UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MATEUS NICOLETTI MONTEIRO

PREVALÊNCIA DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS, GEMELLA MORBILLORUM, PARVIMONAS MICRA, FUSOBACTERIUM NUCLEATUM E PORPHYROMONAS ENDODONTALIS* NOS CANAIS RADICULARES EM INFECÇÕES PRIMÁRIAS E SECUNDÁRIAS

PIRACICABA
2020

MATEUS NICOLETTI MONTEIRO

PREVALÊNCIA DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS, GEMELLA MORBILLORUM, PARVIMONAS MICRA, FUSOBACTERIUM NUCLEATUM E PORPHYROMONAS ENDODONTALIS* NOS CANAIS RADICULARES EM INFECÇÕES PRIMÁRIAS E SECUNDÁRIAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Cirurgião Dentista.

Orientador: Profª.Drª. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO PELO ALUNO MATEUS NICOLETTI MONTEIRO, ORIENTADO PELA PROFª DRª BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES.

PIRACICABA

2020

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

Monteiro, Mateus Nicoletti, 1996-
M764p Prevalência de *Enterococcus faecalis*, *Gemella morbillorum*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas endodontalis* nos canais radiculares em infecções primárias e secundárias / Mateus Nicoletti Monteiro. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. 2. Microbiologia. 3. Bactérias. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações adicionais, complementares

Palavras-chave em inglês:
Endodontics
Microbiology
Bacteria
Titulação: Cirurgião-Dentista
Data de entrega do trabalho definitivo: 27-11-2020

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Maria Elizete Nicoletti e Vandré Augusto Trigo Monteiro.

À minha orientadora Profª. Drª Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, por abrir para mim as portas de seu laboratório, e por ter sido parte integrante do meu processo de aprendizado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos meus amigos e familiares, por todo suporte e apoio a mim dado no período de graduação.

À Professora Doutora Brenda Gomes pela oportunidade de realizar esse trabalho de conclusão de curso, pela orientação e por cada um de seus ensinamentos dentro da disciplina de Endodontia.

RESUMO

A importância e o papel das bactérias e de seus subprodutos como o principal fator etiológico das doenças pulpares e periapicais, tanto nos casos de infecção primária, quanto naqueles associados ao insucesso do tratamento endodôntico, é bastante descrita na literatura. O conhecimento da comunidade microbiana residente se torna indispensável para a efetividade das técnicas e substâncias químicas utilizadas durante o tratamento endodôntico na redução da infecção dos canais radiculares. O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a prevalência de cinco bactérias comumente associadas às infecções endodônticas primárias e secundárias: *Enterococcus faecalis, Fusobacterium nucleatum, Gemella morbillorum, Parvimonas micra e Porphyromonas endodontalis.* Concluiu-se que a comunidade microbiana residente no sistema de canais radiculares, tanto em infecções primárias, como secundárias, é heterogênea, sendo a frequência de detecção dos microrganismos-alvo variável em função de fatores inerentes ao diagnóstico pulpar e periapical do dente em questão; aos métodos de coleta e técnicas empregadas; e as diferenças geográficas, socio-econômicas e culturais da população estudada.

Palavras-chave: Endodontia. Microbiologia. Bactérias.

ABSTRACT

The importance and role of bacteria and their by-products as the main etiological factor of pulpal and periapical diseases, both in cases of primary infection and in those associated with the failure of endodontic treatment, is abundantly described in the literature. Knowledge of the resident microbial community becomes indispensable for the effectiveness of the techniques and chemical substances used during endodontic treatment to reduce root canal infection. The present study aimed to evaluate the prevalence of five bacteria commonly associated with primary and secondary endodontic infections: *Enterococcus faecalis, Gemella morbillorum, Parvimonas micra, Fusobacterium nucleatum e Porphyromonas endodontalis.* It was concluded that the microbial community residing in the root canal system, both in primary and secondary infections, is heterogeneous, with the frequency of detection of target microorganisms varying according to factors inherent to the pulp and periapical diagnosis of the tooth in question; the collection methods and techniques employed; and the geographical, socio-economic and cultural differences of the population studied**.**

Key words: Endodontics. Microbiology. Bacteria.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 9

2 PROPOSIÇÃO 12

3 REVISÃO DA LITERATURA 13

3.1 Etiologia da doença pulpar e periapical 13

3.2 Microbiologia das infecções primárias 15

3.3 Etiologia do Insucesso Endodôntico 18

3.4 Microbiologia das infecções secundárias 20

3.5 Microrganismos relacionados as infeções primárias e secundárias 22

3.5.1 *Enterococcus faecalis* 22

3.5.2. Gemella morbillorum 25

3.5.3 Parvimonas micra 27

3.5.4 Fusobacterium nucleatum 30

3.5.5. Porphyromonas endodontalis 34

4 DISCUSSÃO 37

5 CONCLUSÃO 42

REFERÊNCIAS 43

ANEXOS 1 - VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO 55

1 INTRODUÇÃO

Os principais fatores etiológicos das doenças pulpares e periapicais ·são as bactérias e seus subprodutos, como descrito por Kakehashi et al. (1965). Desde então, vários estudos corroboram que os microrganismos são os principais agentes causais das doenças endodônticas (Siqueira et al., 2001; Muniz et al., 2018; Gomes e Herrera, 2018)

A microbiota das infecções pulpares e periapicais é complexa, ou seja, apresentam diversas espécies de microrganismos, quem variam quanto o tipo da infecção e características individuais do hospedeiro, fatores geográficos, demográficos, culturais e sócio-econômicos (Siqueira et al., 2004; Gomes et al., 2008; 2012). Atualmente, já foram reconhecidas mais de 700 espécies bacterianas que habitam naturalmente a cavidade oral, sendo algumas delas capazes de se tornarem patógenos oportunistas. Estima-se que 40-60% das bactérias capazes de colonizar os tecidos da cavidade bucal ainda não tenham sido cultivadas (Gomes et al., 2015; Gomes e Herrera, 2018).

Microrganismos capazes de colonizar os espaços pulpares em média têm 1/3 do diâmetro dos canalículos dentinários, possuindo o tamanho entre 0,5 a 3 micrômetros aproximadamente, o que explica a descontaminação total durante o procedimento de canal seja algo muito improvável. Bactérias tendem a se proliferar nos túbulos dentinários, no sistema de canais radiculares e na região periapical, caso estes meios possuam fatores favoráveis de crescimento (Gomes et al., 1996).

Tradicionalmente, as infecções endodônticas foram estudadas por métodos dependentes da cultura dos microrganismos. Entretanto as pesquisas que se valem desta metodologia possuem algumas limitações, devido à dificuldade de se reproduzir o ambiente propício para o crescimento de certas espécies bacterianas, sendo assim algumas espécies viáveis no interior do canal radicular podem ser subestimadas pela técnica (Roças e Siqueira 2006; Gomes et al., 2008b; Gomes et al., 2020).

Uma vez que dispensam a necessidade da realização do cultivo de microrganismos, os métodos moleculares são capazes de contornar algumas limitações inerentes aos métodos da microbiologia clássica, além disso possuem vantagens como sua alta sensibilidade e especificidade (Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro 2020; Gomes et al., 2020)

Gemella morbillorum é uma espécie bacteriana gram-positiva, de catalase negativa, anaeróbia facultativa, descrita como um patógeno oportunista, integrante da

microbiota oral (Olsvik et al.,1995). Alguns autores também a associam com outras doenças infecciosas como: atrite endocardite e meningite, desde que se encontre em uma situação de desequilíbrio no hospedeiro (Mitchel e Teddy 1985; Bell e McCartney 1992; Orman e Wood 1993; Shinha et al., 2017). A espécie pode ser encontrada em vários tipos de infecções da cavidade oral, sendo também detectada nos casos de infecção endodôntica (Siqueira 2001, Gomes et al., 2008).

Parvimonas micra é uma bactéria presente em altos números nos tecidos orais e gastrointestinais, sendo uma bactéria anaeróbia estrita e gram-positiva (Murdoch et al., 1998). Possui diversas funções metabólicas que provocam peptidase, o que pode explicar seus fatores de virulência, (Steeg e Van der Hoeven et al., 1989). É frequentemente encontrada no interior dos condutos radiculares associados a infecções endodônticas primárias, como nas secundárias/persistentes (Bystrom e Sundqvist., 1981; Gomes et al., 1994 B; Gomes et al., 1996; Siqueira et al., 2002; Gomes et al., 2004; Vianna et al., 2008; Siqueira et al., 2009; Gomes et al., 2013; Gomes et al., 2015; Nóbrega et al., 2016; Roças et al., 2018; Barbosa-Ribeiro et al., 2020). Também é comumente encontrada em abscessos periapicais pelo método de cultura. (Sundqvist et al., 1989; Sousa et al., 2003).

Porphyromonas endodontalis é uma bactéria de pigmentação negra, gram-negativa, em forma de bastonetes ou cocobacilus, anaeróbia estrita, comumente associada a atividade patológica, (Machado de Oliveira et al., 2000; Nan Ma, et al. 2017). Possui uma alta sensibilidade ao oxigênio, o que dificulta sua identificação pelos métodos de cultura (Gomes et al., 2005).

Fusobacterium nucleatum é uma espécie bacteriana em forma de bastonete, gram-negativa, anaeróbia estrita, imóvel e não formadora e esporo. (Moraes et al., 2002 a). Alguns autores a consideram como um “elo” entre o começo e o final da colonização bacteriana nos canais radiculares (Kolenbrander et al., 1989). Possui em sua parede celular LPS, endotoxinas, que são capazes de provocar reações inflamatórias, além de produzir uma série de subprodutos metabólicos, influenciando no processo. Essas condições a associam com a severidade de infecções endodônticas agudas (Bostad et al., 1996). A espécie é subdividida em 5 subespécies: *F. nucleatum nucleatum, F. nucleatum vicentii* e, *F. nucleatum polymorphum, F. fusiforme e F. animalis.* Apesar de apresentarem genoma e morfologias muito parecidas, estas possuem algumas características individuais (Gendron et al., 2000).

O gênero *Enterococcus* possui espécies presentes em diversas partes do corpo humano, como no trato gastrointestinal, sistema genital, sistema urinário e na cavidade oral. *Enterococcus faecalis* é uma espécie gram-positiva, não formadora de esporos, fermentativa

e aeróbica facultativa, possuindo de 0,5 a 1 μm de diâmetro, que pode sobreviver tanto como uma única célula, quanto em uma comunidade complexa. (Rams et al., 1994; Roças et al. 2004). *E. faecalis* possui a habilidade de penetrar nos túbulos dentinários, bem como sobreviver em smear layer e gaps entre os materiais restauradores, escapando da ação de antimicrobianos durante o tratamento do canal, além de serem capazes de sobreviver em meios escassos de nutrientes onde as interações bacterianas são mínimas por longos períodos de tempo. Também são resistentes ao hidróxido de cálcio (Haapasalo et al., 1987; Lléo et al., 1999; Distel et al. 2002).

Tendo o conhecimento de que estes microrganismos são parte comumente integrante das infecções primárias e secundárias, se torna de suma importância estudar sua prevalência. Entender o papel destes microrganismos dentro da comunidade microbiana colonizadora do sistema de canais radiculares nas infecções endodônticas possibilitará o desenvolvimento de técnicas, tecnologias e substâncias capazes de otimizar o tratamento endodôntico e favorecer seu prognóstico.

2 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a presença e a frequência de detecção dos microrganismos *Enterococcus faecalis*, Fusobacterium nucleatum, Gemella morbillorum, Parvimonas micra e Porphyromonas endodontalis em casos associados as doenças endodônticas primárias e secundárias.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Etiologia da doença pulpar e periapical

Bactérias e seus subprodutos são reconhecidos como os principais responsáveis pelo desenvolvimento das doenças pulpares e periapicais (Kakehashi et al., 1965; Sundqvist et al., 1998; Gomes et al., 1994 B; 1996 A; Siqueira et al., 2001 A). Mais de 700 espécies bacterianas foram detectadas como colonizadores comensais da cavidade oral (Gomes et al., 2015; Gomes e Herrera, 2018), sobretudo nos casos onde há desequilíbrio entre a flora bacteriana presente e o sistema imune do hospedeiro.

Algumas espécies microbianas tornam-se responsáveis pelo desenvolvimento de patologias, sendo conhecidas como patógenos oportunistas (Gomes et al., 1996 B). Kakehashi et al., 1965, objetivando avaliar a importância das bactérias no desenvolvimento da doença endodôntica descreveram os efeitos da exposição pulpar através de um estudo com ratos *germ-free* e ratos convencionais. A exposição pulpar proposital em primeiros molares da maxila de ratos, através da perfuração com broca carbide revelou que ratos estéreis, não apresentaram desvitalização pulpar completa, sendo observada inflamação de grau leve, ocorrendo posteriormente o reparo através da deposição de dentina reparadora sobre a área de exposição pulpar. Essa ocorrência demonstra o importante papel das bactérias e seus subprodutos na origem das doenças pulpares e periapicais.

Em 2006, Fabricius et al., objetivando avaliar o papel da infecção no desenvolvimento das patologias periapicais, realizaram um estudo em modelo animal utilizando macacos. A remoção do tecido pulpar foi realizada de maneira asséptica e os animais, posteriormente, divididos em 2 grupos, sendo que o primeiro recebeu o selamento coronário logo após a extirpação pulpar, impedindo a contaminação do sistema de canais radiculares pela microbiota residente na cavidade bucal, no segundo grupo a cavidade pulpar foi deixada exposta ao meio bucal por um período de 7 dias e, posteriormente, selada. Após 6 meses, os dentes submetidos aos procedimentos foram avaliados clinicamente, radiograficamente e por técnicas histológicas. O estudo demonstrou ausência de sinais de inflamatórios através dos três parâmetros de avaliação no grupo onde a esterilidade do sistema de canais radiculares foi preservada. No grupo onde houve a contaminação dos tecidos pulpares, foi relatada a presença de sinais clínicos de inflamação em 23% das amostras, sinais radiográficos de inflamação foram detectados em 90% das amostras; além disso, a avaliação histológica revelou a presença de uma reação inflamatória de grau elevado em 100% das amostras contaminadas.

Tendo-se estabelecido o importante papel dos microrganismos na doença endodôntica, em 1994 (B), Gomes et al. realizaram um estudo com objetivo de correlacionar a presença de grupos bacterianos específicos com os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes. Para realização do estudo foram coletadas amostras de 30 canais radiculares indicados para o tratamento endodôntico na universidade de Manchester, as amostras foram processadas pelo método de cultura e posteriormente foram realizados testes estatísticos visando correlacionar os sinais e sintomas clínicos a presença de determinados grupos bacterianos.

A presença de bactérias anaeróbias estritas em 93% dos canais associados a sintomatologia dolorosa, correlações positivas foram encontradas entre as bactérias *Prevotella* sp.*, Peptostreptococcus s*sp. e a presença de sintomatologia dolorosa, a presença de *F. nucleatum* e, *P. micra* foi associada a edema, *Eubacterium lentum* foi correlacionada a presença de fístula.

A coabitação de Gram-positivas e Gram-negativas foi associada a dor a percussão. Sobretudo os autores destacam que o caminho seguido pela inflamação depende principalmente do número e virulência dos microrganismos presentes no sistema de canais radiculares e da resposta imune dos hospedeiros. Apesar de resultados promissores ressalta-se a necessidade de estudos posteriores para maior entendimento da relação entre a infecção intrarradicular presente a evolução da doença endodôntica.

Sakamoto et al., 2006, sugeriram que a presença de sintomatologia em infecções poderia estar ligada a bactérias específicas. A partir de técnicas de caracterização molecular realizou estudos com pacientes sintomáticos e assintomáticos. O trabalho revelou uma diversidade da comunidade microbiana, contudo são necessários mais estudos para se concluir sobre a ligação dos microrganismos com a presença de sinais e sintomas, pois mesmo com a utilização de métodos moleculares, algumas bactérias ainda podem ser indetectáveis, indicando que a comunidade residente nos canais radiculares possa estar subestimada.

Apesar de já estabelecido o papel da infecção intrarradicular como principal agente etiológico das doenças pulpares e periapicais, ressalta-se o importante papel do sistema imune do hospedeiro; sendo este o responsável por modular a inflamação ocasionada pelo conteúdo bacteriano presente no interior do sistema de canais radiculares através da expressão de mediadores químicos da inflamação, interferindo ativamente no rumo tomado pela infecção e pela doença endodôntica (Martinho et al., 2014b).

Microrganismos e seus subprodutos são os principais agentes etiológicos das patologias pulpares e periapicais. Eles são capazes de causar infecção do tecido pulpar, a

formação e a manutenção das alterações periapicais através de sua interação com o organismo hospedeiro. O tratamento endodôntico tem como objetivo primordial a desinfecção e o selamento hermético do sistema de canais radiculares, de maneira a reduzir ao máximo a carga bacteriana presente e impossibilitar que bactérias remanescentes atinjamos tecidos periapicais. Trazendo como resultado há a remissão de sinais e sintomas, e o restabelecimento de suas funções no sistema estomatognático (Siqueira et al., 2014).

3.2 Microbiologia das infecções primárias

Infecções endodônticas primárias são a causa mais frequente de emergências odontológicas e se não tratadas podem evoluir para quadros mais graves, como abscessos, granulomas, cistos periapicais e até mesmo septicemias e endocardites. O conhecimento da microbiota presente nestes casos é de extrema importância para o desenvolvimento de técnicas e soluções antimicrobianas mais efetivas (Gomes et al., 2014; Nóbrega et al., 2016)

A comunidade presente nas infecções primárias é polimicrobiana, predominantemente composta por bactérias anaeróbias estritas. Sendo que, apesar de seguir um padrão, a microbiota presente nos canais radiculares pode variar dependendo da via de acesso dos microrganismos ao conduto radicular, da região geográfica estudada e de fatores genéticos e imunológicos do organismo hospedeiro (Gomes et al., 1994 B; 2015; Siqueira et al., 2001 A; 2004)

A microbiota residente dos canais radiculares é modulada por diversos fatores ambientais proporcionados pelo ambiente inóspito que habitam. Fatores como a disponibilidade de nutrientes, a escassez de requerimentos gasosos e as relações interespecíficas sinérgicas, ou antagônicas são capazes de selecionar e alterar a composição do ecossistema endodôntico. (Ricucci e Siqueira 2010; Swimberghe et al., 2019).

Bactérias anaeróbias facultativas presentes na infecção endodôntica são responsáveis por consumir o oxigênio presente no interior do SCR diminuindo assim sua concentração e seu potencial de oxirredução, proporcionando desta maneira um ambiente favorável para o desenvolvimento dos microrganismos anaeróbios estritos (Fingergold et al., 1993)

Tendo o objetivo de analisar as alterações ocorrentes na comunidade bacteriana presente no SCR ao decorrer do tempo, Fabricius et al., 1982, realizaram a exposição pulpar de 24 dentes em espécimes de macaco. Os dentes receberam selamento coronário passados 7 dias da exposição pulpar. Foram procedidas coletas do conteúdo microbiológico presente no

interior dos canais radiculares no período de 7, 90, 180 e 1060 dias. As pesquisas identificaram que com o decorrer do tempo a microbiota alterou-se tanto qualitativa, quanto quantitativamente. Inicialmente prevaleciam bactérias anaeróbias estritas e facultativas e ao decorrer dos tempos analisados aumentou progressivamente a prevalência de bactérias anaeróbias estritas, tanto em número quanto em espécie.

O tempo de contaminação também foi determinante no desenvolvimento de sinais clínicos, como por exemplo a presença de exsudato purulento no momento de reabertura do canal. Supõe-se que os fenômenos ecológicos decorrentes no interior dos canais radiculares são capazes de realizar uma seleção dos microrganismos ali residentes, favorecendo o desenvolvimento de uma comunidade microbiana complexa.

Com o objetivo de se investigar os padrões da infecção microbiana em canais radiculares não tratados associados a presença de lesão periapical crônica Siqueira et al., 2002, analisaram através do microscópio eletrônico de varredura (MEV) 15 dentes associados a infecção primária indicados para exodontia. Através da análise das imagens os autores relataram a presença de bactérias em todos os casos. Os microrganismos foram detectados em abundância em todos os terços do canal radicular. Coccus e/ou bacillus foram detectados na grande maioria das paredes internas do canal radicular, além de serem frequentemente encontradas no interior dos túbulos dentinários, sendo a profundidade máxima de penetração relatada 300 µm. Foi concluído que o sistema de canais radiculares de dentes associados a infecção primária está abundantemente contaminado em toda sua extensão. Os autores destacam a necessidade de se estabelecerem protocolos terapêuticos efetivos e ressaltam a necessidade do uso abundante de soluções químicas auxiliares visando a erradicação de microrganismos em locais de difícil acesso para os instrumentos endodônticos.

Jacinto et al., 2003, avaliaram a microbiota presente em 48 dentes portadores de infecção primária, sendo que destes 19 não apresentavam sintomas e 29 eram sintomáticos. As amostras foram analisadas através da técnica de cultura, e posteriormente submetida a identificação através de testes bioquímicos. Foram isoladas um total de 218 cepas bacterianas, sendo que destas 150 foram isoladas dos pacientes sintomáticos e 68 dos pacientes assintomáticos. Ao todo foram detectadas 48 espécies e 19 gêneros distintos. Bactérias anaeróbias estritas representavam 74,77% do total das bactérias isoladas, reafirmando a maior prevalência dos anaeróbios obrigatórios nos casos de necrose pulpar associada a periodontite apical. 72,4% das bactérias anaeróbias estritas isoladas foram provenientes de casos sintomáticos. A presença de sintomatologia dolorosa espontânea e dor a percussão foi associada a presença de anaeróbios estritos, sendo que estes não foram detectados em apenas um caso sintomático. Os anaeróbios isolados com maior frequência foram

Fusobacterium necrophorum (6.9%), *P. prevotii (i.e., Anaerococcus prevotii)* (6.4%), *Peptostreptococcus micros* (6.0%), *F. nucleatum* (5.0%) e *Prevotella intermedia /nigrescens* (4.6%).

Siqueira et al., 2005, analisaram por PCR a presença de 7 patógenos endodônticos em pacientes de duas localizações geográficas distintas, sendo elas o Brasil e a Coréia do Sul. 72 amostras de dentes portadores de polpa necrótica e periodontite apical foram analisadas, sendo 36 de pacientes brasileiros e 36 de pacientes coreanos. Todos patógenos testados foram detectados em pelo menos uma amostra de cada nacionalidade. A frequência de detecção dos microrganismos foi diferente para a população brasileira e sul-coreana.

Com o objetivo de avaliar o envolvimento de bactérias e archeas nas infecções endodônticas primárias Vianna et al. (2006) coletaram o conteúdo infeccioso presente em 20 canais indicados ao tratamento endodôntico devido a necrose pulpar evidenciada pela presença de lesão periapical crônica. Nenhum dos casos incluídos no estudo apresentavam sintomatologia dolorosa de caráter espontâneo. Os autores avaliaram e quantificaram a presença de bactérias e archeas através dos métodos moleculares de PCR e RTq PCR. Archeas foram detectadas em 5 casos em concentrações de 10^5, sempre acompanhadas de bactérias. Bactérias foram detectadas em todos os casos entre as concentrações de 10^6 e 10^8. Os autores afirmam que existe uma grande lacuna na literatura no que se diz respeito a diversidade, abundância, e na interação das archeas com outros microrganismos e com o organismo humano, sobretudo os resultados deste estudo revelam a presença das archeas nas infecções orais, reafirmando a ideia de que os microrganismos do domínio podem estar relacionados a patologias humanas.

Gomes et a., 2006, avaliaram através da técnica de cultura e do método molecular de PCR a presença de *E. faecalis* em 100 dentes, sendo 50 portadores de infecção primária evidenciada pela presença de lesão periapical e 50 portadores de periodontite apical pós tratamento. A cultura detectou *E. faecalis* em 23 das amostras analisadas (2 casos de infecção primária e 21 de infecção secundária), enquanto o PCR registrou sua presença em 79 amostras (41 e 38 casos de infecção primária e secundária respectivamente). Este estudo demonstra que o microrganismo é parte integrante da flora bacteriana de dentes portadores de polpa necrótica e dentes associados ao insucesso do tratamento endodôntico, descrevendo sua importância no desenvolvimento e na manutenção das lesões periapicais, uma vez que a bactéria se mostra extremamente resistente ao preparo químico mecânico.

Comparando a microbiota das infecções primárias, Gomes et al., 2012, coletaram 15 amostras de dentes associados a infecção primária e 15 de dentes associados a infecção

secundária/persistente, buscando avaliar presença de *Prevotella nigrescens, Fusobacterium nucleatum, Porphyromonas endodontalis, Treponema denticola e Treponema socrankskii* através da técnica de PCR. Bactérias gram-negativas foram encontradas em 93% e 33% dos canais associados as infecções primárias e secundárias respectivamente.

Nóbrega et al., 2016, avaliaram a microbiota presente em 20 canais radiculares diagnosticados com abscesso periapical agudo, através do sequenciamento do 16S rRNA, visando compreender o perfil microbiológico associado a este quadro clínico. Foram identificadas 215 cepas através do sequenciamento genético, sendo 59 espécies distintas e em média 6 espécies por canal. 50 das espécies identificadas nas amostras eram anaeróbias estritas e apenas 9 anaeróbias facultativas. As bactérias detectadas com maior frequência foram *Prevotella buccae, Pseudoramibacter alacolyticus, Prevotella nigrescens, Parvimonas micra* e *Dialister invisus* .Os autores descrevem a microbiota presente nos abscessos apicais agudos como polimicrobiana, heterogênea e variante entre os pacientes de um mesmo diagnóstico, sendo composta principalmente por bactérias anaeróbias estritas, pertencentes em sua maioria ao filo dos Firmicutes.

Desta forma a infecção primária, responsável pela formação das periodontites apicais é identificada na literatura endodôntica através dos métodos de cultura e moleculares como polimicrobiana, com predominância de bactérias anaeróbias estritas e Gram-negativas, sendo a quantidade detectada variável em função da metodologia empregada. (Gomes et al., Siqueira et al., 2001 A; 1994 B; Jacinto et al., 2003; Gomes et al., 2004; Peciuliene et al., 2008; Gomes et al., 2012; Gomes e Herrera, 2018; Aveiro et al., 2020).

3.3 Etiologia do Insucesso Endodôntico

O tratamento endodôntico possui uma alta taxa de sucesso, mesmo assim, o insucesso é relatado em alguns casos, estando associado a erros técnicos de desinfecção durante o procedimento. Entretanto mesmo quando todo o protocolo é seguido corretamente, ainda sim o tratamento pode fracassar. Isso ocorre, porque alguns canais podem apresentar áreas que ainda não podem ser descontaminadas com as técnicas atuais (Nair et al., 2004). Acidentes, como perfurações e fratura de instrumentais intracanal, também estão diretamente associados com os fracassos, dificultando a execução do tratamento adequado (Siqueira et al. 2001 A).

Os tratamentos para as infecções persistentes nos canais radiculares são variados conforme cada caso clinico, podendo ser mais conservadores, como retratamento endodôntico

convencional, ou mais invasivos, como cirurgias parendodônticas e até exodontias com instalação de implante imediato. (Endo et al., 2013.)

O fracasso do tratamento endodôntico é geralmente caracterizado pela presença de periodontite apical, que pode ser emergente, recorrente ou persistente. Os casos mais comuns de insucesso são os que envolvem a persistência da doença, porém pode também estar associado a um selamento coronário deficiente ou uma infecção extrarradicular (Siqueira et al., 2014). Essas condições estão relacionadas comumente a tratamentos que não seguiram os protocolos corretos de prevenção de infecção. Entretanto, fatores como a complexidade anatômica do sistema de canais radiculares e o tipo e a quantidade de microrganismos presentes neste sistema exercem um papel muito importante para o fracasso do tratamento endodôntico (Nair et al., 2004.).

Na maioria dos casos, o insucesso se deve a persistência de microrganismos no canal radicular, principalmente na região apical (Siqueira et al., 2001a). Estudos revelam que alguns canais radiculares possuem áreas que não se consegue instrumentar corretamente, mesmo seguindo o protocolo endodôntico correto (Lin et al. 1991; Zuolo et al., 2018). Essas regiões podem conter bactérias e tecidos necróticos e, portanto, causar um re-inflamação (Nair et al., 1990). O tratamento do canal altera o meio, tornando-o mais inóspito e selecionando microrganismos que possuem fatores de resistência a ações mecânicas e de antimicrobianos, bem como a escassez de nutrientes (Siqueira et al., 2001a).

Microrganismos presentes em áreas de deltas apicais, canais secundários, irregularidades, espaços entre o material restaurador e túbulos dentinários podem às vezes não ser afetadas pelos procedimentos de desinfecção (Lin et al., 1991; Zuolo et al., 2018). É provável que em deltas apicais e ramificações radiculares, o suprimento de nutrientes não se altere muito após a terapia, porém nos espaços e túbulos dentinários ele cai drasticamente (Siqueira et al., 2001 a). Já foi constatado que esses microrganismos possuem a capacidade de escapar de células e moléculas de defesa, alterar a ação de antígenos, incluindo proteólises e moléculas de anticorpos, causando assim, uma imunossupressão local (Siqueira et al., 1997).

Alguns casos isolados de insucesso foram associados a fatores não microbiológicos. Acredita-se que isso se deve a presença de cristais de colesterol na região periapical, pois já foram observadas raízes, em que havia esse tipo de estrutura, mas não havia presença de microrganismos (Nair et al., 1993). Porém os achados são pouco suficientes para se constatar tal afirmação (Siqueira et al. 2001a).

O desenvolvimento de lesões perirradiculares faz com que o corpo crie uma barreira biológica para impedir que os microrganismos em questão se espalhem ainda mais. O tecido ósseo é reabsorvido e substituído por tecido de granuloma, contendo elementos de defesa, como fagócitos e anticorpos (Siqueira et al. 1997). Forma-se assim uma densa barreira polimorfa, que dificulta a passagem dos microrganismos à região periapical. Poucos agentes patológicos conseguem atravessar essa parede, porém os subprodutos produzidos por esses microrganismos podem se difundir pela região, gerando uma inflamação local, (Siqueira et al., 2001 a).

3.4 Microbiologia das infecções secundárias

A microbiota das infecções secundárias ou persistentes difere das infecções primarias, pois devido ao tratamento endodôntico, seleciona-se espécies mais resistentes, capazes de sobreviver a condições mais severas, com pouca disponibilidade de nutriente e menor número de microrganismos para atividade comensal (Bícego-Pereira et al., 2020). Quanto pior for a qualidade do tratamento realizado, mais a microbiota se assemelha das infecções primárias (Siqueira e Figdor et al., 1998).

A composição microbiana no insucesso de tratamentos endodônticos é composta em sua maioria por bactérias anaeróbias facultativas, principalmente do gênero *Enterococcus*, (Molander et al., 1998). Isso se atribui a capacidade desses tipos de microrganismos a resistir a atividades antimicrobianas, bem como resistir em casos de tratamento inadequado.

Em 1998 Sundqvist et al. selecionaram 54 dentes indicados para retratamento endodôntico, com presença de lesão periapical, assintomáticos, que já haviam recebido o tratamento entre 4 a 5 anos antes do estudo, com o objetivo de determinar a microbiota estava presente nestes canais e estabelecer o resultado do retratamento conservador. Os resultados mostraram que a microbiota presente nos canais de dentes com insucesso do tratamento endodôntico diferiu marcadamente daquela dos dentes não tratados. A infecção no momento da obturação e o tamanho da lesão periapical foram fatores que influenciaram negativamente no prognóstico. Três dos quatro fatores ligados ao insucesso endodôntico foram superados com sucesso pelo retratamento.

Em 2003, Chávez de Paz et al. realizaram uma pesquisa sobre microrganismos encontrados em lesões periapicais persistentes após o tratamento endodôntico. Dos 200 casos analisados, 107 apresentaram crescimento bacteriano na amostra do canal radicular, enquanto 93 casos não apresentaram crescimento. Em vários casos, microrganismos

permaneceram e ou novas espécies surgiram indicando que mesmo após o controle químico-mecânico, o canal radicular ainda fornece fatores de crescimento e de sobrevivência.

Pinheiro et al. (2003 A) após análise clínica e radiográfica, selecionaram 60 dentes indicados para retratamento endodôntico, que possuíam a presença de lesão periapical, com o intuito de investigar a microflora presentes nos casos de insucesso do tratamento. As amostras foram coletadas durante a realização do procedimento para análise a partir do método de cultivo. 9 canais radiculares não apresentaram bactérias cultiváveis, o que reforça a importância dos estudos a partir de análises genéticas. *E. faecalis* foi a bactérias mais identificadas (45%), seguida de *P. prevoti (10%), S. constellatus* (8,3%) e *P. micra* (8,3%).

Estudos demonstram que mesmo sendo menos complexo que as infecções primárias, ainda há uma alta complexidade na microbiota de infecções secundárias. Em uma pesquisa envolvendo 45 amostras de canais radiculares com lesão periapical e necessidade de retratamento endodôntico, sendo o tratamento prévio realizado pelo menos 4 anos antes, Gomes et al. (2008b) visaram analisar a prevalência de espécies comumente encontradas em casos de insucesso do tratamento endodôntico. *E. faecalis* foi a espécie mais prevalente (77,8%), seguido de *P. micra* (51,1%) *, P. gingivalis* (35,6%)*, E. alocis* (27,7%)*, T. denticola* (24,4%)*, P. endodontalis*(22,2%)*, P.intermedia* (11,1%)*, P. nigresens* (4,4%)*,*.

Roças et al., 2012, estudando com 42 pacientes, com pelo menos um dente endodonticamente tratado e com lesão periapical assintomática, caracterizaram a microbiota desse tipo de patologia, através de PCR. No estudo foi observado uma alta prevalência das espécies *F. nucleatum, E. faecalis P. alactolyticus.*

Em 2013, Endo et al., selecionaram 15 pacientes com necessidade de retratamento endodôntico e presença de lesão periapical, visando avaliar as espécies e sua quantidade em infecções persistentes. A grande maioria dos microrganismos recuperados era gram-positivos, sendo as bactérias mais encontradas *P. micra, P. nigrescens, E. faecalis* e e *G. morbillorum.* O estudo também reafirmou a importância do estudo bacteriano por métodos genéticos, visto que bactérias gram-negativas estavam presentes, porém só foram identificadas a partir do método de PCR.

Ao avaliarem a comunidade microbiana presente no interior do sistema de canais radiculares de 20 dentes indicados ao retratamento devido ao insucesso do tratamento endodôntico prévio, em 2020, Barbosa-Ribeiro et al. detectaram bactérias presentes em 100% de suas amostras. As espécies detectadas com maio frequência foram: *E. faecalis, P. gingivalis, F. nucleatum, G. morbillorum, T. forsythia, P. micra* e *P. endodontalis.* Sendo o

Enterococcus faecalis a espécie mais prevalente, estando presente em 20/20 amostras coletadas.

A indicação do retratamento endodôntico, requer um diagnóstico baseado em sinais clínicos e radiográficos, mas também pode ser baseada por necessidades protéticas, sem necessariamente com a evidência de uma lesão periapical. Ao avaliarem 45 dentes com necessidade de retratamento por razões protéticas, em 2020, Bicego-Pereira et al. selecionaram 20 dentes com restaurações indiretas, com retentor intra-canal e mal adaptadas, sem a presença de lesão periapical. Os microrganismos foram cultivados e analisados por métodos genéticos. Foram encontradas bactérias em todas as amostras, sendo sua maior incidência no terço coronal (10/20), seguido do médio (7/20) e apical (7/20). *Enterococcus foi* o gênero mais prevalente.

3.5 Microrganismos relacionados as infeções primárias e secundárias

3.5.1 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis é o microrganismo mais frequentemente detectado em infecções orais, incluindo tecidos periodontais e o sistema de canais radiculares. (Brook et al., 1991).

E. faecalis possui a habilidade de penetrar nos túbulos dentinários, bem como sobreviver em smear layer e gaps entre os materiais restauradores, escapando da ação de antimicrobianos durante o tratamento do canal (Haapasalo et al., 1987) e além disso, a espécie se mostrou hábil na formação de biofilme contribuindo para a patogenicidade da microflora local (Distel et al., 2002). Também se mostra resistente ao hidróxido de cálcio, medicação intracanal mais utilizada mundialmente (Evans et al., 2002).

Tradicionalmente a identificação de *Enterococcus* em diversos sítios foi realizada a partir dos métodos de cultura. Sua prevalência em infecções primárias e secundárias foi reportada por essas técnicas (Sundqvist et al., 1998 e Molander et al., 1998). Entretanto, devido a limitações dos métodos dependentes do cultivo, como a incapacidade se identificar cepas com diferentes fenótipos, autores sugerem o uso de técnicas moleculares aliadas à cultura para o estudo da espécie (Lléo et al., 1999)

Em 1998, Sundqvist et al., coletaram amostras do conteúdo microbiano de 54 dentes indicados ao retratamento endodôntico devido a evidência de lesão periapical

radiográfica e analisou-as através dos métodos de cultura. *E. faecalis* foi encontrada em 38% das amostras, sendo a mais recuperada do estudo.

Molander et al., 1998, visando examinar a microbiota de 100 dentes já obturados, mas com presença de lesão periapical, dividiram suas amostras em 2 grupos para se comparar os resultados: grupo P (que possuía sinais clínicos da patologia), representado por 80 dentes e grupo T (técnico), que não apresentava sinais clínicos da doença. As amostras foram cultivadas, identificadas por métodos bioquímicos e classificadas como “esparsa” ou “muito esparsa”. Bactérias anaeróbias facultativas predominaram as amostras (69%). O gênero *Enterococcus* foi o mais encontrado entre esse tipo de bactéria, estando presente em 78% dos casos onde haviam bactérias anaeróbias facultativas, sendo 11 dessas amostras pertencentes ao grupo T.

Pinheiro et al., 2003 B, selecionaram em seu estudo 30 canais radiculares com indicação de retratamento endodôntico, descrevendo a microbiota encontrada em casos de insucesso no tratamento. O tratamento endodôntico prévio foi realizado no mínimo 4 anos antes da intervenção. Após a coleta das amostras, estas foram cultivadas e analisadas fenotípicamente. Foram encontradas 29 espécies bacterianas, sendo *E. faecalis* presente em 11 de 30 canais (36,7%), sendo mais uma vez a espécie mais prevalente. O estudo também testou à susceptibilidade das bactérias presentes a ação de antibióticos. *E. faecalis* apresentou sensibilidade a benzilpenicilina, amoxilina e a combinação de amoxilina com clavunato.

Roças et al., 2004, descreveram a presença de *E. faecalis* de uma maneira geral, em infecções endodônticas e perirradiculares. Foram selecionados pacientes com 18 a 80 anos de idade, com diferentes tipos de diagnósticos pulpares, sendo 21 dentes com necrose pulpar e lesão periapical crônica, assintomáticos, 10 casos com necrose e lesão, porém apresentando sintomatologia, 19 casos de abscesso periapical e 30 dentes com insucesso do tratamento prévio. As amostras foram cultivas e analisadas por métodos genético-moleculares. Nos casos assintomáticos, *E. faecalis* foi encontrada em 33% das amostras (7/21), 10% em lesões periapicais crônicas sintomáticas (1/10), 5% em casos de abscesso (1/19). No geral, a espécie foi presente em 18% dos casos de infecção primária (9/50). Os resultados mostraram que *E. faecalis* é mais presente em infecções assintomáticas do que sintomáticas.

Em 2006, Gomes et al., realizaram um estudo com o objetivo de comparar a identificação de *E. faecalis* pelos métodos de cultura e PCR. Foram selecionados 50 dentes anteriores que apresentavam necrose pulpar e 50 dentes apresentando insucesso do tratamento prévio. Através do método de cultura, a espécie foi recuperada em 23 dos 100 dentes, sendo 2 dos 50 canais necróticos (4%) e 21 dos 50 canais com infecção secundária.

Já pelo método PCR, *E. faecalis* foi encontrada em 41 de 50 (82%) dentes com necrose pulpar e 38 de 50 (72%) dos casos associados a infecção secundária/persistente.

Pinheiro et al., 2006, coletaram m total de 22 amostras contendo bactérias do gênero *Enterococcus* foram isolados de canais radiculares que apresentavam insucesso no tratamento endodôntico prévio. Essas amostras foram coletadas de 41 dentes de 35 pacientes, durante o procedimento de retratamento. Os dentes haviam realizado o tratamento pelo menos 4 anos antes desse estudo. As espécies encontradas foram cultivadas e as espécies identificadas pelo método de sequenciamento 16S rRNA. O objetivo do estudo foi identificar espécies do gênero *Enterococcus* nos canais radiculares que apresentaram insucesso do tratamento endodôntico anterior. Microrganismos foram encontrados em 35 canais radiculares após a desobturação e 6 não apresentavam bactérias cultiváveis. O gênero *Enterococcus* foram encontradas em 22 (62,8%) dos 35 canais positivos a cultura. Em 15 amostras, *E. faecalis* se apresentou como o único isolado, em 2 esteve associada a mais duas espécies e em 5 foi recuperada em uma infecção polimicrobiana com 3 ou mais espécies.

Em 2006, Zoletti et al. descreveram a presença de *E. faecalis* em infecções endodônticas primárias com e sem lesão periapical. Foram coletadas amostras de 53 canais radiculares indicados para tratamento endodônticos, os pacientes possuíam entre 19 a 75 anos. 27 dentes possuíam evidências radiográficas de lesão periapical e 26 não apresentavam. As amostras foram cultivadas e analisadas morfologicamente e por métodos moleculares, sendo que 3 delas foram excluídas por motivos de contaminação da cultura. *E. faecalis* foi encontrada em 40 dentes (80%), sendo 22 sem lesão e 18 com lesão periapical, não foram registradas diferenças estatísticas significantes entre os dois grupos.

Em 2008, Pirani et al., descreveram a presença de *E. faecalis* tanto em infecções primárias, quanto em infecções secundárias/persistentes, selecionando 102 pacientes entre 16 e 73 anos de idade, com presença de infecção primária (72/102) ou secundária (30/102). As amostras foram coletadas durante o procedimento endodôntico e identificadas através do método PCR. Os resultados mostraram *E. faecalis* em 7,6% dos casos de infecção primária e 39,1% em infecções secundárias. O estudo não demonstra relação dessa bactéria com sintomatologias, mas reforçou que esta é mais relacionada o insucesso do tratamento endodôntico.

Gomes et al., 2008b, ao avaliarem a comunidade microbiana relacionada as infecções secundárias/persistentes em seu estudo detectaram *E. faecalis* em 77,8% de suas amostras, sendo a bactéria detectada com maior frequência.

Em 2013, Penas et al., coletaram amostras de 21 canais radiculares que tiveram insucesso no tratamento endodôntico para identificarem a presença de *E. faecalis*. Um total de 40 cepas de *E. faecalis* foram cultivadas. O estudo concluiu que as variações genéticas dessa bactéria são relacionadas com o nicho em que está. Além disso, algumas cepas de *E. faecalis* também podem produzir uma cápsula anti-fagocítica que pode ajudar a evadir o sistema imunológico e sustentar uma infecção de longo prazo. Em canais radiculares altamente infectados, esses fatores de virulência podem contribuir para a patogênese da doença pós-tratamento.

Em 2012, Roças e Siqueira et al., realizaram um estudo visando caracterizar a microbiota de dentes que já haviam recebido tratamento endodôntico. Foram selecionados 42 dentes de pacientes entre 16 a 70 anos de idade. Todos os canais eram assintomáticos, possuíam evidências de lesão periapical e haviam realizado o tratamento pelo menos 2 anos antes. As amostras foram coletadas durante o procedimento de retratamento para cultivo e análise pelo método de PCR a partir do sequenciamento16S rRNA. *E. faecalis* foi encontrada em 38% dos canais (11/29), embora a espécie não tenha sido encontrada com alta frequência no presente estudo, deve-se ressaltar que apresentava um alta quantidade populacional (média de 2.45×10^5 células), reafirmando que essa espécie é o principal patógeno nos insucessos do tratamento endodôntico.

Em 2020, Barbosa-Ribeiro et al., relataram a detecção de *E. faecalis* em 100% das amostras coletadas em casos de insucesso do tratamento endodôntico prévio, evidenciado pela presença de periodontite apical crônica.

3.5.2 Gemella morbillorum

A presença de *Gemella morbillorum* no interior de canais radiculares acometidos por infecções primárias ou secundárias já foi vastamente descrita na literatura científica atual (Pinheiro 2003a; Sousa et al., 2004; Sassone et al., 2007; Gomes et al., 2008a; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2020).

Ao analisar o conteúdo microbiano de 28 dentes diagnosticado com necrose pulpar associada a periodontite apical crônica em busca de 42 espécies através do método molecular de Checkerboard DNA-DNA hybridization Siqueira et al. (2000) constataram a presença de bactérias em 100% de suas amostras. A bactéria *Gemella morbillorum* foi detectada em 12% dos casos.

Siqueira et al., 2001c, utilizando o método de checkerboard DNA-DNA hybridization avaliaram o conteúdo microbiano presente na coleção purulenta associada a 27 dentes diagnosticados com abscesso apical agudo. Os autores relataram a detecção da espécie bacteriana em 11,1% dos casos.

Pinheiro et al., 2003a relataram a detecção do microrganismo em 6,7% dos casos de infecção secundária/persistente analisados em seu estudo. No mesmo ano a bactéria foi detectada em 10% dos casos de infecção primária (Jacinto et al., 2003)

Estudo subsequente realizado em 2004, por Sousa et al., investigaram o conteúdo bacteriano presente no interior do sistema de canais radiculares de dentes associados a abscessos apicais agudo através do cultivo e da posterior identificação bacteriana por meio de testes bioquímicos. A autora relata maior prevalência de bactérias anaeróbias estritas associadas a este diagnóstico. Sobretudo a anaeróbia facultativa *G. morbillorum* foi detectada em 30% dos casos sendo a segunda espécie detectada com maior frequência nestes casos.

Sassone et al., 2007, relataram a detecção de G. morbillorum em 52% dos casos associados a necrose pulpar e a presença de lesão periapical crônica através da técnica de Checkerboard DNA-DNA hybridization.

Gomes et al., 2008 A, através dos métodos de cultura e do Nested-PCR objetivaram avaliar a presença de *Gemella morbillorum* em 50 associados a infecção primária e 50 dentes indicados ao retratamento devido ao insucesso do tratamento. A bactéria alvo foi identificada através da cultura e do PCR em 22 e 77 casos respectivamente, os autores sugerem que essa diferença se deva a uma maior sensibilidade e especificidade do método molecular, ressaltam ainda que em alguns casos métodos bioquímicos de identificação possuem limitações e por vezes podem identificar a *G. morbillorum* de maneira equivocada como uma bactéria do gênero *Streptococcus.* O estudo demonstra uma maior prevalência do microrganismo nos casos de infecção primária (36 e 82%) que na infecção secundária (8 e 72%) através dos métodos de cultura e PCR respectivamente. Detectando também associações positivas ($p<0,05$) entre a presença de *G. morbillorum* e exsudato purulento, edema e dor a palpação.

Posteriormente em 2013, Signoretti et al., analisaram através do método de cultura o perfil microbiológico presente em 20 lesões periapicais resistentes a re-intervenção endodôntica, indicadas a cirurgia periapical. Foi detectada a presença de cistos periapical em 13 casos, e de granuloma periapical em 7 casos. Sendo que a bactéria detectada com maior frequência nos casos de cisto periapical verdadeiro foi a *G. morbillorum* (61,5%). Os autores ressaltam a necessidades de estudos futuros visando compreender o papel ecológico da

bactéria na comunidade microbiana residente do sistema de canais radiculares, elucidar seus mecanismos de resistência e instituir protocolos eficazes em sua eliminação, visto que sua permanência no interior do conduto pode culminar no insucesso do tratamento endodôntico.

Endo et al., 2013 reportaram a detecção da espécie em 10,9% e 12% nos casos associados ao insucesso do tratamento endodôntico prévio através dos métodos de cultura e PCR.

Avaliando a microflora bacteriana presentes nas bolsas periodontais e nos canais radiculares de dentes vitais com comprometimento periodontal extenso indicados ao tratamento endodôntico e os efeitos da terapia sobre a microbiota através do Nested PCR, Louzada et al. (2020) investigaram a presença de 17 espécies bacterianas em ambos os sítios estudados. Foram realizadas coletas em ambos os sitos antes (S1) e após o PQM (S2) e após o uso de medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio (S3). A bactéria *G. morbillorum* foi detectada apenas nas amostras coletadas nas bolsas periodontais, sendo que sua frequência de detecção neste sítio diminuiu após o PQM e o uso de medicação intra-canal.

3.5.3 Parvimonas micra

Originalmente classificadas como *Peptostreptococcus micros*, a espécie *Parvimonas micra* passou por reclassificações recentes no que se diz respeito a seu gênero. Inicialmente classificada como pertencente ao gênero *Peptostreptococcus* a bactéria foi reclassificada em 1999 como *Micromonas micro*s somente em 2006 foi classificada pertencente ao gênero *Parvimonas*, classificação a qual se perdura até os tempos atuais (Tindal e Euzéy 2006; Uemura et al., 2014). Sendo este um microrganismo descrito como componente da flora bacteriana dos tecidos bucais e gastrointestinais.

Esse microrganismo possui diversas funções que provocam peptidase, (Steeg e Van der Hoeven et al., 1989). Isto é, a quebra de moléculas proteicas, expressas pela atividade de hialuronidase, (Tam et al., 1985) e pela liberação de compostos de enxofre voláteis da L-cisteina. (Persson et al., 1990). Isso representa fatores chave de virulência, entretanto as características da relação dessa bactéria com a doença ainda são incertas.

Conhecida como uma das bactérias que compõe a flora bacteriana dos tecidos orais e gastrointestinais (Murdoch et al., 1998) a bactéria anaeróbia estrita é classificada quanto a coloração de Gram como positiva. Relatos da presença do microrganismo no interior do conduto radicular de dentes associados à infecção endodôntica primária e secundária/persistente na literatura são abundantes (Bystrom e Sundqvist., 1981; Gomes et

al., 1994a; Gomes et al., 1996 A; Siqueira et al., 2002; Gomes et al., 2004; Vianna et al., 2008; Siqueira et al., 2009; Gomes et al., 2013; Gomes et al., 2015; Nóbrega et al., 2016; Roças et al., 2018; Barbosa-Ribeiro et al., 2020), sendo também relacionada a infecções em focos distantes da cavidade oral, como exemplo a espondilodiscite, revelando-se como um patógeno oportunista (Uemura et al., 2014).

P. micra é constantemente encontrada na microbiota de abscessos periapicais através do método de cultura, (Sundqvist et al., 1989, Sousa et al., 2003). Porém, utilizando métodos de identificação genéticos e moleculares, a espécie é encontrada em alta frequência associada a diagnósticos diversos (Baumgartner et al., 2004, Sakamoto et al., 2006). Wayman, et al., 1992 destacaram a presença frequente da espécie em lesões periapicais agudas e crônicas.

Em 2008, Roças e Siqueira et al., ao coletarem amostras de dentes monorradiculares de 43 pacientes, apresentando necrose pulpar e lesão periapical indicada radiograficamente encontram *P. micra* em 28% das amostras, porém em níveis populacionais altos (cerca de mais que 10^5 células). As bactérias identificadas avaliadas através do método PCR, pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. O objetivo do estudo era descrever a microbiota encontrada de canais radiculares com lesão periapical crônica.

No ano seguinte, Siqueira e Roças et al., também citaram *P. micra*, juntamente com *F. nucleatum* e *P. endodontalis* como as espécies mais prevalentes em abscessos periapicais agudos. Essa afirmação foi feita a partir de um breve estudo sobre a microbiota deste tipo de patologia. Foram coletadas 42 amostras de pacientes adultos diagnosticados com abscesso periapical, que procuraram tratamento de emergência. Todos os pacientes apresentavam dor e ou inchaço, alguns apresentavam febre, linfoadenopatia. As amostras foram cultivadas e as espécies identificadas a partir do método PCR, utilizando o sequenciamento do gene 16s rRNA. Nenhum caso apresentou fístula, ligada a cavidade oral. P. micra foi encontrada em 22 de 42 amostras (52%) indicando uma alta prevalência.

A bactéria também recebeu destaque nos trabalhos de Endo et al., 2013, sendo a detectada com maior frequência através do método de PCR, nos casos indicados ao retratamento devido a presença de lesão periapical.

Em 2014, Sousa et al., coletaram amostras de 10 pacientes apresentando necrose pulpar com abscessos periapicais agudos, ambos apresentando dor espontânea, dor a palpação, dor a percussão e perda óssea periapical. O objetivo do estudo era determinar a ativação de macrófagos em abscessos periapicais agudos. As amostras foram divididas em 3 grupos: RCS 1 (coletadas antes do preparo químico-mecânico), RCS 2 (coletadas após o

preparo químico-mecânico) e RCS 3 (coletadas após 30 de colocação da medicação intra-canal). As bactérias foram identificadas através do método de cultura e identificação das espécies através do método de PCR, pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. *P. micra* foi encontrada nas 10 de 10 amostras, sendo a espécie mais recuperada.

A espécie em questão é constantemente atribuída a interações bacterianas contribuintes a injúrias dentárias. Para se entender melhor sua prevalência e essa relação com patógenos dominantes da polpa no sentido de colonização bacteriana em periodontites apicais, Hai ji et al. (2014) desenvolveram um estudo sobre o tema. Foram selecionados 120 dentes diagnosticados com infecções primárias ou secundárias. As amostras foram coletadas e o DNA bacteriano extraído, para identificação pelo método PCR, através do sequenciamento do gene 16S rRNA. *P. micra* foi encontrada em 40% (24/60) das amostras de infecções primárias e 5% (3/60) de infecções secundárias. Também foram encontradas correlações significativas entre *P. micra* e *P. endodontalis*, assim como entre *P. micra* e *E. faecalis*.

Pesquisas envolvendo a microbiota de caries profundas e sua relação com pulpites irreversíveis, Roças et al. (2015), encontraram *P. micra* em uma frequência de 13% em infecções primárias. Essa pesquisa foi realizada a partir da coleta de amostras e extração de DNA bacteriano de 30 pacientes que apresentavam lesões de cárie profundas com exposição pulpar, diagnosticados com pulpite irreversível, para análise pelo método PCR, a partir do sequenciamento do gene 16s rRNA. Os pacientes possuíam de 12 a 33 anos. O estudo também associou *P. micra* à sintomatologia de dor latejante e ressaltou a interação entre esta e *P. endodontalis*.

Nóbrega et al., 2016, ao avaliarem a microbiota presente em dentes acometido por abscesso periapical agudo detectaram através do PCR a presença de *Parvimonas micra* em 40% de suas amostras.

Utilizando métodos de extração de DNA bacteriano, identificação por PCR, Gomes et al. (2015) identificaram *P. micra* em alta frequência tanto antes da instrumentação dos canais radiculares, quanto após, em casos de lesões endo-periodontais. O objetivo do estudo foi identificar a microbiota presente em infecções endo-pério. Foram coletados de 15 amostras de canais radiculares e das bolsas periodontais, diagnosticados com essa patologia. Embora a espécie tenha sido encontrada antes e após, há de se destacar que a quantidade populacional decaiu muito, mas se manteve proporcionalmente maior que a maioria de outras espécies. *P. micra* também foi à bactéria mais recuperada em bolsas periodontais antes e após o tratamento.

Parvimonas micra contribui para várias infecções polimicrobianas, sendo comum em placas bacterianas de pacientes com doenças endodônticas e periodontais. O ácido lipotecóico (LTA) atua em diversas funções em bactérias gram-positivas, incluindo manutenção da homeostase catiônica e modulação das atividades autolíticas. A ativação da expressão do gene dltA protege bactérias Gram-positivas, que expressam LTA, da defesa antimicrobiana imune inata. Um mutante deficiente do gene dltA foi criado a partir de *P. micra* (ATCC 33270), em um estudo, através recombinação homóloga. Unidades formadoras de colônias (UFC) ajudaram a estimar o crescimento da espécie. A coloração com violeta de cristal, microscopia confocal a laser de varredura (CSLM) e microscopia eletrônica de varredura (SEM) avaliaram a massa e a estrutura do biofilme. *P. micra* ATCC 33270 foi estabelecida com sucesso, concluindo-se que o gene dltA está associado ao crescimento bacteriano e a formação de biofilme, estimulado por esta bactéria (Liu e Hou et al., 2018).

3.5.4 Fusobacterium nucleatum

Fusobacterium nucleatum é uma espécie de bactéria gram-negativa em forma de bastonete, anaeróbia estrita, imóvel e não formadora de esporos (Moraes et al., 2002 b). Morfologicamente é descrita como uma célula delgada e alongada, de extremidades pontiagudas, com 5 a 10 µm de comprimento (Bolstad et al., 1996). É frequentemente encontrada nos canais radiculares podendo causar ou contribuir em doenças da polpa e periápicie. Isso se deve, porque possuem em sua parede celular o LPS e endotoxinas, que provocam reações inflamatórias. Seus subprodutos metabólicos, produzidos a partir da degradação de peptídeos e carboidratos, são geralmente citotóxicos. Além disso, apresentam interações com outras bactérias potencialmente patógenos, como: *P. intermédia, P. gingivalis,* e *P. micros.* (Chávez de Paz et al., 2002).

Até onde se sabe a espécie geralmente não consegue causar infecções por si só, mesmo possuindo fatores inflamatórios, sendo dependentes de associação em biofilme para causar dano ao hospedeiro, assim como as outras espécies com potencial patógeno presentes nesses nichos (Steeg et al., 1987). Alguns autores a consideram como um a “ponte” entre o começo e o final da colonização bacteriana nos canais radiculares (Kolenbrander et al., 1989).

Também é associada à severidade das infecções endodônticas agudas, sendo que a prescrição de antibióticos pode ser utilizada como coadjuvante para o tratamento deste tipo de patologia, pois *F. nucleatum* apresenta sensibilidade a diversos tipos dessa classe de medicamentos. (Bolstad, et al., 1996).

A espécie é subdividida em 5 subespécies: *F. nucleatum nucleatum, F. nucleatum vicentii*e, *F. nucleatum polymorphum, F.fusiforme* e *F. animalis.* Apesar de apresentarem genoma e morfologias muito parecidas, estas possuem algumas características individuais, (Gendron et al., 2000).

Estudos epidemiológicos apontaram *F. nucleatum* com uma das espécies mais prevalentes em infecções primárias. Moraes et al. (2002) realizaram um estudo com o objetivo de comparar a efetividade dos métodos de cultura, PCR através do sequenciamento do gene 16S rRNA e hibridização DNA-DNA para a identificação de cepas de *F. nucleatum.* Treze dentes monorradiculares de pacientes adultos, apresentando, lesões cariosas, necrose pulpar e evidência radiográfica de lesão periapical foram envolvidos no estudo. As amostras foram coletadas desses dentes e analisadas a partir de cada um desses 3 métodos. A espécie foi encontrada na frequência de 15,4 % através do método PCR, 15,4% pela cultura e 10,4% pelo método de DNA-DNA.

Alguns estudos afirmaram que essa espécie possui uma alta heterogeneidade, ou seja, apresenta tipos variados de cepas, com diferenças em seu material genético. Não foram encontrados fatores de virulência diferentes entre as cepas, mas sabe-se que a variabilidade deles se apresenta como a necessidade de nutrientes. Dependendo da disponibilidade de nutrientes em determinados sítios da cavidade oral, a cepa pode se tornar mais ou menos patogênica (Moraes et al., 2002 b).

Em 2002 b, Moraes et al., realizaram um estudo, com o objetivo de avaliar a heterogeneidade das cepas de *F. nucleatum.* Foram coletadas 13 amostras de dentes, ambos com lesões cariosas profundas, necrose pulpar e evidência radiográfica de lesão periapical. As amostras foram cultivadas e testadas através de oligonucleoides para se determinar os clones. Os resultados mostraram pelo menos duas espécies de cepa por canal, sendo uma de alta frequência, pois representou 95% dos isolados da bactéria. Isso sugere que há diferentes tipos da espécie na cavidade oral e todas podem acessar os canais radiculares, porém nem todos os clones conseguem se manter na mesma frequência e, portanto, participar do processo infeccioso.

Em 2002, Chávez de Paz et al., descreveram a presença de *F. nucleatum* em infecções primárias. O estudo envolveu 28 pacientes (12 homens e 16 mulheres) entre 25 e 70 anos de idade. As amostras foram coletadas durante o tratamento e cultivadas em placas de Agar. Outras espécies presentes, com supostas interações também foram cultivadas. A espécie foi recuperada em 10 casos (35,7 %), todos com presença de dor severa. Os resultados mostraram que a espécie dá um suporte chave para o insucesso do tratamento,

pois em todos os casos em que foi encontrada, espécies do gênero *Prevotella* e ou *Porphyromonas* também foram encontradas, indicando uma sinergia no processo inflamatório apical.

Foram selecionados 60 pacientes, com necessidade de tratamento e retratamento (41 com necrose pulpar e 19 com insucesso do tratamento endodôntico prévio e evidência de lesão periapical) para coleta de amostras, cultivo e análise morfológica. O objetivo do presente estudo era avaliar a microbiota das infecções primárias e secundárias. *F. nucleatum,* foi umas das espécies anaeróbias estritas mais encontradas com 11% de frequência nas amostras, sendo todas em casos de necrose. Esta foi encontrada principalmente em canais que apresentavam exudato purulento (Gomes et al., 2004).

Em 2007, Vianna et al., analisaram microrganismos encontrados em infecções endodônticas antes e após o preparo químico-mecânico. O método utilizado foi à coleta de amostras de 21 pacientes (entre 18 e 59 anos de idade), necessitando de tratamento endodôntico, durante a abertura coronária e após a instrumentação e extração do DNA bacteriano para identificação através do método de hibridização DNA-DNA. Todos os dentes apresentavam necrose pulpar, com evidências radiográficas de lesão periapical e eram monorradiculares. As amostras foram cultivadas e analisadas por métodos genéticos. *F. nucleatum* foi à espécie mais recuperada antes do tratamento (60% dos casos). Após o preparo, apenas 4 amostras apresentaram bactérias, sendo apenas 1 destas com a espécie em questão presente.

Ao selecionarem 110 pacientes, que buscaram tratamento odontológico, em nível de emergência, com casos clínicos de abscessos crônicos ou agudos, Jacinto et al. (2008) analisaram a frequência de interações bacterianas entre *F. nucleatum*e *F. necrophorum.* As amostras foram coletadas durante os procedimentos endodônticos necessários a cada caso, e cultivados. Após essa etapa, os microrganismos foram identificados morfologicamente. *F. nucleatum* foi encontrada em 38 canais radiculares (28,9%), todos eles com a infecção dominada por bactérias anaeróbias estritas e ou gram-negativas. As espécies mais comumente associadas foram: *Prevotella spp, Prevotella intermedia, Prevotella oralis, Eubacterium spp, Bifidobacterium spp, Clostridium spp*e e *Gemella morbillorum.* A interação apresentada entre as duas espécies chave do estudo foi irrelevante para aumento de patogenicidade.

Em 2009, Siqueira et al., realizaram um estudo visando ampliar o conhecimento sobre a microbiologia de infecções pulpares primárias, foram extraídos DNAs presentes em amostras de pesquisas prévias, para futura análise através do ensaio de hibridização DNA-

DNA checkerboard de captura reversa. O material examinado consistia em 20 amostras extraídas de dentes diagnosticados com necrose pulpar e evidências radiográficas de lesão periapical. A avaliação foi dada quanto à presença e nível populacional, baseados em 28 espécies de bactérias comumente isoladas de doenças periapicais. DNAs bacterianos foram encontrados em 19 das 20 amostras, sendo *F. nucleatum* presente em 10,5% delas (2/19).

Um estudo realizado em adultos noruegueses comparou a microbiota presente em infecções de polpa sintomáticas e assintomáticas, sendo todas as amostras coletadas de dentes com necrose pulpar, 21 assintomáticos e 13 sintomáticos. Além disso, 9 dentes apresentavam abscessos periapicais crônicos. O DNA foi extraído das amostras e analisado. *F. nucleatum* foi encontrada em 62% das amostras assintomáticas, porém em casos sintomáticos sua presença foi irrelevante, se comparada com outras espécies gram-negativas, como *P. endodontalis* que foi recuperada em 69% das amostras (Roças et al., 2011).

Roças e Siquera, 2012, ao avaliarem a microbiota residente em canais radiculares já tratados associados ao insucesso através do método de PCR relataram a detecção do microrganismo em 24% das amostras.

Em 2017, Pereira et al., encontraram *F. nucleatum* em 71,6% das amostras de infecções secundárias, a partir da extração do DNA bacteriano e identificação a partir do sistema SYBR Green. O estudo utilizou 30 amostras, coletadas de 30 dentes com essa condição.

Em 2018, Bouillaguet et al., afirmaram que *F. nucleatum,* também demonstra uma forte interação negativa com *E. faecalis,* após realizar uma pesquisa sobre interações bacterianas em infecções primárias e secundarias dos canais radiculares. Coletaram-se amostras de dentes com lesões periapicais, porém já indicados para exodontia devido à impossibilidade de retratamento. Dentes com outras patologias periodontais foram excluídos do estudo. Os resultados também mostraram uma grande incidência de *F. nucleatum* em lesões primárias, tanto em frequência, quanto em população.

Babosa-Ribeiro et al., 2020, relataram através de seus estudos a presença da bactéria em 75% dos casos associados ao insucesso do tratamento endodôntico prévio, sendo sua prevalência reduzida para 45% após a execução do preparo químico-mecânico.

Estudos mais recentes indicam a presença da espécie e seu envolvimento em tumores malignos e processos de metástase, (Bullman et al., 2017). Um mecanismo molecular que pode promover câncer foi testado *in vitro* usando padrões celulares em modelos animais.

Foi sugerido que estas bactérias podem ser um fator de risco para progressão de adenomas de cabeça e pescoço para câncer.

Flanegan et al. (2014); e Kostic et al. (2013) já haviam afirmado que subprodutos de *F. nucleatum* alteram o meio, sendo o processo inflamatório um fator que favorece o desenvolvimento de tumores, pois havia através de um estudo, gerado neoplasia dessa forma em ratos. O mesmo sugeriu que o fator central para malignização é o FadA, uma proteína de adesão à superfície celular envolvida na aderência e invasão de células epiteliais, que é capaz de estimular importantes vias de transdução de sinal. Na linha celular HCT116, o FadA interage com a E-caderina e estimula a via Wnt e ß-catenina..O resultado é a estabilização da β-catenina, seu acúmulo no citoplasma e sua subsequente translocação para o núcleo, onde ativa a expressão dos genes de sinalização da ciclina D1, c-MyceWnt, promovendo assim a proliferação celular e o crescimento tumoral (Rubinstein et al., 2013).

A diferença entre os métodos utilizados nos estudos sobre esse tema acaba gerando controversas entre eles. A forma de coleta, tamanho amostral e método de identificação das amostras bem como as características demográficas dos pacientes voluntários podem alterar com vigor os resultados. Entretanto, ao se traçar uma análise geral das pesquisas, conclui-se que a abundância do gênero *Fusobacterium* tem significância no desenvolvimento de tumores. (Zhang et al., 2019).

Fora da cavidade oral, a importância do gênero *Fusobacterium* tem que ser reconhecida, pois são frequentemente encontradas e associadas a vários tipos de doenças (Brennan et al., 2019). Alguns autores associaram o gênero com a presença de determinadas patologias, tais como: doenças cardiovasculares, problemas na gravidez, artrite reumatoide, abscessos pulmonares e neoplasias (Bronzato et al., 2020).

3.5.5 Porphyromonas endodontalis

Em 1894, Miller et al., sugeriram o envolvimento de *P. endodontalis,* em doenças pulpares e periapicais. A comprovação dessa co-relação só foi confirmada a partir dos achados de Sundqvist et al., 1976. Bactérias de pigmento negro fazem parte da microbiota normal do homem em várias regiões do corpo, embora sejam frequentemente encontradas em infecções, compreendendo algumas espécies presentes nos gêneros *Bacteroidae, Prevotella e Porphyromonas.* Essas bactérias costumam ser mais recuperados de canais com necrose pulpar, variando sua frequência entre 25% a 50%. Alguns autores associaram *P. endodontalis* com a sintomatologia de infecções pulpares, porém até onde se sabe, essa espécie está envolvida apenas em fatores indiretos (Siqueira et al.t, 2011).

Porphyromonas endodontalis é descrita como uma bactéria gram-negativa em forma de bastonetes imóveis ou cocobacilos, anaeróbia estrita e de pigmentação negra, comumente associada à atividade patológica (Machado de Oliveira et al., 2000),sendo comumente encontrada em infecções envolvendo canais radiculares e periápicie (Nan Ma, et al., 2017). É uma espécie difícil de analisar pelo método de cultura, visto que possui uma alta sensibilidade ao oxigênio, assim como as outras bactérias do gênero *Porphyromonas,* indicando seu estudo por métodos genéticos. É presente tanto em casos sintomáticos, quanto em casos assintomáticos (Gomes et al. 2005). A espécie pode causar infecções purulentas em animais, principalmente dentro de microfloras complexas, devido sua capacidade de interação com outras espécies, além de possuir a capacidade de ativação de citocinas pró-inflamatórias, através de sua membrana de LPS. Outros fatores de virulência dessa bactéria são a presença de cápsula, outras membranas proteicas, proteinases e a produção de cito toxinas (Roças e Siqueira et al., 2018).

Ao coletarem amostras de 43 dentes que apresentavam lesões de cárie profundas, ou necrose pulpar estabelecida com a presença de perda óssea periapical, Machado de Oliveira et al. (2000) analisaram a presença dessa espécie em infecções sintomáticas e assintomáticas. *P. endondontalis* foi recuperada em 17 de 43 amostras (39,5 %), sendo presente em 4 de 6 casos de abscesso periapical (66,7%), em 6 de 24 casos de lesões periapicais assintomáticas (25%) e presente em a apenas um caso assintomático sem qualquer tipo de lesão perirradicular. A alta incidência da bactéria em abscessos periapicais, nesse estudo, indicou um grau de importância da patogenicidade da espécie em infecções endodônticas.

Siqueira et al., 2001 B analisaram a presença de bactérias de pigmentação negra em pulpites irreversíveis. As amostras foram coletadas de 54 dentes monorradiculares, com canal único, quem apresentavam lesões de cárie profundas e ou necrose pulpar, sendo que apenas 2 dentes não apresentavam perda óssea radiográfica e 10 apresentavam abscesso periapical. Quinze dentes foram positivos ao teste de percussão e os demais casos assintomáticos. A idade dos pacientes variava entre 18 e 60 anos. O DNA bacteriano foi isolado e analisado pelo método de PCR, a partir a amplificação do gene 16S rRNA. Os resultados mostraram uma incidência de 58,3 % (32 amostras de 54) de bactérias de pigmentação negra, com destaque para os casos de abscessos em 80% (8 de 10), sendo *P. endodontalis* encontrada em 42,6% das amostras totais (24 de 54) e 70% nos casos de abscesso (7 de 10 caos).

Em 2004, Gomes et al. analisaram a microbiota presente em infecções endodônticas primárias e secundárias através do método de coleta e cultura dos

microrganismos. O estudo foi realizado a partir da seleção de 60 pacientes, sendo que 41 apresentavam necrose pulpar e 19 dentes com canal tratado há pelo menos 4 anos, porém que apresentavam lesão periapical. Apesar da dificuldade de se cultivar a espécie, *P. endodontalis* foi recuperada em 3 canais (5%), todos com necrose.

Marinho et al. (2005), coletaram o conteúdo microbiano presente nas infecções primárias durante todas as fases do tratamento. 30 pacientes, entre 15 e 88 anos de idade, que necessitavam de tratamento endodôntico foram incluídos no estudo e tiveram amostras dos canais radiculares coletados para análise molecular a partir do método PCR, utilizando o sequenciamento do gene 16S rRNA. O objetivo do estudo foi avaliar a atividade pró-inflamatória contra macrófagos nesse tipo de infecção. Foram encontradas endotoxinas em todos os canais e *P. endodontalis* foi identificada em 15 das 30 amostras (50%). Também foi notado uma redução drástica no nível endotoxinas, após o preparo químico-mecânico.

4 DISCUSSÃO

A microbiota responsável por colonizar o sistema de canais radiculares sendo precursora dos quadros de infecção primária é amplamente descrita na literatura endodôntica como sendo uma infecção mista, composta por bactérias Gram-positivas e negativas, anaeróbias estritas e facultativas, com predominância dos microrganismos Gram-negativos anaeróbios estritos (Gomes et al., 1994 A; Siqueira et al., 2001; Gomes et al., 2015). Em contrapartida a comunidade bacteriana habitante dos casos associados ao fracasso do tratamento endodôntico foi por muito tempo descrita como uma comunidade menos complexa, composta na maioria das vezes por uma pequena variedade microrganismos Gram-positivos, sendo frequentemente relatada como uma monoinfecção (Sundqvist et al., 1998; Peciuliene et al., 2000; Pinheiro et al., 2003).

Sobretudo, a evolução tecnológica e o aprimoramento dos métodos de cultura através da anaerobiose e o desenvolvimento dos métodos moleculares de identificação microbiana revelaram uma maior abundância de espécies residentes no interior do sistema de canais radicular nos quadros associados a infecção primaria, mas principalmente naqueles associados ao fracasso do tratamento endodôntico prévio (Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016).

A dificuldade, e por vezes até incapacidade de se mimetizar o ambiente propício para o desenvolvimento de algumas espécies bacterianas revela-se como uma limitação do cultivo bacteriano, tornando os métodos moleculares de identificação microbiana uma importante ferramenta para o entendimento da microflora bacteriana associada as patologias endodônticas. Sendo que, além de independentes da cultura, são altamente sensíveis e específicos, o que os torna extremamente confiáveis (Gomes et al., 2008; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016). Em contrapartida os métodos moleculares analisam apenas a presença ou ausência de DNA bacteriano na amostra coletada, sendo incapazes de identificar se o DNA encontrado é originário de um microrganismo viável ou não, tornando o uso concomitante dos métodos moleculares e tradicionais indispensável (Siqueira et al., 2001; Gomes et al., 2005; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro 2020).

Estudos diversos, valendo-se de métodos tradicionais e métodos moleculares para avaliação do conteúdo microbiano presente no interior do sistema de canais radiculares associados ao fracasso do tratamento endodôntico prévio descreveram o *E. faecalis* como microrganismo detectado com maior frequência (Sundqvist et al., 1998; Molander et al., 1998; Peciuliene et al., 2000; Pinheiro et al., 2003; Gomes et al., 2008; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016; 2020).

A resistência às medicações intracanais rotineiramente utilizadas no tratamento endodôntico, como o hidróxido de cálcio, pode ser devido a capacidade de *E. faecalis* penetrar no interior dos túbulos dentinários, evadindo desta forma os procedimentos executados durante o preparo químico-mecânico; e sobreviver por grandes períodos de escassez em forma de latente, podendo ser reativado na presença de condições mais favoráveis a seu desenvolvimento (Haapasalo et al., 1987; Evans et al., 2002; Gomes et al., 2006).

Índices de prevalência distintos, variando de 10 a 100%, são encontrados na literatura endodôntica no que se diz respeito ao *E. faecalis* (Peciuliene et al., 2000 ;Pinheiro et al., 2003; 2006; Roças et al., 2004; Siqueira et al., 2005; Zoleti et al., 2006; Gomes et al., 2006; Pirani et al., 2008; Gomes et al., 2008; Roças e Siqueira 2012; Barbosa-Ribeiro 2016; 2020). As diferentes prevalências detectadas entre os estudos podem ser explicadas pelas diferenças entre os métodos de identificação utilizados, o procedimento e ao sítio de coleta das amostras, a localização geográfica, os hábitos e condições sócio-econômicas da população estudada e ao diagnóstico dental estudado.

Embora existam registros de detecção do *E. faecalis* nos mais diversos diagnósticos pulpares o microrganismo encontra-se em maiores proporções nos casos associados a infecção secundária, quando comparado a infecção primária (Roças e Siqueira 2012; Gomes et al., 2008; Barbosa-Ribeiro et al., 2016, 2020).

Analisando a microbiota residente dos casos de insucesso do tratamento endodôntico através dos métodos de cultura Pinheiro et al. (2003 relatou ter detectado o microrganismo em 45% de suas amostras, corroborando com estudos anteriores, que utilizaram os mesmos métodos (Sundqvist et al. 1998; Roças e Siqueira 2012). Os métodos moleculares de detecção revelaram uma prevalência ainda maior do microrganismo, variando entre 70 e 100% (Gomes et al., 2006; Gomes et al., 2008; Barbosa-Ribeiro et al., 2016; Barbosa-Ribeiro et al., 2020).

Outro microrganismo Gram-positivo analisado no presente estudo foi a bactéria *Gemella morbillorum*. O microrganismo foi detectado em 61,5% das amostras resultantes das coletas de cistos periapicais verdadeiros, sendo o microrganismo detectado com maior frequência nestes casos (Signoretti et al., 2013). O que destaca a importância da eliminação da bactéria em questão do interior dos canais radiculares, uma vez que sua permanência parece estar atrelada ao desenvolvimento de lesões resistentes até mesmo ao retratamento endodôntico.

Maiores índices de detecção de *G. morbillorum* têm sido relatados nos casos de infecção primária, que secundária. Alguns autores ainda destacam que os métodos de

identificação genotípicos são indispensáveis na detecção da bactéria, uma vez que a identificação da espécie através de testes bioquímicos por vezes culmina na identificação errônea, sendo o microrganismo identificado como pertencente ao gênero *Streptococcus* (Gomes et al., 2008).

Quanto a sua prevalência, Gomes et al., 2008, relataram a identificação do microrganismo em 38% dos casos de infecção primária através dos métodos de cultura, corroborando com estudos prévios (Sousa et al., 2003; Jacinto et al., 2003), maiores frequências de detecção, variando entre 52 e 82%, foram encontradas na utilização de métodos moleculares (Sassone et al., 2007; Gomes et al., 2008). As diferentes taxas de detecção são inerentes a maior sensibilidade dos métodos moleculares e ao fato destes serem capazes de detectar não só a presença de microrganismos viáveis, mas também daqueles não viáveis, os quais não são detectados através dos métodos de cultura.

Nos casos de infecção secundária/persistente a bactéria *G. morbillorum* apresentou-se em frequências distintas, sendo detectada em apenas 8% das amostras através dos métodos de cultura e 72% através do método molecular de PCR (Gomes et al., 2008). Valendo-se também da utilização de métodos moleculares para identificação do microrganismo nos casos associados ao insucesso do tratamento endodôntico prévio outros autores relataram a prevalência do microrganismo em frequências divergentes, que variaram de 12 a 30% (Siqueira et al., 2000; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2020).

Um padrão de detecção distinto foi encontrado para a bactéria *Parvimonas micra*, que revelou um padrão versátil, sendo detectada em altas frequências tanto nos casos de infecção primária, quanto secundária/persistente, apesar de ser encontrada com uma prevalência ligeiramente maior nos casos de infecção primária (Sousa et al., 2008; Endo et al., 2013; Martinho et al., 2014 a; Gomes et al., 2015; Roças 2015; Nóbrega et al., 2015; Barbosa-Ribeiro et al., 2020).

Ao avaliar a comunidade microbiana residente no interior do conduto radicular nos casos de infecção primária Martinho et al., 2014 a, utilizando o método de checkerboard DNA-DNA hybridization, relataram ter encontrado *P. micra* em 76% de suas amostras, sendo este o microrganismo detectado com maior prevalência nos casos inclusos neste estudo.

Frequências de detecção distintas foram relatadas por outros autores ao avaliar a presença do *P. micra* através do método molecular de PCR. Roças et al., 2015, valendo-se deste método para avaliação da comunidade microbiana associada a quadros de pulpite irreversível, encontraram o microrganismo em apenas 13% dos casos avaliados.

Outros estudos mostram uma maior prevalência de *P. micra* em estágios mais avançados da doença endodôntica. Nóbrega et al., 2015; 2016, utilizando o mesmo método para identificação microbiana, revelaram ter encontrado *P. micra* em 40% dos casos de abscesso periapicais, corroborando com os achados de Siqueira e Roças 2008; 2009 e Hai-ji et al., 2014, que apresentaram taxas de detecção semelhantes ao avaliar dentes portadores do mesmo diagnóstico.

Quanto a sua participação nos casos de infecção secundária Endo et al., 2013, utilizando o PCR para identificação bacteriana, relataram ter detectado o microrganismo em 24% dos casos associados ao fracasso do tratamento endodôntico prévio, sendo este o microrganismo detectado com maior prevalência neste estudo, discordando dos achados de Gomes et al., 2008 e Barbosa-Ribeiro et al., 2016; 2020, que revelaram o *Enterococcus faecalis* como a bactéria mais prevalente nos casos de insucesso. Sobretudo apesar desta divergência, os autores concordam quanto a taxa de detecção deste microrganismo, sendo este detectado em 20% dos casos de diagnóstico similar por Barbosa-Ribeiro et al., 2020.

A espécie Gram-negativa de pigmento negro *Porphyromonas endodontalis* apresentou primeiramente destaque nos casos de infecções primárias, sendo detectada através do método de PCR em 66,7% em casos de abscesso periapical agudo por Machado de Oliveira et al., 2000. Tal fato foi confirmado posteriormente através dos estudos de Siqueira et al., 2001b.

Em 2004, ao avaliarem o conteúdo microbiológico de dentes associados a necrose pulpar e a presença de periodontite apical crônica, Gomes et al., identificaram a presença do microrganismo em 5% dos casos utilizando o método de cultura. A baixa prevalência descrita é reflexo do método utilizado, visto que apesar de as evoluções nas técnicas de cultivo e anaerobiose mimetizar o ambiente necessário para o cultivo de microrganismos fastidiosos continua sendo um desafio. Avaliando pacientes portadores do mesmo diagnóstico descrito Marinho et al., 2015 identificaram a presença do microrganismo em 50% dos casos, corroborando com estudos prévios.

Fusobacterium nucleatum foi detectado por Vianna et al., 2007, através do Checkerboard DNA-DNA hybridization em 60% dos casos de infecção primária, corroborando com os achados de Rôças et al., 2011, que utilizando o mesmo método detectaram *F. nucleatum* em 62% de suas amostras. Utilizando o mesmo método Siqueira et al., 2009 relataram sua presença em apenas 10,5% dos casos. As diferenças de prevalência podem ser explicadas pelo sítio de coleta das amostras, sendo que Vianna et al., 2007 coletaram o conteúdo do interior do conduto radicular utilizando a técnica do cone de papel estéril,

enquanto que no estudo de Siqueira et al., realizado em 2009 as amostras foram coletadas da região apical de dentes associados a infecção endodôntica primária extraídos pela impossibilidade de reabilitação, mostrando uma maior prevalência do microrganismo no interior do sistema do canal radicular, se comparado a áreas extrarradiculares.

Quando analisada a presença de *F. nucleatum* através dos métodos de cultura, tanto nos casos associados a infecção endodôntica primária, quanto nos casos associados ao insucesso do tratamento endodôntico, prévio índices de detecção inferiores aqueles descritos através da análise molecular são encontrados, o que se deve ao fato de se tratar de um microrganismo fastidioso de difícil cultivo. Tendo sido detectado em 28,9% das amostras obtidas de pacientes portadores de abscesso periapical agudo por Jacinto et al., 2008, e 11% dos casos de necrose pulpar associada a presença de periodontite apical aguda por Gomes et al., 2004.

Estudos recentes analisando o conteúdo infeccioso presente em casos de infecção secundária através do método molecular de PCR e relataram taxas de detecção em torno de 70% para *Fusobacterium nucleatum*. Estas foram similares as obtidas quando os casos de infecção primária foram analisados através do mesmo método, revelando que o microrganismo pode possuir papel importante não só no ecossistema presente no interior de canais infectados não tratados endodonticamente, mas também nos casos refratários a terapia endodôntica (Barbosa-Ribeiro et al., 2020).

5 CONCLUSÃO

Concluiu-se que a comunidade microbiana residente no sistema de canais radiculares tanto nos casos de infecção primária quanto secundária é heterogênea, sendo a frequência de detecção dos microrganismos alvo variável em função de fatores inerentes ao diagnóstico pulpar e periapical do dente em questão, aos métodos de coleta e técnicas empregadas e as diferenças geográficas, socioeconômicas e culturais da população estudada.

6 REFERÊNCIAS

1. Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, Feres M, Tomson PL, Cooper PR, Gomes BPFA. Investigation of microbial profile, levels of endotoxin and lipoteichoic acid in teeth with symptomatic irreversible pulpitis: a clinical study. Int Endod J. 2020 Sep 6. doi: 10.1111/iej.13402. Epub ahead of print.

2. Aveiro E, Chiarelli-Neto VM, de-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, et al. Efficacy of reciprocating and ultrasonic activation of 6% sodium hypochlorite in the reduction of microbial content and virulence factors in teeth with primary endodontic infection. IntEndod J. 2020 May;53(5):604-618. doi: 10.1111/iej.13261.

3. Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, Dos Santos DG, Andreote FD, Gomes BPFA. Microbiological analysis of endodontically treated teeth with apical periodontitis before and after endodontic retreatment. Clin Oral Investig. 2020 Aug 28. doi: 10.1007/s00784-020-03510-2. Epub ahead of print.

4. Baumgartner JC, Siqueira JF Jr, Xia T, Róças IN. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. J Endod. 2004 Mar;30(3):141-4. doi: 10.1097/00004770-200403000-00004. PMID:

5. Bell E, McCartney AC. *Gemella morbillorum* endocarditis in an intravenous drug abuser. J Infect. 1992 Jul;25(1):110-2. doi: 10.1016/0163-4453(92)93753-d.

6. Bicego-Pereira EC, Barbosa-Ribeiro M, de-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, et al. Evaluation of the presence of microorganisms from root canal of teeth submitted to retreatment due to prosthetic reasons and without evidence of apical periodontitis. Clin Oral Investig. 2020 Sep;24(9):3243-54. doi: 10.1007/s00784-020-03200-z. Epub 2020 Jan 20.

7. Binder Gallimidi A, Fischman S, Revach B, Bulvik R, Maliutina A, Rubinstein AM, et al. Periodontal pathogens Porphyromonas gingivalis and *Fusobacterium nucleatum* promote tumor progression in an oral-specific chemical carcinogenesis model. Oncotarget. 2015 Sep 8;6(26):22613-23. doi: 10.18632/oncotarget.4209.
8. Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. Clin Microbiol Rev. 1996 Jan;9(1):55-71. doi: 10.1128/CMR.9.1.55-71.1996.

9. Bouillaguet S, Manoil D, Girard M, Louis J, Gaïa N, Leo S, et al. Root microbiota in primary and secondary apical periodontitis. Front Microbiol. 2018 Oct 9; 9:2374. doi: 10.3389/fmicb.2018.02374.

10. Brennan CA, Garrett WS. *Fusobacterium nucleatum* - symbiont, opportunist and oncobacterium. Nat Rev Microbiol. 2019 Mar;17(3):156-66. doi: 10.1038/s41579-018-0129-6.

11. Bronzato JD, Bomfim RA, Edwards DH, Crouch D, Hector MP, Gomes BPFA. Detection of Fusobacterium in oral and head and neck cancer samples: A systematic review and meta-analysis. Arch Oral Biol. 2020 Apr; 112:104669. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104669.

12. Brook I, Frazier EH, Gher ME. Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscess. Oral Microbiol Immunol. 1991 Apr;6(2):123-5. doi: 10.1111/j.1399-302x.1991.tb00464. x.

13. Bullman S, Pedamallu CS, Sicinska E, Clancy TE, Zhang X, Cai D, et al. Analysis of *Fusobacterium* persistence and antibiotic response in colorectal cancer. Science. 2017 Dec 15;358(6369):1443-1448. doi: 10.1126/science. aal5240.

14. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. Scand J Dent Res. 1981 Aug;89(4):321-8. doi: 10.1111/j.1600-0722. 1981.tb01689.x.

15. Cardoso FG, Chung A, Martinho FC, Camargo CH, Carvalho CA, Gomes BP, et al. Investigation of bacterial contents from persistent endodontic infection and evaluation of their inflammatory potential. Braz Dent J. 2016 Jul-Aug;27(4):412-8. doi: 10.1590/0103-6440201600520.

16. Chávez De Paz LE, Dahlén G, Molander A, Möller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. Int Endod J. 2003 Jul;36(7):500-8. doi: 10.1046/j.1365-2591.2003.00686. x.

17. Chávez de Paz Villanueva LE. *Fusobacterium nucleatum* in endodontic flare-ups. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002 Feb;93(2):179-83. doi: 10.1067/moe.2002.120803.

18. de Sousa EL, Ferraz CC, Gomes BP, Pinheiro ET, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. Bacteriological study of root canals associated with periapical abscesses. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod. 2003 Sep;96(3):332-9. doi: 10.1016/s1079-2104(03)00261-0.

19. del Mar Lleó M, Tafi MC, Signoretto C, Dal Cero C, Canepari P. Competitive polymerase chain reaction for quantification of nonculturable Enterococcus faecalis cells in lake water. FEMS Microbiol Ecol. 1999 Dec 1;30(4):345-53. doi: 10.1111/j.1574-6941. 1999.tb00662.x.

20. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. J Endod. 2002 Oct;28(10):689-93. doi: 10.1097/00004770-200210000-00003.

21. Endo MS, Ferraz CCR, Zaia AA, Almeida JFA, Gomes BPFA. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. Eur J Dent. 2013 Jul;7(3):302-9. doi: 10.4103/1305-7456.115414.
22. Fabricius L, Dahlén G, Holm SE, Möller AJ. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. Scand J Dent Res. 1982 Jun;90(3):200-6. doi: 10.1111/j.1600-0722. 1982.tb00728.x.

23. Fabricius L, Dahlén G, Sundqvist G, Happonen RP, Möller AJ. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. Eur J Oral Sci. 2006 Aug;114(4):278-85. doi: 10.1111/j.1600-0722.2006.00380. x.
24. Finegold SM. A century of anaerobes: a look backward and a call to arms. Clin Infect Dis. 1993 Jun;16 Suppl 4: S453-7. doi: 10.1093/clinids/16.supplement_4. s453.

25. Flanagan, L., Schmid, J., Ebert, M. *et al. Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer, and disease outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33, 1381–1390 (2014). https://doi.org/10.1007/s10096-014-2081-3.

26. Gendron R, Grenier D, Maheu-Robert L. The oral cavity as a reservoir of bacterial pathogens for focal infections. Microbes Infect. 2000 Jul;2(8):897-906. doi: 10.1016/s1286-4579(00)00391-9.

27. Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Associations of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. Int Endod J. 1994a Nov;27(6):291-8. doi: 10.1111/j.1365-2591. 1994.tb00271. x.

28. Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Positive and negative associations between bacterial species in dental root canals. Microbios. 1994b;80(325):231-43.

29. Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Associations of endodontics symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. Int Endod J. 1996a Mar;29(2):69-75. doi: 10.1111/j.1365-2591. 1996.tb01164.x.

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

31. Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. 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.

32. Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas endodontalis, Prevotella intermedia and Prevotella nigrescens in endodontic lesions detected by culture and by PCR. Oral Microbiol Immunol. 2005 Aug;20(4):211-5. doi: 10.1111/j.1399-302X.2005.00214.x.

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

34. Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, Pinheiro ET, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Gemella morbillorum in primary and secondary/persistent endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008a Apr;105(4):519-25. doi: 10.1016/j.tripleo.2007.10.005.

35. Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. J Endod. 2008b May;34(5):537-40. doi: 10.1016/j.joen.2008.01.016.

36. Gomes GB, Sarkis-Onofre R, Bonow ML, Etges A, Jacinto RC. An investigation of the presence of specific anaerobic species in necrotic primary teeth. Braz Oral Res. 2013 Mar-Apr;27(2):149-55. doi: 10.1590/s1806-83242013000100020.

37. Gomes BP, Berber VB, Kokaras AS, Chen T, Paster BJ. Microbiomes of endodontic-periodontal lesions before and after chemomechanical preparation. J Endod. 2015 Dec;41(12):1975-84. doi: 10.1016/j.joen.2015.08.022.

38. Gomes BPFA, Herrera DR. Etiologic role of root canal infection in apical periodontitis and its relationship with clinical symptomatology. Braz Oral Res. 2018 Oct 18;32(suppl 1):e69. doi: 10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0069.

39. Gomes BPFA, Louzada LM, Almeida-Gomes RF, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, et al. Investigation of Filifactor alocis in primary and in secondary endodontic infections: A molecular study. Arch Oral Biol. 2020 Oct; 118:104826. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104826.

40. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. J Dent Res. 1987 Aug;66(8):1375-9. doi: 10.1177/00220345870660081801.

41. Horiuchi A, Kokubu E, Warita T, Ishihara K. Synergistic biofilm formation by Parvimonas micra and *Fusobacterium nucleatum*. Anaerobe. 2020 Apr; 62:102100. doi: 10.1016/j.anaerobe.2019.102100. Epub 2019 Sep 12.

42. Jacinto RC, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. Oral Microbiol Immunol. 2003 Oct;18(5):285-92. doi: 10.1034/j.1399-302x.2003.00078. x.

43. Jacinto RC, Montagner F, Signoretti FG, Almeida GC, Gomes BP. Frequency, microbial interactions, and antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and Fusobacterium necrophorum isolated from primary endodontic infections. J Endod. 2008 Dec;34(12):1451-6. doi: 10.1016/j.joen.2008.08.036. Epub 2008 Oct 19. PMID: 19026872.

44. Ji H, Li H, He Y, Hou B. [Study of association between Parvimonas micra and pulp dominant pathogens in the infected root canals with chronic periradicular periodontitis]. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2014 Aug;49(8):495-9. Chinese. PMID: 25351224.

45. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965 Sep;20:340-9. doi: 10.1016/0030-4220(65)90166-0.

46. Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LV. Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, Selenomonas flueggei, Selenomonas infelix, Selenomonas noxia, and

Selenomonas sputigena with strains from 11 genera of oral bacteria. Infect Immun. 1989 Oct;57(10):3194-203. doi: 10.1128/IAI.57.10.3194-3203.1989.

47. Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, et al. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. Cell Host Microbe. 2013 Aug 14;14(2):207-15. doi: 10.1016/j.chom.2013.07.007.

48. Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gängler P, Langeland K. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1991 May;71(5):603-11. doi: 10.1016/0030-4220(91)90371-i.

49. Liu K, Hou BX. The regulation of DLTA gene in bacterial growth and biofilm formation by Parvimonas micra. Eur Ver Med Pharmacol Sci. 2018 Jul;22(13):4033-44. doi: 10.26355/eurrev_201807_15390.

50. Ma N, Yang D, Okamura H, Teramachi J, Hasegawa T, Qiu L, Haneji T. Involvement of interleukin-23 induced by Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharide in osteoclastogenesis. Mol Med Rep. 2017 Feb;15(2):559-566. doi: 10.3892/mmr.2016.6041.

51. Machado de Oliveira JC, Siqueira JF Jr, Alves GB, Hirata R Jr, Andrade AF. Detection of Porphyromonas endodontalis in infected root canals by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. J Endod. 2000 Dec;26(12):729-32. doi: 10.1097/00004770-200012000-00016.

52. Marinho AC, Martinho FC, Leite FR, Nascimento GG, Gomes BP. Proinflammatory activity of primarily infected endodontic content against macrophages after different phases of the root canal therapy. J Endod. 2015 Jun;41(6):817-23. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.017.

53. Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. J Endod. 2010 Sep;36(9):1467-74. doi: 10.1016/j.joen.2010.06.012.

54. Martinho FC, Leite FR, Chiesa WM, Nascimento GG, Feres M, Gomes BP. Signaling pathways activation by primary endodontic infectious contents and production of inflammatory mediators. J Endod. 2014a Apr;40(4):484-9. doi: 10.1016/j.joen.2013.10.022.

55. Martinho FC, Leite FR, Nascimento GG, Cirelli JA, Gomes BP. Clinical investigation of bacterial species and endotoxin in endodontic infection and evaluation of root canal

content activity against macrophages by cytokine production. Clin Oral Investig. 2014b Dec;18(9):2095-102. doi: 10.1007/s00784-014-1198-1.

56. McBride SM, Coburn PS, Baghdayan AS, Willems RJ, Grande MJ, Shankar N, et al. Genetic variation, and evolution of the pathogenicity island of Enterococcus faecalis. J Bacteriol. 2009 May;191(10):3392-402. doi: 10.1128/JB.00031-09.

57. Mitchell RG, Teddy PJ. Meningitis due to Gemella haemolysans after radiofrequency trigeminal rhizotomy. J Clin Pathol. 1985 May;38(5):558-60. doi: 10.1136/jcp.38.5.558.

58. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. IntEndod J. 1998 Jan;31(1):1-7.

59. Moraes SR, Siqueira JF Jr, Colombo AP, Rôças IN, Ferreira MC, Domingues RM. Comparison of the effectiveness of bacterial culture, 16S rDNA directed polymerase chain reaction, and checkerboard DNA-dNA hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic infections. J Endod. 2002a Feb;28(2):86-9. doi: 10.1097/00004770-200202000-00009.
60. Moraes SR, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Ferreira MC, Domingues RM. Clonality of *Fusobacterium nucleatum* in root canal infections. Oral Microbiol Immunol. 2002b Dec;17(6):394-6. doi: 10.1034/j.1399-302x.2002.170610. x.

61. Muniz FWMG, Montagner F, Jacinto RC, Rösing CK, Gomes BPFA. Correlation between crestal alveolar bone loss with intracanal bacteria and apical lesion area in necrotic teeth. Arch Oral Biol. 2018 Nov; 95:1-6. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.07.007. Epub 2018 Jul 11.

62. Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. J Endod. 1990 Dec;16(12):580-8. doi: 10.1016/S0099-2399(07)80201-9. PMID: 2094761.

63. Nair PN, Sjögren U, Schumacher E, Sundqvist G. Radicular cyst affecting a root-filled human tooth: a long-term post-treatment follow-up. Int Endod J. 1993 Jul;26(4):225-33. doi: 10.1111/j.1365-2591. 1993.tb00563.x.

64. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. Crit Rev Oral Biol Med. 2004 Nov 1;15(6):348-81. doi: 10.1177/154411130401500604.

65. Nóbrega LM, Montagner F, Ribeiro AC, Mayer MA, Gomes BP. Bacterial diversity of symptomatic primary endodontic infection by clonal analysis. Braz Oral Res. 2016 Oct 10;30(1): e103. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0103.
66. Olsvik B, Olsen I, Tenover FC. Detection of tet(M) and tet(O) using the polymerase chain reaction in bacteria isolated from patients with periodontal disease. Oral Microbiol Immunol. 1995 Apr;10(2):87-92. doi: 10.1111/j.1399-302x.1995.tb00124. x.
67. Peciuliene V, Maneliene R, Balcikonyte E, Drukteinis S, Rutkunas V. Microorganisms in root canal infections: a review. Stomatologija. 2008;10(1):4-9.

68. Persson S, Edlund MB, Claesson R, Carlsson J. The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. Oral Microbiol Immunol. 1990 Aug;5(4):195-201. doi: 10.1111/j.1399-302x.1990.tb00645. x.

69. 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. 2003a Jan;36(1):1-11. doi: 10.1046/j.1365-2591.2003.00603. x.

70. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. Oral Microbiol Immunol. 2003b Apr;18(2):100-3. doi: 10.1034/j.1399-302x.2003.00058. x.
71. Pinheiro ET, Anderson MJ, Gomes BP, Drucker DB. Phenotypic and genotypic identification of enterococci isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Oral Microbiol Immunol. 2006 Jun;21(3):137-44. doi: 10.1111/j.1399-302X.2006.00285. x.
72. Pirani C, Bertacci A, Cavrini F, Foschi F, Acquaviva GL, Prati C, et al. Recovery of Enterococcus faecalis in root canal lumen of patients with primary and secondary endodontic lesions. New Microbiol. 2008 Apr;31(2):235-40.

73. Rams TE, Feik D, Young V, Hammond BF, Slots J. Enterococci in human periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 1992 Aug;7(4):249-52. doi: 10.1111/j.1399-302x.1992.tb00034. x.

74. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms, and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. J Endod. 2010 Aug;36(8):1277-88. doi: 10.1016/j.joen.2010.04.007.

75. 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.
76. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of Enterococcus faecalis with different forms of periradicular diseases. J Endod. 2004 May;30(5):315-20. doi: 10.1097/00004770-200405000-00004.

77. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Characterization of Dialister species in infected root canals. J Endod. 2006 Nov;32(11):1057-61. doi: 10.1016/j.joen.2006.04.010.

78. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. J Clin Microbiol. 2008 Nov;46(11):3599-606. doi: 10.1128/JCM.00431-08.

79. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Debelian GJ. Analysis of symptomatic and asymptomatic primary root canal infections in adult Norwegian patients. J Endod. 2011 Sep;37(9):1206-12. doi: 10.1016/j.joen.2011.05.026.

80. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. J Clin Microbiol. 2012 May;50(5):1721-4. doi: 10.1128/JCM.00531-12.

81. Rôças IN, Lima KC, Assunção IV, Gomes PN, Bracks IV, Siqueira JF Jr. Advanced Caries Microbiota in teeth with irreversible pulpitis. J Endod. 2015 Sep;41(9):1450-5. doi: 10.1016/j.joen.2015.05.013.

82. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Frequency and levels of candidate endodontic pathogens in acute apical abscesses as compared to asymptomatic apical periodontitis. PLoS One. 2018 Jan 2;13(1):e0190469. doi: 10.1371/journal.pone.0190469.

83. Rubinstein MR, Wang X, Liu W, Hao Y, Cai G, Han YW. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/β-catenin signaling via its FadA adhesin. Cell Host Microbe. 2013 Aug 14;14(2):195-206. doi: 10.1016/j.chom.2013.07.012.

84. Ruviére DB, Leonardo MR, da Silva LA, Ito IY, Nelson-Filho P. Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by checkerboard DNA-DNA hybridization. J Dent Child (Chic). 2007 May-Aug;74(2):118-23.

85. Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. Oral MicrobiolImmunol. 2006 Apr;21(2):112-22. doi: 10.1111/j.1399-302X.2006.00270. x.

86. Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant Enterococcus faecalis. Nature. 2002 Jun 13;417(6890):746-50. doi: 10.1038/nature00802.

87. Shinha T. Endocarditis due to *Gemellamorbillorum*. Intern Med. 2017;56(13):1751. doi: 10.2169/internalmedicine.56.8253.

88. Signoretti FG, Endo MS, Gomes BP, Montagner F, Tosello FB, Jacinto RC. Persistent extraradicular infection in root-filled asymptomatic human tooth: scanning electron microscopic analysis and microbial investigation after apical microsurgery. J Endod. 2011 Dec;37(12):1696-700. doi: 10.1016/j.joen.2011.09.018.

89. Siqueira JF Jr, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, de Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of Enterococcus faecalis from the root canal, in vitro. Int Endod J. 1997 Jul;30(4):279-82. doi: 10.1046/j.1365-2591.1997.00096. x.

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

91. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Oliveira JC, Santos KR. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. J Endod. 2001b Sep;27(9):563-6. doi: 10.1097/00004770-200109000-00002.

92. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001c Oct;92(4):451-7. doi: 10.1067/moe.2001.118620.

93. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Lopes HP. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod. 2002 Feb;93(2):174-8. doi: 10.1067/moe.2002.119910.

94. Siqueira JF, Jung IY, Rôças IN, Lee CY. Differences in prevalence of selected bacterial species in primary endodontic infections from two distinct geographic locations. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod. 2005 May;99(5):641-7. doi: 10.1016/j.tripleo.2004.07.009.

95. Siqueira JF Jr, Rôças IN. The microbiota of acute apical abscesses. J Dent Res. 2009 Jan;88(1):61-5. doi: 10.1177/0022034508328124.

96. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Alves FR, Silva MG. Bacteria in the apical root canal of teeth with primary apical periodontitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009 May;107(5):721-6. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.01.042.

97. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Microbiology and treatment of acute apical abscesses. Clin Microbiol Rev. 2013 Apr;26(2):255-73. doi: 10.1128/CMR.00082-12.

98. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Ricucci D, Hülsmann M. Causes and management of post-treatment apical periodontitis. Br Dent J. 2014 Mar;216(6):305-12. doi: 10.1038/sj.bdj.2014.200.
99. Smyth CJ, Matthews H, Halpenny MK, Brandis H, Colman G. Biotyping, serotyping and phage typing of Streptococcus faecalis isolated from dental plaque in the human mouth. J Med Microbiol. 1987 Feb;23(1):45-54. doi: 10.1099/00222615-23-1-45.

100. Sousa EL, Martinho FC, Leite FR, Nascimento GG, Gomes BP. Macrophage cell activation with acute apical abscess contents determined by interleukin-1 Beta and tumor necrosis factor alpha production. J Endod. 2014 Nov;40(11):1752-7. doi: 10.1016/j.joen.2014.06.019.

101. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. J Endod. 1992 Sep;18(9):427-30. doi: 10.1016/S0099-2399(06)80842-3.

102. Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. J Endod. 1989 Jan;15(1):13-9. doi: 10.1016/S0099-2399(89)80092-5.

103. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998 Jan;85(1):86-93. doi: 10.1016/s1079-2104(98)90404-8.

104. Swimberghe RCD, Coenye T, De Moor RJG, Meire MA. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. Int Endod J. 2019 May;52(5):604-628. doi: 10.1111/iej.13050. Epub 2018 Dec 20.

105. Tam YC, Chan EC. Purification and characterization of hyaluronidase from oral Peptostreptococcus species. Infect Immun. 1985 Feb;47(2):508-13. doi: 10.1128/IAI.47.2.508-513.1985.
106. Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. Periodontol 2000. 2006; 42:180-218. doi: 10.1111/j.1600-0757.2006.00192.x.

107. Ter Steeg PF, Van der Hoeven SJ, de Jong MH, van Munster PJ, Jansen MJ. Enrichment of subgingival microflora on human serum leading to accumulation of Bacteroides species, Peptostreptococci and Fusobacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 1987;53(4):261-72. doi: 10.1007/BF00393933.

108. Uemura H, Hayakawa K, Shimada K, Tojo M, Nagamatsu M, Miyoshi-Akiyama T, et al. Parvimonas micra as a causative organism of spondylodiscitis: a report of

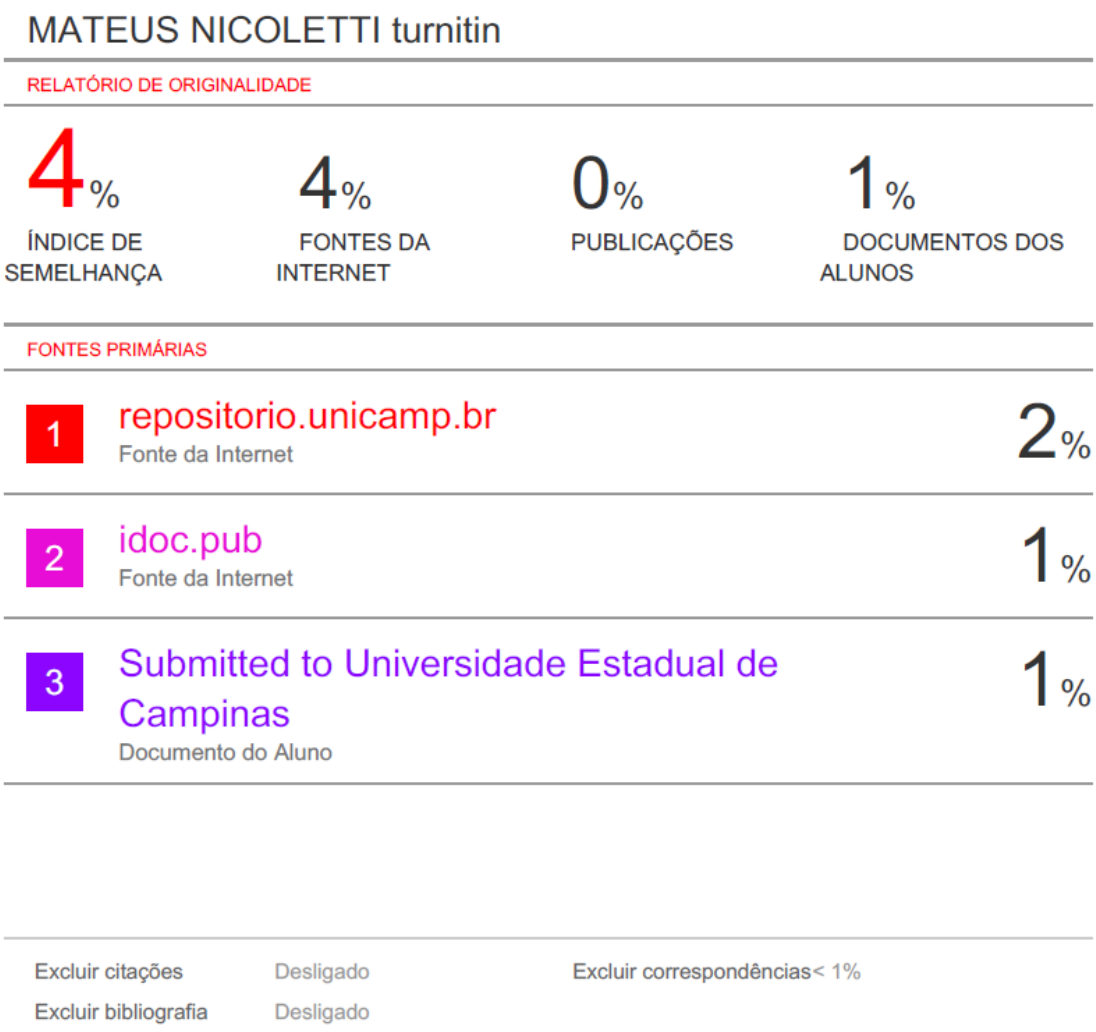
two cases and a literature review. Int J Infect Dis. 2014 Jun; 23:53-5. doi: 10.1016/j.ijid.2014.02.007.

109. Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. Int Endod J. 2006 Jun;39(6):484-92. doi: 10.1111/j.1365-2591.2006.01121. x.

110. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BP. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. Oral Microbiol Immunol. 2008 Aug;23(4):282-90. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00425. x.

111. Zhang X, Zhu X, Cao Y, Fang JY, Hong J, Chen H. Fecal *Fusobacterium nucleatum* for the diagnosis of colorectal tumor: A systematic review and meta-analysis. Cancer Med. 2019 Feb;8(2):480-91. doi: 10.1002/cam4.1850.

ANEXOS 1 - VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO



MATEUS NICOLETTI turnitin

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

4%	4%	0%	1%
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS

FONTES PRIMÁRIAS

1	repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	2%
2	idoc.pub Fonte da Internet	1%
3	Submitted to Universidade Estadual de Campinas Documento do Aluno	1%

Excluir citações	Desligado	Excluir correspondências	< 1%
Excluir bibliografia	Desligado		