



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ANA BEATRIZ SAFADY LOPES

**COMPARAÇÃO DA MICROBIOTA, FATORES
DE VIRULÊNCIA E NÍVEIS DE CORTISOL EM
DENTES COM PULPITE IRREVERSÍVEL
SINTOMÁTICA E POLPA NORMAL**

Piracicaba
2023

ANA BEATRIZ SAFADY LOPES

Comparação da microbiota, fatores de virulência e níveis de cortisol em dentes com pulpite irreversível sintomática e polpa normal

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Brenda Paula

Figueiredo de Almeida Gomes

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA ANA BEATRIZ
SAFADY LOPES E ORIENTADA PELA
PROF^a. DR^a. BRENDA PAULA FIGUEIREDO
DE ALMEIDA GOMES

Piracicaba
2023

FICHA CATALOGRÁFICA

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

L881c Lopes, Ana Beatriz Safady, 1995-
Comparação da microbiota, fatores de virulência e níveis de cortisol em dentes com pulpite irreversível sintomática e polpa normal / Ana Beatriz Safady Lopes. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2023.

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

1. Bactérias. 2. Endodontia. 3. Inflamação. 4. Pulpite. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Comparison of microbiota, virulence factors and cortisol levels in teeth with symptomatic irreversible pulpitis and normal pulp

Palavras-chave em inglês:

Bacteria

Endodontics

Inflammation

Pulpitis

Área de concentração: Endodontia

Titulação: Mestra em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes [Orientador]

Marina Angélica Marciano da Silva

Rodrigo Arruda Vasconcelos

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/0000-0003-3750-4835>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7788422299581725>



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 a candidata ANA BEATRIZ SAFADY LOPES aprovada.

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

PROF. DR. RODRIGO ARRUDA VASCONCELOS

PROF^ª. DR^ª. MARINA ANGÉLICA MARCIANO DA SILVA

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 à minha mãe, Yara, por sempre me apoiar em todas as minhas decisões profissionais e pessoais. Você é minha maior inspiração de força, dedicação e amor.

Dedico também ao meu pai, Paulo, que sempre se fez presente e me motivou quando falava o quanto se orgulhava de mim. Obrigada por acompanhar essa trajetória de perto e com muito amor.

A minha irmã Julia, que não mede esforços para sempre estar presente na minha rotina mesmo de longe. Com mensagens e demonstrações de carinho que fizeram toda a diferença.

E a minha família, por toda a demonstração de carinho e auxílio durante este período, sem vocês esse sonho não seria possível.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha querida orientadora Prof^a Dr^a Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes. É um privilégio ser sua aluna desde a Graduação e poder aprender todos os dias algo novo e desafiador. Agradeço por todo o apoio, auxílio, e dedicação.

Obrigada por aceitar me orientar e proporcionar momentos incríveis, tanto pessoais como profissionais, ao longo do meu mestrado.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual de Campinas** na pessoa de seu magnífico reitor Prof. Dr. **Marcelo Knobel** e à sua **Faculdade de Odontologia**, 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 ao Prof. Dr. **Valentim Adelino Ricardo Barão**, coordenador do Programa de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP e 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, Prof^ª. Dra. Mariana Angélica Marciano da Silva, por todo o apoio e ensino durante a minha trajetória acadêmica.

Aos funcionários Maria Helídia Neves Pereira, Janaína Leite e Andre Fernando dos Santos por estarem sempre presentes e me ajudarem.

À funcionária Ana Godoy, na nossa rotina do laboratório aprendi com você a levar nosso dia com gratidão, felicidade e amizade.

Ao funcionário e amigo Maicon Ricardo Zieberg Passini, obrigada por sempre se dispor a ajudar e ensinar, minha eterna gratidão pela amizade e pelos ensinamentos.

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.

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

Aos colegas de mestrado da Endodontia, David Saldanha de Brito Alencar, Leandro Bueno Gobbo, Leticia Tank Oliveira e Pedro Ivo da Graça Fagundes. É muito gratificante evoluir junto com vocês ao longo destes anos.

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.

Ao meu co-orientador de iniciação científica Augusto Rodrigues Lima, você foi inspiração direta na minha escolha em seguir carreira acadêmica, muito obrigada por me fazer evoluir ao longo de todos esses anos.

À pós-doutoranda Erica Mendes Lopes, obrigada por todo o carinho, amizade, conselhos pessoais e profissionais e sempre mostrando o valor de uma boa amizade.

Às minhas amigas de infância Anna Gurdzha, Beatriz Batello, Mayra Sanmiguel, Poliana Silveira e Thais Gomes, vocês são significado de saudade e amor.

Aos meus amigos de Faculdade Ana Carla Pasquini, Amanda Farhat, Alexa Nicole Guerrero, Caio Hashizume, Daniel Maruki, João Pedro Marcatto, Bruno Cazoti, Gabriela Campos, Marcela Lazarini, Mayara Silva, Vanessa Germano e Wilian Segatto por acreditarem em mim e participarem desse processo com momentos especiais de reencontros durante estes anos.

Aos meus primos Amanda Safady, Aline Safady, Luisa Safady, Mayra Safady, Luis Safady, Jorge Safady e Murieli de Paula pela presença e compartilhar um sentimento de família e carinho.

Ao meu colega de mestrado Pedro Ivo da Graça Fagundes em sempre estar presente desde 2014, espero que nossa amizade dure por muitos e infinitos anos, obrigada pela parceria.

Ao meu colega do doutorado Ederaldo Pietrafesa pela amizade que só cresceu durante estes dois anos, sempre me apoiando, aconselhando e vivendo bons momentos juntos.

A todos os pacientes que colaboraram com minha pesquisa, o estudo só foi possível devido a eles.

Aos professores que participaram da minha banca de qualificação, Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto, Prof. Dr. Felipe Nogueira Anacleto e Profa. Dra. Erica Mendes Lopes, foi essencial as sugestões e questionamentos sobre o meu projeto, com toda a certeza evolui e aprendi com todos.

Aos professores: Prof^a.Dr^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Prof^a. Dr^a. Marina Angélica Marciano da Silva, Prof. Dr. Rodrigo Arruda - Vasconcelos, Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida e Prof. Dr. Augusto Rodrigues Lima, por aceitarem participar da minha banca da defesa da dissertação de Mestrado. Minha eterna gratidão a cada um de vocês por acrescentarem sugestões relevantes e importantes no trabalho. Muito obrigada por aceitarem participar desse dia tão especial que sem vocês não seria possível.

À Deus, obrigada por me dar fé, gratidão e perseverança nessa jornada tão sonhada e poder presenciar momentos tão especiais nessa vida.

A todos que estiveram me apoiando com carinho durante este jornada, meus agradecimentos.

RESUMO

A cárie é uma doença infectocontagiosa de caráter multifatorial que pode acarretar danos severos a polpa dentária. Lesões profundas de cárie podem resultar em um aumento significativo na densidade dos vasos sanguíneos, inflamação pulpar e conseqüentemente, em uma pulpite irreversível (PI). Além disso, a dor de origem pulpar é frequentemente relatado nestes casos, o cortisol é considerado um biomarcador preciso em pesquisas para medir estas condições. Bactérias Gram-positivas são normalmente encontradas nestas situações e apresentam um componente em sua parede celular conhecido como ácido lipoteicóico – LTA. No caso das Bactérias Gram-negativas, seu principal componente celular é o lipopolissacarídeo (LPS), conhecido como uma endotoxina capaz de realizar destruição tecidual indireta através de diferentes mediadores químicos. Leveduras do gênero *Candida* também estão presentes no grupo de microrganismos associados à formação de biofilmes na cavidade oral. Este estudo teve como objetivo: 1) Avaliar por métodos moleculares a presença de espécies bacterianas e fúngicas, presentes na pulpite irreversível sintomática. 2) Monitorar os níveis de LPS, LTA e cortisol. Foram coletadas 10 amostras de cárie (C1), iniciais (C2), pós preparo químico mecânico (C3) e pós medicação intracanal(C4) de pacientes com diagnóstico de PI e 10 amostras iniciais, pós preparo químico mecânico e pós medicação intracanal do grupo controle constituído de polpas normais(PN). A quantificação de ácido lipoteicóico (LTA) e endotoxinas (LPS) foi realizada respectivamente, pelos métodos do ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked immunosorbent Assay- ELISA) e método turbidimétrico (LAL Pyrogent 5000). Além disso, também foram analisados os níveis de cortisol através do teste de ELISA. Após a realização e processamento dos dados, estes foram tabulados e a análise estatística realizada com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os resultados, em relação ao grupo PI, mostraram que bactérias e fungos foram detectados em 100% nas coletas C1 e C2 através do Nested PCR. As espécies mais encontradas nas coletas de cárie foram, *Candida glabrata*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *Candida tropicalis* e *Candida dubliniensis*. Nas coletas iniciais (C2), as espécies mais prevalentes foram *Enterococcus faecalis*, *Prevotella nigrescens*, *Candida tropicalis* e *Candida dubliniensis*. Associações estatisticamente significantes entre bactérias específicas em conjunto no interior do canal radicular foram encontradas ($p < 0,05$). Níveis de cortisol nas amostras iniciais foram superiores ($2,96 \pm 1,18 \mu\text{g/dL}$) quando comparado entre preparo químico-mecânico e medicação intracanal que não revelaram diferença estatística entre os grupos. Em relação aos níveis de LPS e LTA, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre C2 e C3. Concluiu-se dentes com PI apresentam microbiota diversificado com redução nos níveis de LPS e LTA pós-PQM. No caso de dentes com Polpa Vital Normal (PN) não foi identificado bactérias e fungos específicos, porém detectou-se níveis inferiores de LPS, LTA e cortisol quando comparado com a pulpite irreversível.

Palavras-chave: Bactérias. Endodontia. Inflamação. Pulpite

ABSTRACT

Caries is a multifactorial infectious disease that can cause severe damage to the dental pulp. Deep carious lesions can result in a significant increase in the density of blood vessels, pulpal inflammation and, consequently, irreversible pulpitis. In addition, pulpal pain is often reported in these cases, cortisol is considered an accurate biomarker in research to measure these conditions. Gram-positive bacteria are normally found in these situations and have a component in their cell wall known as lipoteichoic acid – LTA. The Gram-negative bacteria have the main cellular component denominated lipopolysaccharide (LPS), known as an endotoxin capable of indirect tissue destruction through different chemical mediators. Yeasts of the genus *Candida* are also present in the group of microorganisms associated with the formation of biofilms in the oral cavity. This project aimed to 1) Analyze and quantify the different microbial, bacterial and fungal types present in symptomatic irreversible pulpitis through molecular methods; 2) Monitor LPS, LTA and cortisol levels. 10 caries samples were collected (C1), initial (C2), after mechanical chemical preparation (C3) and after intracanal medication (C4) from patients diagnosed with irreversible pulpitis (IP) and 10 initial samples, after mechanical chemical preparation and after intracanal medication from the control group consisting of normal pulps (NP). The quantification of lipoteichoic acid (LTA) and endotoxins (LPS) was performed, respectively, by immunoenzymatic assay methods (Enzyme-Linked immunosorbent Assay-ELISA) and the turbidimetric method (LAL Pyrogen 5000). In addition, cortisol levels were also analyzed using the test of ELISA. After the realization and processing of the data, these were tabulated, and the statistical analysis performed. The significance level was set at 5% ($P < 0.05$). The results, in relation to the PI group, showed that bacteria and fungi were detected in 100% of the C1 and C2 collections through Nested PCR. The most common species found in caries samples were *Candida glabrata*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis*. In the initial collections (C2), the most prevalent species were *Enterococcus faecalis*, *Prevotella nigrescens*, *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis*. Statistically significant associations between specific bacteria together within the root canal were found ($p < 0.05$). Cortisol levels in the initial samples were higher ($2.96 \pm 1.18 \mu\text{g/dL}$) when compared between chemical-mechanical preparation and intracanal medication, which did not reveal statistical difference between groups. Regarding LPS and LTA levels, there was a significant difference ($p < 0.05$) between C2 and C3. It was concluded that teeth with PI have a diversified microbiota with a reduction in post-PQM LPS and LTA levels. In teeth with Normal Vital Pulp (NP), specific bacteria and fungi were not identified, but lower levels of LPS, LTA and cortisol were detected when compared to irreversible pulpitis.

Keywords: Bacteria. Endodontics. Inflammation. Pulpitis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Tabela 1 - Tipos de coleta e armazenamento das amostras de microrganismos e seus fatores de virulências nas diferentes etapas do tratamento endodôntico.
- Quadro 1 - Sequências dos primers bacterianos espécie-específico que foram utilizados nas reações de PCR
- Quadro 2 - Primers para detecção de *Candida* por Nested -PCR
- Tabela 2 - Diluição da solução de endotoxina de *E. coli* para a determinação da curva padrão
- Tabela 3 - Descrição das características clínicas detectadas nos pacientes pertencentes ao grupo de pulpíte irreversível sintomática
- Tabela 4 - Descrição das características clínicas detectadas nos pacientes pertencentes ao grupo de polpa normal
- Tabela 5 - Perfil geral e dados clínicos de pacientes diagnosticados com pulpíte irreversível e polpa vital
- Tabela 6 - Distribuição de frequência e porcentagem dos casos de pulpíte irreversível em função do número de microrganismos detectados em lesões cariosas conjuntamente no mesmo paciente através do Nested-PCR
- Tabela 7 - Distribuição de frequência e porcentagem dos casos de pulpíte irreversível em função do número de microrganismos detectados em amostras iniciais conjuntamente no mesmo paciente através do Nested-PCR
- Tabela 8 - Distribuição de frequência e porcentagem de bactérias detectadas em lesões cariosas dos casos de pulpíte irreversível em função da coloração de Gram
- Tabela 9 - Distribuição de frequência e porcentagem de bactérias detectadas em amostras iniciais dos casos de pulpíte irreversível em função da

coloração de Gram

- Figura 1 - Frequência de detecção dos primers testados (espécies bacterianas) no grupo pulpíte irreversível durante as diferentes etapas do tratamento endodôntico
- Figura 2 - Frequência de detecção dos primers testados (espécies fúngicas) no grupo pulpíte irreversível durante as diferentes etapas do tratamento endodôntico
- Tabela 10 - Frequência e porcentagem dos resultados positivos obtidos no grupo de pulpíte irreversível detectados através do Nested-PCR nos diferentes tempos de coleta
- Tabela 11 - Correlações positivas entre a presença de bactérias nas amostras iniciais
- Tabela 12 - Média e desvio padrão dos níveis de cortisol nos diferentes tempos de coleta no grupo da pulpíte irreversível.
- Tabela 13 - Média e desvio padrão dos níveis de cortisol nos diferentes tempos de coleta no grupo da polpa vital normal
- Tabela 14 - Média e desvio padrão dos níveis de endotoxinas(Eu/mL) nos diferentes tempos de coleta no grupo da pulpíte irreversível.
- Tabela 15 - Mediana, mínima e máximo dos níveis de endotoxinas nos diferentes tempos de coleta no grupo de polpa vital normal
- Tabela 16 - Média e desvio padrão dos níveis de ácido lipoteicóico nos diferentes tempos de coleta no grupo da pulpíte irreversível.
- Tabela 17 - Média e desvio padrão dos níveis de ácido lipoteicóico nos diferentes tempos de coleta no grupo da polpa vital normal
- Figura 3 - Média e desvio-padrão dos níveis de LTA nos diferentes tempos de coleta nos dois grupos estudados

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 O mecanismo da doença cárie e inflamação pulpar	20
2.2 Dor de origem pulpar em relação ao estresse e nível de cortisol	22
2.3 Espécies bacterianas associados com a inflamação pulpar.	24
2.3.1 Fatores de virulência associados com a inflamação pulpar	26
2.4 Presença de múltiplos gêneros de Candida em infecções endodônticas	28
2.5 Efeito do tratamento endodôntico nos níveis de microrganismos e fatores de virulência	31
3 PROPOSIÇÃO	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
5 RESULTADOS	48
5.1 Perfil dos casos clínicos	48
5.2 Perfil microbiológico de pulpite reversível sintomática	52
5.2.1 Associação entre bactérias específicas no interior dos canais radiculares em dentes com pulpite	57
5.3 Perfil microbiológico de polpa vital normal	57
5.4 Quantificação dos níveis de cortisol	58
5.5 Quantificação dos níveis de lipopolisacarídeos	58
5.6 Quantificação dos níveis de ácido lipoteicóico	59
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXO 1 – Parecer consubstanciado CEP/FOP	76
ANEXO 2 – Relatório de similaridade	78

1 INTRODUÇÃO

A polpa dentária em condições de normalidade é um tecido conjuntivo envolto por dois tecidos denominados esmalte e dentina, estes circundem, protegem e previnem a câmara pulpar e os canais radiculares de forças mecânicas da mastigação e contaminação de microrganismos da cavidade oral (Yu & Abbott, 2007; Cohenca et al., 2013; Kawashima & Okiji, 2016).

A comunidade microbiológica é definida como fator primordial para o início de uma lesão cariosa. Esta inicia-se através de uma desmineralização do esmalte e posteriormente, a junção de um ambiente sacarolítico com microrganismos poderá evoluir para uma degradação dentinária. Nesta etapa infecciosa, espécies pertencentes aos gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Actinomyces* estão presentes, iniciando o processo inflamatório, onde moléculas da matriz dentinária são liberadas. No entanto, células hospedeiras na interface dentina-polpa reconhecem estas espécies e visam proteger o hospedeiro através de respostas antibacterianas, inflamatórias e imunológicas (Farges et al., 2011).

A evolução da cárie para uma alteração pulpar envolve mecanismos imunológicos e inflamatórios, além da presença de microrganismos. Quando há inflamação pulpar, mediadores pró-inflamatórios são difundidos na interface dentina-polpa com objetivo de desencadear eventos protetores, antibacterianos e respostas anti-inflamatórias. Portanto, do ponto de vista clínico, torna-se essencial reconhecer o mecanismo de ação e de citocinas envolvidas no processo de na defesa pulpar contra microrganismos relacionados à cárie visando o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas na Endodontia (Farges et al., 2015).

Um patógeno que se adere facilmente em superfícies dentárias e no biofilme é o *Streptococcus mutans*. Seu mecanismo de adesão é explicado pela grande produção de ácidos orgânicos e habilidade de permanência em ambientes desfavoráveis, com pH baixo. A detecção de *S. mutans* em casos de cáries primárias é de grande interesse; mas ele também pode estar associado em casos de infecções extra-orais como endocardite infecciosa (Lima et al., 2020). Este e outros grupos bacterianos presentes são responsáveis pela produção de ácidos além da capacidade de invasão dos túbulos dentinários através da ligação com o colágeno tipo I da

dentina, resultando em um avanço da cárie a nível pulpar. Os subprodutos metabólicos e antígenos bacterianos podem se difundir através da dentina intratubular onde inicia-se o processo de resposta imunológica e enzimas proteolíticas extracelulares agravam esta inflamação (Hahn et al. 2007).

Streptococcus mutans, *Lactobacillus acidophilus* e *Actinomyces israelii* tem sido considerados agentes primários de cáries de superfície radicular em humanos (Shen et al., 2004; Leites et al. 2004; Lima et al., 2020, Zheng et. al. 2019).

Enterococcus faecalis é uma espécie frequentemente associada a infecções pulpares e periapicais, sendo também encontrada em lesões na mucosa oral e no trato gastro intestinal dos indivíduos. Sendo reconhecida como uma bactéria gram-positiva e resistente por permanecer no interior dos canais radiculares mesmo com a descontaminação química e mecânica do canal radicular (Gomes et al., 2006; Endo et al., 2013).

Leveduras do gênero *Candida* também estão presentes no grupo de microrganismos associados à formação de biofilmes na cavidade oral, sendo a mais freqüente causadora de candidíase em pacientes imunodeprimidos (Zaremba et al., 2006; Sakko et. al. 2016; Bernal-Treviño et. al. 2018). A morfogênese de fungos compreende duas formas básicas; ovóide (leveduras) ou de aspecto filamentoso (hifas). A espécie *C. albicans* se reproduz formando células de levedura, porém cresce em forma de hifas quando macrófagos ingerem as leveduras. Outra morfologia presente nesta espécie são os clamidósporos, sendo estes esporos redondos e com parede celular espessa (Siqueira e Sen, 2004; Kohler et al., 2017).

Para reconhecer e quantificar microrganismos presentes e as moléculas sinalizadoras são realizados diversos testes que auxiliam na conduta clínica a ser executada. A técnica de cultura é considerada um método de identificação microbiana padrão ouro bem embasado ao longo dos anos. Esta técnica possibilita quantificação de microrganismos viáveis em amostras e informações notórias sobre a etiologia bacteriana e fúngica, de maneira confiável e assídua (Rajaram et al., 2016; Barbosa-Ribeiro et al., 2020).

PCR e Next Generation Sequencing (NGS) são exemplos de métodos moleculares (Arruda-Vasconcelos et al., 2021). O real time-PCR também oferece

informações da população microbiana de maneira geral, incluindo bactérias cultiváveis e não cultiváveis (Lima et al., 2020). Entretanto não há nenhuma técnica microbiológica que identifique e quantifique todas as espécies bacterianas de maneira abrangente presentes na polpa (Gomes et al., 2004). Métodos moleculares são alternativas viáveis aos métodos de cultura, no entanto a interpretação da diversidade bacteriana pode ser tendenciosa e limitada, uma vez que há diferença na eficácia de lise celular na extração de DNA e, conseqüentemente, PCR. (Siqueira et al., 2009)

Dentes com lesões profundas de cárie podem resultar em um aumento significativo na densidade dos vasos sanguíneos, inflamação pulpar e conseqüentemente, em uma pulpíte irreversível. Bactérias Gram-positivas são normalmente encontradas nestas situações, induzindo a expressão de mediadores químicos inflamatórios, além de apresentarem um componente em sua parede celular conhecido como ácido lipoteicoico – LTA. O conhecimento destes mecanismos e vias de sinalização são essenciais para que se descubra condutas terapêuticas para pulpites e patologias perirradiculares (Soden et al., 2009).

O LTA é um polímero da parede celular de bactérias Gram-positivas de extrema importância podendo ser subclassificado baseado nas estruturas químicas e grupos hidroxila. Além disso, é frequentemente comparado ao LPS devido as enzimas semelhantes e localização dentro do periplasma em ambos os casos (Percy e Gründling, 2014). O ácido lipoteicoico é encontrado em grandes proporções na presença de sacarose e bactérias cariogênicas, como por exemplo, *Streptococcus* e sua ligação na membrana celular ocorre através de forças hidrofóbicas. Na presença destes microrganismos em baixo pH, este polímero é conduzido a matriz extracelular induzindo a expressão de diversos mediadores inflamatórios, além de atuar diretamente na neovascularização em locais infecciosos e ser potente indutor de atividade celular (Telles et al., 2003).

No caso das Bactérias Gram-negativas, seu principal componente celular é o lipopolissacarídeo (LPS), conhecido como endotoxina, que é capaz de realizar destruição tecidual indireta através de diferentes mediadores químicos, a reabsorção óssea periapical e reação inflamatória também é encontrada através de efeitos biológicos quando há liberação do LPS (Mohammadi et al., 2012). A toxicidade conferida ao LPS se deve a sua porção de lípideo A, que é estruturalmente composto

por um esqueleto de dissacaródeo de D-glucosamina e multicadeias de ácidos graxos em posições específicas. Sua estrutura química é diferente em cada espécie bacteriana em relação a composição de cadeia por ácido graxo (Wheize et al., 2020). Os níveis de endotoxina estão diretamente relacionados com sintomatologia dolorosa e sinais clínicos como sensibilidade ou dor a percussão e palpação. Sua quantificação laboratorial pode ser realizada através do método LAL que detecta a endotoxina a partir de um substrato sintético produtor de cor. A extrema sensibilidade para a detecção de mínimas quantidades de LPS é uma grande vantagem deste tipo de teste. (Gomes et al., 2009)

Citocinas pró-inflamatórias são produzidas através do sistema imunológico na presença de uma microbiota complexa. A resposta inflamatória acontece devido a reações biológicas tais como trauma físico, condições autoimunes, neoplasias e, infecções microbianas. Os mediadores químicos estão diretamente relacionados com o lipopolissacarídeo, sendo que este promove desregulação de vasos sanguíneos e inflamação aguda (Yamashiro et al., 2020).

Os tratamentos odontológicos são comumente relacionados às situações de ansiedade e estresse. O cortisol é responsável pela resposta do corpo humano ao estresse. Este glicocorticoide é responsável pela regulação de carboidratos e proteínas e manutenção de reatividade vascular. Sua produção é modulada pelo ritmo diurno e estresse. Caso sua produção seja diminuída, ocorrerá graves mudanças na homeostase do corpo (Miller et al., 1995). Cortisol pode também ser considerado como um biomarcador preciso em pesquisas para medir o estresse gerados pela infecção odontológica. Kits de ensaio de quimioluminescência são utilizados para analisar e realizar a medição do cortisol (AlMaummar et al., 2019). Pacientes que apresentam inflamação pulpar e dor espontânea, podem ser comprometidos pela privação do sono e da qualidade de vida que, desta maneira, irá interferir nos níveis de cortisol devido a estas condições desagradáveis.

Portanto, o tratamento endodôntico deve eliminar o máximo possível da carga microbiana e seus fatores de virulência, citocinas e marcadores. Além disso, o objetivo da terapia é a remissão dos sinais e sintomas clínicos e regressão do processo inflamatório.

O teste LAL é utilizado para quantificação de endotoxina bacteriana a partir de métodos de alteração de cor através de espectrofotometria e revelação do lipopolissacarídeo. O reagente do teste é adicionado a um reagente cromogênico de alta especificidade com o LPS que na presença de endotoxinas provenientes da coleta, uma coloração amarela é encontrada (Couto et al., 2020).

As condições reais da polpa a partir de suas características histológicas são mais precisas que as obtidas com os dados do exame subjetivo e exame clínico do paciente. Portanto, a correlação clínica, histológica e imunológica deve ser realizadas para que haja uma classificação assídua entre polpa normal, pulpíte reversível e pulpíte irreversível (Ricucci et al., 2014).

Assim, o presente estudo clínico tem por objetivo principal estudar a microbiota, os níveis de ácido lipoteicóico, de endotoxina e dos níveis de cortisol relacionados a dor neurogênica de origem pulpar de dentes com diagnóstico de pulpíte irreversível sintomática.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O mecanismo da doença cárie e inflamação pulpar

O sistema de defesa imune inato e adaptativo são constituídos por fatores de crescimento, células-tronco mesenquimais, componentes humorais e celulares. Células imunes podem secretar grandes quantidades de interleucina-6, interleucina-8 e citocinas MIF (fator inibidor de migração de macrófagos) em que recrutam e ativam leucócitos e macrófagos. Saoud, em 2006, enfatizou o conhecimento do mecanismo imunológico e busca contribuir em relação a opções terapêuticas regenerativas do complexo dentina-polpa.

Os linfócitos e macrófagos também são ativados durante o processo inflamatório, liberando e produzindo quimiocinas, citocinas, prostaglandinas e mediadores lipídicos (Hahn et al., 2007).

Chen, em 2007, projetou e avaliou diferentes primers espécie-específicos de *Streptococcus mutans*, uma vez que este é um dos principais patógenos associados a cárie dentária em pacientes jovens. Além disso, a utilização de metodologias moleculares implementa o estudo epidemiológico de alto rendimento quando comparados ao método de cultura tradicional.

Outras bactérias altamente presentes na cárie e na sua progressão são do gênero *Lactobacillus*, Kneist S (2010) coletou dentina cariada de molares decíduos e investigou as diversas espécies por suas características bioquímicas e fisiológicas.

Ainda em relação a imunidade, outras moléculas protetoras contra microrganismos são os peptídeos antimicrobianos, frequentemente encontrados na cavidade oral na forma de defensinas, catelicidinas e histatinas. Estes são responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias, recrutamento de células de defesa e respostas imuno-inflamatórias. O enfoque de estudos imunológicos é extremamente essencial para o surgimento de terapêuticas efetivas, tanto no tratamento convencional como no ramo da endodontia regenerativa (Mai et al., 2016).

Zheng, em 2019, em um estudo envolvendo o sequenciamento de amplicon analisou o microbioma presente em cárie de dentina avançada e correlacionou com o

estado inflamatório da polpa. Sua amostra foi subdividida em quatro diferentes grupos estabelecidos através do diagnóstico pulpar: polpa normal com cárie profunda, pulpíte com teste de sensibilidade responsivo ao frio, pulpíte com teste responsivo ao frio e ao calor e pulpíte irreversível sintomática.

Bactérias como *Streptococcus mutans* são frequentemente encontradas na cárie dentária, porém também pode estar presente em infecções endodônticas primárias e secundárias. Lima et al., 2020, analisaram as diversas características patofisiológicas deste microrganismo e seus fatores de virulência.

Os sintomas clínicos e sua correlação com as espécies bacterianas da cárie na forma avançada não é totalmente clara. Sun, em 2020, associou a microbiota e os sintomas clínicos como dor espontânea, dor a percussão e ausência de dor através de amostras obtidas de pacientes diagnosticados com cárie dentinária profunda sem alteração pulpar, pulpíte reversível e pulpíte irreversível. Estas foram sequenciadas a partir do DNA ribossômico 16S.

Além do estudo microbiológico contínuo em alterações pulpares e de cárie dentinária, é de extrema importância a investigação dos outros mecanismos envolvidos nas linhas de defesa contra a cárie e seu avanço aos tecidos pulpares. Zhou, em 2021, realizou um modelo de pulpíte *in vitro* com o objetivo de detectar citocinas pró-inflamatórias. Neste estudo concluiu-se que a função mitocondrial (mtDNA) e a expressão da via cGAS-STING presentes em células odontoblásticas podem ser uma opção terapêutica no caso de inflamações microbianas em casos de pulpíte.

Nireeksha, em 2021, revisou o papel das catelidinas visto que estas estimulam a resposta imuno-inflamatória na polpa e no periápice e apresentam uma grande capacidade na produção de citocinas, além de regular a formação de dentina reparadora através dos odontoblastos; todos esses mecanismos de ação também caracterizam opção terapêuticas relevantes contra agentes bacterianos, fúngicos e virais. Outro fator a ser explicado nesta revisão é o processo inflamatório da polpa que é caracterizado pelo patrulhamento de linfócitos T e citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- α .

Outro importante mecanismo de defesa inato são os neutrófilos, sendo que

os que se encontram na cavidade oral apresentam função única de vigilância imunológica. Zamperini, em 2021, avaliou os neutrófilos presentes na progressão de cárie radicular em espécimes de dentina bovina e o efeito proteolítico das enzimas.

Demant, em 2022, também realizou uma investigação *in vitro* de respostas imunológicas em lesões de cáries avançadas e inflamação pulpar. Neste estudo foram utilizados quarenta e seis dentes com lesões de cárie avançada, e então realizado a cultura celular e expressão dos genes de marcadores relacionados à osteogênese e/ou condrogênese. Ou seja, esse estudo teve como intuito correlacionar a estimulação inflamatória de células pulpares e a expressão gênica de marcadores presentes nessa condição e no tecido conjuntivo.

2.2 Dor de origem pulpar em relação ao estresse e nível de cortisol

Miller et al., 1995, coletaram saliva de cinquenta indivíduos saudáveis com o intuito de avaliar o cortisol e estresse fisiológico oriundo de vários procedimentos odontológicos e em diferentes períodos: antes, entre o atendimento, final do procedimento e após uma hora da realização. Tais procedimentos realizados foram exame clínico, profilaxia, restauração, tratamento endodôntico e exodontia. Para análise, foi utilizado o kit de radioimunoensaio GammaCoat Cortisol (INCSTAR Corp., Stillwater, Minn.) e constatou-se um maior nível de estresse em pacientes submetidos a exodontia, quando comparado aos outros procedimentos de rotina. Além disso, os níveis de cortisol diminuíram em 15% dos pacientes desde a coleta inicial até o final quando submetidos à profilaxia, restauração ou tratamento endodôntico.

Kambalimath et al., 2010, estudaram o estresse psicológico de crianças com e sem cárie precoce da infância quando submetidas a tratamentos odontológicos. Foram coletadas amostras de saliva durante os procedimentos de profilaxia e aplicação tópica de flúor. A coleta foi analisada por radioimunoensaio e não encontrou-se diferença significativa entre os grupos estudados, isso pôde ser explicado devido ao tamanho da amostra (n=100) e pela capacidade de enfrentamento do público-alvo que são crianças.

AlMaummar et al., 2019, avaliaram 151 crianças de 6 a 9 anos, em relação

aos níveis de cortisol salivar e alfa-amilase salivar, que foram submetidos a tratamentos odontológicos bem sucedidos devido a técnicas de controle de comportamento não farmacológico e farmacológicos. Foram analisados três diferentes grupos nos quais foram pacientes denominados fóbicos, ansiosos e um grupo controle e constatou-se que a amilase salivar é um método de avaliar estresse e diferenciar o estresse do medo. Em relação ao cortisol, este seria um indicativo de estresse ao longo prazo.

Haug et al., 2019, avaliaram a dor aguda associada a aspectos como inflamação pulpar ou de origem periapical e sua correlação com marcadores, mediadores inflamatórios, fluxo salivar e o aumento da expressão de cortisol. Foram preenchidas fichas relacionadas ao estresse pelos pacientes, onde questionava-se fatores indutores do estresse, ansiedade no ambiente odontológico e insônia. Detectou-se níveis mais elevados de cortisol em pacientes sintomáticos quando comparados ao grupo controle, este último era constituído por pacientes sem dor e sem complicações odontológicas.

de Almeida et al., 2019, avaliaram a eficácia da acupuntura em relação ao uso de controle farmacológico em pacientes com dor dentária e de origem pulpar. Para tal estudo, foi coletado cortisol salivar, classificação de dor pela Escala Visual Analógica (EVA) pelos pacientes e medição do nível de energia pelo método Ryodoraku. Para análise do cortisol, o kit Salivary Cortisol (Salimetrics, State College, PA, EUA) foi utilizado e então realizado o método de ELISA onde os níveis de cortisol salivar foram determinados através das curvas padrão fornecidas pelo fabricante.

Jabali et al., 2019, analisaram biomarcadores salivares em casos de periodontite crônica em que os pacientes eram submetidos ao tratamento periodontal não cirúrgico: raspagem e alisamento radicular. Os biomarcadores salivares investigados no presente estudo foram a imunoglobulina A, L-6, interferon- γ , molécula de adesão intercelular solúvel-1 (sICAM), ALP e cortisol através do uso de um kit ELISA. Como conclusão, os níveis de cortisol aumentaram significativamente após os procedimentos de raspagem, enquanto outros biomarcadores salivares diminuíram.

Nijakowski et al., 2022, realizaram um estudo com o objetivo de correlacionar os parâmetros bioquímicos salivares em estudantes de odontologia

durante o ano letivo. Amostras de saliva foram coletadas nos períodos diurnos, noturnos e em épocas diferentes tais como meio do ano letivo e do ano consecutivo, durante o período de provas e o início do ano. Concluíram que o cortisol coletado no período diurno ou matinal apresenta melhores parâmetros e previsibilidades como marcador de níveis de estresse.

Nalci et al., 2022, compararam o uso de um aplicativo móvel para controle de ansiedade durante as diferentes etapas do tratamento endodôntico no qual a ansiedade foi avaliada através dos níveis de cortisol salivar. As amostras foram coletadas nos períodos pré-operatório, pós-anestesia e pós-operatório e analisadas através do ensaio de imunoabsorção enzimática. A queda dos níveis de cortisol entre o período pré e pós operatório foi maior no grupo experimental quando comparado ao grupo controle que não utilizou o software como auxílio para controle da ansiedade.

Poucos relatos na literatura científica analisam o aumento ou diminuição dos níveis de cortisol em casos de pulpites sintomáticas uma vez que os pacientes terão sua vida laboral comprometida, privação do sono devido aos sinais e sintomas de dor e inflamação de origem endodôntica contínua e intensa. Todas essas condições irão gerar desconforto, estresse e ansiedade e, conseqüentemente, aumento nos níveis do biomarcador relatado acima.

2.3. Espécies bacterianas associados com a inflamação pulpar.

A capacidade de bactérias sobreviverem e se multiplicarem dentro do canal radicular depende do ambiente e da pressão seletiva em que se encontram. Nos casos de infecção endodôntica primária há predominância de bactérias anaeróbias estritas enquanto na infecção secundária há uma maior presença de bactérias anaeróbias facultativas. Gomes et al., 2004, investigou a microbiota presente nestes dois tipos de infecção associando os sinais e sintomas através de técnicas de cultura onde foram recuperados através de diluição seriada, plaqueamento, incubação e identificação. Diversas espécies foram encontradas tais como *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis*. Além disso, concluiu-se uma maior presença de anaeróbios facultativos e gram-

positivos nos casos de infecção secundária.

Rajaram et al., 2016, utilizaram o método do cultura convencional para identificação de várias espécies produtoras de pigmento negro como *Porphyromonas* e *Prevotella* em trinta e um pacientes com infecção endodôntica primária e concluiu-se que essas duas espécies desempenham um papel importante na patogênese endodôntica.

Nelson-Filho et al., 2018, coletaram amostras de 123 canais radiculares de dentes decíduos com pulpite inflamatória irreversível e/ou necrose pulpar e periodontite apical com a finalidade de comparar os patógenos Gram-negativos identificados nestas duas condições clínicas. As espécies encontradas foram *Prevotella nigrescens*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum polymorphum*, *Fusobacterium nucleatum spp nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans sorotipo a*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans sorotipo b*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella melaninogenica* sendo que em maior porcentagem nos casos de periodontite apical.

Bronzato et al. 2021, correlacionaram fatores de virulência associados aos microrganismos e características clínicas e radiográficas de lesões periapicais em dentes obturados e retratados endodonticamente. Foi detectado 17 espécies bacterianas através do Nested-PCR sendo que *Parvimonas micra* foi a espécie mais detectada dentre os grupos. Além disso, foi encontrado correlação entre os fatores de virulência (LPS e LTA) e sinais/sintomas clínicos, não havendo diferença significativa entre os tipos de infecção.

Singh et al., 2020, utilizaram a cadeia de reação em polimerase para identificar microrganismos do complexo vermelho e *E. faecalis* além de sua associação com sinais e sintomas clínicos. Os grupos avaliados foram indivíduos com infecção endodôntica em dentes decíduos e o outro com infecção secundária, sendo que houve associação estatisticamente significativa entre as bactérias estudadas com a infecção sintomática e doença perirradicular.

Delikan et al., 2021, avaliaram dentes decíduos e permanentes e sua diversidade microbiana a partir de sequenciamento genético (16sRNA) e Next Generation Sequencing. Foram identificados 14 filos, 89 famílias e 236 gêneros. O filo

mais detectado em ambas as situações foi Firmicutes, sendo que os Bacteroidetes e Proteobacterias foram encontrados em dentes decíduos enquanto Actinobacteria e Verrucomicrobia em dentes permanentes.

2.3.1 Fatores de virulência bacterianos associados com a inflamação pulpar

A associação do ácido lipoteicóico (LTA) e a patogênese de pulpíte é frequentemente relatada, em que danos irreversíveis aos tecidos pulpare e aumento da pressão intrapulpar através do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) quando expresso. Este induz permeabilidade vascular, edema e angiogênese. Na presença de pH baixo, as bactérias Gram-positivas são cultivadas com a exportação do LTA para matriz extracelular em uma proporção significativa e com isso, há a expressão de vários mediadores inflamatórios. Telles et al., 2003, realizaram um estudo *in vitro* em que avaliou o LTA como um indutor de expressão de VEGF em macrófagos, fibroblastos, células pulpare indiferenciadas e células semelhantes a odontoblastos. Ao final, não observou expressão significativa de VEGF em fibroblastos, e um aumento dose dependente no caso dos macrófagos e células semelhantes a odontoblastos (MDPC-23); esta expressão foi avaliada por ELISA e RT-PCR.

Siqueira & Roças, 2009, revisaram a diversidade da microbiota em diferentes situações clínicas baseado nos tipos de infecção endodôntica. A catalogação dos táxons microbianos identificados a partir da cultura e métodos moleculares resultou em 468 táxons, uma arqueia e 9 fungos encontrados nas infecções endodônticas. Em relação aos filos, as bactérias pertencentes no sítio oral encontradas foram Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobactérias, Proteobactérias, Fusobactérias, Espiroquetas.

O ácido lipoteicóico (LTA) é um componente presente na parede celular de bactérias Gram-positivas que pode induzir vários mediadores inflamatórios e quimiocinas. Soden et al., 2009, avaliaram se a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em células de polpa dentária é induzido pelo ácido lipoteicóico. Foram utilizadas células semelhantes a odontoblastos e células pulpare indiferenciadas oriundas da cultura celular, citometria de fluxo para expressão de TLR2 e expostas ao LTA a partir do teste imunoenzimático ELISA. Concluiu-se que o

LTA induziu a expressão de VEGF em ambas as células e que a inibição da sinalização de TLR2 inibiu significativamente a expressão deste mesmo fator de crescimento. O conhecimento de vias de sinalização desencadeada por bactérias é de extrema relevância para descoberta de novas medidas terapêuticas em casos de pulpíte.

Segundo Percy & Grunding, em 2014, há diversas variações do ácido lipoteicóico em relação a suas estruturas químicas e vias de síntese. O LTA mais caracterizado e em grande diversidade é o poliglicerolfosfato (tipo I), no qual é encontrado em bactérias Gram-positivas do filo Firmicutes. LTA do tipo II ao V apresentam uma maior complexidade uma vez que suas estruturas químicas não foram muito bem estabelecidas e poderiam passar por revisões adicionais. O conhecimento deste polímero resulta em informação e possíveis condutas como a utilização dos mesmos para vacinas, probióticos e alvos antimicrobianos a partir da síntese proteica.

O lipopolissacarídeo ou LPS, apresenta uma estrutura química composta por polissacarídeos, lipídios e proteínas e é encontrada em bactérias Gram-negativas. Sua função não é dano tecidual direto, mas é denominada a grande responsável por liberar mediadores químicos que causam patose celular e/ou tecidual diretamente. Sua liberação ocorre durante a morte ou multiplicação das bactérias, causando reabsorção óssea periapical e reação inflamatória (Modammadi et al., 2012).

Couto et al., 2020, avaliaram o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) e seus efeitos inibitórios nos lipopolissacarídeos, utilizando quatro diferentes fotossensibilizadores (PSs). Para a avaliação destes fatores, foram utilizadas diferentes abordagens e metodologias tais como ensaios funcionais usando macrófagos de camundongos, modelo *in vivo* de injeção de LPS e o ensaio de LAL (teste de lisado de amebócitos de *Limulus*). Como resultado, houve diminuição da secreção de citocinas inflamatórias pelos macrófagos e que o potencial inflamatório do LPS diminuiu após o tratamento com os PSs.

Os lipopolissacarídeos (LPS) ou endotoxina é um fator de virulência oriundo de bactérias Gram-negativas como o ácido lipoteicóico (LTA) que se origina de bactérias Gram-positivas, estes fatores são liberados durante a multiplicação

bacteriana e são responsáveis pela inflamação e dano pulpar, além disso estão frequentemente associados aos sinais clínicos do paciente (Arruda-Vasconcelos et al. 2021).

A disbiose da microbiota oral em relação a cárie pode diferir de acordo com o estágio apresentado, ou seja, uma superfície de esmalte hígida apresenta bactérias produzindo ácido leve e incomum. No entanto, quando há um processo de remineralização e desmineralização ocorre um maior fornecimento de carboidratos e, conseqüentemente, cepas acidogênicas também. Zhu et al., 2022, revisaram os mecanismos microbiológicos e sua evolução na cavidade oral, incluindo cárie, doenças periodontais e doenças peri-implantares.

2.4 Presença de múltiplos gêneros de *Candida* em infecções endodônticas

Haynes et al., 1996, utilizaram 82 cepas de isolados clínicos de várias espécies de *Candida*. A identificação foi através da reação em cadeia de polimerase e foram utilizados primers para amplificação de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* e a quantidade de cepas encontradas foi, respectivamente, nove cepas, dezoito, treze e dezoito. Além disso foi identificado outras 17 cepas de *Candida* e outros gêneros de levedura.

Donnelly et al., 1999, elegeram o gene ACT1 a fim de confirmar a relação de *C. dubliniensis* e outras espécies de leveduras. A análise das sequências filogenéticas revelaram um nível muito baixo de variação de sequência intraespécies.

Na presença de fatores locais ou sistêmicos que conduzem um indivíduo a uma infecção, os fungos podem ser encontrados sendo que a *C. albicans* é uma das leveduras comensais e patológicas mais encontradas na cavidade oral. Baumgartner et al., 2000, avaliaram o conteúdo de 24 amostras retiradas de canais radiculares infectados e 19 apresentando infecções perirradiculares de origem endodôntica quanto à presença de *Candida albicans*. Nos aspirados perirradiculares não foi encontrado nenhum fungo enquanto nos canais radiculares infectados foi encontrado em 21% das amostras.

Tratamentos de insucesso endodôntico e necessidade de retratamento representam como principal fator etiológico a persistência de microrganismos

considerados resistentes. Pinheiro et al., 2003, identificaram diversas espécies microbianas em sessenta dentes que apresentavam lesões periapicais persistentes e correlacionaram os fatores clínicos com os achados microbiológicos. Em dentes que não apresentavam selamento coronário, houve uma correlação positiva entre *Streptococcus spp.* ou *Candida spp.*

Trost et al., 2004, identificaram espécies-alvo de PCR de *Candida* para caracterização dos produtos de PCR. Foi utilizado a amplificação intergênica de ITS1 e ITS2 para espécies clinicamente relevante, a partir de amostras clínicas isoladas. Tais espécies investigadas foram: *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae* e *Candida dubliniensis*. O objetivo do estudo foi fundamental para identificação rápida dos produtos de amplificação.

Kang et al., 2008, realizaram estudos comparativos entre bandas de DNA de *Candida tropicalis* com outras espécies de *Candida*. Foi descoberto uma banda específica que foi extraída e sequenciada. O fragmento do gene Trf4 representou uma sequência característica de *C. tropicalis* e foi essencial para o crescimento dessas linhagens.

Silva et al., 2012, forneceram informações sobre epidemiologia, patogenicidade, identificação e resistência antifúngica de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* em uma revisão. Estas espécies são patógenos frequentemente encontrados uma vez que pouco se sabe sobre as mesmas quando comparadas com a *C. albicans*. A diferenciação destas espécies pode ser explicada pela sua morfologia, na qual a *C. glabrata* cresce apenas em levedura, já a *C. parapsilosis* não produz hifas porém podem gerar pseudo-hifas.

Alnuaimi et al., 2014, examinaram regiões transcritas no rDNA de oito espécies de *Candida* clinicamente relevantes com o objetivo de viabilizar análises realizadas pelo método molecular. A técnica utilizada neste estudo foi classificada como uma boa alternativa para a análise genotípica de cepas clínicas, no qual foi experimentado PCR em tempo real, análise de uma curva de fusão de alta resolução das regiões transcritas e eletroforese em gel.

Segundo Staniszewska em 2020, os fungos apresentam fatores de

virulência significativos tais como barreiras de membrana e parede celular, formação de biofilme, proteínas relacionadas à tolerância ao estresse, toxinas, enzimas hidrolíticas e dimorfismo. O dimorfismo presente nas espécies de *Candida* é um fator de virulência significativo devido sua capacidade de resistência em mudanças de pH, além de causar lise em tecidos epiteliais orais e formação de biofilme, sendo este último associado a um tipo de gene específico denominado CNB1. Outro gene presente neste processo é o gene ECE1, sua principal função é formação de poros que causam invasão das células epiteliais e representa papel importante no crescimento morfológico dos fungos em hifas.

Al-Sakati et al., 2020, identificaram microrganismos dominantes em dentes obturados diagnosticados com periodontite apical através do Real-TimePan-PCR. No caso dos fungos foi direcionado a região ITS1-2 e então, detectado *C. albicans* em 5 dos 42 canais radiculares investigados.

Chen et al., 2020, revisaram mecanismos de formação em relação a sua fase biológica da *C. albicans*, para compreender o crescimento das leveduras e hifas com o objetivo de identificar possíveis alvos terapêuticos e antifúngicos. As três fases biológicas podem ser definidas como levedura, pseudo-hifas e hifas, sendo que, quando se apresentam no formato de hifa há maior probabilidade de dano tecidual, invasão celular e uma possível infecção sanguínea.

A capacidade da *C. albicans* na sua transformação morfológica de blastóforo e hifa confere a este fungo um fator de virulência relevante. Além de ser um microrganismo resistente em infecções secundárias, ele sobrevive em ambientes com ampla faixa de pH e em condições ecologicamente adversas. Thienngern et al., 2022, realizaram um estudo in vitro com raízes humanas extraídas submetidas a um biofilme maduro de *C. albicans* e avaliaram diferentes medicações intracanaís em relação a sua eficácia antimicrobiana.

A investigação de espécies fúngicas em alterações pulpares e periapicais é de extrema relevância visto que sua presença é frequente e seus fatores de virulência irão conferir resistência no interior dos canais radiculares a este microrganismo.

2.5 Efeito do tratamento endodôntico nos níveis de microrganismos e fatores de virulência

O principal objetivo da terapia endodôntica é a máxima remoção total ou parcial dos microrganismos e seus subprodutos, além da remissão dos sinais e sintomas clínicos.

Gomes et al., 1996, examinaram a microbiota de setenta canais radiculares associada a diversos sinais e sintomas clínicos como dor, sensibilidade a percussão, exsudato, tratamento endodôntico prévio. O trabalho confirmou associações entre bactérias específicas e falhas clínicas no tratamento endodôntico elucidando a importância e complexidade do microbioma endodôntico e a busca pela sua redução e, conseqüentemente, os sinais clínicos associados.

Gomes et al., 2009, comparou a eficácia do preparo químico-mecânico na eliminação do LPS em dentes com necrose e periodontite utilizando hipoclorito de sódio e clorexidina. A quantificação de endotoxinas foi realizado através do Ensaio de Amebócito de *Limulus* (LAL), e concluiu-se que a ação química e mecânica foram eficazes na porcentagem de redução de endotoxina.

Rahimi et al., 2014, revisaram os agentes microbianos e suas propriedades para serem utilizados na Endodontia e reforça a importância da terapia endodôntica na eliminação da microbiota e remoção bacteriana, uma vez que novas técnicas, medicamentos e soluções irrigadoras sejam implementadas e complementares a instrumentação mecânica nos canais radiculares.

Os fungos desempenham um papel relevantes nas infecções primárias endodônticas e pós tratamento devido sua capacidade de adesão à dentina, além de formar biofilmes persistentes. Ferreira et al., 2021, compararam dois tipos de solventes seguido de uma irrigação com NaOCl quando submetidos a um biofilme de *C. albicans*, a escolha desse fungo foi devido sua prevalência nas infecções endodônticas. O efeito das substâncias foi avaliado através do método de difusão para cultura planctônica, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Concluiu-se que os solventes foram mais eficazes na remoção do biofilme fúngico quando comparados com a irrigação convencional (NaOCl e EDTA).

Arruda-Vasconcelos et al., 2021, investigou os níveis de LPS e LTA em dentes com pulpite irreversível sintomática. Também foi investigado nesse estudo o perfil microbiano através do Checkerboard DNA-DNA hybridization nas diferentes etapas do tratamento endododôntico.

Portanto, ao longo do tempo vem se buscando otimizar técnicas e materiais relacionados ao preparo químico-mecânico, substâncias químicas auxiliares, medicações intracanal e materiais com selamento coronário efetivo visando uma terapia endodôntica com prognósticos promissores.

3 PROPOSIÇÃO

O conhecimento dos mecanismos de virulência associado aos sinais clínicos e microbiológicos é essencial para um diagnóstico acurado. Estas associações irão conduzir em tentativas terapêuticas mais precisas e eficazes.

Portanto, a hipótese deste estudo foi avaliar a correlação e presença de microrganismos, fatores de virulência e nível de cortisol em casos de pulpíte irreversível sintomática quando comparada a polpa normal.

Diante disto, foram objetivos desta pesquisa:

Objetivo Geral

Detectar microrganismos específicos em lesões cariosas e canal radicular em dentes com pulpíte irreversível sintomática e polpa normal.

Quantificar os níveis de fatores de virulência e cortisol presentes nos canais radiculares e tecidos periapicais de dentes com diagnóstico de pulpíte irreversível sintomática.

Correlacionar microrganismos, fatores de virulência e cortisol nos casos de pulpíte irreversível sintomática e polpa normal.

Objetivos Específicos

- a) Detectar através do Nested - PCR bactéria Gram-positiva como *Enterococcus faecalis* e bactérias Gram-negativas como *Porphyromona gingivallis*, *Prevotella nigrescens* e fungos como *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Detectar através do PCR a bactéria Gram-positiva *Streptococcus mutans*.
- b) Quantificar os níveis de endotoxinas através do LAL Pyrogen 5000;
- c) Quantificar os níveis de ácido lipoteicoico e cortisol através do ensaio de imunoabsorção enzimática;

4 MATERIAL E MÉTODOS

O fluxuograma abaixo descreve o material e métodos realizados para execução do presente estudo.



Parte dos métodos a serem utilizados neste estudo foi descrita previamente em detalhe pela pesquisadora responsável do projeto (Gomes et al. 1994, Gomes et al. 1996, Gomes et al. 2004, Gomes et al. 2011, Gomes et al. 2015, Martinho & Gomes 2008, Barbosa-Ribeiro et al. 2019, Aveiro et al. 2020, Louzada et al. 2020, Arruda-Vasconcelos et al. 2021)

Autorização para a realização da pesquisa

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP) e aprovado (CAAE:861402180.00005418). Os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) previamente a realização dos procedimentos clínicos.

Local da Pesquisa

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia aplicada à Endodontia e na Clínica de Pós-Graduação e Extensão da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP).

Seleção dos sujeitos da pesquisa

O tamanho da amostra foi justificado com base nos artigos de Zheng et al. (2019) e Zargar et al. (2020). O cálculo amostral foi obtido através do programa G *

Power v3.1 para Mac (Heinrich Heine, University Dusseldorf). Utilizou-se o teste de comparação com a diferença entre 2 médias com grupos independentes (Teste t). A partir dos dados obtidos e com base em 2 grupos da pesquisa, foi realizada uma estimativa de desvio padrão de 0,32, uma mínima diferença a ser detectada no valor de 0,98, erro do tipo alfa (α) de 0,05 e poder beta (β) de 0,80 para as variáveis. Dez amostras ($n = 10$) por grupo foram indicados como o tamanho ideal necessário requerido, com um total de 20 dentes para o estudo.

Foram selecionados 10 pacientes com diagnóstico de pulpíte irreversível sintomática, baseados nos critérios clínicos e radiográficos e 10 pacientes do grupo controle. O grupo controle foi constituído de dentes hígidos com polpas vitais normais indicados ao tratamento endodôntico devido à indicação protética. O diagnóstico de pulpíte irreversível foi determinado de acordo com os critérios da *American Association of Endodontists Consensus Conference* (Levin et al. 2009). Os pacientes deveriam apresentar dor aguda, espontânea, e persistente (30 segundos ou mais após a remoção do estímulo térmico).

Os critérios de inclusão para os casos de pulpíte irreversível incluíram dentes permanentes, posteriores e anteriores, ápices com rizogênese completa, presença de lesões cariosas em polpas vitais, com sintomatologia dolorosa intensa e prolongada aos testes de sensibilidade pulpar (teste térmico-frio). No momento do atendimento deveria ser relatado presença de dor espontânea e sem lesão periapical aparente ao exame radiográfico.

Para os casos de polpa vital normal, os critérios de inclusão foram tanto dentes posteriores como anteriores, permanentes e ápices com rizogênese completa, ausência de lesões cariosas, testes de sensibilidade pulpar (teste térmico-frio) com resposta normal, sem sintomatologia dolorosa. Além disso, a realização de tratamento endodôntico nestes casos era devido indicação protética.

Não foram incluídos casos de pacientes, para ambos os grupos, em antibióticoterapia prévia nos últimos 3 meses, canais expostos a cavidade oral, casos onde o isolamento absoluto não foi conseguido, casos com doença periodontal avançada; pacientes jovens com histórico de traumatismos dentais recentes, dentes com rizogênese incompleta, dentes com presença de curativos de demora na câmara

pulpar e de tratamentos endodônticos anteriores, dentes com terapia previamente iniciada.

Aspectos clínicos e radiográficos

No momento da anamnese e exame clínico do paciente, foi fornecido dados como, por exemplo, idade, gênero, e história médica e odontológica. Além disso, a situação clínica do dente selecionado foi avaliada em relação a condição pulpar, estado periodontal, presença e qualidade da restauração, fraturas, infiltrações coronárias. Os aspectos radiográficos também foram levados em consideração tais como ausência de lesão periapical aparente.

Procedimentos clínicos e coleta das amostras

Os procedimentos e a coleta das amostras ocorreram na clínica de Pós-Graduação da Instituição e o processamento destas foi realizado no Laboratório de Microbiologia aplicada à Endodontia.

As coletas realizadas foram : a) lesões cariosas(C1) para o grupo PI; e dos canais radiculares (PI e PV) : b) antes do preparo químico-mecânico (PQM) (C2), c) após o PQM (C3), d) após utilização da medicação intracanal (MIC) por 30 dias (C4).

Alguns critérios para realização dos procedimentos clínicos foram seguidos: a) utilização de técnicas assépticas e instrumentos esterilizados e aprotogênicos; b) isolamento absoluto.

Obs: Para o grupo PI, primeiramente foram removidas as restaurações e caries (CI) para depois realizar a coleta inicial dos canais radiculares (C2)

A antissepsia da face externa do paciente foi realizada com solução de clorexidina a 0,2%, seguida de anestesia local (infiltrativa e troncular) do dente selecionado para o estudo. Em seguida, foi realizado polimento coronário com pedra pomes e água, com o auxílio de taça de borracha acoplada em micromotor de baixa rotação. Após a profilaxia do elemento dental foi realizado isolamento absoluto e selamento da interface coroa dental/lençol de borracha com cianocrilato (Super Bonder, Loctite, São Paulo, SP) com o objetivo de prevenir infiltração salivar. O

protocolo de desinfecção do campo operatório consistiu em aplicar, com auxílio de swabs estéreis, água oxigenada 30% (v/v), seguida de hipoclorito de sódio 2,5% por 30 segundos cada, seguida da neutralização com solução estéril de tiosulfato de sódio 5%. A confirmação da desinfecção do campo operatório foi realizada por meio de coleta de amostra com swab estéril e plaquemaneto em Fastidious Anaerobe Agar (FAA, Lab M, Bury, UK) + 5% de sangue desfibrinado de carneiro e incubados em câmara de anaerobiose por 48 horas. Após esse período, caso a desinfecção do campo não fosse confirmada, a amostra era descartada do estudo. O procedimento de abertura coronária foi realizado por meio de brocas esféricas diamantadas (#1012 ou #1014) sem irrigação proveniente do equipo, entretanto, com solução fisiológica estéril, com o objetivo de minimizar quaisquer formas de contaminação e reduzir o aquecimento produzido durante o procedimento.

No caso dos pacientes com pulpíte irreversível, a coleta das amostras clínicas de dentina infectada (cárie) foram realizadas através de curetas afiadas estéreis e apiorgênicas, e por brocas esféricas diamantas para análise microbiológica e para os fatores de virulência (LPS e LTA).

As coletas das amostras clínicas do canal radicular para análise microbiológica, LTA, LPS, e cortisol foram realizadas com cones de papel absorvente e limas endodônticas (ambos estéreis e apirogênicos), sendo introduzidos em toda a extensão do conduto. Vale ressaltar que, para os fatores de virulência e cortisol, a introdução dos cones foi 1 mm além do comprimento real do dente, ou seja, para ser coletado o fluido periapical. Os cones de papel permaneceram em posição por 60 segundos.

Após a finalização da abertura coronária, foi realizado uma coleta inicial dos pacientes com cone de papel (C2) e após este processo, uma lima K #15 (Dentsply Sirona), com movimentos de cateterismo, foi introduzida em toda a extensão do comprimento aparente do dente, determinado por meio de radiografia pré-operatória, além disso foi utilizado o localizador foraminal (Novapex, Forum Technologies, Rishon le-zion, Israel) para confirmação da patência e determinação do comprimento de real trabalho (CRT) no qual foi estabelecido na posição zero do localizador.

O PQM foi realizado com sistema reciprocante Reciproc (VDW, Munique, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. O movimento realizado pelo instrumento foi de introdução e remoção com pincelamento contra as paredes do canal radicular, não ultrapassando 3 mm de amplitude. A cada ciclo de instrumentação a lima Reciproc houve a remoção e limpeza em gaze estéril e o canal radicular foi irrigado com 5 mL de soro fisiológico estéril e então preenchido com o irrigante de escolha (NaOCl 6%). O PQM foi finalizado com a utilização de limas Reciproc correspondentes ao diâmetro de 3 limas subsequentes ao diâmetro inicial do forame apical (LAF), podendo quando necessário, utilizar uma lima manual do tipo K para complementar a instrumentação. Durante todo o PQM, uma lima de pequeno calibre foi utilizada para manter a patência do canal e realizada abundante irrigação/aspiração. Após a instrumentação, a Patência foi confirmada e então realizada uma segunda coleta pós o preparo químico-mecânico (C3), com posterior irrigação dos canais radiculares com solução específica para promover a neutralização da SQA (NaOCl 6% = tiosulfato de sódio 5%). O protocolo de irrigação foi finalizado com 5 ml de solução fisiológica. Foram inseridos 3 ml de EDTA 17% (ácido etilenodiamonotetraacético) no interior do canal radicular por 1 minuto (com substituição a cada 30 s), sob agitação ultrasônica com insterto ultrasônico E1 Irrisonic (Helse Ultrasonic), com a finalidade de remover a camada residual de smear layer e permitir a abertura dos túbulos dentinários para melhor difusão da MIC (medicação intracanal). A irrigação final foi realizada com 10 ml de solução fisiológica estéril. A medicação intracanal utilizada foi hidróxido de cálcio associado ao veículo Clorexidina gel 2% e introduzidos através do uso de limas endodônticas e Lentulo, permanecendo no interior dos canais radiculares durante um período de 30 dias.

Após o uso da meciação intracanal, foi realizada uma terceira coleta (C4). Após a realização de todas as coletas de interesse para este trabalho, é relevante ressaltar que o dente foi obturado através da técnica de cone único com guta-percha e cimento à base de Óxido de Zinco e Eugenol (Endomethasone N - Septodont, Pomerode, SC, Brasil) . Após a finalização da obturação, foi selado com uma camada de 2 mm de Coltosol (Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) na embocadura do canal radicular. Em seguida, foi aplicado ácido fosfórico 37% por 15 segundos em dentina e 30 segundos em esmalte, adesivo Single Bond 3M (3M Dental Products, St Paul, EUA) e restauração em resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St Paul, EUA).

Quando necessário, o paciente foi encaminhado para tratamento em outras áreas, como dentística restauradora, prótese dental, periodontia e cirurgia.

As amostras coletadas foram imediatamente transportadas em meios específicos (Tabela 1) para o Laboratório de Microbiologia aplicada à Endodontia e armazenadas a - 80°C para posterior processamento.

Tabela 1 - Tipos de coleta e armazenamento das amostras de microrganismos e seus fatores de virulência realizadas nas diferentes etapas do tratamento endodôntico.

Amostra	Instrumento	Comprimento	Meio
Bactérias/Fungos	Cone papel/ limas endodônticas	Limite apical	VMGA III
LPS	Cone papel/ limas endodônticas	Limite apical	Criotubo
LTA/Cortisol	Cone papel	+1 mm forame apical	Criotubo

Procedimentos laboratoriais

Extração de DNA e Nested – PCR (monitoramento qualitativo das bactérias de interesse endodôntico nas diversas fases do tratamento endodôntico)

Extração do DNA bacteriano

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

Inicialmente foi amplificada a região que abrange o gene 16S e 23S rRNA através dos Primers Universais:

Univ Forward (785) 16S 5' GGATTAGATACCCTGGTAGTC 3'
Univ Forward (L422) 23S 5' GGAGTATTTAGCTT 3'

As reações de PCR 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 das lesões cariosas e canal radicular.

O Nested PCR consiste em duas etapas. As etapas iniciais (FILE 11) do ciclo de PCR compreenderam a 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. Uma 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 desta reação foi utilizada para realização de outra reação PCR, agora usando um primer espécie-específico juntamente com o L189R. As espécies investigadas foram: *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella nigrescens* (Quadro 1).

As etapas finais (FILE 12) do ciclo de PCR de bactérias 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 e os produtos analisados pelo gel eletroforético de agarose 1%.

Quadro 1 - Sequências dos primers bacterianos espécie-específico que foram utilizados nas reações de PCR.

Bactéria	Primer
<i>Enterococcus faecalis</i>	5' GTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCA 3'
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5' CATCGGTAGTTGCTAACAGTTTTTC 3'
<i>Prevotella nigrescens</i>	5' CGTTGGCCCTGCCTGCGG 3'

PCR (monitoramento qualitativo de *Streptococcus mutans*)

Para a identificação microbiana de *Streptococcus mutans* (Primer F- 5'-TCGCGAAAAAGATAAACAAACA-3'; Primer R - 5'-GCCCTTCACAGTTGGTTAG-3') foi realizado a Reação em Cadeia de Polimerase (Chen et al, 2007).

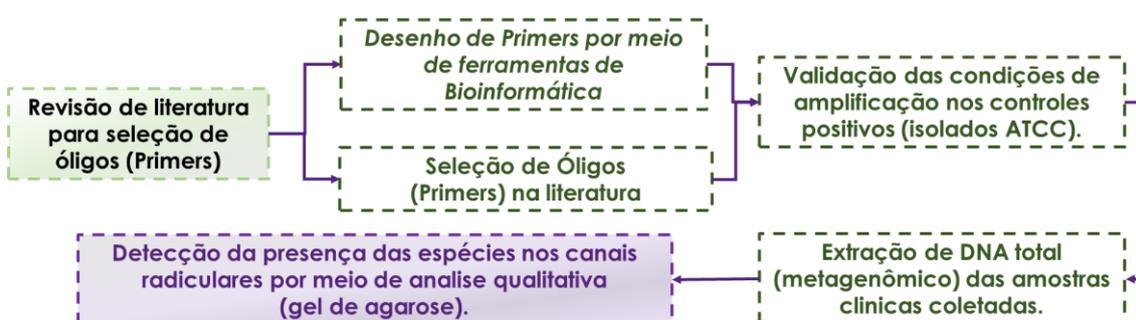
As reações de PCR foram processadas na quantidade total de 25 µL para cada amostra contendo 1X PCR buffer (10x Reaction Buffer, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 1,5 µL de uma mistura de deoxiribonucleotídeos fosfatados (2mM) (dNTPs, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 1 µL de solução de cloreto de magnésio (25 mM) (MgCl₂, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 0,25 µL de uma solução 100 µM de Primer Forward (20 mM) (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 0,25 µL de uma solução 100 µM de Primer Reverse (20 mM) (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 16,3 µL de água ultrapura livre de DNAase e RNAase; 0,3 µL da enzima Taq DNA Polimerase (Taq Platinum, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil) e 1 µL de DNA extraído da amostra coletada do canal radicular.

O ciclo de PCR compreendeu uma desnaturação inicial (95°C, 2 min); 40 ciclos de desnaturação (95°C, 30 seg), anelamento (65°C, 30 seg) e extensão (72°C, 1 min); seguidos de uma extensão final (72°C, 5 minutos).

Nested – PCR (monitoramento qualitativo das espécies fúngicas de interesse endodôntico nas diversas fases do tratamento endodôntico)

Seleção e padronização dos primers para as espécies fúngicas

Para realização do Nested – PCR das espécies de *Candida*, primeiramente foi necessário realizar uma seleção e padronização dos primers . O fluxograma abaixo descreve as etapas realizadas para realização do monitoramento qualitativo das espécies de *Candida*.



Para seleção de primers (oligos) foi realizada uma busca sistêmica na literatura nas plataformas PubMed, Biblioteca Virtual de saúde (BVS), e Medline. Como critérios de inclusão os trabalhos deveriam citar a sequência dos primers de detecção, tamanho de amplicon bem como as condições de amplificação do gene por PCR, descritas de forma completa e detalhada. Já como critérios de exclusão foram os estudos que apresentavam informações parciais, ou que se tratasse de outras técnicas de biologia molecular como PCR em tempo real.

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.

Os iniciadores foram desenhados propondo sua utilização em duas PCRs. Na1ª PCR utiliza-se os primers Yeast universal (Haynes & Westerneng, 1996a) que amplificam um fragmento de 600-640 pares de base. O fragmento resultante desta etapa é submetido a 2ªPCR, uma Semi-Nested, onde mantém-se o primerR (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.

Nested-PCR das espécies fúngicas

Após a padronização dos primers, foi realizado as reações de Nested-PCR para as espécies fúngicas descritas abaixo:

As reações de Nested- PCR para espécies fúngicas foram processadas na quantidade total de 50 μ L para cada amostra contendo 5 μ L de tampão; 0,5 μ L dNTPs; 1,5 μ L de solução de cloreto de magnésio (25 mM) 0,5 μ L de uma solução 100 μ M de Primer Forward (20 mM) (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 0,5 μ L de uma solução 100 μ M de Primer Reverse (20 mM) (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 40,8 μ L de água ultrapura livre de DNAase e RNAase; 0,2 μ L da enzima Taq e 1 μ L de DNA extraído da amostra coletada do canal radicular.

As etapas iniciais para as espécies fúngicas compreenderam uma desnaturação inicial (94°C, 4 min); 30 ciclos de desnaturação (94°C, 30 seg), anelamento (66°C, 1min 30seg) e extensão (72°C, 15seg); seguidos de uma extensão final (72°C, 5 minutos).

As etapas finais compreenderam 30 ciclos de desnaturação (94°C, 30 seg), anelamento (66°C, 1min e 30seg) e extensão (72°C, 15 seg). Para essa etapa final foram utilizados os reagentes nas mesmas concentrações da primeira reação produtos analisados pelo gel eletroforético de agarose 1%.

Quadro 2 - Primers para detecção de *Candida* por Nested -PCR.

Primers Nested -PCR (região 18S rRNA)					
Primer		Sequência	Amplicon		Referência
Yeast Universal	Primer F	5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3'	600-640	64	(Haynes & Westernen g, 1996)
	Primer R	5' GGTCCGTGTTTCAAGACG 3'		64	
<i>C. albicans</i>	Primer F	5' TTGGAGCGGCAGGATAATGG 3'	156	64	
<i>C. glabrata</i>	Primer F	5' GTTTTGCGCCCCTTGCTCT 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)					
<i>Universal ITS1</i>	Primer F	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'	165	60	(White et al., 1990)
<i>Universal ITS 4</i>	Primer R	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'	159	60	
<i>C. dubliniensis (Cdub18)</i>	Primer F	5' CTAAGCCATTGTCAAGCATCTC 3'	412	60	(Than et al., 2012)
<i>C. tropicalis (Ct3)</i>	Primer F				

Quantificação de endotoxinas

Teste Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Pyrogen-5000 (Lonza, Walkersville, MD, EUA)

Para a realização do teste LAL Pyrogen-5000, todos os materiais foram apirogêinizados [calor seco (estufa) a 250°C por 30 minutos ou por energia ionizante (EMBRARAD, Cotia, SP)]. Outros materiais já se apresentavam apirogênicos e esterilizados oriundos de fábrica (Lonza, Walkersville, MD, EUA).

Pyrogen-5000 é um ensaio cinético quantitativo para detecção de endotoxina de bactéria Gram-negativa. Esse teste utiliza uma preparação de Lisado do Amebócito Limulus (LAL), em combinação com um incubador fotométrico e um software apropriado, para detecção fotométrica da endotoxina. Uma amostra é misturada com o reagente LAL reconstituído, colocada em um fotômetro e monitorada automaticamente até o desenvolvimento de uma aparência de turvação (densidade ótica). O tempo necessário antes da aparição da turvação (tempo de reação) é inversamente proporcional a quantidade de endotoxina presente. A concentração de endotoxina em amostras desconhecidas pode ser calculada a partir de uma curva-padrão.

Para o cálculo da concentração de endotoxina em amostras desconhecidas foi estabelecida uma curva-padrão com quantidades conhecidas de endotoxina (*Escherichia coli*). Esta foi preparada utilizando soluções com concentrações 0,01 UE/mL, 0,10 UE/mL, 1 UE/mL, 10 UE/mL, 100 UE/mL como descrito na tabela 2.

Tabela 2 - Diluição da solução de endotoxina de *E. coli* para a determinação da curva padrão.

Tubos apirogênicos	Concentração de endotoxina (UE/mL)	Volume de água reagente LAL	Volume de solução de endotoxina adicionado à água apirogênica
1	10	0,9 mL	0,1 mL de 100 EU/mL solução
2	1	0,9 mL	0,1 mL de 10 EU/mL solução
3	0,10	0,9 mL	0,1 mL de 1 EU/mL solução
4	0,01	0,9 mL	0,1 mL de 0,10 EU/mL solução

Os valores da absorvância das soluções de endotoxina previamente preparadas foram espectrofotometricamente medidos a 340 nm no leitor Biotek (ELX 808, Winooski, VT, EUA). A absorvância a 340 nm foi linear com os intervalos de concentração usados. A linearidade da curva padrão dentro do intervalo de concentração foi usada para determinar os valores de endotoxina. A reprodutibilidade foi verificada pela comparação das diferentes curvas.

Procedimentos para execução do teste

Foi impresso um esboço com o posicionamento da água apirogênica, da curva padrão, das amostras e do controle positivo do produto (PPC) na microplaca de 96 poços (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, EUA). Em seguida, foi dispensado cuidadosamente no interior dos poços da microplaca: 100 µl das amostras e 100 µl dos controles positivos das mesmas, ambas em duplicata. Nas amostras controles foram dispensados 10 µl da endotoxina na concentração de 10 UE/mL, evitando formação de bolha. Após o preenchimento das amostras e dos respectivos controles previamente contaminados com *E. coli*, foi dispensado cuidadosamente no

interior dos poços da microplaca: 100 µl de água apirogênica (branco), padrões de endotoxina (100 µl da concentração de 0,01 UE/mL; 0,1 UE/mL; 1 UE/mL; 10 UE/mL e 100 UE/mL). A placa foi pré-incubada por ≥ 10 minutos a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, no leitor Biotek. Próximo ao final do período de pré-incubação, cada frasco de reagente Pyrogent-5000 foi reconstituído com 5,2 mL de tampão de reconstituição Pyrogent-5000. Após isso, foi dispensado rapidamente 100 µL do reagente reconstituído de Pyrogent-5000 dentro de todos os poços da microplaca, iniciando pela primeira coluna (A1-H1) e procedendo em sequência até a última coluna utilizada. Com a tampa da microplaca removida foi iniciada a leitura.

Cálculo da concentração de endotoxinas

De forma contínua durante todo o ensaio, o leitor de microplacas foi monitorado na absorvância de 340 nm de cada poço da microplaca. Usando a leitura de absorvância inicial de cada orifício como seu próprio branco, o leitor determina o tempo necessário para que a absorvância aumente a 0,03 unidades. Este tempo é denominado tempo de reação. O software WinKQCL (Lonza, Walkersville, MD, EUA) executa automaticamente uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Os parâmetros da curva padrão foram impressos no relatório. Se o valor absoluto do coeficiente de correlação (r) for $\geq 0,980$, um modelo polinomial pode ser usado para construir uma curva padrão e, assim, predizer as concentrações de endotoxina das amostras de teste.

Quantificação dos níveis de ácido lipoteicóico e de cortisol

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

As amostras da região periapical foram eluídas em 600 µl de solução tampão (PBS – phosphate buffered saline) contendo 0,1% de solução Tween 20 e 1 µl de coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA). Os tubos foram agitados por 30 minutos e centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos. A amostra foi dividida em alíquotas para a quantificação de LTA e cortisol por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

O ácido lipoteicóico e biomarcador (CORTISOL) foram avaliados através do uso de kits laboratoriais específicos (Human Quantikine, R&D Systems,

Minneapolis, EUA). Todos os reagentes foram levados a temperatura ambiente e a solução diluente foi adicionada em cada poço contendo o anticorpo monoclonal específico contra o biomarcador a ser quantificado. Os padrões e amostras foram adicionados aos poços, permitindo a ligação do LTA ou cortisol ao anticorpo imobilizado. Após um período de incubação específico para cada biomarcador os poços foram lavados com solução tampão e um segundo anticorpo policlonal específico e conjugado a fosfatase alcalina foi adicionado. As placas foram novamente incubadas e lavadas. A seguir, foi adicionado em todos os poços o substrato (NADPH), que inicia a reação colorimétrica catalisada pela fosfatase alcalina, seguido de incubação e adição da solução amplificadora da reação colorimétrica. Após novo período de incubação, a solução de parada foi adicionada. O desenvolvimento e a intensidade da cor foram quantificados utilizando um leitor de placas para ELISA. A curva padrão foi feita com os padrões fornecidos no kit pelo fabricante.

Análise Estatística

A tabulação dos dados coletados foi realizada em uma planilha de cálculo e, posteriormente, a análise estatística foi através do SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA) pelos testes apropriados.

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 e o Teste de McNemar foi utilizado para comparação entre as frequências dos microrganismos detectados durante os quatro tempos de coleta realizados.

Para análise estatística dos níveis de LPS, LTA e Cortisol foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para averiguar a normalidade dos resultados e sendo atestado a normalidade, optou-se pela estatística paramétrica: Teste t dependente para análise intra-grupo e Teste t independente para análise entre os grupos estudados.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil dos casos clínicos

Foram selecionados para a pesquisa 20 pacientes de faixa etária compreendida entre 23 e 67 anos, com uma média de 43 anos. Em relação ao gênero, 13 pacientes (65% dos casos) eram pertencentes ao sexo feminino e 7 pacientes (35%) pertencentes ao sexo masculino.

Destes 20 pacientes, 10 foram diagnosticados com pulpite irreversível devido a relato de dor espontânea, teste de sensibilidade com resultado positivo exacerbado e prolongado e sem lesão periapical aparente pela análise radiográfica (10/10).

Em relação ao grupo de pulpite irreversível, 20% dos dentes eram birradiculares e 80% multirradiculares. A idade dos pacientes estava compreendida entre 23 e 49 anos (média: 35,9), sendo 90% do gênero feminino e 10% do gênero masculino. 30% dos casos apresentavam lesão cáriosa e 70% possuíam restauração em resina. Sintomatologia espontânea e prévia foi relatada em 100% dos casos.

Os outros 10 pacientes necessitavam realizar tratamento endodôntico devido a indicação protética, portanto nenhum paciente relatou sintomatologia dolorosa prévia ou espontânea. Além disso, todos os pacientes apresentavam resposta normal de sensibilidade ao teste térmico ou nenhum desconforto aos testes de percussão no dente em questão (00/10). Todos os dentes se encontravam hígidos sem presença de cárie ou restauração.

No grupo de polpa vital, 70% dos dentes eram unirradicular, 20% birradiculares e 10% multirradiculares. A idade dos pacientes estava compreendida entre 29 e 67 anos (média: 51,2), sendo 40% do gênero feminino e 60% do gênero masculino. 100% dos casos não apresentavam lesão cáriosa e eram hígidos.

Tabela 3 - Descrição das características clínicas detectadas nos pacientes pertencentes ao grupo de pulpite irreversível sintomática

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Dente	Sintomatologia				MED	HIG	CAR	REST
				DE	DA	PERC	PALP				
1	49	Feminino	47	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Presente	Ausente	Ausente	Presente
2	38	Feminino	27	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Presente	Ausente	Ausente	Presente
3	23	Feminino	14	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Presente	Ausente	Presente	Ausente
4	41	Masculino	36	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Presente	Ausente	Ausente	Presente
5	49	Feminino	46	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Presente	Ausente	Ausente	Presente
6	31	Feminino	24	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Presente	Ausente	Ausente	Presente
7	33	Feminino	46	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Presente	Ausente	Presente	Ausente
8	31	Feminino	26	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Presente	Ausente	Ausente	Presente
9	33	Feminino	26	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Presente	Ausente	Presente	Ausente
10	31	Feminino	16	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Presente	Ausente	Ausente	Presente

Legenda: DE (dor espontânea); DA (dor anterior); PERC (percussão); PALP (palpação); MED (medicação prévia); HIG (hígido); CAR (cariado); REST (restaurado)

Tabela 4 - Descrição das características clínicas detectadas nos pacientes pertencentes ao grupo de polpa normal.

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Dente	Sintomatologia				MED	HIG	CAR	REST
				DE	DA	PERC	PALP				
1	63	Feminino	33	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
2	63	Feminino	34	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
3	67	Feminino	22	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
4	29	Masculino	22	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
5	52	Feminino	14	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
6	30	Masculino	47	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
7	52	Masculino	13	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
8	52	Masculino	15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
9	52	Masculino	43	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
10	52	Masculino	41	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Ausente	Presente	Ausente	Ausente

Legenda: DE (dor espontânea); DA (dor anterior); PERC (percussão); PALP (palpação); MED (medicação prévia); HIG (hígido); CAR (cariado); REST (restaurado)

Tabela 5 - Perfil geral e dados clínicos de pacientes diagnosticados com pulpíte irreversível e polpa vital.

Variável	Categoria	Total	Grupo	
			Pulpíte Irreversível	Polpa vital
Gênero	Feminino	13(65%)	9(45%)	4(20%)
	Masculino	7(35%)	1(5%)	6(30%)
Idade	< 30 anos	2(10%)	1(5%)	1(5%)
	≥30 anos	18(90%)	9(45%)	9(45%)
Número de raízes dentais	Unirradicular	7(35%)	0(0%)	7(35%)
	Birradicular	4(20%)	2(10%)	2(10%)
	Multirradicular	9(45%)	8(40%)	1(5%)
Arcada	Superior	13(65%)	6(30%)	7(35%)
	Inferior	7(35%)	4(20%)	3(15%)
Grupo dental	Incisivo central	1(5%)	0(0%)	1(5%)
	Incisivo lateral	2(10%)	0(0%)	2(10%)
	Canino	3(15%)	0(0%)	3(15%)
	Pré-molar	5(25%)	2(10%)	3(15%)
	Molar	9(45%)	8(40%)	1(5%)
Dor espontânea	Sim	10(50%)	10(50%)	0(0%)
	Não	10(50%)	0(0%)	10(50%)
Dor prévia	Sim	10(50%)	10(50%)	0(0%)
	Não	10(50%)	0(0%)	10(50%)
Uso de analgésicos	Sim	10(50%)	10(50%)	0(0%)
	Não	10(50%)	0(0%)	10(50%)
Teste de sensibilidade	Normal	10(50%)	0(0%)	10(50%)
	Positivo e Exacerbado	10(50%)	10(50%)	0(0%)
	Negativo	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Condição do elemento dental	Hígido	10(50%)	0(0%)	10(50%)
	Cariado	3(15%)	3(15%)	0(0%)
	Restaurado	7(35%)	7(35%)	0(0%)

5.2 Perfil microbiológico de pulpíte reversível sintomática

Bactérias e fungos foram detectadas em todas as amostras de cárie e amostras iniciais. Dos 10 *primers* testados, 9 foram detectados através do *Nested-PCR*. O único *primer* não detectado foi *Candida parapsilosis*.

Uma média de 5,5 espécies por caso foram detectadas em amostras de cárie nos casos de pulpíte, sendo o mínimo de 1 e o máximo de 6 microrganismos detectados por caso (Tabela 6).

Tabela 6 - Distribuição de frequência e porcentagem dos casos de pulpíte irreversível em função do número de microrganismos detectados em lesões cariosas conjuntamente no mesmo paciente através do *Nested-PCR*

Número de Microrganismos detectados na dentina infectada				
	1	2 a 3	4 a 5	6
Frequência (n)	0	1	3	6
Porcentagem (%)	0%	10%	30%	60%

Uma média de 3,2 espécies por caso foram detectadas em amostras iniciais nos casos de pulpíte, sendo o mínimo de 1 e o máximo de 6 microrganismos detectados por caso (Tabela 7).

Tabela 7 - Distribuição de frequência e porcentagem dos casos de pulpíte irreversível em função do número de microrganismos detectados em amostras iniciais conjuntamente no mesmo paciente através do *Nested-PCR*

Número de Microrganismos detectados na coleta inicial				
	1	2 a 3	4 a 5	6
Frequência (n)	1	2	5	1
Porcentagem (%)	10%	20%	50%	10%

Um total de 24 de 40 cepas bacterianas foram detectadas nas coletas de cárie, representando 60% do total de cepas identificadas. Dessas, 8 eram bactérias Gram-positivas e 16 Gram-negativas (Tabela 8).

Tabela 8 - Distribuição de frequência e porcentagem de bactérias detectadas em lesões cariosas dos casos de pulpíte irreversível em função da coloração de Gram.

Número de Microrganismos detectados na dentina infectada		
	Gram-positivos	Gram negativos
Frequência (n)	8	17
Porcentagem (%)	40%	85%

Um total de 22 cepas bacterianas foram detectadas nas amostras iniciais, representando 55% do total de cepas identificadas. Dessas, 7 eram bactérias Gram-positivas e 15 Gram-negativas (Tabela 9).

Tabela 9 - Distribuição de frequência e porcentagem de bactérias detectadas em amostras iniciais dos casos de pulpíte irreversível em função da coloração de Gram.

Número de Microrganismos detectados na coleta inicial		
	Gram-positivos	Gram negativos
Frequência (n)	7	15
Porcentagem (%)	35%	75%

Os microrganismos identificados com maior frequência em dentina infectada dos casos associados a pulpíte irreversível foram *Candida glabrata* (10/10); *Porphyromonas gingivalis* (8/10); *Prevotella nigrescens* (8/10); *Candida tropicalis* (6/10)

e *Candida dubliniensis* (6/10).

Os microrganismos identificados com maior frequência no interior do canal radiculares dos casos associados a pulpite irreversível sintomática foram *Enterococcus faecalis* (7/10); *Prevotella nigrescens* (7/10); *Candida tropicalis* (7/10) e *Candida dubliniensis* (5/10).

Após a realização do preparo químico-mecânico, as bactérias mais prevalentes foram *Candida tropicalis* (5/10); *Candida dubliniensis* (5/10) e *Candida albicans*(5/10). *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromona gingivalis*, *Prevotella nigrescens* e *Candida glabrata* deixaram de ser detectadas nessa etapa do tratamento endodôntico.

Nas amostras obtidas após o uso de medicação intracanal, *Candida dubliniensis* foi o fungo detectado com maior frequência (4/10), seguido por *Candida albicans* (2/10); *Candida tropicalis* (2/10); e *Candida glabrata* (2/10). *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromona gingivalis*, *Prevotella nigrescens* e *Candida krusei* deixaram de ser detectadas nessa etapa do tratamento endodôntico.

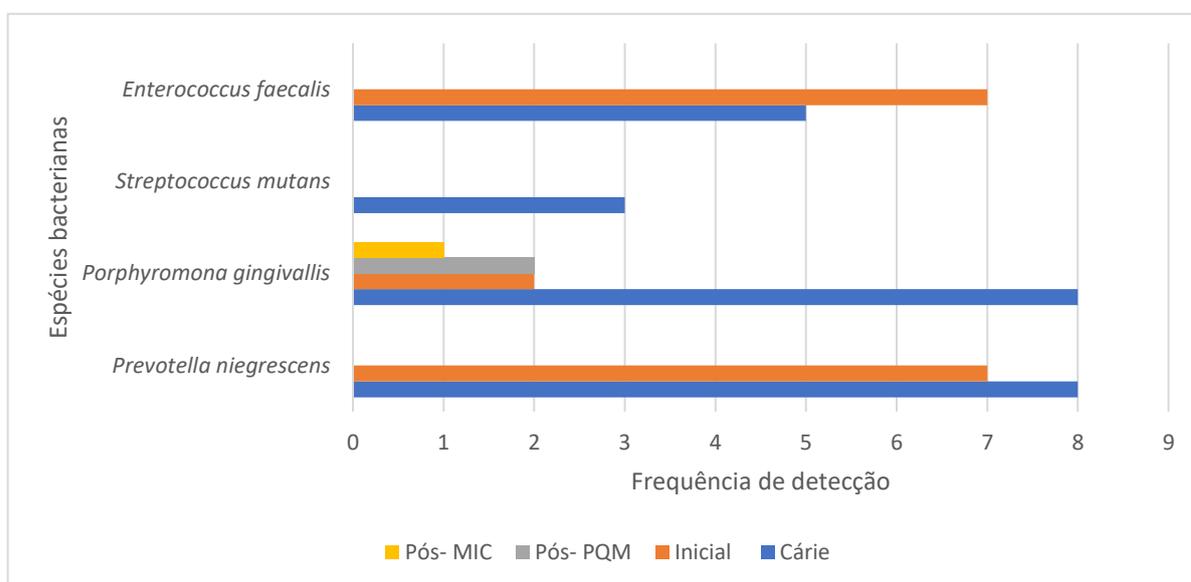


Figura 1 - Frequência de detecção dos primers (espécies bacterianas) testados no grupo pulpite irreversível durante as diferentes etapas do tratamento endodôntico

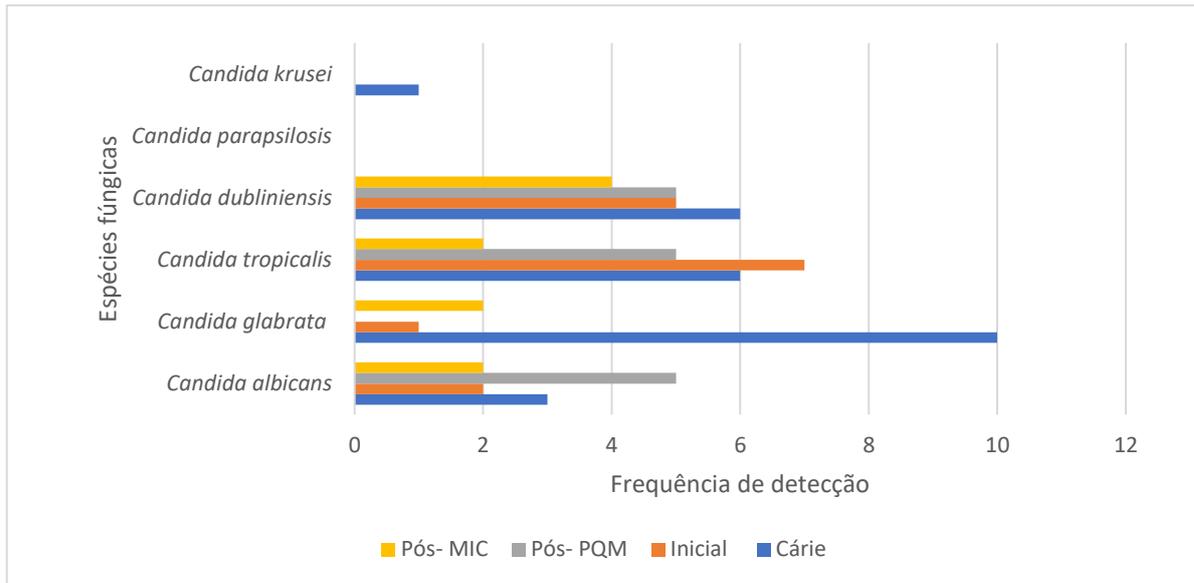


Figura 2 - Frequência de detecção dos primers (espécies fúngicas) testados no grupo pulpíte irreversível durante as diferentes etapas do tratamento endodôntico

Tabela 10 - Frequência e porcentagem dos resultados positivos obtidos no grupo de pulpíte irreversível detectados através do Nested-PCR nos diferentes tempos de coleta.

Microrganismo	Frequência e porcentagem de detecção			
	Cárie (C1)	Inicial (C2)	Pós - PQM (C3)	Pós - MIC (C4)
<i>Enterococcus faecalis</i>	5 (50%)	7 (70%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Streptococcus mutans</i>	3(30%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Porphyromonas gingivallis</i>	8(80%)	2(20%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Prevotella nigrescens</i>	8(80%)	7 (70%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Candida albicans</i>	3(30%)	2(20%)	5(50%)	2(20%)
<i>Candida dubliniensis</i>	6(60%)	5(50%)	5(50%)	4 (40%)
<i>Candida tropicalis</i>	6(60%)	7 (70%)	5(50%)	2(20%)
<i>Candida glabrata</i>	10(100%)	1(10%)	0 (0%)	2(20%)
<i>Candida krusei</i>	1(10%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Candida parapsilosis</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

5.2.1 Associação entre bactérias específicas no interior dos canais radiculares em dentes com pulpite

A investigação de correlações entre a presença de espécies bacterianas específicas entre si presentes nos casos incluídos no presente estudo revelou associação positiva. A presença de *Prevotella nigrescens* mostrou correlação estatisticamente significativa com a presença de *Enterococcus faecalis* detectados em amostras da coleta inicial ($p < 0,05$).

Nos 10 casos estudados, 70% (7/10) dos canais radiculares apresentavam ambas cepas bacterianas em conjunto e 30% (3/10) das amostras não foi detectada a associação e presença de *Prevotella nigrescens* e *Enterococcus faecalis*.

Tabela 11 - Correlações positivas entre a presença de bactérias nas amostras iniciais.

<i>Prevotella nigrescens</i> (C2)			
	Presença	Ausência	p-valor
<i>E. faecalis</i> (C2)	7 (70%)	3 (30%)	0,008

5.3 Perfil microbiológico de polpa vital normal

Em nenhuma das amostras foram detectadas bactérias e fungos durante os diferentes procedimentos: coleta inicial, pós preparo químico-mecânico e pós-medicação. Dos 10 *primers* testados, não houve nenhuma banda específica através do *Nested-PCR*.

A constatação de ausência foi através da utilização de controles positivos, compostos por DNA extraídos de isolado bacteriano ou fúngico. E controles negativos (produto da reação com os determinados reagentes).

5.4 Quantificação dos níveis de cortisol

Os níveis de cortisol do grupo da pulpíte irreversível sintomática nos seus diferentes tempos de coleta e procedimentos estão elucidados na Tabela 13. Após a realização da análise estatística, constatou-se que houve diferença significativa entre a coleta inicial e pós preparo químico – mecânico ($p < 0,05$). No entanto, quando foi analisado a diferença dos níveis de cortisol entre preparo químico-mecânico e medicação intracanal, a análise não revelou diferença entre os grupos (p valor:0,342).

Tabela 12 – Média e desvio padrão dos níveis de cortisol nos diferentes tempos de coleta no grupo da pulpíte irreversível.

	Coletas		
	Inicial	Pós- PQM	Pós - MIC
Cortisol	2,96 ($\pm 1,18$) ^a	1,07 ($\pm 0,628$) ^b	0,80 ($\pm 0,583$) ^b

Os níveis de cortisol do grupo da polpa vital normal nos seus diferentes tempos de coleta e procedimentos estão elucidados na Tabela 13.

Tabela 13 – Média e desvio padrão dos níveis de cortisol nos diferentes tempos de coleta no grupo da polpa vital normal.

	Coletas		
	Inicial	Pós- PQM	Pós - MIC
Cortisol	0,77 ($\pm 0,30$) ^a	0,44 ($\pm 0,14$) ^b	0,37 ($\pm 0,21$) ^b

5.5 Quantificação dos níveis de lipopolisacarídeos

Os níveis de endotoxinas (lipopolisacarídeos) no grupo pulpíte irreversível sintomática nos diferentes tempos de coleta estão fornecidos na Tabela 14.

Os níveis de endotoxinas em amostras de lesões cáries foram significativamente maiores quando comparado as coletas de amostra inicial dos canais

radiculares. Quando há comparação entre o período inicial e pós-PQM também observa-se diferença significativa ($p < 0.05$). No entanto, entre as coletas de preparo químico-mecânico e medicação intracanal não houve diferença estatística.

Tabela 14 - Média e desvio padrão dos níveis de endotoxinas (Eu/mL) nos diferentes tempos de coleta no grupo da pulpíte irreversível.

	Coletas			
	Cárie	Inicial	Pós-PQM	Pós- MIC
LPS	43,37 ($\pm 7,6$) ^a	0,38 ($\pm 0,06$) ^b	0,06 ($\pm 0,01$) ^c	0,05 ($\pm 0,009$) ^c

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os diferentes tempos de coleta ($p < 0,05$).

Em relação ao grupo de polpa vital normal, seus valores foram significativamente inferiores quando comparados ao grupo de pulpíte apresentando um valor de mediana de 0,0100 EU/mL.

Tabela 15 – Mediana, mínimo e máximo dos níveis de endotoxinas nos diferentes tempos de coleta no grupo de polpa vital normal.

	Inicial	Coletas	
		Pós-PQM	Pós- MIC
LPS	0,0100 (0,0100 - 0,0112) ^{Aa}	0,0100 (0,0100 - 0,0100) ^{Aa}	0,0100 (0,0100 - 0,0100) ^{Aa}

5.6 Quantificação dos níveis de ácido lipoteicóico

Os níveis de LTA no grupo da pulpíte irreversível em seus diferentes tempos de coleta estão fornecidos na Tabela 15. Os níveis de ácido lipoteicóico em amostras de cárie foram significativamente maiores quando comparado as coletas de amostra inicial. Quando há comparação entre o período inicial e Pós-PQM também observa-se diferença significativa ($p < 0.05$). No entanto, entre as coletas de preparo químico-mecânico e medicação intracanal não houve diferença estatística.

Tabela 16 - Média e desvio padrão dos níveis de ácido lipoteicóico nos diferentes tempos de coleta no grupo da pulpíte irreversível.

	Coletas			
	Cárie	Inicial	Pós-PQM	Pós- MIC
LTA	521,78 ($\pm 43,5$) ^a	423,51 ($\pm 36,8$) ^b	211,21 ($\pm 40,01$) ^c	195,43 ($\pm 45,04$) ^c

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os diferentes tempos de coleta ($p < 0,05$).

Os dados do LTA encontrados nas amostras coletadas foram: amostras iniciais com média de 18,6 pg/mL, pós-PQM de 3,97 pg/mL no pós-MIC de 4,3 pg/mL com redução de 4,34% (Tabela 16). Não houve correlação estatisticamente significativa entre as concentrações do LTA entre o pós-PQM e pós-MIC.

Tabela 17 - Média e desvio padrão dos níveis de ácido lipoteicóico nos diferentes tempos de coleta no grupo da polpa vital normal.

	Coletas		
	Inicial	Pós-PQM	Pós- MIC
LTA	18,6 ($\pm 34,5$) ^a	3,97 ($\pm 5,02$) ^b	4,30 ($\pm 6,7$) ^b

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os diferentes tempos de coleta ($p < 0,05$).

A figura 2 ilustra a diferença dos níveis de LTA entre os grupos de pulpíte irreversível e polpa vital normal.

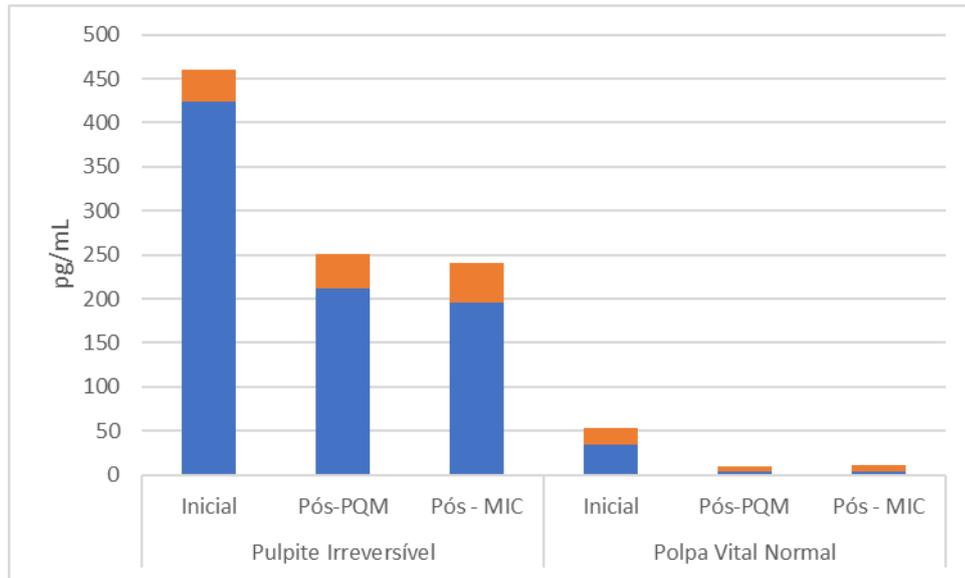


Figura 3 – Média e desvio-padrão dos níveis de LTA nos diferentes tempos de coleta nos dois grupos estudados.

6 DISCUSSÃO

Nenhum trabalho até o presente momento buscou investigar a presença de diferentes espécies de leveduras e níveis de cortisol em dentes com pulpite irreversível sintomática e polpa vital normal, tornando este estudo inédito na área. Portanto, o estudo teve como objetivo avaliar e correlacionar a microbiota específica de fungos e bacterianas presente em casos de pulpite irreversível e polpa vital normal. Também buscou correlacionar os fatores de virulência e níveis de cortisol dos dois grupos.

A coleta de dentina infectada ou lesão de cárie permite um maior conhecimento do perfil microbiológico em evolução para alterações pulpare e periapicais, e futuros estudos devem ser implementados para auxílio em diagnóstico do estado pulpar em pacientes que apresentam lesões de cárie profunda. A coleta de amostras de tecido cariado foi relatado na literatura endodôntica porém com pouca frequência (Munson et al., 2004; Roças et al., 2016; Arruda-Vasconcelos et al., 2021).

Todos os casos de pulpite irreversível sintomática apresentaram 100% de dor espontânea, sendo que o diagnóstico foi determinado pelos critérios da *American Association of Endodontists Consensus Conference*. Além disso, a resposta aos testes térmicos deveriam ser de característica aguda e prolongada, com trinta segundos ou mais após remoção do estímulo (Levin et al., 2009; Sarmiento et al., 2016; Zheng et al., 2019; Sun et al., 2020).

Na literatura endodôntica há poucas evidências e relatos sobre o microbioma da pulpite irreversível sintomática, portanto torna-se essencial analisar os diversos tipos microbianos e fúngicos nesta situação clínica e avaliar durante as diferentes etapas do tratamento endodôntico.

Um estudo clínico, realizado através de exames histopatológicos, evidenciou a presença de microrganismos em dentes com lesões cariosas e diagnosticados com pulpite irreversível quando comparado com dentes hígidos que caracterizaram-se pela ausência de microrganismos (Ricucci et al., 2021). Desta maneira, o vigente estudo clínico confirma a presença de microrganismos em casos de pulpite através de técnica molecular, diferentemente dos casos de polpa normal este fator e corrobora a partir dos resultados encontrados pelo método histopatológico

do trabalho acima.

O método molecular utilizado no presente estudo foi através do Nested-PCR. Para identificação da microbiota em casos de pulpíte irreversível sintomática também pode ser realizado outros métodos moleculares atuais como Next Generation Sequencing que permitem um sequenciamento massivo de DNA e Checkerboard DNA-DNA hybridization (Roças et al., 2016; Arruda-Vasconcelos et al., 2021).

Reação em cadeia de polimerase (PCR) é um exame extremamente sensíveis que permitem uma identificação de cepas e espécies microbianas que são difíceis ou impossíveis para o cultivo. Outra vantagem é sua proteção contra fatores ambientais externos como, por exemplo, contaminação de amostras que impeçam o crescimento microbiano. A eleição por este tipo de método deve-se pela análise de presença dos microrganismos em quantidades suficientes que expliquem ou justifiquem o processo infeccioso.

Outros métodos a serem utilizados para identificação microbiana são os testes bioquímicos como o teste de catalase. Rajaram et al., 2016, encontraram espécies produtoras de pigmento negro como *Prevotella* e *Porphyromonas* em dentes com infecção endodôntica primária, sendo que *Porphyromonas gingivalis* foi encontrado em uma maior prevalência corroborando com os resultados encontrados no vigente estudo.

A correlação positiva entre *Enterococcus faecalis* e *Prevotella nigrescens* pode ser explicada através da interação por coagregação, ou seja, uma adesão celular em que diferentes espécies se aderem em maiores quantidades ou menores devido sua especificidade. Johnson et al., 2006, buscaram investigar a coagregação de *E. faecalis* com diferentes espécies bacterianas como *Propionibacterium anaerobius*, *Prevotella oralis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus anginosus*.

Cortisol é um hormônio esteroide liberado pelas glândulas adrenais e pela saliva em resposta ao estresse e pela modulação da inflamação. Haug, em 2019, evidenciou dor aguda de origem periapical ou inflamação em região periapical em pacientes que apresentaram maiores níveis salivares de cortisol. Além disso, houve um maior nível de cortisol nos pacientes do gênero masculino quando comparado ao gênero feminino no grupo controle composto por indivíduos sem experiência dolorosa

ou tratamento endodôntico prévio. No vigente estudo é investigado as amostras da região periapical com o objetivo de analisar o biomarcador na região específica do dente que apresenta alteração inflamatória pulpar. Além disso, o enfoque do trabalho é investigar se pacientes diagnosticados com pulpíte e com dor intensa, pulsátil e espontânea apresentam maiores níveis de cortisol devido sua qualidade de vida afetada.

Nossos resultados mostraram que pacientes diagnosticados com pulpíte irreversível sintomática apresentam um maior nível de cortisol, possivelmente devido ao estresse e a dor. Poucos estudos evidenciam e investigam a presença de cortisol em infecções pulpares e periapicais através de amostras de saliva (Haug et al., 2019; Nalci et al., 2022).

Em relação aos níveis de lipopolissacarídeo e ácido lipoteicóico nas amostras de lesão cariada, encontrou-se um maior nível destes fatores de virulência quando comparado com as amostras inicial dos canais radiculares e após a terapia endodôntica. A associação do preparo químico-mecânico e irrigação promovem uma redução significativa nos níveis de endotoxinas e ácido lipoteicóico em dentes com alterações pulpares e periapicais quando comparado aos seus níveis iniciais (Gomes et al, 2009).

Houve uma diminuição de ácido lipoteicóico, ou LTA, através do preparo químico mecânico em níveis significativos. Quando utilizado uma medicação intracanal, também observamos uma queda nos níveis deste fator de virulência que pode ser explicado através da inativação do LTA a partir do uso do hidróxido de cálcio. Esta associação do fator de virulência com a medicação pode ser explicada pelo estímulo e indução de citocinas pró-inflamatórias de macrófagos, e comprometer a atividade imunoestimulante do LTA (Baik et al., 2011)

Porém, a prevalência das espécies de *Candida* em diversas fases do tratamento demonstra sua alta capacidade de resistência e virulência indicando sua permanência no interior dos canais radiculares apesar de um preparo químico-mecânico eficiente e medicação intracanal apresentados neste estudo. Diversos estudos comprovam a presença deste fungo em infecções secundárias e de insucesso endodôntico (Silva et al., 2012, Bernal-Treviño et al., 2018; Al-Sakati et al., 2020).

Portanto, torna-se essencial o estudo do perfil microbiológico, dos fatores de virulência e do cortisol em casos de pulpíte irreversível sintomática como de polpa vital normal visando compreender e entender aspectos microbianos e mecanismos de resistência com o objetivo de buscar alternativas terapêuticas e condutas clínicas adequadas.

Como perspectivas futuras, é de extrema importância a manutenção e aprimoramento de técnicas de identificação microbiana, de fatores de virulência e marcadores de estresse presente em casos de polpa vital normal e pulpíte irreversível sintomática. É interessante associar diferentes estágios de lesões cariosas para que se possa investigar a evolução da doença cárie para alterações pulpares, e possíveis prognósticos preventivos ou terapêuticos.

7 CONCLUSÃO

Após realização do presente estudo com os diversos métodos e resultados obtidos pode-se concluir que:

- O microbioma de dentes com lesões de cárie profunda e pulpite irreversível sintomática é misto e diversificado, incluindo bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos da espécie *Candida*.
- O Nested -PCR não identificou espécies bacterianas e fúngicas pesquisadas em dentes com polpa vital normal.
- Foram encontrados níveis superiores de cortisol na pulpite irreversível quando comparado aos dentes com polpa vital normal, indicando um maior nível de estresse nos pacientes que apresentam dor de origem pulpar.
- O preparo químico-mecânico mostrou-se eficaz na redução dos níveis de LPS, LTA e cortisol em pacientes com pulpite.
- Níveis de LPS, LTA e Cortisol de pacientes com polpa vital normal são inferiores aos dentes com pulpite irreversível sintomática.

A busca por identificação de bactérias e fungos em casos sintomáticos de pulpite irreversível como em lesões cariosas deve ser contínua com o objetivo de conhecer os mecanismos de virulência e sua correlação clínica.

Estes achados irão influenciar diretamente no diagnóstico, conduta clínica e terapêutica, sempre em busca de um melhor prognóstico para o paciente.

REFERÊNCIAS

AlMaummar M, AlThabit HO, Pani S. The impact of dental treatment and age on salivary cortisol and alpha-amylase levels of patients with varying degrees of dental anxiety. *BMC Oral Health*. 2019 Sep 6;19(1):211. doi: 10.1186/s12903-019-0901-7.

Alnuaimi AD, Wiesenfeld D, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC, Peng B, McCullough MJ. The development and validation of a rapid genetic method for species identification and genotyping of medically important fungal pathogens using high-resolution melting curve analysis. *Mol Oral Microbiol*. 2014 Jun;29(3):117-30. doi: 10.1111/omi.12050.

Al-Sakati H, Kowolik S, Gabris S, Balasiu A, Ommerborn M, Pfeffer K, et al. The benefit of culture-independent methods to detect bacteria and fungi in re-infected root filled teeth: a pilot study. *Int Endod J*. 2021 Jan;54(1):74-84. doi: 10.1111/iej.13404.

Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, Feres M, Tomson PL, Cooper PR, Gomes BPF. Investigation of microbial profile, levels of endotoxin and lipoteichoic acid in teeth with symptomatic irreversible pulpitis: a clinical study. *Int Endod J*. 2021 Jan;54(1):46-60. doi: 10.1111/iej.13402.

Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *J Endod*. 2000 Dec;26(12):695-8. doi: 10.1097/00004770-200012000-00003.

Baik JE, Jang KS, Kang SS, Yun CH, Lee K, Kim BG, Kum KY, Han SH. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* through deacylation of the lipid moiety. *J Endod*. 2011 Feb;37(2):191-6. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.007.

Bernal-Treviño A, González-Amaro AM, Méndez González V, Pozos-Guillen A. Frecuencia de *Candida* en conductos radiculares de dientes con infección endodóntica primaria y persistente [Frequency of *Candida* in root canals of teeth with primary and persistent endodontic infections]. *Rev Iberoam Micol*. 2018 Apr-Jun;35(2):78-82. Spanish. doi:10.1016/J.RIAM.2017.09.004

Bronzato JD, Davidian MES, de Castro M, de-Jesus-Soares A, Ferraz CCR, Almeida JFA, Marciano MA, Gomes BPF. Bacteria and virulence factors in periapical lesions associated with teeth following primary and secondary root canal treatment. *Int Endod J*. 2021 May;54(5):660-671. doi: 10.1111/iej.13457.

Chen H, Zhou X, Ren B, Cheng L. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*. 2020 Dec;11(1):337-348. doi: 10.1080/21505594.2020.

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 Microbiol Lett*. 2007 Jul;272(2):154-62. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00756.x.

Cohenca N, Paranjpe A, Berg J. Vital pulp therapy. *Dent Clin North Am*. 2013 Jan;57(1):59-73.

Couto ACF, de Carvalho RVH, Brancini GTP, Martins FG, Sorgi CA, da Silva RAB, Nelson-Filho P, Paula-Silva FWG, Borsatto MC, Braga GÚL, Novaes Júnior AB. Photosensitizers attenuate LPS-induced inflammation: implications in dentistry and general health. *Lasers Med Sci*. 2021 Jun;36(4):913-926. doi: 10.1007/s10103-020-03180-2.

de Almeida TB, Zotelli VLR, Wada RS, Sousa MLR. Comparative Analgesia Between Acupuncture and Dipyron in Odontalgia. *J Acupunct Meridian Stud*. 2019 Dec;12(6):182-191. doi: 10.1016/j.jams.2019.07.005.

Delikan E, Caliskan S, Cankilic MY, Aksu S, Kesim B, Ulger ST. Microbiota of Endodontically Infected Primary and Permanent Teeth. *Pediatr Dent*. 2021 Mar 15;43(2):102-110.

Demant S, Schoenmaker T, van Erck SMG, Dabelsteen S, de Vries TJ, Bjørndal L. Intra-pulpal connective tissue formation and the advanced carious lesion: Is chondrogenesis and heterotopic ossification a response to pulpal inflammation? *Int Endod J*. 2022 Nov;55(11):1212-1224. doi: 10.1111/iej.13821.

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 (Reading)*. 1999 Aug;145 (Pt 8):1871-1882. doi: 10.1099/13500872-145-8-1871.

Endo MS, Ferraz CCR, Zaia AA, Almeida JFA, Gomes BPF. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. *Eur J Dent*. 2013 Jul;7(3):302-309. doi: 10.4103/1305-7456.115414.

Farges JC, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, Cooper PR. Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:230251. doi: 10.1155/2015/230251.

Ferreira I, Rodrigues ME, Fernandes L, Henriques M, Pina-Vaz I. Candida albicans Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Novel Endodontic Solvents. *Appl. Sci.* 2021, 11, 7748. DOI:10.3390/app11167748

Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dent.* 1996 Jan-Mar;24(1-2):47-55. doi: 10.1016/0300-5712(95)00042-9. PMID: 8636492.

Gomes BPFA, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod.* 2009 Oct;35(10):1350-3. doi: 10.1016/j.joen.2009.06.011.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Apr;19(2):71-6. doi: 10.1046/j.0902-0055.2003.00116.x.

Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. Enterococcus faecalis in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Aug;102(2):247-53. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.11.031.

Hahn CL, Liewehr FR. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. *J Endod.* 2007 Jul;33(7):773-81. doi: 10.1016/j.joen.2007.01.002.

Haug SR, Marthinussen MC. Acute Dental Pain and Salivary Biomarkers for Stress and Inflammation in Patients with Pulpal or Periapical Inflammation. *J Oral Facial Pain Headache.* 2019 Spring;33(2):227–233. doi: 10.11607/ofph.2007.

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.* 1996 May;44(5):390-6. doi: 10.1099/00222615-44-5-390.

Jabali S, Mesgari Abbasi M, Abdollahi AA. Effect of non-surgical periodontal therapy on concentrations of salivary biomarkers in patients with chronic periodontitis: A clinical

trial. *J Adv Periodontol Implant Dent.* 2019 Aug 31;11(1):7-11. doi: 10.15171/japid.2019.002.

Johnson EM, Flannagan SE, Sedgley CM. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. *J Endod.* 2006 Oct;32(10):946-50. doi: 10.1016/j.joen.2006.03.023.

Kambalimath HV, Dixit UB, Thyagi PS. Salivary cortisol response to psychological stress in children with early childhood caries. *Indian J Dent Res.* 2010 Apr-Jun;21(2):231-7. doi: 10.4103/0970-9290.66642.

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. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2008;49(1):39-43. doi: 10.3314/jjmm.49.39.

Kawashima N, Okiji T. Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex. *Congenit Anom (Kyoto).* 2016 Jul;56(4):144-53. doi: 10.1111/cga.12169. PMID: 27131345.

Kneist S, Schmidt F, Callaway A, Willershausen B, Rupf S, Wicht M, Thiede B. Diversity of *Lactobacillus* species in deep carious lesions of primary molars. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2010 Aug;11(4):181-6. doi: 10.1007/BF03262741.

Köhler JR, Hube B, Puccia R, Casadevall A, Perfect JR. Fungi that Infect Humans. *Microbiol Spectr.* 2017 Jun;5(3). doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0014-2016.

Leites ACBR, Pinto MB, Sousa ERS. Aspectos microbiológicos da cárie dental. *Salusvita, Bauru, v. 25, n. 2, p. 239- 252, 2006.*

Li M, Tian J, Xu Z, Zeng Q, Chen W, Lei S, Wei X. Histology-based profile of inflammatory mediators in experimentally induced pulpitis in a rat model: screening for possible biomarkers. *Int Endod J.* 2021 Mar 14. doi: 10.1111/iej.13514.

Li X, Bosch-Tijhof CJ, Wei X, de Soet JJ, Crielaard W, Loveren CV, Deng DM. Efficiency of chemical versus mechanical disruption methods of DNA extraction for the identification of oral Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Int Med Res.* 2020 May;48(5):300060520925594. doi: 10.1177/0300060520925594.

Lima AR, Ganguly T, Walker AR, Acosta N, Francisco PA, Pileggi R, Lemos JA, Gomes BPFA, Abranches J. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Streptococcus mutans* Strains Isolated from Endodontic Infections. *J Endod*. 2020 Dec;46(12):1876-1883. doi: 10.1016/j.joen.2020.09.002.

Mai S, Mauger MT, Niu LN, Barnes JB, Kao S, Bergeron BE, Ling JQ, Tay FR. Potential applications of antimicrobial peptides and their mimics in combating caries and pulpal infections. *Acta Biomater*. 2017 Feb;49:16-35. doi: 10.1016/j.actbio.2016.11.026.

Miller CS, Dembo JB, Falace DA, Kaplan AL. Salivary cortisol response to dental treatment of varying stress. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995 Apr;79(4):436-41. doi: 10.1016/s1079-2104(05)80123-4.

Mohammadi Z, Shalavi S, Yazdizadeh M. Antimicrobial activity of calcium hydroxide in endodontics: a review. *Chonnam Med J*. 2012 Dec;48(3):133-40. doi: 10.4068/cmj.2012.48.3.133.

Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol*. 2004 Jul;42(7):3023-9. doi: 10.1128/JCM.42.7.3023-3029.2004.

Nalci G, Alaçam T, Altunkaynak B. Evaluation of the effectiveness of a mobile application in the management of dental anxiety: A randomised controlled trial. *J Oral Rehabil*. 2022 May;49(5):535-540. doi: 10.1111/joor.13311.

Nelson-Filho P, Ruviera DB, de Queiroz AM, de Paula-Silva FWG, Silva RABD, Lucisano MP, da Silva LAB. Comparative Molecular Analysis of Gram-Negative Bacteria in Primary Teeth with Irreversible Pulpitis or Periapical Pathology. *Pediatr Dent*. 2018 Jul 15;40(4):259-264.

Nijakowski K, Gruszczyński D, Łaganowski K, Furmańczyk J, Brożek A, Nowicki M, Formanowicz D, Surdacka A. Salivary Morning Cortisol as a Potential Predictor for High Academic Stress Level in Dental Students: A Preliminary Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Mar 7;19(5):3132. doi: 10.3390/ijerph19053132.

Nireeksha, Varma SR, Damdoum M, Alsaegh MA, Hegde MN, Kumari SN, Ramamurthy S, Narayanan J, Imran E, Shabbir J, Khurshid Z. Immunomodulatory Expression of Cathelicidins Peptides in Pulp Inflammation and Regeneration: An

Update. *Curr Issues Mol Biol.* 2021 May 13;43(1):116-126. doi: 10.3390/cimb43010010.

Owsianowska J, Kamińska MS, Bosiacki M, Chlubek D, Karakiewicz B, Jurczak A, Stanisławska M, Barczak K, Grochans E. Depression, changes in peripheral blood cell count, and changes in selected biochemical parameters related to lead concentration in whole blood (Pb-B) of women in the menopausal period. *J Trace Elem Med Biol.* 2020 Mar 31;61:126501. doi: 10.1016/j.jtemb.2020.126501.

Percy MG, Gründling A. Lipoteichoic acid synthesis and function in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2014;68:81-100. doi: 10.1146/annurev-micro-091213-112949.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003 Jan;36(1):1-11. doi: 10.1046/j.1365-2591.2003.00603.x.

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.

Rajaram A, Kotrashetti VS, Somannavar PD, Ingalagi P, Bhat K. Culture-based identification of pigmented *Porphyromonas* and *Prevotella* species in primary endodontic infections. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2016;10(3):136-41. doi: 10.15171/joddd.2016.022.

Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF Jr. Correlation between clinical and histologic pulp diagnoses. *J Endod.* 2014 Dec;40(12):1932-9. doi: 10.1016/j.joen.2014.08.010.

Ricucci D, Siqueira JF Jr, Abdelsayed RA, Lio SG, Rôças IN. Bacterial Invasion of Pulp Blood Vessels in Teeth with Symptomatic Irreversible Pulpitis. *J Endod.* 2021 Dec;47(12):1854-1864. doi: 10.1016/j.joen.2021.09.010. Epub 2021 Sep 29.

Sakko M, Tjäderhane L, Rautemaa-Richardson R. Microbiology of Root Canal Infections. *Prim Dent J.* 2016 May 1;5(2):84-89. doi: 10.1308/205016816819304231.

Saoud TMA, Ricucci D, Lin LM, Gaengler P. Regeneration and Repair in Endodontics- A Special Issue of the Regenerative Endodontics-A New Era in Clinical Endodontics. *Dent J (Basel).* 2016 Feb 27;4(1):3. doi: 10.3390/dj4010003.

Şemsi R, Kökbaş U, Arslan B, Ergünel E, Kayrın L, Sepici Dinçel A. The Saliva Cortisol and Amylase Levels Related with Stress Response Compared by Different Analytical Methods. *Appl Biochem Biotechnol.* 2022 Mar;194(3):1166-1177. doi: 10.1007/s12010-021-03676-9.

Shen, Y., Peng, B., & Cheung, G. S. P. (2004). Factors associated with the removal of fractured NiTi instruments from root canal systems. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 98(5), 605-610. doi: 10.1016/j.tripleo.2004.04.011.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Mar;36(2):288-305. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x.

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 Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 2009 Nov;88(11):969-81. doi: 10.1177/0022034509346549.

Siqueira JF Jr, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 May;97(5):632-41. doi: 10.1016/S1079210404000046.

Soden RI, Botero TM, Hanks CT, Nör JE. Angiogenic signaling triggered by cariogenic bacteria in pulp cells. *J Dent Res.* 2009 Sep;88(9):835-40. doi: 10.1177/0022034509341946.

Staniszewska M. Virulence Factors in *Candida* species. *Curr Protein Pept Sci.* 2020;21(3):313-323. doi: 10.2174/1389203720666190722152415.

Sun C, Xie Y, Hu X, Fu J, Zhou J, Wu L. Relationship between Clinical Symptoms and the Microbiota in Advanced Caries. *J Endod.* 2020 Jun;46(6):763-770. doi: 10.1016/j.joen.2020.02.011.

Telles PD, Hanks CT, Machado MA, Nör JE. Lipoteichoic acid up-regulates VEGF expression in macrophages and pulp cells. *J Dent Res*. 2003 Jun;82(6):466-70. doi: 10.1177/154405910308200612.

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.

Trost A, Graf B, Eucker J, Sezer O, Possinger K, Göbel UB, Adam T. Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. *J Microbiol Methods*. 2004 Feb;56(2):201-11. doi: 10.1016/j.mimet.2003.10.007.

Yamashiro K, Ideguchi H, Aoyagi H, Yoshihara-Hirata C, Hirai A, Suzuki-Kyoshima R, Zhang Y, Wake H, Nishibori M, Yamamoto T, Takashiba S. High Mobility Group Box 1 Expression in Oral Inflammation and Regeneration. *Front Immunol*. 2020 Jul 14;11:1461. doi: 10.3389/fimmu.2020.01461.

Yu, C.; Abbott, P.V. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Australian Dental Journal Endodontic*, v.52, n.1, p.4-16, 2007.

Zamperini CA, Aydin B, Sroussi HY, Bedran-Russo AK. In vitro Study of the Role of Human Neutrophil Enzymes on Root Caries Progression. *Caries Res*. 2021;55(2):99-107. doi: 10.1159/000512482.

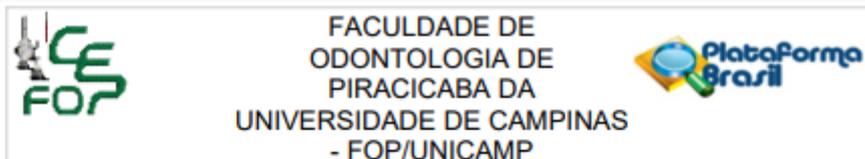
Zaremba ML, Stokowska W, Klimiuk A, Daniluk T, Rozkiewicz D, Cylwik-Rokicka D, et al. Microorganisms in root carious lesions in adults. *Adv Med Sci*, 2006;51 Suppl 1:237-40.

Zheng J, Wu Z, Niu K, Xie Y, Hu X, Fu J, Tian D, Fu K, Zhao B, Kong W, Sun C, Wu L. Microbiome of Deep Dentinal Caries from Reversible Pulpitis to Irreversible Pulpitis. *J Endod*. 2019 Mar;45(3):302-309.e1. doi: 10.1016/j.joen.2018.11.017.

Zhou L, Zhang YF, Yang FH, Mao HQ, Chen Z, Zhang L. Mitochondrial DNA leakage induces odontoblast inflammation via the cGAS-STING pathway. *Cell Commun Signal*. 2021 May 20;19(1):58. doi: 10.1186/s12964-021-00738-7.

Zhu J, Chu W, Luo J, Yang J, He L, Li J. Dental Materials for Oral Microbiota Dysbiosis: An Update. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Jun 30;12:900918. doi: 10.3389/fcimb.2022.900918.

ANEXO 1 – Parecer consubstanciado CEP/FOP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Monitoramento clínico, microbiológico, imunológico e biomolecular das diferentes condições pulpares e perirradiculares

Pesquisador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Área Temática:

Versão: 10

CAAE: 86140218.0.0000.5418

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

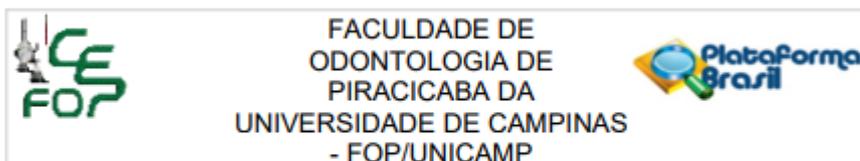
Número do Parecer: 5.871.764

Apresentação do Projeto:

O parecer inicial é elaborado com base na transcrição editada do conteúdo do registro do protocolo na Plataforma Brasil e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil. Os pareceres de retorno, emendas e notificações são elaborados a partir do último parecer e dos dados e arquivos da última versão apresentada.

Trata-se de SOLICITAÇÃO DE EMENDA (E4) AO PROTOCOLO originalmente aprovado em 10/08/2018, emendado em 09/12/2019 (E1), em 03/10/2021 (E2) e em 08/01/2022 (E3), para inclusão de novo pesquisador. O parecer foi atualizado de acordo com a documentação apresentada. A descrição detalhada da solicitação está ao final do parecer.

A LISTA DE PESQUISADORES citada na capa do protocolo inclui, em ordem alfabética, exceto pesquisador responsável, BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES (Cirurgiã-Dentista, Docente Titular da área de Endodontia da FOP-UNICAMP, pesquisadora responsável, orientadora), ALINE VITORIA DE SOUZA NOGUEIRA (Graduanda no curso de Odontologia da FOP-UNICAMP, Incluída em E2), ANA BEATRIZ SAFADY LOPES (Cirurgiã-Dentista, Mestranda no PPG em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP, Incluída em E4), BEATRIZ ISABEL NOGUEIRA LEMOS (Graduanda no



Continuação do Parecer: 5.871.784

curso de Odontologia da FOP-UNICAMP, Incluída em E2), BIANCA LIMA DE ARAÚJO (Graduanda no curso de Odontologia da FOP-UNICAMP, Incluída em E3), EMELLY DE AVEIRO (Cirurgião-Dentista, Mestranda no PPG em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP), EZEQUIEL GABRIELLI (Cirurgião-Dentista, Mestrando no PPG em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP), JULIANA DELATORRE BRONZATO (Cirurgião-Dentista, Pesquisadora Colaboradora na FOP-UNICAMP), LIDIANE MENDES LOUZADA (Cirurgião-Dentista, Mestranda no PPG em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP), MARIA EUNICE DA SILVA DAVIDIAN (Cirurgião-Dentista, Doutoranda no PPG em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP), NATHALIA REICHE MOREIRA (Graduanda no curso de Odontologia da FOP-UNICAMP, Incluída em E2), RODRIGO ARRUDA VASCONCELOS (Cirurgião-Dentista, Mestrando no PPG em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP, pesquisador participante), VITO MADIO CHIARELLI NETO (Cirurgião-Dentista, Mestrando no PPG em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP), o que é confirmado na declaração dos pesquisadores e na PB.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PIRACICABA, 01 de Fevereiro de 2023

Assinado por:
jacks jorge junior
(Coordenador(a))

ANEXO 2 – Relatório de similaridade

Mestrado Safady

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE



FONTES PRIMÁRIAS

1	repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	14%
2	www.prp.unicamp.br Fonte da Internet	1%
3	idoc.pub Fonte da Internet	1%

Excluir citações

Desligado

Excluir correspondências

< 1%

Excluir bibliografia

Em