
<i>C. albicans</i> 18S r-RNA gene	Primer F	5' CGATTCAGGGGAGGTAGTGAC 3'	200-276 bp	55	(Baumgartner et al., 2000b)
	Primer R	5' GGTTCCGCATAAATGGCTACCAG 3'		55	
<i>C. dubliniensis</i>	Primer F	5' GTATTTGTCGTTCCCTTTC 3'	251-270 bp	52	(Donnelly et al., 1999b)
	Primer R	5' GTGTTGTGTGCACTAACGTC 3'		52	
<i>C. tropicalis</i>	Primer F	5' ATTGGCAACTGAGGTAGA 3'	324 bp	60	(Kang et al., 2008b)
	Primer R	5' CCCCAAATTGTCTAATGCAC 3'			
Primers Nested -PCR (região 18S rRNA)					
Yeast Universal	Primer F	5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3'	600-640	64	
	Primer R	5' GGTCCGTGTTTCAAGACG 3'		64	
<i>C. albicans</i>	Primer F	5' TTGGAGCGGCAGGATAATGG 3'	156	64	(Haynes and Westerneng, 1996)
<i>C. glabrata</i>	Primer F	5' GTTTTGCGCCCCTTGCCTCT 3'	217	64	
<i>C. parapsilosis</i>	Primer F	5' GCGGTAGGATAAGTGAC 3'	139	64	
<i>C. krusei</i>	Primer F	5' GACATGGGAATCGCGCACCG 3'	226	64	
Primers Nested -PCR (região ITS rRNA)					
Universal ITS1	Primer F	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'	165	60	(White et al., 1990)
Universal ITS 4	Primer R	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'	159	60	
<i>C. dubliniensis</i> (Cdub18)	Primer F	5' CTAAGCCATTGTCAAGCATCTC 3'	412	60	(Than et al., 2012)
<i>C. tropicalis</i> (Ct3)	Primer F	5' TTTTGGATAAACCTAAGTCGCT 3'	370	60	

Em relação ao *Streptococcus mutans* foram identificadas 43 publicações científicas e somente três artigos foram incluídos, sendo que todos estes utilizaram o primer descrito por Chen et. al (2007), utilizando PCR tradicional.

Tabela 3 - Primers para detecção de *S. mutans*

Primers PCR					
Primers		Sequence	Product size (bp)	T melting °C	Reference
Sm479F	Primer F	5'-TCGCGAAAAAGATAAACAACA-3'	500	65	(Chen et al., 2007)
Sm479R	Primer R	5'-GCCCTTCACAGTTGGTTAG-3'		65	

4.9.2.2. Estudo in-silico para desenho de óligos específicos para *Candida spp*

Com intuito de complementar as pesquisas realizadas por Haynes e Westerneng (2000) utilizando Nested PCR, desenhamos oligos complementares para *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*, espécies estas que não constavam neste artigo,

A busca de sequências referência de genes marcadores para *Candida* se deu no Genbank do National Center for Biotechnology Information (NCBI)(Brown et al. 2015). Na guia RefSeq Home, utilizou-se a expressão “*Candida* 18S” como palavra-chave. As cepas resultantes desta busca foram selecionadas, de modo que houvesse representantes de diversos estudos clínicos. O total foi de 5 a 10 cepas, exibidas no formato Genbank. Estas foram convertidas para o formato FASTA Text no próprio sistema do banco de dados e realizado o Download.

As sequências foram agrupadas e exportadas para um software de edição de textos simples (bloco de notas do sistema operacional Windows), dando origem a bancos de sequências, um contendo as sequencias para cada espécie citada acima. Cada uma foi devidamente identificada com o local de origem, seu respectivo código de identificação no GenBank. Para o alinhamento, foi utilizado o software Bioedit, onde se criou um documento novo de alinhamento de DNA, e adicionado os dois bancos de sequências resultantes do passo anterior. O algoritmo utilizado foi o Clustal W (Thompson et al. 1994) contido no próprio software, que realiza alinhamento do tipo Múltiplo global. Por meio do alinhamento foram analisadas as regiões quanto a sua conservação ou variabilidade. As regiões semelhantes em ambos os tipos de *Candida* (consensus) serviram para o desenho de primers que diferenciasses os genótipos. Os primers foram selecionados observando alguns parâmetros como critérios de inclusão ou exclusão. A região escolhida deveria apresentar cerca de 20 nucleotídeos e uma boa distribuição de bases guanina e citosina, no máximo 60% para evitar a elevação da temperatura de anelamento e dissociação. As regiões com muitas adeninas e timinas também foram evitadas para não haver a redução desses mesmos parâmetros.

A validação final foi feita com uso da ferramenta online Netprimer. Foi verificada a possível formação de self dímeros, hetero-dimeros e hairpin. Na análise de dímeros, os primers não poderiam apresentar energia livre de Gibbs abaixo de -9

kcal/mole-1, ou muitas bases complementares. Na análise de Hairpin, além dos valores de Delta G, foi verificada a temperatura de melting que possibilitasse o auto anelamento, não sendo recomendado valores inferiores que 50°. A Tmelting foi calculada estimando-se que os valores entre cada par de primers fossem próximos, visando posteriormente estabelecer uma média na padronização da PCR.

As temperaturas não poderiam ser muito divergentes, sendo que no caso de alta variação, foram excluídas ou acrescentadas algumas bases na sequência do primer, até se obter um resultado satisfatório.

Os iniciadores foram desenhados propondo sua utilização em duas PCRs (Nested PCR). Na 1ª PCR utiliza-se os primers Yeast universal (Haynes and Westerneng, 1996a) que amplificam um fragmento de 600-640 pares de base. O fragmento resultante desta etapa é submetido a 2ª PCR, uma Semi-Nested, onde mantém-se o primer R (637-654 bp), e acrescenta-se o primer F correspondente a espécie de *Candida*. O uso de primers sense distintos para cada variante, permite a diferenciação por meio de diferentes tamanhos de fragmentos, possibilitando assim a genotipagem de fungos em dados metagenômicos.

Tabela 4 - Primers complementares da região 18S específicos para *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* considerando a metodologia descrita por Haynes e Westerneng (1996)

Primers Finais Nested (PCR)					
Primers		Sequence	Product size (bp)	T melting °C	Reference
Yeast Universal	Primer F	5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3'	600-640	64	(Haynes and Westerneng, 1996a)
	Primer R	5'GGTCCGTGTTTCAAGACG3'		64	
C. dubliniensis*	Primer F	5'TTGCCTTTGATGTTGACGAG3'	165	64	BPFA
C. tropicalis *	Primer F	5'GGGTCCTGTGCAACTGATTT3'	159	64	BPFA

*Os primers descritos não apresentaram resultados satisfatórios para Nested-PCR com DNA de amostras clínicas

4.9.2.3. Obtenção de amostras de DNA das cepas de referência

Para a realização dos ensaios de PCR foram utilizadas amostras de DNA genômico de *Candida* spp. incluindo *C. albicans* (ATCC 63242), *C. dubliniensis* (ATCC MYA 646), *C. glabrata* (BG-2), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. tropicalis* (ATCC MYA-3404) e *Streptococcus mutans* (UA 159). O DNA genômico destes microrganismos foi utilizado para as avaliações de especificidade dos primers selecionados e desenhados para essa pesquisa.

4.9.2.4. Determinação da especificidade de primers e condições para a reação de PCR

Além da avaliação executada por meio do BLAST (GenBank) e Netprimers, a especificidade dos primers foi complementada com a realização dos ensaios de PCR testando as amostras de DNA genômico dos microrganismos citados no item 4.9.4. Para tais reações empregou-se a combinação de primers definidos como espécie- específicos.

A partir do protocolo de amplificação definido como padrão, foram executadas reações de PCR como testes de otimização, visando avaliar diferentes concentrações de reagentes e ciclos de amplificação, seguindo a literatura descrita (Baumgartner et al., 2000; Chen et al., 2007; Haynes e Westerneng, 1996a; Kumar et al., 2003; Than et al., 2012; White et al., 1990)

Os testes de otimização, a partir do protocolo de PCR estabelecido como padrão, incluíram avaliações sobre diferentes concentrações de $MgCl_2$, de temperaturas de anelamento, tempos de cada etapa de um ciclo de amplificação e de número de ciclos.

Para a otimização da concentração do $MgCl_2$, foi definido como primeiro teste uma concentração final de 0,5 mM, um segundo teste na concentração final de 1,0 mM, e finalmente, para um terceiro teste, 1,5 mM, mantendo-se todas as concentrações e quantidades dos demais reagentes do protocolo padrão, apenas ajustando o volume de água ultrapura esterilizada para o volume final de mix de 25 μ L.

4.9.2.5. Validação dos primers em controles e amostras clínicas

Os pares de primers considerados espécies específicas apresentados na tabela 2 bem como os primers de Nested- PCR descrito por Haynes e Westerneng, (1996) apresentaram resultados positivos na amplificação dos controles positivos utilizando PCR tradicional e Nested-PCR (Baumgartner et al., 2000; Donnelly et al., 1999; Haynes and Westerneng, 1996). Contudo para as amostras coletadas de pacientes não houve o mesmo resultado, pois estas apresentam uma quantidade diminuta de ácidos nucleicos.

Considerando a fragilidade e baixa concentração de material genético, recorreremos ao protocolo de Nested -PCR utilizando as sondas e condições de PCR de Haynes e Westerneng, (1996). Nesta metodologia obtivemos sucesso na amplificação tanto para os controles, quanto para as amostras de pacientes. A amplificação do fragmento alvo de 150 -220 pb a partir do DNA genômico das espécies de *Candida* corroborou com os achados de Haynes e Westerneng (2000).

Os primers desenhados e otimizados por Haynes e Westerneng (1996) foram elaborados e desenhados com base na região 18S e regiões específicas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Contudo buscamos identificar *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*, que se mostraram presentes em estudos proteômicos de casos de insucesso endodôntico (Francisco et al., 2019).

No intuito de desenhar primers que complementassem os estudos de Haynes e Westerneng (1996), recorreremos a sequências depositadas no GenBank, referente ao 18S rRNA de *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*. Porém a falta de informação quanto a região da sequência do primer universal impossibilitou o processo de seleção dos primers e a subsequente avaliação pelo *BLAST*. Apesar da dificuldade realizamos o desenho de primers com sequências depositadas no NCBI, porém não obtivemos sucesso com o nested PCRs para essas duas espécies. Assim não pudemos concluir o processamento destas 2 espécies de *Candida*

Como alternativa recorreremos a primers que tem como referência a região ITs (Than et al., 2012; White et al., 1990), obtendo resultado positivo para a prospecção de *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*. Regiões variáveis do DNAr (região ITS: Regiões transcritas internamente) ou outros genes (calmodulina, β -tubulina, actina,

TEF-1 α) podem ser utilizadas para estabelecer relações filogenéticas entre diferentes grupos fúngicos

Os resultados obtidos foram satisfatórios no processo de avaliação da especificidade dos primers. O fato de obtermos uma série de alternativas para prospecção de *Candida* spp. apresenta-se como uma vantagem para estudos nessa linha na área de Endodontia.

Para detecção de *E. faecalis* e *S. mutans* foram utilizados primers espécie-específicos padronizados anteriormente em nosso laboratório (Gomes et al. 2005,2006, 2008; Barbosa-Ribeiro et al. 2020, Lima et al. 2021)

4.9.3. Detecção de *Candida* ssp. por meio de Nested PCR em amostras clínicas e controles

O Nested-PCR consiste em duas etapas:

- Primeira amplificação: Os iniciadores foram desenhados propondo sua utilização em duas PCRs. Na 1ª PCR foi utilizado os primers Yeast universal (Haynes; Westerneng, 1996) que amplificam um fragmento de 600-640 pares de base. As condições de amplificação, bem como as etapas de ciclagem foram realizadas como o descrito por Haynes e Westerneng (1996).

Os Produtos da reação da PCR foram analisados pelo gel eletroforético de agarose 1% (Invitrogen® - Life Technology do Brasil) em tampão de Tris-borato EDTA (pH 8,0) (TBE) corado com brometo de etídio (5 μ g/mL-Invitrogen®, São Paulo, SP, Brasil), com um padrão de peso molecular de 1Kb (DNA ladder, Invitrogen® - Life Technology do Brasil). Após o término de cada corrida (60 volts por 40 min), as bandas foram observadas com transiluminador de luz ultravioleta. A identificação positiva ou negativa foi baseada na presença de bandas integras correspondente ao peso molecular esperado.

- Segunda amplificação: O fragmento resultante desta etapa é submetido a 2ªPCR, uma Semi-Nested, onde mantém-se o primer R (637-654 bp), e acrescenta-se o primer F correspondente a espécie de *Candida*. O uso de primers sense distintos para cada variante, permite a diferenciação, por meio de diferentes tamanhos de

fragmentos, possibilitando assim a genotipagem de fungos em dados metagenômicos.

Também foram investigadas as espécies: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *C. krusei*.

Os controles positivos das reações foram compostos por cepas de referência de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *C. krusei*, adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC, Baltimore, MD, EUA).

4.9.4. Detecção de *Streptococcus mutans* por PCR e *Enterococcus faecalis* por meio de Nested PCR

4.9.4.1. Detecção de *Streptococcus mutans* por PCR

• Primeira amplificação: A região que abrange o gene 16S e 23S rRNA é amplificada através dos Primers Universais abaixo listados:

Univ Forward (785) 16S 5' GGATTAGATACCCTGGTAGTC 3'

Univ Reverse (L422) 23S 5' GGAGTATTTAGCTT 3'

A primeira amplificação das amostras foi processada para volume final de 50 µL para cada amostra contendo 5 µL de tampão para reação de PCR (10x Reaction Buffer, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 5µL de uma mistura de deoxiribonucleotídeos fosfatados (2mM) (dNTPs, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 6 µL de solução de cloreto de magnésio (25 mM) (MgCl₂, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 1,25 µL de uma solução 100 µM de Primer Forward (20 mM) (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 1,25 µL de uma solução 100 µM de Primer Reverse (20 mM) (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 29,3 µL de água ultrapura livre de DNAase e RNAase; 0,25 µL da enzima Taq DNA Polimerase (Taq Platinum, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil) e 2 µL de DNA extraído da amostra coletada do canal radicular.

As etapas iniciais da Primeira Amplificação (FILE 11) do ciclo de PCR compreende uma desnaturação inicial (95°C, 2 min); 22 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min), anelamento (42°C, 2min) e extensão (72°C, 3 min); seguidos de uma extensão

final (72°C, 10 minutos). Os Produtos da reação da PCR foram analisados pelo gel eletroforético de agarose 1% (Invitrogen® - Life Technology do Brasil) em tampão de Tris-borato EDTA (pH 8,0) (TBE) corado com brometo de etídio (5ug/mL-Invitrogen®, São Paulo, SP, Brasil), com um padrão de peso molecular de 100 bp (DNA ladder, Invitrogen® - Life Technology do Brasil). Após o término de cada corrida (60 volts por 40 min), as bandas foram observadas com transiluminador de luz ultravioleta. A identificação positiva ou negativa foi baseada na presença de bandas integras e com tamanho e peso molecular esperado.

4.9.4.2. Detecção de *Enterococcus faecalis* por Nested-PCR

As extrações de DNA das amostras foram realizadas com o QIA amp DNA kit (QYAGEN, Valencia, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após extração, foi realizada a leitura da concentração de DNA presente nas amostras coletadas dos canais radiculares a 260 nm através de espectrofotometria (Nanodrop 2000; Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

O *Nested-PCR* consiste em duas etapas. a) Primeira amplificação: A região que abrange o gene 16S e 23S rRNA é amplificada através dos Primers Universais abaixo listados:

Univ Forward (785) 16S 5' GGATTAGATACCCTGGTAGTC 3' (FILE 11)

Univ Reverse (L422) 23S 5' GGAGTATTTAGCTT 3' (FILE 11)

a) Segunda amplificação: Utilizando *primers* específicos (16S) + L189 R (23S)

As reações de PCR para a primeira amplificação foram processadas na quantidade total de 50 µL para cada amostra contendo 5 µL de tampão para reação de PCR (10x Reaction Buffer, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 5µL de uma mistura de deoxiribonucleotídeos fosfatados (2mM) (dNTPs, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 6 µL de solução de cloreto de magnésio (25 mM) (MgCl₂, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 1,25 µL de uma solução 100 µM de Primer Forward (20 mM) (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 1,25 µL de uma solução 100 µM de Primer Reverse (20 mM) (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 29,3 µL de água ultrapura livre de DNAase e RNAase; 0,25 µL da enzima Taq DNA

Polimerase (Taq Platinum, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil) e 2 µL de DNA extraído da amostra coletada do canal radicular.

As etapas iniciais da Primeira Amplificação (FILE 11) do ciclo de PCR compreende uma desnaturação inicial (95°C, 2 min); 22 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min), anelamento (42°C, 2min) e extensão (72°C, 3 min); seguidos de uma extensão final (72°C, 10 minutos).

Produtos da reação da PCR foram analisados pelo gel eletroforético de agarose 1% (Invitrogen® - Life Technology do Brasil) em tampão de Tris-borato EDTA (pH 8,0) (TBE) corado com brometo de etídio (5ug/mL-Invitrogen®, São Paulo, SP, Brasil).

Foi incluído em cada gel um padrão de peso molecular de 100 bp (DNA ladder, Invitrogen® - Life Technology do Brasil). Após o término de cada corrida (60 volts por 40 min), as bandas foram observadas com transiluminador de luz ultravioleta. A identificação positiva ou negativa foi baseada na presença de bandas limpas do esperado tamanho da molécula na altura do fragmento.

Verificado o sucesso da reação universal, uma alíquota do produto dessa reação foi utilizada para realização de outra reação PCR, agora usando um *primer* espécie-específico forward (16S) juntamente com o L189R (23S) (SEGUNDA AMPLIFICAÇÃO).

As cepas de bactérias de referência usadas neste estudo foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC, Baltimore, MD, EUA) e são listadas a seguir: *Enterococcus faecalis* (ATCC 4034

Especificidade dos *primers* de PCR: Os *primers* espécie-específicos na região codificadora do rDNA 16S foram selecionados com base na investigação anterior de bactérias endodônticas por clonagem e sequenciamento do gene 16S bacteriano (Gomes et al., 2004) e em sequências disponíveis no GenBank. A especificidade das espécies foi ainda confirmada por sequenciação de pelo menos um produto de PCR de uma amostra clínica para o iniciador específico em um sequenciador automático ABI Prism 310 (AME Bioscience Ltd, London UK) conforme descrito por Rumpf et al., 1999.

As etapas finais (FILE 12) do ciclo de PCR compreenderam 27 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min), anelamento (52°C, 2min) e extensão (72°C, 3 min). Para essa etapa final, foram utilizados os reagentes nas mesmas concentrações da primeira reação FILE 11.

Os amplicons resultantes do PCR foram incluídos em eletroforese em gel de agarose a 1% e corados com uma mistura de EZ-vision e tampão de carregamento 10x Blue Juice diluído individualmente em cada produto. Um padrão de peso molecular de escada de DNA de 100 pb foi incluído nos géis. Os produtos foram analisados sob transiluminação ultravioleta.

Tabela 5 - Sequências dos primer espécie-específico utilizados nas reações de PCR

Bacteria	Primer	Ciclo
<i>Enterococcus faecalis</i>	GTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCA	File 12

4.9.5. Forma de análise dos resultados

As etapas metodológicas foram analisadas tendo como recursos ferramentas on-line e protocolos determinados pelo laboratório de Endodontia da FOP –Unicamp e especificamente definidos para cada etapa como será descrito abaixo:

- Desenho de primers: para o desenho de óligos foram utilizados diversos bancos de dados disponíveis on-line (gratuito) como por exemplo: GenBank (Park et al., 2012), BioEdit, ClustalW (Thompson et al., 1994) e Primer3 (Rozen and Skaletsky, 1999) e NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com>). Os alinhamentos que foram realizados por meio do ClustalW, foram representados a partir de recursos gráficos da plataforma Bioedit, as regiões conservadas as quais o primers se alinham foram coloridas com base nos recursos das ferramentas descritas acima. Após a escolha dos óligos foi realizada uma etapa de validação por meio de uma PCR in-silico no software NetPrimer.

- Detecção de *Candida ssp*, *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis*: A presença e ausência de diferentes genótipos de *Candida ssp* e *Streptococcus mutans*, foi avaliada por presença e ausência de bandas em gel de agarose 1%. Os dados de presença e ausência foram tabulados e submetidos a uma análise de

clusterização na ferramenta estatística PAST (Hammer, Øyvind et al., 2001) e serão visualizados na forma de dendrogramas hierárquicos. A presença e ausência de bandas nos estudos de *Nested*-PCR, foi convertida em uma matriz que considerou zero para ausência e um para presença de bandas, ou seja, de produto amplificado. Essa matriz foi submetida a uma análise de correlação estatística com o software SPSS 23 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). A normalidade dos dados quantitativos foi averiguada através do teste de Shapiro-Wilk.

- A comparação da idade entre os grupos foi realizada através do teste T de Student. Correlações entre sinais e sintomas foram avaliados através do Teste exato de Fischer. O mesmo teste também foi utilizado para se avaliar a presença de correlação entre a presença de espécies bacterianas específicas no interior do canal radicular e a presença de sinais e sintomas clínicos e radiográficos, a presença de correlação na existência simultânea de duas espécies bacterianas e a presença de correlação entre pares de bactérias e sinais e sintomas clínicos e radiográficos encontrados nos pacientes.

- Teste de McNemar foi utilizado para comparação entre as frequências dos microrganismos detectados durante os três tempos de coleta realizados.

- A hipótese de que se existiam diferenças entre a carga microbiana detectada nos grupos CL e SL foi averiguada pelo teste de Mann-Whitney.

5 RESULTADOS

5.1 Características gerais dos casos selecionados no estudo

Neste presente estudo foram analisadas 20 amostras de pacientes com a faixa de idade de 30 a 69 anos, com a média de idade de 48,5 anos, 15 (75%) pacientes do sexo feminino e 5 (25%) do sexo masculino. Destes 20 pacientes participantes, 10 se incluíram no grupo que eram indicados para retratamento por apresentarem periodontite apical crônica (CL) e outros 10 pacientes que necessitavam de retratamento por motivos protético, onde se encontravam sem lesão periapical (SL). O quadro clínico dos mesmos não apresentavam dor. A média dos tratamentos endodônticos anteriores realizados nestes pacientes foi de 9,8 anos. Os dentes/ sinais e sintomas clínicos e radiográficos que foram incluídos na pesquisa estão presentes nas Tabelas 5, 6 e 7 constituindo-se de 10 unirradiculares e 10 multirradiculares.

5.2 Sinais clínicos e radiográficos dos casos indicados ao retratamento pela presença de periodontite apical crônica (Grupa- CL)

Os dentes incluídos neste grupo foram 10 dentes com necessidade de retratamento por apresentarem periodontite apical crônica pós tratamento endodôntico anterior. A faixa de idade dos pacientes foi de 30 a 69 anos com uma média de idade de 49,1 anos, destes 9 (90%) eram do sexo feminino e 1 (10%) era do sexo masculino. Foram incluídos neste grupo, 6 dentes unirradiculares (60%) e 4 dentes multirradiculares (40%). A média de tempo decorrido desde o tratamento anterior foi de 10,3 anos, sendo o tempo máximo encontrado de 30 anos e o tempo mínimo encontrado de 2 anos. Nenhum destes pacientes apresentou dor a palpação; edema facial, fístula ou exsudato no interior do sistema de canais após a desobturação do conduto. Porém todos apresentavam lesão periapical, essas variavam entre 1 e 5,6 mm, (média de 3,25mm) sendo 2 (20%) menores que 2mm, 6 (60%) com lesões entre 2 e 5mm e 2 (20%) com lesões maiores que 5mm. Os casos apresentaram profundidade de sondagem entre 1mm e 3mm, sendo assim, dentes com profundidade de sondagem maior que 3mm foram excluídos do estudo. A queixa estética do dente (restauração) se apresentou em 6 casos (60%). Já a qualidade de obturação boa se apresentou em apenas 2 casos (20%), a qualidades de obturação

ruim se apresentou em 8 casos (80%) e limite apical bom em apenas 2 casos (20%). Os dados completos dos sinais clínicos e radiográficos referente a cada paciente estão apresentados na tabela 5.

Tabela 6 - Descrição das características clínicas e radiográficas detectadas nos pacientes pertencentes ao grupo portador de periododntite apical crônica (CL)

SINTOMATOLOGIA																			
Paciente	IDADE	DENTE	SEXO	DA	DP	DE	PERC	PALP	SE	EDM	FIST	EXSU	LP	TML	TTA	QE	QOB	QOR	LAPB
1	52	46	Feminino	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	3,2	3	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
2	30	35	Feminino	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	4	4	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
3	52	25	Masculino	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	1	16	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
4	39	45	Feminino	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	5,6	8	Presente	Presente	Ausente	Presente
5	44	25	Feminino	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	1	5	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
6	38	11	Feminino	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	2,1	2	Presente	Presente	Ausente	Presente
7	63	23	Feminino	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	3,1	15	Presente	Ausente	Presente	Ausente
8	48	36	Feminino	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	5	10	Presente	Ausente	Presente	Ausente
9	69	22	Feminino	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	5,5	30	Presente	Ausente	Presente	Ausente
10	56	35	Feminino	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	2	10	Presente	Ausente	Presente	Presente

Legenda: DA (dor atual); DP (dor prévea); DE (dor espontânea); PERC (percussão); PALP (palpação); SE (sintomatologia estimulada) EDM (edema); FIST (fístula); EX (exsudato); LP (Lesão periapical); TML (Tamanho da lesão); TTA (Tempo do tratamento anterior); QE (Questão estética); QOB (Qualidade de obturação boa); QOR (Qualidade de obturação ruim); LAPB (Limite apical bom).

5.3 Sinais clínicos e radiográficos dos casos indicados ao retratamento somente por motivo protético, livres de qualquer alteração periapical (Grupo- SL)

Os dentes incluídos neste grupo foram 10 dentes com necessidade de retratamento somente por motivo protético, livres de qualquer alteração periapical. A faixa de idade dos pacientes foi de 35 a 61 anos com uma média de idade de 47,9 anos, destes 6 (60%) eram do sexo feminino e 4 (40%) era do sexo masculino. Foram incluídos neste grupo, 4 dentes unirradiculares (40%) e 6 dentes multirradiculares (60%). A média de tempo decorrido desde o tratamento anterior foi de 9,3 anos, sendo o tempo máximo encontrado de 22 anos e o tempo mínimo encontrado de 2 anos. Nenhum destes pacientes apresentou dor ao teste de percussão vertical, dor a palpação; edema facial, fístula ou exsudato no interior do sistema de canais após a desobturação do conduto. A queixa estética da restauração se apresentou em 6 casos (60%). Já a qualidade de obturação boa se apresentou em apenas 3 casos (30%), a qualidade de obturação ruim se apresentou em 7 casos (70%) e limite apical bom em apenas 4 casos (40%). Lembrando no grupo sem lesão periapical (MP) nenhum caso apresentou lesão, nem descontinuidade de lâmina dura, nem espessamento do ligamento periodontal. Os casos apresentaram profundidade de sondagem entre 1mm e 3mm, sendo assim, dentes com profundidade de sondagem maior que 3mm foram excluídos do estudo. Quanto ao selamento coronário, 100% dos casos estavam restaurados em resina composta, e não apresentaram nenhum sinal radiográfico de microinfiltração coronária.

Os dados completos dos sinais clínicos e radiográficos referente a cada paciente estão apresentados na tabela 6.

Tabela 7 - Descrição das características clínicas e radiográficas detectadas nos pacientes pertencentes ao grupo de pacientes indicados ao retratamento por motivo protético SL

Paciente	IDADE	DENTE	SEXO	SINTOMATOLOGIA																
				DA	DP	DE	PERC	PALP	SE	EDM	FÍST	EXSU	LP	TL	TTA	QE	QOB	QOR	LAPB	
1	61	32	Masculino	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	2	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
2	47	23	Feminino	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	20	Presente	Presente	Ausente	Presente
3	47	11	Feminino	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	22	Presente	Presente	Ausente	Presente
4	51	44	Masculino	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	5	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
5	42	24	Feminino	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	16	Presente	Presente	Ausente	Presente
6	57	22	Masculino	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	7	Presente	Ausente	Presente	Ausente
7	54	46	Feminino	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	5	Presente	Ausente	Presente	Ausente
8	35	16	Feminino	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	10	Presente	Ausente	Presente	Ausente
9	40	46	Masculino	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	3	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
10	45	22	Feminino	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	3	Ausente	Ausente	Presente	Presente

Legenda: DA (dor atual); DP (dor prévea); DE (dor espontânea); PERC (percussão); PALP (palpação);SE (sintomatologia estimulada) EDM (edema); FIST (fístula); EX (exsudato); LP (Lesão periapical); TML(Tamanho da lesão); TTA(Tempo do tratamento anterior); QE(Questão estética); QOB (Qualidade de obturação boa); QOR (Qualidade de obturação ruim); LAPB (Limite apical bom).

Tabela 8 - Características clínicas e radiográficas dos pacientes submetidos a tratamento endodôntico de acordo com os grupos estudados

Variável	Categoria	Total	Grupo	
			CL	SL
Gênero	Feminino	15(75%)	9(90%)	6(60%)
	Masculino	5(25%)	1(10%)	4(40%)
Idade	< 50anos	11(55%)	5(50%)	6(60%)
	≥ 50anos	9(95%)	5(50%)	4(40%)
Nº de canais	Unirradicular	10(50%)	6(60%)	4(40%)
	Multirradicular	10(50%)	4(40%)	6(60%)
Localização dos dentes	Superior	11(55%)	5(50%)	6(60%)
	Inferior	9(45%)	5(50%)	4(40%)
Grupo dental	Incisivo Central	2(10%)	1(10%)	1(10%)
	Incisivo Lateral	4(20%)	1(10%)	3(30%)
	Caninos	2(10%)	1(10%)	1(10%)
	Pré-molares	7(35%)	5(50%)	2(20%)
	Molares	5(25%)	2(20%)	3(30%)
Dor atual	Sim	0(100%)	0(100%)	0(100%)
	Não	20(100%)	10(100%)	10(100%)
Dor prévia	Sim	0(100%)	0(100%)	0(100%)
	Não	20(100%)	10(100%)	10(100%)
Dor espontânea	Sim	0(100%)	0(100%)	0(100%)
	Não	20(100%)	10(100%)	10(100%)
Dor à percussão	Sim	2(10%)	2(20%)	0(100%)
	Não	18(80%)	8(80%)	0(100%)
Dor à palpação	Sim	0(100%)	0(100%)	0(100%)
	Não	20(100%)	10(100%)	10(100%)
Sintomatologia estimulada	Sim	2(10%)	2(20%)	0(100%)
	Não	18(80%)	8(80%)	0(100%)

continua

Tabela 8 - Características clínicas e radiográficas dos pacientes submetidos a tratamento endodôntico de acordo com os grupos estudados
conclusão

Variável	Categoria	Total	Grupo	
			CL	SL
Edema	Sim	0(100%)	0(100%)	0(100%)
	Não	20(100%)	10(100%)	10(100%)
Fístula	Sim	0(100%)	0(100%)	0(100%)
	Não	20(100%)	10(100%)	10(100%)
Exsudato	Sim	0(100%)	0(100%)	0(100%)
	Não	20(100%)	10(100%)	10(100%)
Periodontite apical crônica	Sim	10(50%)	10(100%)	0(100%)
	Não	0(100%)	0(100%)	0(100%)
Tamanho da lesão	<2mm	2(10%)	2(20%)	0(100%)
	2-5mm	6(30%)	6(60%)	0(100%)
	>5mm	2(10%)	2(20%)	0(100%)
Tempo do tratamento anterior	entre 2 e 5	9(95%)	4(40%)	5(50%)
	maior que 5 menos que 8	1(5%)	0(100%)	1(10%)
	igual ou maior que 8	10(50%)	6(60%)	4(40%)
	15 ou mais	6(30%)	3(30%)	3(30%)
Queixa estética da restauração	Sim	12(60%)	6(60%)	6(60%)
	Não	8(40%)	4(40%)	4(40%)
Qualidade de obturação boa	Sim	5(25%)	2(20%)	3(30%)
	Não	15(75%)	8(80%)	7(70%)
Qualidade de obturação ruim	Sim	15(75%)	8(80%)	7(70%)
	Não	5(25%)	2(20%)	3(30%)
Limite apical da obturação bom	Sim	6(30%)	2(20%)	4(40%)
	Não	14(70%)	8(80%)	6(60%)

5.4 Perfil microbiológico dos grupos com indicação de retratamento por periodontite apical crônica (CL) e por motivos protéticos (SL)

Tabela 9 - Frequência e porcentagem dos resultados positivos obtidos nos grupos CL e SL detectados através do Nested-PCR nos diferentes tempos de coleta

Microrganismos	Tempo da coleta	Grupos		
		Total	CL	SL
<i>S.mutans</i>	C1	14(70%)	7(70%)	7(70%)
	C2	3(15%)	3(30%)	0(0%)
	C3	3(15%)	3(30%)	0(0%)
<i>E.faecalis</i>	C1	15(75%)	9(90%)	6(60%)
	C2	14(70%)	9(90%)	5(50%)
	C3	10(50%)	6(60%)	4(40%)
<i>C.albicans</i>	C1	13(65%)	10(100%)	3(30%)
	C2	12(60%)	10(100%)	2(20%)
	C3	11(55%)	10(100%)	1(10%)
<i>C.glabrata</i>	C1	10(50%)	10(100%)	0(0%)
	C2	2(10%)	2(20%)	0(0%)
	C3	1(5%)	1(10%)	0(0%)
<i>C.parapsilosis</i>	C1	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	C2	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	C3	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<i>C.krusei</i>	C1	0(0%)	0(0%)	1(10%)
	C2	0(0%)	0(0%)	1(10%)
	C3	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<i>C.tropicalis</i>	C1	0(0%)	0(0%)	4(40%)
	C2	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	C3	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<i>C.dublinsiensis</i>	C1	19(95%)	10(100%)	9(90%)
	C2	12(60%)	10(100%)	2(20%)
	C3	4(20%)	4(40%)	0(0%)

Analisando todos os grupos (CL e SL) em relação à diferença estatística entre a microbiota encontrada nos diferentes tempos do tratamento foi encontrada diferença estatística entre a coleta 1 e coleta 2 na frequência do *S. mutans* ($p=0,001$) e da *C. glabrata* ($p=0,001$) e *C. dubliniense* ($p=0,016$). Também foi encontrada uma diferença estatística entre a coleta 2 e a coleta 3 em relação a frequência da *C. dubliniense* ($p=0,08$)

Comparando a frequência de microrganismos na coleta inicial entre os grupos CL e SL, houve diferença estatística da frequência de *C.albicans* ($p=0,0031$) e *C. glabrata* ($p<0,00001$). *C.albicans* 13 (65%) e *C. glabrata* (10%).

5.5 Perfil microbiológico dos casos do grupo com indicação de retratamento por apresentarem periodontite apical crônica (CL)

Dentre os microrganismos identificados alguns obtiveram maior frequência no interior dos canais radiculares dos casos relacionados a lesão periapical nas amostras iniciais entre eles *Enterococcus faecalis* (9/10), *Streptococcus mutans* (7/10), *Candida albicans* (10/10), *Candida glabrata* (10/10) e *Candida dubliniensis* (10/10). (Figura 1 e 2)

Já na fase C2 pós preparo químico mecânico, a bactéria mais presente foi *Enterococcus faecalis* (9/10). Houve uma redução de *Streptococcus mutans* (3/10) e *C.glabrata* (2/10). *Candida albicans* (10/10) e *Candida dubliniensis* (10/10) foram as espécies mais encontradas, não havendo uma redução comparado com o C1.

Nas amostra obtidas após o uso da medicação intracanal (C3), *Enterococcus faecalis* (6/10) e *Candida albicans* (10/10) foram em conjunto os 2 microrganismos mais presentes no interior dos canais radiculares. Houve redução de detecção de *Streptococcus mutans* (3/10), *Candida glabrata* (1/10), e *Candida dubliniensis* (4/10).

Candida krusei, *Candida parapsilosis* e *C.tropicalis* não foram detectadas em nenhuma amostra dos CRs.

Em relação a comparação de frequência dos microrganismos durante os tempos de coletas realizadas, foi verificado que não houve diferença estatística.

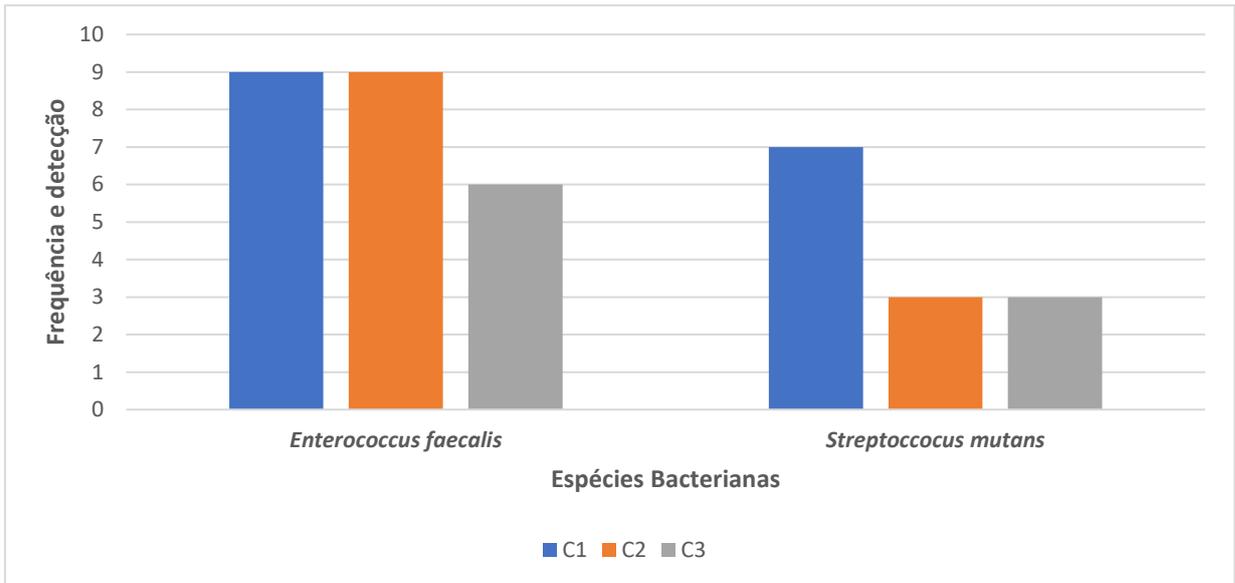


Figura 1 –Espécies Bacterianas X Frequência de Detecção(Periodontite Apical- CL)

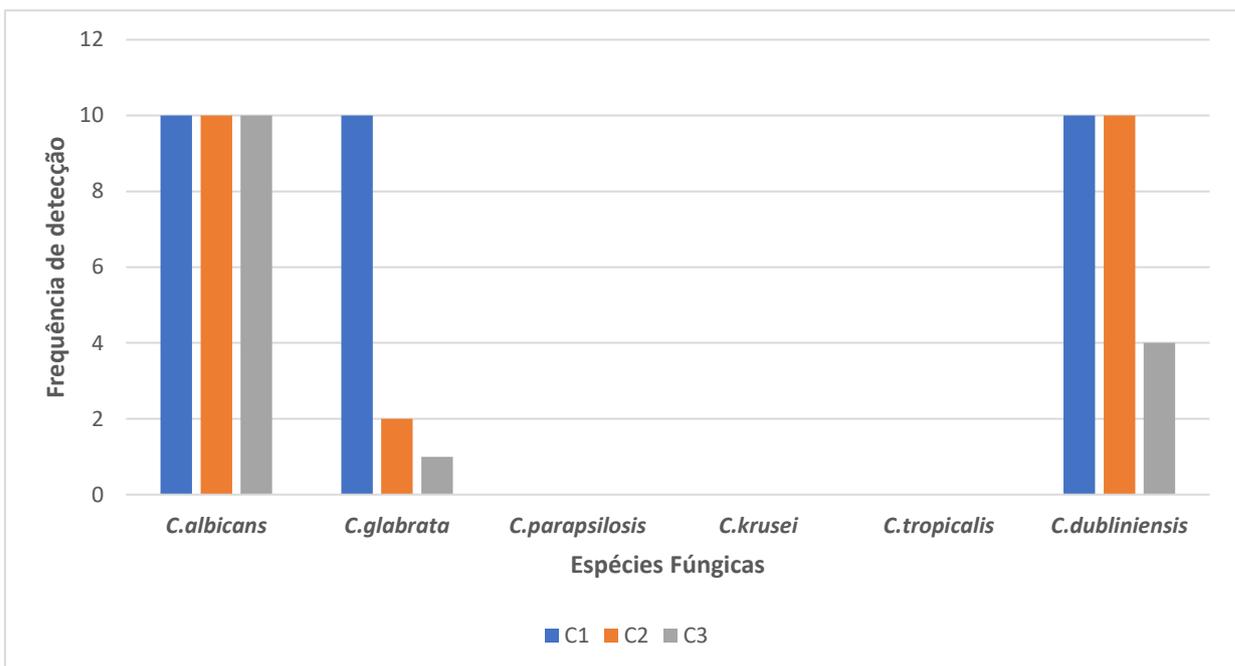


Figura 2 –Espécies Fúngicas X Frequência de Detecção(Periodontite Apical- CL)

5.6 Perfil microbiológico dos casos do grupo com indicação de retratamento por motivos protéticos (SL)

Os microrganismos identificados com maior frequência no interior dos canais radiculares dos casos sem lesão periapical foram *Streptococcus mutans* (7/10), *Enterococcus faecalis* (6/10), *Candida albicans* (3/10), *Candida dubliniensis* (9/10), *Candida krusei* (1/10) *Candida tropicalis* (4/10). (Figura 3 e 4).

Após o preparo químico mecânico (C2) houve uma redução por total de *Streptococcus mutans* (0/10) . *Enterococcus faecalis* foi detectado em 5/10 CRs. *Candida dubliniensis* foi encontrada apenas em 2/10, enquanto *Candida krusei* em 1/10 canais radiculares.

Após o uso da medicação intracanal, houve uma diminuição na frequência das bactérias detectadas. *Streptococcus mutans* continuou não sendo identificada (0/10) e *Enterococcus faecalis* em 4/10 CRs. Em relação aos fungos houve redução de de *Candida dubliniensis* (0/10), *Candida tropicalis* (0/10) e *Candida krusei* (0/10).

Candida albicans teve uma diminuição na coleta C1 (3/10), para coleta C2 com (2/10) e para coleta C3 (1/10).

Candida glabrata e *Candida parapsilosis* não foram detectadas em nenhuma das fases das coletas.

Em relação a comparação de frequência dos microrganismos durante os tempos de coletas realizadas, foi verificado que não houve diferença estatística quando comparados separadamente.

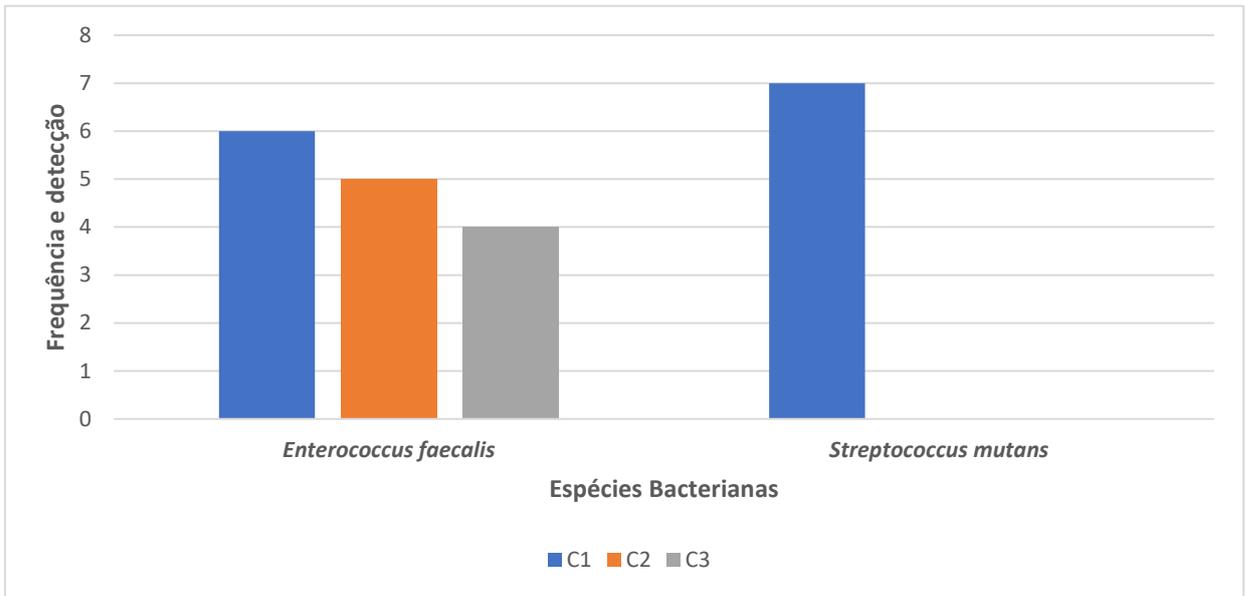


Figura 3 - Espécies Bacterianas X Frequência de Detecção(Motivos Protético- SL)

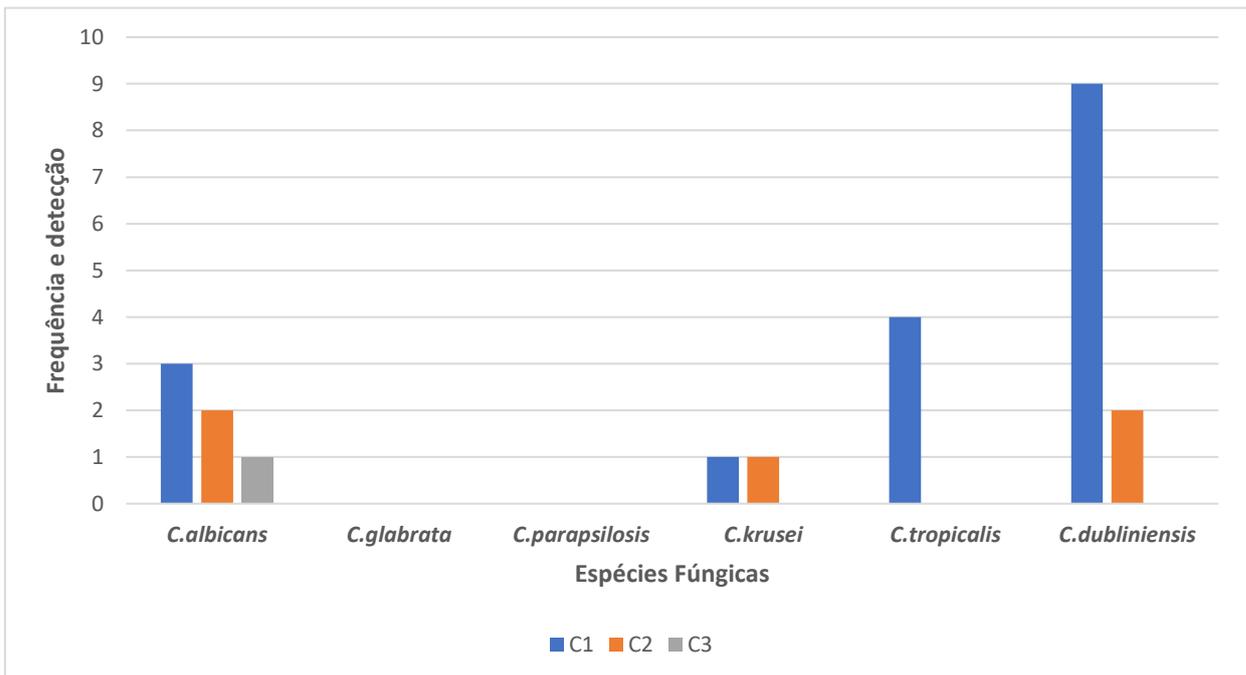


Figura 4 - Espécies Fúngicas X Frequência de Detecção(Motivos Protético- SL)

5.7 Associação entre a presença de microrganismos no interior dos canais radiculares e sinais e sintomas clínicos e radiográficos nas amostras

As associações entre a presença de espécies bacterianas/fúngicas específicas com sinais e sintomas clínicos e radiográficos dos casos incluídos no presente estudo revelaram uma série de associações (tabela 9).

O diagnóstico de periodontite apical crônica mostrou associação estatisticamente significativa com a presença de *C.albicans* (C1,C2 e C3), *C.glabrata* (C1) e *C.dublinsiensis* (C2) no interior do conduto radicular.

A presença de *S.mutans* (C2 e C3) *C.albicans* (C3) e *C.glabrata* (C1) no interior do conduto foi associada a casos em que existia a presença lesão periapical com tamanho de 2-5mm.

Tabela 10 - Correlações positivas entre a presença de bactérias e sinais e sintomas clínicos e/ou radiográficos apresentados pelos pacientes

		Lesão Periapical		
		Presença	Ausência	p valor
<i>Candida albicans</i> Inicial (C1)	Presença	10	3	0,003
	Ausência	0	7	
<i>Candida albicans</i> Pós-PQM (C2)	Presença	10	2	0,001
	Ausência	0	8	
<i>Candida albicans</i> Pós - MIC (C3)	Presença	10	1	0,000
	Ausência	0	9	
<i>Candida glabrata</i> Inicial (C1)	Presença	10	0	0,000
	Ausência	0	10	
<i>Candida dubliniensis</i> Pós-PQM (C2)	Presença	10	2	0,001
	Ausência	0	8	
		Lesão Periapical de 2-5mm		
		Presença	Ausência	p valor
<i>Streptococcus mutans</i> Pós-PQM (C2)	Presença	3	0	0,009
	Ausência	2	15	
<i>Streptococcus mutans</i> Pós - MIC (C3)	Presença	3	0	0,009
	Ausência	2	15	
<i>Candida albicans</i> Pós - MIC (C3)	Presença	5	6	0,038
	Ausência	0	9	
<i>Candida glabrata</i> Inicial (C1)	Presença	5	5	0,033
	Ausência	0	10	

Legenda: C1 Coleta inicial , C2 coleta pós PQM, C3 coleta pós MIC

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a presença de microrganismos específicos como *E. Faecalis*, *S. mutans* e 6 espécies de *Candida* spp. nos canais radiculares de dentes com necessidade de retratamento endodôntico. Verificamos também a presença dos mesmos nas diversas fases do tratamento. Dos 10 dentes de pacientes que apresentavam periodontite apical crônica (CL), 6 (60%) apresentam queixa estética tendo, possivelmente, microinfiltração. Sendo assim, dentes que possuem uma via de comunicação do meio bucal para o interior dos canais radiculares (Shetty et al., 2015; Pedro et al., 2016; Delboni et al., 2017), ou seja, apresentam microinfiltração, possivelmente, possuem uma respósta negativa no sucesso do tratamento endodontico.

Dos 10 dentes de pacientes que apresentavam necessidade de tratamento endodôntico por causas protéticas (SL), 6 (60%) também apresentavam queixa estética, porém não apresentavam microinfiltração coronária, visto que todos os pacientes deste grupo são isentos de sinais/ sintomas clínicos e radiográficos de patologias periapicais, considerando que todos os dentes estavam selados e restaurados com material restaurador permanente.

Na literatura existem diversos estudos que investigaram a presença de microrganismos em dentes com insucesso do tratamento endodôntico e presença de periodontite apical crônica (CL) .(Pinheiro et al., 2003; Gomes et al., 2004; 2006; 2008b; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro 2020ab; Gomes et al., 2021). Entretanto, poucos investigaram a presença de microrganismos em dentes com necessidade de retratamento endodôntico por motivos protéticos, mesmo radiograficamente não apresentando lesão periapical.

Com o passar dos anos, a degradação de materiais obturadores pode comprometer a qualidade da obturação tridimensional dos canais radiculares (Maniglia-Ferreira et al., 2007) e favorecer a re-infecção do espaço previamente ocupado com tecido pulpar. Frente a este embasamento, a terapia de retratamento endodôntico por motivos protéticos, visa melhorar o prognóstico e estender a longevidade dos trabalhos protéticos futuros, portanto, recomenda-se a realização de retratamento endodôntico via não cirúrgica, antes da confecção e instalação de coroas

protéticas, mesmo que os sinais e sintomas clínicos e radiográficos não apresentem nenhum sinal de alterações periapicais. (Maniglia-Ferreira et al., 2007; Landys et al., 2015; Shetty et al., 2015; Pedro et al., 2016).

Dentro do planejamento, diagnóstico e seleção de casos dos dois grupos do presente estudo (PA e MP), foi traçada uma análise de dados clínicos e radiográficos de cada caso conforme o descrito. A tomografia computadorizada de feixe cônico (CBTC) não foi utilizada neste estudo, pois os pacientes não apresentavam sinais, sintomas e lesão periapical nos casos de retratamento por motivo protético. Segundo European Society of endodontology o uso de TCFC especificamente em retratamento endodôntico é indicado apenas para sinais radiológicos de patologias periapicais. Quando há sinais e sintomas clínicos que podem confundir o diagnóstico quando são analisados somente por exames bidimensionais (radiografias convencionais), ou quando se faz necessária a avaliação de uma anatomia complexa, avaliações de complicações do retratamento endodôntico (desvios, zips, perfurações). Sendo assim, a tomografia tem se tornado bastante presente em casos de planejamento de retratamentos endodônticos nos quais a visualização dos casos por radiografias convencionais não fornecem informações precisas para o planejamento dos casos (Patel et al., 2019).

Foi utilizado o método de identificação bacteriana (gene 16s) e fúngica (gene 18s), através do PCR e Nested-PCR, afim de avaliar a presença de conteúdo microbiológico dos casos com lesão periapical crônica (CL) e dos casos por motivos protéticos (SL), objetivando identificar 2 espécies bacterianas (*E.faecalis* e *S.mutans*) e 6 espécies fúngicas (*C.albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.krusei*, *C.tropicalis* e *C. dubliniensis*), pautou-se na alta eficiência, especificidade e sensibilidade descrita em estudos prévios (Siqueira et al., 2004; Gomes et al., 2008b; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2020ab).

Analisando os dois grupos CL e SL em relação a diferenças estatísticas encontrada nos diferentes tempos de tratamento (C1,C2 E C3), foi encontrada diferença estatística entre C1 e C2 na frequência de *S.mutans* (p=0,001), *C.glabrata* (p=0,001) e *C.dubliniensis* (p=0,016).

Nas C2 e C3 também foram encontradas diferença estatística com

frequência da *C. dubliniensis* ($p=0,08$). Por meio de outras análises estatísticas comparando a frequência de microrganismos na C1 dos dois grupos (CL e SL), houve diferença estatística da frequência de *C.albicans* ($p=0,0031$) (CL 10/10) (SL 3/10) e *C.glabrata* ($< 0,00001$) (CL 10/10) (SL 0/10).

Dentre os microrganismos estudados, *E.faecalis* apresenta alta prevalência (CL 9/10) e (SL 6/10) prevalências similares (70-100%) foram relatadas por autores que usaram metodologias semelhantes (Gomes et al., 2006; Gomes et al., 2008b; Sakamoto et al., 2008; Roças et al., 2008; Barbosa-Ribeiro 2016; Barbosa-Ribeiro 2020ab; Gomes et al., 2021).

S.mutans foi detectado em 7/10 (ambos os grupos em C1) . A presença desta bactéria gram positiva, mostrando que a mesma pode ser detectada em casos de quadros clínicos de retratamento endodôntico em ambas condições de (CL e SL), não somente de casos primários assintomáticos, como de costume e mostrado no estudo de (Lima AR et al., 2020).

Com relação a detecção de espécies fúngicas nos grupos CL e SL na coleta C1, no grupo CL as Candidas mais prevalentes foram *C. albicans* 10/10, *C. glabrata* 10/10 e *C. dubliniensis* 10/10. Já no grupo SL a espécie mais prevalente foi *C.dubliniensis* 9/10, no qual podemos observar alta prevalência de espécies fúngicas junto às espécies bacterianas, mostrando assim, que agem em sinergismo para alterar (ou não) a saúde do hospedeiro. Assim como vemos no estudo de (Alberti A. Et al 2021) no qual avalia as características em comum que as espécies apresentavam frente ao fator de agregação de biofilme e ativação e indução a expressão gênica de virulência de *S.mutans*, dificultando sua eliminação.

Na coleta pós-PQM (C2), houve uma diminuição de frequência de detecção, que representa as coletas pós preparo químico mecânico na parte das bactérias, revelou uma frequência inferior àquela obtida durante as coletas iniciais (C1) tanto no CL quanto no SL. Confirmando, assim, a eficiência do preparo químico mecânico na descontaminação do SCR, corroborando com os resultados apresentados por Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016; Barbosa-Ribeiro et al., 2020b, que utilizaram protocolos similares para execução do PQM em seus estudos. A diminuição mais frequente foi de *S.mutans* que de 7/10 em C1 e em C2

teve uma redução para 0/10 no grupo MP, já na detecção de fungos a redução mais notória foi de *C.glabrata* 2/10 no grupo CL e *C.dublinskiensis* 2/10 no grupo MP.

Já nas coletas pós MIC foi realizada a inserção de medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio P.A. ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) e digluconato de clorexidina gel 2% durante um intervalo de 30 dias com intuito de observar a eficácia da medicação em promover descontaminação adicional ao PQM. As análises estatísticas revelaram ausência de diferença estatística entre os valores de carga microbiana obtidos na coleta pós-MIC (C3) nos grupos CL e SL. Diferenças estatisticamente significantes entre a carga microbiana apresentada nas coletas C2 e C3 foram ausentes em ambos os grupos. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios (Gomes et al., 2009; Roças e Siqueira 2011; Endo et al., 2012; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016; Barbosa-Ribeiro et al., 2020b).

A análise molecular do conteúdo microbiológico foi realizada através do *Nested-PCR* objetivando identificar a presença de espécies frequentemente associadas as infecções endodônticas e bucais no interior do conduto radicular dos dentes inclusos nesta pesquisa. A aplicação do método, com a finalidade de se realizar a identificação das espécies associadas a dentes já tratados endodonticamente, pautou-se na alta eficiência, especificidade e sensibilidade descrita em estudos prévios (Siqueira et al., 2004; Gomes et al., 2008b; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2020ab).

As associações entre a presença de espécies bacterianas/fúngicas específicas com sinais e sintomas clínicos e radiográficos dos casos incluídos no presente estudo revelaram uma série de associações significativas (tabela 9).

O diagnóstico de periodontite apical crônica mostrou associação estatisticamente significativa com a presença de *C.albicans* (C1,C2 e C3), *C.glabrata* (C1) e *C.dublinskiensis* (C2) no interior do conduto radicular. E a presença de *S.mutans* (C2 e C3) *C.albicans* (C3) e *C.glabrata* (C1) no interior do conduto foi associada a casos em que existia a presença lesão periapical com tamanho de 2-5mm.

C. albicans, uma espécie considerada dentinófila, ou seja, capaz de se aderir e penetrar aos túbulos dentinários, mostrou-se resistente a medicações a base de hidróxido de cálcio. *E. faecalis* compartilha da mesma propriedade. Tal fato justifica

a alta prevalência desses dois microrganismos nas coletas iniciais. *C. albicans* induz a expressão gênica de virulência dos *S. mutans*, que por sua vez podem facilitar a agregação de bactérias e leveduras.(Alberti A. et al 2021)

Trabalhos futuros envolvendo um maior número de casos e a preservação do mesmo são necessários para confirmar os dados obtidos no presente trabalho.

7 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo permitiram concluir que:

- a) A comunidade microbiana associada aos dois grupos apresenta uma microbiota diversificada de bactérias e fungos;
- b) *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* foram detectados em todas as amostras iniciais, do presente estudo através do PCR e Nested-PCR, independente da condição periapical do dente em questão;
- c) *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida dubliniensis* foram detectadas em 100% nas amostras iniciais de C1 do grupo com Lesão (CL). No Grupo por motivos protético(SL) a mais frequente foi *Candida dubliniensis* C1 (9/10).
- d) Os perfis microbiológicos de ambas as condições são semelhantes, variando porém no número das espécies detectadas por canal sendo maior em dentes com lesão periapical;
- e) A reintervenção endodôntica reduziu bactérias e fungos específicos em ambos os grupos, não havendo diferenças nas coletas pós-PQM e pós-MIC;
- f) Foram encontradas associações entre determinadas espécies fúngicas e bacterianas com a presença de lesão periapical.

REFERÊNCIAS

Alberti A, Corbella S, Taschieri S, Francetti L, Fakhruddin KS, Samaranayake LP. Fungal species in endodontic infections: A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2021 Jul 22;16(7):e0255003. doi: 10.1371/journal.pone.0255003.

Al-Nuaimi N, Patel S, Davies A, Bakhsh A, Foschi F, Mannocci F. Pooled analysis of 1-year recall data from three root canal treatment outcome studies undertaken using cone beam computed tomography. Int Endod J. 2018;51:e216–26. doi: 10.1111/iej.12844.

Aw V. Discuss the role of microorganisms in the aetiology and pathogenesis of periapical disease. Aust Endod J. 2016;42:53–9. doi: 10.1111/aej.12159.

Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPFA. Quantification of Lipoteichoic Acid Contents and Cultivable Bacteria at the Different Phases of the Endodontic Retreatment. J Endod 2016;42:552–6. doi: 10.1016/j.joen.2016.01.002.

Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, de-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, de Almeida JFA, et al. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medication on infectious/inflammatory contents in teeth with post-treatment apical periodontitis. Clin Oral Investig. 2019 Jun;23(6):2759-66. doi: 10.1007/s00784-018-2719-0.

Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Mendes Louzada L, Rodrigues Lima A, Marciano M, Affonso de Almeida JF, De-Jesus-Soares A, et al. Microbiological Investigation in Teeth with Persistent/Secondary Endodontic Infection in Different Stages of Root Canal Retreatment. Eur Endod J. 2020 Dec;5(3):219-25. doi: 10.14744/eej.2020.73626.

Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, dos Santos DG, Andreote FD, Gomes BPFA. Microbiological analysis of endodontically treated teeth with apical periodontitis before and after endodontic retreatment. Clin Oral Investig. 2021 Apr;25(4):2017-27. doi: 10.1007/s00784-020-03510-2.

Basmaci F, Oztan MD, Kiyani M. Ex vivo evaluation of various instrumentation techniques and irrigants in reducing *E. faecalis* within root canals. Int Endod J. 2013;46:823–30. doi: 10.1111/iej.12067.

Baumgartner J, Watts C, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in Infections of Endodontic Origin. *J Endod*. 2000a;26:695–8. doi: 10.1097/00004770-200012000-00003.

Bicego-Pereira EC, Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, et al. Evaluation of the presence of microorganisms from root canal of teeth submitted to retreatment due to prosthetic reasons and without evidence of apical periodontitis. *Clin Oral Investig*. 2020;24:3243–54. doi: 10.1007/s00784-020-03200-z.

Biffi JC, Rodrigues HH. Ultrasound in endodontics: a quantitative and histological assessment using human teeth. *Endod Dent Traumatol*. 1989 Feb;5(1):55-62. doi: 10.1111/j.1600-9657.1989.tb00337.x.

Briggs PF, Scott BJ. Evidence-based dentistry: endodontic failure--how should it be managed? *Br Dent J*. 1997;183:159–64. doi: 10.1038/sj.bdj.4809455.

Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1983 Mar;55(3):307-12. doi: 10.1016/0030-4220(83)90333-x.

Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res*. 1981 Aug;89(4):321-8. doi: 10.1111/j.1600-0722.1981.tb01689.x.

Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J*. 1985 Jan;18(1):35-40. doi: 10.1111/j.1365-2591.1985.tb00416.x.

Bystrom A, Happonen R-P, Sjogren U, Sundqvist G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Dent Traumatol*. 1987;3:58–63. doi: 10.1111/j.1600-9657.1987.tb00543.x.

Cardoso FGR, Chung A, Martinho FC, Camargo CHR, Carvalho CAT, Gomes BPF, et al. Investigation of Bacterial Contents From Persistent Endodontic Infection and Evaluation of Their Inflammatory Potential. *Braz Dent J*. 2016;27:412-8. doi: 10.1590/0103-6440201600520.

Chávez de Paz LE, Dahlén G, Molander A, Möller Å, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J*. 2003;36:500–8. doi: 10.1046/j.1365- 2591.2003.00686.x.

Chen Z, Saxena D, Caufield PW, Ge Y, Wang M, Li Y. Development of species-specific primers for detection of *Streptococcus mutans* in mixed bacterial samples. *FEMS Microbiology Letters* 2007;272:154–62. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00756.x.

Chong BS, Pitt Ford TR. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J*. 1992 Mar;25(2):97-106. doi: 10.1111/j.1365-2591.1992.tb00743.x.

Chu C-H, Wong A, Zhang C. A systematic review of nonsurgical single-visit versus multiple-visit endodontic treatment. *Clin Cosmet Investig Dent*. 2014:45. doi: 10.2147/CCIDE.S61487.

Chugal NM, Clive JM, Spångberg LS. Endodontic infection: some biologic and treatment factors associated with outcome. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2003;96:81–90. doi: 10.1016/S1079- 2104(02)91703-8.

Dahlén G, Pipattanagovit P, Rosling B, Möller ÅJR. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol*. 1993;8:375–82. doi: 10.1111/j.1399-302X.1993.tb00614.x.

Dahlén G. Microbiology and treatment of dental abscesses and periodontal-endodontic lesions. *Periodontol 2000*. 2002;28:206–39. doi: 10.1034/j.1600-0757.2002.280109.x.

Danin J, Strömberg T, Forsgren H, Linder LE, Ramsköld LO. Clinical management of nonhealing periradicular pathosis. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 1996;82:213–7. doi: 10.1016/S1079- 2104(96)80259-9.

Davies A, Patel S, Foschi F, Andiappan M, Mitchell PJ, Mannocci F. The detection of periapical pathoses using digital periapical radiography and cone beam computed tomography in endodontically retreated teeth - part 2: a 1 year post- treatment follow-up. *Int Endod J*. 2016;49:623–35. doi: 10.1111/iej.12500.

Delboni MG, Gomes BPFA, Francisco PA, Teixeira FB, Drake D. Diversity of *Enterococcus faecalis* genotypes from multiple oral sites associated with endodontic failure using repetitive sequence-based polymerase chain reaction and arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Endod*. 2017;43:377–82. doi: 10.1016/j.joen.2016.10.042.

Distel J, Hatton J, Gillespie M. Biofilm formation in medicated root Canals. *J Endod*. 2002;28:689–93. doi: 10.1097/00004770-200210000-00003.

Donnelly SM, Sullivan DJ, Shanley DB, Coleman DC. Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. *Microbiology* 1999a;145:1871–82. doi: 10.1099/13500872-145-8-1871.

Endo MS, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPFA. Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31:2575–83. doi: 10.1007/s10096-012-1598-6.

Endo MS, Ferraz CCR, Zaia AA, Almeida JFA, Gomes BPFA. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. *Eur J Dent*. 2013;07:302–9. doi: 10.4103/1305-7456.115414.

Estrela C, Silva JA, Decurcio DA, Alencar AHG, Estrela CR, Faitaroni LA, et al. Monitoring nonsurgical and surgical root canal treatment of teeth with primary and secondary infections. *Braz Dent J*. 2014;25:494–501. doi: 10.1590/0103-6440201302437.

Fabricius L, Dahlén G, Sundqvist G, Happonen R-P, Möller ÅJR. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *Eur J Oral Sci*. 2006;114:278-85. doi: 10.1111/j.1600-0722.2006.00380.x.

Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun*. 2014 May;82(5):1968-81. doi: 10.1128/IAI.00087-14.

Feuille F, Ebersole JL, Kesavalu L, Stepfen MJ, Holt SC. Mixed infection with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in a murine lesion model: potential synergistic effects on virulence. *Infect Immun*. 1996;64:2094–100. doi: 10.1128/IAI.64.6.2094-2100.1996.

Francisco PA, Delboni MG, Lima AR, Xiao Y, Siqueira WL, Gomes BPFA. Proteomic profile of root canal contents in teeth with post-treatment endodontic disease. *Int Endod J*. 2019;52:451–60. doi: 10.1111/iej.13021.

Francisco PA, Fagundes PIG, Lemes-Junior JC, Lima AR, Passini MRZ, Gomes BPFA. Pathogenic potential of *Enterococcus faecalis* strains isolated from root canals after unsuccessful endodontic treatment. *Clin Oral Investig*. 2021 Sep;25(9):5171-9. doi: 10.1007/s00784-021-03823-w.

Friedman J, Yaniv Z, Dafni A, Palewitch D. A preliminary classification of the healing potential of medicinal plants, based on a rational analysis of an ethnopharmacological field survey among Bedouins in the Negev desert, Israel. *J Ethnopharmacol*. 1986 Jun;16(2-3):275-87. doi: 10.1016/0378-8741(86)90094-2.

Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Positive and negative associations between bacterial species in dental root canals. *Microbios*. 1994;80:231–43.

Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J*. 1994;27:291–8. doi: 10.1111/j.1365-2591.1994.tb00271.x.

Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dent* 1996;24:47–55. doi: 10.1016/0300-5712(95)00042-9.

Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J*. 1996;29:235–41. doi: 10.1111/j.1365-2591.1996.tb01375.x.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004;19:71–6. doi: 10.1046/j.0902-0055.2003.00116.x.

Gomes BPFA, Griffen AL, Kummar PS, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, et al. Molecular and culture analysis of bacteria in infected root canals. *J Dent Res*. 2004;83:1040.

Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20:211–5. doi: 10.1111/j.1399-302X.2005.00214.x.

Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. Molecular Analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola* Associated With Primary Endodontic Infections and Failed Endodontic Treatment. *J Endod*. 2006a;32:937–40. doi: 10.1016/j.joen.2006.05.003.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006b;102:247–53. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.11.031.

Gomes BPFA, Montagner F, Jacinto R, Zaia A, Ferraz C, Souza-Filho F. Polymerase Chain Reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in Primary Endodontic Infections. *J Endod*. 2007;33:1049–52. doi: 10.1016/j.joen.2007.05.017.

Gomes BPFA, Montagner F, Jacinto RC, Pinheiro ET, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. *Gemella morbillorum* in primary and secondary/persistent endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008a;105:519–25. doi: 10.1016/j.tripleo.2007.10.005.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod* 2008b;34:537–40. doi: 10.1016/j.joen.2008.01.016.

Gomes BPFA, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, de Almeida JFA, et al. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent*. 2009;37:76–81. doi: 10.1016/j.jdent.2008.09.009.

Gomes BPFA, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JFA, Souza-Filho FJ, Ferraz CCR. Chlorhexidine in Endodontics. *Braz Dent J*. 2013;24:89–102. doi: 10.1590/0103-6440201302188.

Gomes BPFA, Berber VB, Kokaras AS, Chen T, Paster BJ. Microbiomes of Endodontic-Periodontal Lesions before and after Chemomechanical Preparation. *J Endod.* 2015;41:1975–84. doi: 10.1016/j.joen.2015.08.022.

Gomes BPFA, Herrera DR. Etiologic role of root canal infection in apical periodontitis and its relationship with clinical symptomatology. *Braz Oral Res.* 2018;32. doi: 10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0069.

Haapasalo M. *Bacteroides* spp. in dental root canal infections. *Dent Traumatol.* 1989;5:1–10. doi: 10.1111/j.1600-9657.1989.tb00330.x.

Hancock HH, 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;91:579–86. doi: 10.1067/moe.2001.113587.

Haynes KA, Westerneng TJ. Rapid identification of *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. krusei* by species-specific PCR of large subunit ribosomal DNA. *J Med Microbiol.* 1996b;44:390–6. doi: 10.1099/00222615-44-5-390.

Hepworth MJ, Friedman S. Treatment outcome of surgical and non-surgical management of endodontic failures. *J Can Dent Assoc.* 1997;63:364–71.

Holland R, Valle GF, Taintor JF, Ingle JI. Influence of bony resorption on endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1983;55:191–203. doi: 10.1016/0030-4220(83)90178-0.

Horiuchi A, Kokubu E, Warita T, Ishihara K. Synergistic biofilm formation by *Parvimonas micra* and *Fusobacterium nucleatum*. *Anaerobe.* 2020;62:102100. doi: 10.1016/j.anaerobe.2019.102100.

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;33:1278–82. doi: 10.1016/j.joen.2007.07.018.

Jacinto RC, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Filho FJS. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18:285–92. doi: 10.1034/j.1399-302X.2003.00078.x.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germfree and conventional laboratory rats. *J South Calif Dent Assoc.* 1966 Sep;34(9):449-51.

Kang Y, Iida S, Yamamoto S, Kogure T, Tanaka R, Mikami Y. Trf4 is a useful gene for discrimination of *Candida tropicalis* from other medically important *Candida* species. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2008a;49:39–43. doi: 10.3314/jjmm.49.39.

Kerekes K, Tronstad L. Long-term results of endodontic treatment performed with a standardized technique. *J Endod.* 1979;5:83–90. doi: 10.1016/S0099-2399(79)80154-5.

Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore L V. Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. *Infect Immun.* 1989;57:3194–203. doi: 10.1128/IAI.57.10.3194-3203.1989.

Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2003;82:338–44. doi: 10.1177/154405910308200503.

Kvist T, Reit C. Results of endodontic retreatment: a randomized clinical study comparing surgical and nonsurgical procedures. *J Endod.* 1999;25:814–7. doi: 10.1016/S0099-2399(99)80304-5.

Landys Borén D, Jonasson P, Kvist T. Long-term survival of endodontically treated teeth at a public dental specialist clinic. *J Endod.* 2015;41:176–81. doi: 10.1016/j.joen.2014.10.002.

Laukkanen E, Vehkalahti MM, Kotiranta AK. Radiographic outcome of root canal treatment in general dental practice: tooth type and quality of root filling as prognostic factors. *Acta Odontol Scand.* 2021;79:37–42. doi: 10.1080/00016357.2020.1773531.

Lima AR, Herrera DR, Francisco PA, Pereira AC, Lemos J, Abranches J, et al. Detection of *Streptococcus mutans* in symptomatic and asymptomatic infected root canals. *Clin Oral Investig.* 2021 Jun;25(6):3535-42. doi: 10.1007/s00784-020-03676-9.

Louzada LM, Arruda-Vasconcelos R, Duque TM, Casarin RCV, Feres M, Gomes BPFA. Clinical investigation of microbial profile and levels of endotoxins and lipoteichoic acid at different phases of the endodontic treatment in teeth with vital pulp and associated periodontal disease. *J Endod.* 2020;46:736–47. doi: 10.1016/j.joen.2020.02.005.

Maniglia-Ferreira C, Silva JBA, de Paula RCM, Feitosa JPA, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. Degradation of trans-polyisoprene over time following the analysis of root fillings removed during conventional retreatment. *Int Endod J.* 2007;40:25–30. doi: 10.1111/j.1365-2591.2006.01172.x.

Marinho ACS, Martinho FC, Gonçalves LM, Rabang HRC, Gomes BPFA. Does the Reciproc file remove root canal bacteria and endotoxins as effectively as multifile rotary systems? *Int Endod J.* 2015;48:542–8. doi: 10.1111/iej.12346.

Martinho FC, Chiesa WMM, Leite FRM, Cirelli JA, Gomes BPFA. antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1 β and tumor necrosis factor α . *J Endod.* 2010;36:1467–74. doi: 10.1016/j.joen.2010.06.012.

Martinho FC, Freitas LF, Nascimento GG, Fernandes AM, Leite FRM, Gomes APM, et al. Endodontic retreatment: clinical comparison of reciprocating systems versus rotary system in disinfecting root canals. *Clin Oral Investig.* 2015;19:1411–7. doi: 10.1007/s00784-014-1360-9.

Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998;31:1–7. doi: 10.1046/j.1365-2591.1998.t01-1-00111.x.

Moller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Methodological studies.* *Odontol Tidskr.* 1966;20:1–380. doi: 5335186.

Möller ÅJR, Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Eur J Oral Sci.* 1981;89:475–84. doi: 10.1111/j.1600-0722.1981.tb01711.x.

Moreno JO, Alves FRF, Gonçalves LS, Martinez AM, Rôças IN, Siqueira JF. Periradicular status and quality of root canal fillings and coronal restorations in an urban colombian population. *J Endod.* 2013;39:600–4. doi: 10.1016/j.joen.2012.12.020.

Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res*. 2002;81:761–6. doi: 10.1177/0810761.

Nair PNR, 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;87:617–27. doi: 10.1016/S1079-2104(99)70145-9.

Ng Y-L, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part 1: periapical health. *Int Endod J*. 2011;44:583–609. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01872.x.

Nóbrega LMM, Delboni MG, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BPFA. *Treponema* diversity in root canals with endodontic failure. *Eur J Dent*. 2013;7:61–8.

Patel S, Brown J, Semper M, Abella F, Mannocci F. European Society of Endodontology position statement: use of cone beam computed tomography in Endodontics. *Int Endod J*. 2019;52:1675–8. doi: 10.1111/iej.13187.

Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J*. 2001;34:429–34. doi: 10.1046/j.1365-2591.2001.00411.x.

Pereira RS, Rodrigues VAA, Furtado WT, Gueiros S, Pereira GS, Avila-Campos MJ. Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth with endodontic failure. *Anaerobe*. 2017;48:12–8. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.06.016.

Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. *Int Endod J*. 2002;35:698–702. doi: 10.1046/j.1365-2591.2002.00550.x.

Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*. 2003a;36:1–11. doi: 10.1046/j.1365-2591.2003.00603.x.

Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol*. 2003b;18:100–3. doi: 10.1034/j.1399-302X.2003.00058.x.

Pourhajibagher M, Ghorbanzadeh R, Bahador A. Culture-dependent approaches to explore the prevalence of root canal pathogens from endodontic infections. *Braz Oral Res.* 2017 Dec 18;31:e108. doi: 10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0108.

Prada I, Mico-Munoz P, Giner-Lluesma T, Mico-Martinez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2019:e364–72. doi: 10.4317/medoral.22907.

Rahimi S, Janani M, Lotfi M, Shahi S, Aghbali A, Vahid Pakdel M, et al. A review of antibacterial agents in endodontic treatment. *Iran Endod J.* 2014;9:161–8.

Ray HA, Trope M. Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration. *Int Endod J.* 1995;28:12–8. doi: 10.1111/j.1365-2591.1995.tb00150.x.

Ricucci D, Siqueira JF. 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. doi: 10.1016/j.joen.2008.06.002.

Ricucci D, Siqueira JF, 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;35:493–502. doi: 10.1016/j.joen.2008.12.014.

Ricucci D, Siqueira JF. Recurrent apical periodontitis and late endodontic treatment failure related to coronal leakage: a case report. *J Endod.* 2011;37:1171–5. doi: 10.1016/j.joen.2011.05.025.

Rocas I, Siqueirajr J, Santos K. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004;30:315–20. doi: 10.1097/00004770-200405000-00004.

Rôças IN, Hülsmann M, Siqueira JF. microorganisms in root canal-treated teeth from a german population. *J Endod.* 2008;34:926–31. doi: 10.1016/j.joen.2008.05.008.

Rôças IN, Siqueira JF. Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. *J Endod.* 2011;37:143–50. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.006.

Rocas IN, Siqueira JF. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. *J Clin Microbiol*. 2012;50:1721–4. doi: 10.1128/JCM.00531-12.

Rôças IN, Provenzano JC, Neves MAS, Siqueira JF. Disinfecting effects of rotary instrumentation with either 2.5% sodium hypochlorite or 2% chlorhexidine as the main irrigant: a randomized clinical study. *J Endod*. 2016;42:943–7. doi: 10.1016/j.joen.2016.03.019.

Rumpf RW, Griffen AL, Wen B-G, Leys EJ. Sequencing of the ribosomal intergenic spacer region for strain identification of *porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol*. 1999;37:2723–5. doi: 10.1128/JCM.37.8.2723-2725.1999.

Sakamoto M, Rocas IN, Siqueira JF, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21:112–22. doi: 10.1111/j.1399-302X.2006.00270.x.

Sakamoto M, Siqueira Jr JF, Rôças IN, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23:275–81. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00423.x.

Sánchez-Sanhueza G, Bello-Toledo H, González-Rocha G, Gonçalves AT, Valenzuela V, Gallardo-Escárate C. Metagenomic study of bacterial microbiota in persistent endodontic infections using Next-generation sequencing. *Int Endod J*. 2018;51:1336–48. doi: 10.1111/iej.12953.

Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. *Dent Clin North Am*. 1974 Apr;18(2):269-96.

Schirrmeister JF, Liebenow A-L, Pelz K, Wittmer A, Serr A, Hellwig E, et al. New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions. *J Endod*. 2009;35:169–74. doi: 10.1016/j.joen.2008.10.024.

Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod*. 2006;32:104–9. doi: 10.1016/j.joen.2005.10.022.

Semenoff-Segundo A, Kuga MC, Tonetto MR, Pedro FM, Marques A, Pereira TM, et al. Status of endodontic treatment and the correlations to the quality of root canal filling and coronal restoration. *J Contemp Dent Pract*. 2016;17:830–6. doi: 10.5005/jp-journals-10024-1939.

Shetty K, Habib Va, Shetty Sv, Khed J, Prabhu V. An assessment of coronal leakage of permanent filling materials in endodontically treated teeth: An in vitro study. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015;7:607. doi: 10.4103/0975-7406.163566.

Singh A, Goering R V., Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19:512–30. doi: 10.1128/CMR.00025-05.

Singh KK, Kumar P, Das P, Marandi M, Panda S, Mahajan A, Kumar D. Association of specific microorganisms with endodontic signs and symptoms. A comparative study. *J Family Med Prim Care*. 2020 Aug 25;9(8):3965-3969. doi: 10.4103/jfmpc.jfmpc_523_20.

Siqueira JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J*. 2001;34:1–10. doi: 10.1046/j.1365-2591.2001.00396.x.

Siqueira JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radidentis* in primary and persistent endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;96:215–22. doi: 10.1016/S1079-2104(03)00158-6.

Siqueira JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction–based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;97:85–94. doi: 10.1016/S1079-2104(03)00353-6.

Siqueira JF, Rocas IN. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. *J Clin Microbiol*. 2005;43:3314–9. doi: 10.1128/JCM.43.7.3314-3319.2005.

Siqueira JF, Rôças IN, Alves FRF, Campos LC. Periradicular status related to the quality of coronal restorations and root canal fillings in a Brazilian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;100:369–74. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.03.029.

Siqueira JF, Rôças IN, Ricucci D, Hülsmann M. Causes and management of post-treatment apical periodontitis. *Br Dent J.* 2014;216:305–12. doi: 10.1038/sj.bdj.2014.200.

Siqueira JF, Antunes HS, Rôças IN, Rachid CTCC, Alves FRF. Microbiome in the apical root canal system of teeth with post-treatment apical periodontitis. *PLoS One.* 2016;11:e0162887. doi: 10.1371/journal.pone.0162887.

Siren EK, Haapasalo MPP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo ENJ. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J.* 1997;30:91–5. doi: 10.1046/j.1365-2591.1997.00057.x.

Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod.* 1990 Oct;16(10):498-504. doi: 10.1016/S0099-2399(07)80180-4.

Sjögren U, Figdor D, Spångberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J.* 1991 May;24(3):119-25. doi: 10.1111/j.1365-2591.1991.tb00117.x.

Socransky SS, Gibbons RJ, Dale AC, Bortnick L, Rosenthal E, Macdonald JB. The microbiota of the gingival crevice area of man—I. *Arch Oral Biol.* 1963;8:275–80. doi: 10.1016/0003-9969(63)90019-0.

Song Y. PCR-based diagnostics for anaerobic infections. *Anaerobe.* 2005 Feb-Apr;11(1-2):79-91. doi: 10.1016/j.anaerobe.2004.10.006.

Song M, Park M, Lee C-Y, Kim E. Periapical Status Related to the Quality of Coronal Restorations and Root Fillings in a Korean Population. *J Endod.* 2014;40:182–6. doi: 10.1016/j.joen.2013.10.017.

Sousa ELR, Martinho FC, Nascimento GG, Leite FRM, Gomes BPF. Quantification of endotoxins in infected root canals and acute apical abscess exudates: monitoring the effectiveness of root canal procedures in the reduction of endotoxins. *J Endod.* 2014;40:177–81. doi: 10.1016/j.joen.2013.10.008.

Spratt DA. Significance of bacterial identification by molecular biology methods. *Endod Topics.* 2004;9:5-14.

Stuart C, Schwartz S, Beeson T, Owatz C. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod. 2006;32:93–8. doi: 10.1016/j.joen.2005.10.049.

Sunde P, Olsen I, Debelian G, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. J Endod. 2002;28:304–10. doi: 10.1097/00004770-200204000-00011.

Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. J Endod. 1992;18:427–30. doi: 10.1016/S0099-2399(06)80842-3.

Sundqvist G, Reuterving C-O. Isolation of *Actinomyces israelii* from periapical lesion. J Endod. 1980;6:602–6. doi: 10.1016/S0099-2399(80)80021-5.

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. doi: 10.1016/S1079-2104(98)90404-8.

Swartz DB, Skidmore AE, Griffin JA. Twenty years of endodontic success and failure. J Endod. 1983;9:198–202. doi: 10.1016/S0099-2399(83)80092-2.

Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. Int Endod J. 1998 Sep;31(5):311-25. doi: 10.1046/j.1365-2591.1998.00171.x.

Than LTL, Chong PP, Ng KP, Seow HF. Detection of 10 medically important *Candida* species by seminested polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;72:196–8. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.10.008.

Thienngern P, Panichuttra A, Ratisoontorn C, Aumnate C, Matangkasombut O. Efficacy of chitosan paste as intracanal medication against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilm compared with calcium hydroxide in an in vitro root canal infection model. BMC Oral Health. 2022 Aug 16;22(1):354. doi: 10.1186/s12903-022-02385-x.

Tian H, Feng C, Zhao J, Liu L. [Evaluation of dental operating microscope and ultrasonic technique in root canal retreatment]. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2008 Oct;26(5):509-12. Chinese.

Torabinejad M, Corr R, Handysides R, Shabahang S. Outcomes of nonsurgical retreatment and endodontic surgery: a systematic review. *J Endod*. 2009;35:930–7. doi: 10.1016/j.joen.2009.04.023.

Tronstad L, Asbjørnsen K, Døving L, Pedersen I, Eriksen HM. Influence of coronal restorations on the periapical health of endodontically treated teeth. *Dent Traumatol*. 2000;16:218–21. doi: 10.1034/j.1600-9657.2000.016005218.x.

van der Borden WG, Wang X, Wu M-K, Shemesh H. Area and 3-dimensional volumetric changes of periapical lesions after root canal treatments. *J Endod*. 2013;39:1245–9. doi: 10.1016/j.joen.2013.07.001.

Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;97:79–84. doi: 10.1016/s1079-2104(03)00360-3.

Vianna ME, Horz H-P, Gomes BPFA, Conrads G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20:253–8. doi: 10.1111/j.1399-302X.2005.00221.x.

Villanueva LECP. *Fusobacterium nucleatum* in endodontic flare-ups. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;93:179–83. doi: 10.1067/moe.2002.120803.

Waltimo TM, Sirén EK, Torkko HL, Olsen I, Haapasalo MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J*. 1997 Mar;30(2):96-101. doi: 10.1046/j.1365-2591.1997.00058.x.

Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod*. 2012;38:1376–9. doi: 10.1016/j.joen.2012.06.035.

West J. Endodontic Update 2006. *J Esthet Restor Dent*. 2006;18:280–300. doi: 10.1111/j.1708-8240.2006.00039.x.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols*. Elsevier; 1990, p. 315–22. doi: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.

Zandi H, Kristoffersen AK, Ørstavik D, Rôças IN, Siqueira JF, Enersen M. Microbial analysis of endodontic infections in root-filled teeth with apical periodontitis before and after irrigation using pyrosequencing. *J Endod.* 2018;44:372–8. doi: 10.1016/j.joen.2017.11.019.

Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and persistent intraradicular infection compared with primary intraradicular infection: a systematic review. *J Endod.* 2015;41:1207–13. doi: 10.1016/j.joen.2015.04.008.

Zuolo AS, Mello JE, Cunha RS, Zuolo ML, Bueno CES. Efficacy of reciprocating and rotary techniques for removing filling material during root canal retreatment. *Int Endod J.* 2013;46:947–53. doi: 10.1111/iej.12085.

Zuolo ML, Zaia AA, Belladonna FG, Silva EJNL, Souza EM, Versiani MA, et al. Micro-CT assessment of the shaping ability of four root canal instrumentation systems in oval-shaped canals. *Int Endod J.* 2018 May;51(5):564-71. doi: 10.1111/iej.12810.

ANEXOS

Anexo 1 – Verificação de Originalidade e Prevenção de Plágio

PEDRO IVO DA GRACA FAGUNDES- FINAL

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE



FONTES PRIMÁRIAS

1	repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	16%
2	www.arca.fiocruz.br Fonte da Internet	2%

Excluir citações	Desligado	Excluir correspondências	< 1%
Excluir bibliografia	Desligado		

Anexo 2 - Comitê de Ética em Pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Investigação microbiológica e de seus fatores de virulência nas diferentes patologias pulpares e perirradiculares e sua interação com o sistema imunológico inato"**, CAAE **48374615.7.0000.5418**, dos pesquisadores **Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Priscila Amanda Francisco, Augusto Rodrigues Lima, Pedro Ivo da Graça Fagundes, João Carlos Leme Junior, Eloá Cristina Bicego Pereira e Rafaela Casadei Chapola**, satisfaz as exigências das resoluções específicas sobre ética em pesquisa com seres humanos do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde e foi aprovado por este comitê em 21/10/2015 (projeto original), em 30/01/2018 (primeira emenda) e em 07/05/2018 (segunda emenda).

The Research Ethics Committee of the Piracicaba Dental School of the University of Campinas (FOP-UNICAMP) certifies that research project **"Microbiological and virulence factors investigation in different pulp and periradicular pathologies and their interaction with innate immune system"**, CAAE **48374615.7.0000.5418**, of the researcher's **Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Priscila Amanda Francisco, Augusto Rodrigues Lima, Pedro Ivo da Graça Fagundes, João Carlos Leme Junior, Eloá Cristina Bicego Pereira and Rafaela Casadei Chapola**, meets the requirements of the specific resolutions on ethics in research with human beings of the National Health Council - Ministry of Health, and was approved by this committee on 10/21/2015 (original project), on 01/30/2018 (first amendment) and on 05/07/2018 (second amendment).

Profa. Fernanda Miori Pascon

Vice Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Jacks Jorge Junior

Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo e a lista de autores aparecem como fornecidos pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title and the list of researchers of the project appears as provided by the authors, without editing.