



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Ederaldo Pietrafesa de Godoi Junior

Perfil microbiológico de canais radiculares de
dentes submetidos ao retratamento endodôntico
devido à presença de periodontite apical crônica e
por motivos protéticos

Piracicaba
2021

Ederaldo Pietrafesa de Godoi Junior

Perfil microbiológico de canais radiculares de dentes submetidos ao retratamento endodôntico devido à presença de periodontite apical crônica e por motivos protéticos

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

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

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO EDERALDO PIETRAFESA DE GODOI JUNIOR E ORIENTADA PELA PROF^a. DR^a. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

Piracicaba
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

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

G547p Godoi Junior, Ederaldo Pietrafesa, 1994-
Perfil microbiológico de canais radiculares de dentes submetidos ao
retratamento endodôntico devido à presença de periodontite apical crônica e
por motivos protéticos / Ederaldo Pietrafesa de Godoi Junior. – Piracicaba, SP :
[s.n.], 2021.

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

1. Endodontia. 2. Retratamento. 3. Bactérias. 4. Reação em cadeia da
polimerase. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Microbial profile of root canals submitted to endodontic retreatment
due to the presence of apical periodontitis or for prosthetic reasons

Palavras-chave em inglês:

Endodontics

Retreatment

Bacteria

Polymerase chain reaction

Área de concentração: Endodontia

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes [Orientador]

Daniel Rodrigo Herrera Morante

Marina Angélica Marciano da Silva

Data de defesa: 28-04-2021

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3067-5546>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7455311166829325>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 28 de abril de 2021, considerou o candidato EDERALDO PIETRAFESA DE GODOI JUNIOR aprovado.

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

PROF. DR. DANIEL RODRIGO HERRERA MORANTE

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

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Ederaldo e Eliana, por todo carinho, amor, atenção, dedicação e companheirismo. Vocês foram essenciais para a materialização desse sonho.

A minhas irmãs Bruna e Gabriela, a minha tia Aurora e a minha avó Cecília por toda amizade e carinho. Vocês sempre se fizeram presentes, mesmo quando distantes.

Aos meus avôs Gomidez, Benedita e Joaquim e ao meu primo David, vocês são e sempre serão um pedaço de mim.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora Prof^a Dr^a Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes. Agradeço por ter me escolhido como seu aluno, por ter confiado no meu potencial e me proporcionado oportunidades ímpares de crescimento. Obrigado por todo apoio e dedicação. Sinto-me honrado e grato em ter a senhora como professora orientadora.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual de Campinas** na pessoa de seu magnífico reitor Prof. Dr. **Marcelo Knobel** e à sua **Faculdade de Odontologia**, na pessoa de seu diretor Prof. Dr. **Francisco Haiter Neto** e do Diretor Associado Prof. Dr. **Flavio Henrique Baggio Aguiar**, por oferecer-me suas instalações e quadro pessoal que ocupam posições de destaque no cenário nacional e internacional.

À Profa. Dra. **Karina Gonzales Silvério Ruiz**, coordenadora do Programa de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP e ao Prof. Dr. **Valentim Adelino Ricardo Barão**, coordenador do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica. Agradeço pelo espaço científico ofertado para realização das atividades acadêmicas.

À CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

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

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

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

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

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

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

Aos colegas de mestrado da Endodontia, Antonio Airton L. de Moura Filho, Esdras Gabriel Alves, Arthur Barroso Pimentel, Fernanda M. Antonialli, Tamares Andrade e Silva, Thiago Bessa, Tamires F. Mello, Walbert Vieira, Rodolfo Figueiredo e Paulo H Gabriel.

Aos colegas de doutorado, Augusto Rodrigues Lima, Bruna Milaré, Diogo da Silva, Eloá Cristina Bicego, Emelly de Aveiro, Ezequiel Gabrielli, Flávia Saavedra, Jaqueline Lazzari, Jéssika Jeuken Teixeira, Juliana Delatorre Bronzato, Lauter Eston Pelepenko Teixeira, Lidiane Mendes Louzada, Maria Eunice da Silva Davidian, Marina Prado, Patrícia Almeida da Silva de Macedo, Priscila Amanda Francisco, Rafaela Casadei Chapola, Ricardo Honda, Rodrigo Vasconcelos, Vito Madio Chiarelli Neto, Yanna de Omena Soares.

Aos pós-doutorandos Andrea Cardoso Pereira, Érica Mendes Lopes e Emilio Carlos Sponchiado Junior.

À pós-doutoranda Erica Mendes Lopes, obrigado por todo apoio e ajuda durante minha jornada na execução desse projeto, além da amizade e dos bons momentos.

Aos meus amigos Tarcísio Defendi, Thomas Muciacito, Henrique César, Pedro Faria, Bruno de Toledo, Giulia Defendi e Hugo Deleon por fazer minha jornada mais feliz e descontraída desde os tempos de colégio.

Aos meus primos irmãos Arthur Pietrafesa Bernardi, Laís Nascimento Pietrafesa de Godoi e Fernanda Nascimento Pietrafesa de Godoi, pela oportunidade de compartilhar a um sentimento único de fraternidade.

Aos amigos Augusto Rodrigues Lima, Priscila Amanda Francisco e Eloá Cristina Bicego Pereira, obrigado por toda amizade, ajuda e conselhos. Vocês foram fundamentais na lapidação deste trabalho.

Ao meu colega de mestrado Antonio Airton L. de Moura Filho pelos bons momentos vividos durante esse período, pela oportunidade de poder aprender e crescer junto de você e pela amizade que construímos, meus sinceros agradecimentos.

A minha amiga Lara Nantes Mantovani por todo apoio e ajuda durante esse período. Obrigado pela sua amizade, é muito bom estar cercado de pessoas como você.

Aos meus colegas de moradia e irmãos piracicabanos Lauter Eston Pelepenko Teixeira, Felipe Nogueira Anacleto, Ricardo Honda, Arthur Pimentel Barroso e Pedro Ivo das Graças Fagundes, por todo suporte e fraternidade. Obrigado por me incluírem como parte desta família.

A todos os pacientes que confiaram em meu trabalho e colaboraram com minha pesquisa, sem eles nada disso seria possível.

Aos professores que participaram da minha banca de qualificação, Prof. Dr. Caio César Randi Ferraz, Prof^a. Dra. Maraísa Greggio Delboni, Prof. Dr. Marlos Barbosa Ribeiro e Prof. Dr. José Flavio Affonso de Almeida.

Aos professores doutores Daniel R. Herrera, Marina Angélica Marciano da Silva, Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Felipe Nogueira Anacleto e Andréa Cardoso Pereira, por serem banca da defesa de minha dissertação de Mestrado. Minha gratidão a cada um de vocês por dedicarem seu tempo para contribuir com o crescimento deste trabalho.

A todos que de alguma maneira participaram dessa caminhada, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O insucesso da terapia endodôntica está intimamente ligado à presença de microrganismos e seus subprodutos no interior do sistema de canais radiculares (SCR), sendo o retratamento endodôntico (RE) via não cirúrgica a primeira opção de tratamento da infecção secundária/persistente. Os objetivos deste estudo foram: a) investigar a microbiota encontrada nos canais radiculares (CR) de dentes submetidos ao RE devido à presença de periodontite apical crônica (PAC) e por motivos protéticos nas diversas fases do RE; b) monitorar a eficácia de todas as etapas do RE através da redução da carga microbiana; c) investigar associações entre pares de bactéria e entre bactérias específicas e os aspectos clínicos. Foram selecionados 30 pacientes, obtendo uma amostra de 30 dentes tratados endodonticamente e indicados ao RE pela presença de periodontite apical crônica (G1, n=15) ou por finalidade protética (G2, n=15). Amostras microbiológicas foram coletadas dos CR após a abertura coronária (CI), após o preparo químico-mecânico (Pós-PQM) e após 30 dias de uso da medicação intracanal (Pós-MIC). A análise molecular foi realizada através do Nested-PCR para detecção de 17 espécies bacterianas. A carga microbiana e a eficiência dos procedimentos das etapas do RE foram verificadas pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). O teste de Wilcoxon foi aplicado para a análise intragrupo das etapas do tratamento. Mann-Whitney foi utilizado para análise intergrupo da carga bacteriana detectada. O teste exato de Fischer foi aplicado para avaliar correlações entre espécies bacterianas e sinais e sintomas, com nível de significância estabelecido em 5%. Os resultados mostraram que bactérias foram detectadas em 100% das coletas iniciais, em ambos os grupos, pelo Nested PCR. As espécies mais encontradas nas coletas iniciais em ambos os grupos de estudo foram *E. faecalis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *A. actinocetemcomitans* e *P. micra*. O RE é eficaz em reduzir a carga microbiana dos dentes dos grupos G1 e G2 ($p < 0,05$). Associações estatisticamente significantes entre bactérias específicas com sinais e sintomas clínicos foram encontradas ($p < 0,05$). Concluiu-se que a comunidade presente no CR dos dentes indicados para RE é mista e heterogênea. A carga microbiana do CR com PAC é maior do que a do RC sem PAC. O RE é eficiente na redução da carga microbiana do CR. Existem associações entre bactérias específicas e aspectos clínicos.

Palavras-chaves: endodontia, retratamento, bactéria, PCR

ABSTRACT

The failure of endodontic therapy is strongly associated to the presence of microorganisms and their by-products within the root canal system (RCS), being the conventional endodontic retreatment (ER) the first option for treating secondary / persistent infection. The objectives of this study were: a) to investigate the microbiota found in the root canals (RC) of teeth submitted to ER due to the presence of chronic apical periodontitis (CAP) and for prosthetic reasons, in the different phases of the ER; b) to monitor the effectiveness of all stages of the ER by reducing the microbial load; c) to investigate associations between pairs of bacteria and between specific bacteria and clinical features. The samples consisted of 15 teeth endodontically-treated indicated to the ER for the presence of CAP (G1) and 15 teeth indicated for prosthetic purposes (G2). Microbiological samples were collected from the RC after coronal access (IC), after chemo-mechanical preparation (Post-CMP) and after 30 days of using intracanal medication (Post-ICM). Molecular analysis was performed using Nested-PCR to detect 17 bacterial species. The microbial load and the efficiency of the procedures of every stage of the ER were verified by counting colony-forming units (CFU). Wilcoxon test was applied for the intragroup analysis of the treatment steps. Mann-Whitney was used for intergroup analysis of the detected bacterial load. Fischer's exact test was applied to assess correlations between bacterial species and signs and symptoms with a significance level set at 5%. The results showed that bacteria were detected in 100% of the cases, in both groups, by the Nested PCR. The species most found in both groups in the initial samples were *E. faecalis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. micra* and *A. actinocetemcomitans*. ER was effective in reducing the microbial load of teeth in groups G1 and G2. Statistically significant associations were found between specific bacteria with clinical signs and symptoms. It was concluded that the community present in the RC of teeth indicated to ER is mixed and heterogeneous. The microbial load of RC with CAP is greater than that of RC without CAP. The ER is efficient in reducing the microbial load of the RC. There are associations between specific bacteria and clinical features.

Keywords: endodontics, retreatment, bacteria, PCR

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo das coletas realizadas ao longo dos procedimentos endodônticos e suas respectivas siglas (pág. 40);

Tabela 2 - Tabela 2. Sequências dos primer espécie-específico utilizados nas reações de PCR (pág 49);

Tabela 3 - Descrição das características clínicas e radiográficas detectadas nos pacientes pertencentes do G1(pág. 52);

Tabela 4 - Descrição das características clínicas e radiográficas detectadas nos pacientes pertencentes do G2 (pág. 54);

Tabela 5 - Mediana, mínima e máxima de UFC/ml nos grupos G1 e G2 durante as etapas do tratamento endodôntico (pág. 55);

Tabela 6 - Distribuição de frequência e porcentagem dos casos incluídos no G1 em função do número de microrganismos detectados conjuntamente no mesmo paciente através do Nested-PCR (pág. 57);

Tabela 7 - Frequência e porcentagem dos microrganismos identificados nos casos indicados ao retratamento devido a presença de lesão periapical crônica em função da coloração de Gram (pág. 57);

Tabela 8 - Distribuição de frequência dos casos inclusos no G2 em função do número de espécies detectadas por caso (pág. 58);

Tabela 9 - Distribuição de frequência dos microrganismos detectados em função da coloração de Gram (pág. 59);

Tabela 10 - Frequência e porcentagem dos resultados positivos obtidos nos grupos G1 e G2 detectados através do Nested-PCR nos diferentes tempos de coleta (pág. 62);

Tabela 11 - Correlações positivas entre a presença de bactérias e sinais e sintomas clínicos e/ou radiográficos apresentados pelos pacientes (pág. 66)

SUMÁRIO

	Página
1 Introdução	14
2 Revisão da literatura	17
3 Proposição	37
4 Material e Métodos	38
5 Resultados	52
6 Discussão	70
7 Conclusão	77
Referências	78
Anexos	89
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	89
Anexo 2 – Verificação de Originalidade e Prevenção de Plágio	90

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, mais de 700 espécies bacterianas já foram reconhecidas como colonizadoras da cavidade oral das quais estima-se que de 40 a 60% ainda sejam incultiváveis (Gomes et al., 2015; Gomes & Herrera 2018). Além disso, é sabido que os microrganismos capazes de colonizar o sistema de canais radiculares são provenientes da cavidade bucal (Gomes et al., 2004; Sedgley et al., 2006). Estes desempenham papel importante no desenvolvimento e na perpetuação das doenças pulpares e periapicais (Takehashi et al., 1965; Moller et al., 1981; Fabricius et al., 2006).

Apesar de fatores como reação de corpo estranho a substâncias endógenas ou exógenas já terem sido descritos como causas de insucesso da terapia endodôntica (Nair et al., 1999ab), a presença de infecção intra-radicular é comprovadamente o principal fator etiológico do insucesso do tratamento endodôntico (Gomes et al., 2004; Gomes et al., 2008b; Endo et al., 2013; Prada et al., 2019).

A infecção secundária é descrita como uma reinfecção dos canais radiculares, podendo ser resultante da ocorrência de cáries recorrentes ou falhas no selamento coronário do dente tratado. A infecção também pode ser caracterizada como persistente nos casos onde for originada por microrganismos remanescentes ao tratamento inicial, o que pode ser ocasionado pela instrumentação ou obturação imprópria do SCR (Ray & Trope 1995; Pinheiro et al., 2003; Siqueira et al., 2005; Barbosa-Ribeiro et al., 2016; Delboni et al., 2017; Francisco et al., 2019; Barbosa-Ribeiro et al., 2020ab).

A microinfiltração causada por falhas de selamento coronário age não só como uma via de acesso para que novos microrganismos possam acessar o sistema de canais radiculares, mas também como uma fonte de nutrientes para os microrganismos residuais que ficam em estado de latência, podendo reativá-los (Molander et al., 1998; Ray & Trope 2005; Siqueira et al., 2005; Pedro et al., 2016; Delboni et al., 2017).

Grupos restritos de microrganismos podem resistir as alterações ecológicas ocasionadas pela terapia endodôntica, sobrevivendo em um meio escasso de nutrientes onde as relações bacterianas interespecíficas são diminutas (Sundqvist et al., 1998; Gomes et al., 2008b; Nóbrega et al., 2013; Tennert et al., 2014; Zhang et al., 2015; Barbosa-Ribeiro et al., 2016). Sendo assim, a comunidade presente nos canais radiculares associados à infecção secundária difere-se em abundância e

diversidade de espécies daquela encontrada nos casos de infecção primária, com maior prevalência de microrganismos Gram-positivos e anaeróbios facultativos (Molander et al., 1998; Pinheiro et al., 2003a; Gomes et al., 2005); entretanto, a microbiota residente de canais radiculares indicados ao retratamento endodôntico por motivos exclusivamente protéticos é pouco descrita na literatura atual (Sundqvist et al., 1998; Bicego-Pereira et al., 2020).

A contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) é um método de análise microbiológica confiável, empregado para avaliar a suscetibilidade da comunidade bacteriana residente dos canais radiculares aos procedimentos da terapia endodôntica (Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2020b).

Entretanto, existe uma limitação da cultura, pois nem todos os microrganismos são capazes de crescer nos meios de cultura vigentes e nas condições gasosas e de temperatura. Além disso, algumas espécies necessitam de um número grande de UFC para crescerem. (Gomes et al., 1994a; Siqueira & Roças 2005; Gomes et al., 2008b; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016 Gomes & Herrera et al., 2018; Gomes et al., 2020).

Métodos moleculares de identificação bacteriana possuem algumas vantagens inerentes à técnica de cultura, como uma maior sensibilidade e especificidade, além de sua capacidade de identificar microrganismos incultiváveis (Gomes et al., 2004; Gomes et al 2008ab; Barbosa-Ribeiro et al 2020ab). Por isso, eles têm sido amplamente empregados na Endodontia (Gomes et al., 2004; Gomes et al., 2006; Roças & Siquiera 2012; Endo et al., 2013; Gomes et al., 2005 Babosa-Ribeiro et al., 2020ab; Bicego-Pereira et al., 2020).

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

A terapia endodôntica deve ter como objetivo a máxima redução da carga microbiana presente no sistema de canais radiculares (SCR) através do preparo químico-mecânico (PQM), que envolve a instrumentação e o emprego de soluções químicas auxiliares (SQA); e do uso de uma medicação intracanal (MIC). Entretanto, a completa erradicação dos microrganismos associados à infecção endodôntica é

impossibilitada pela complexidade anatômica do SCR (Gomes et al., 1996; Siqueira et al., 2001; Rôças et al., 2010; Rahimi et al., 2014; Gomes et al., 2015; Zuolo et al., 2017). A presença do selamento coronário e apical adequada é fundamental para impedir que os microrganismos presentes no meio bucal recolonizem o SCR e atinjam os tecidos pericapicais (Siqueira et al., 2005ab; Song et al, 2014; Landys et al, 2015; Pedro et al, 2016; Delboni et al., 2017).

Dessa forma, o presente trabalho visa avaliar o impacto da reintervenção endodôntica na microbiota de dentes com presença de lesão periapical e de dentes sem lesão periapical, mas indicados ao retratamento por motivos exclusivamente protéticos, partindo-se da hipótese de que existem diferenças qualitativas e/ou quantitativas entre a microbiota associada aos quadros clínicos avaliados no presente estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ÍNDICE DE SUCESSO DA INTERVENÇÃO E DA REINTERVENÇÃO ENDODÔNTICA

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

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

O sucesso do tratamento endodôntico é definido pela ausência de sintomas e sinais clínicos e radiográficos, os quais devem ser periodicamente avaliados até que seja possível de se atestar o sucesso ou o fracasso do tratamento endodôntico realizado (Siqueira et al., 2014). Os sinais e sintomas clínicos que determinam o sucesso do tratamento endodôntico são: a ausência de dor, exsudato e fístula nos casos em que esses se fizerem presentes previamente ao tratamento, e o reestabelecimento da função mastigatória. Radiograficamente, o sucesso é avaliado através da remissão de radioluscências periapicais e do reestabelecimento de continuidade da lâmina dura em um período de 6 a 24 meses após o tratamento endodôntico (Prada et al., 2019).

Kerekes e Tronstad, 1979, avaliaram sucesso de 478 tratamentos realizados por alunos de graduação na universidade de Oslo obtendo índices de sucesso 93% nos casos onde a polpa dental se encontrava vital, e 86% nos casos onde o diagnóstico pulpar era de necrose.

Swartz et al., 1983, realizaram o monitoramento de um total de 1007 dentes periodicamente durante um período de 10 anos, relatando um índice de sucesso geral de 87,79%. A presença de periodontite apical prévia e o limite apical de obturação foram considerados fatores capazes de interferir significativamente no índice de sucesso do tratamento endodôntico.

Sjögren et al., 1990, avaliaram os índices de sucesso da intervenção endodôntica primária e da reintervenção endodôntica não cirúrgica em 356 dentes.

Os índices de sucessos encontrados foram de 98% para os casos de dentes foram indicados ao tratamento endodôntico devido a necrose pulpar; 86% para dentes com necrose pulpar associada a periodontite apical crônica; e de 62% para dentes com insucesso do tratamento endodôntico prévio, evidenciado pela presença de lesão periapical respectivamente.

Danin et al., 1996, selecionaram 38 pacientes portadores de periodontite apical crônica pós-tratamento endodôntico. Os dentes foram aleatoriamente divididos em dois grupos, o primeiro tratado através da reintervenção endodôntica convencional, e o segundo via cirúrgica. Os autores relataram remissão completa da lesão periapical em 28% dos casos retratados via convencional e 58% dos casos retratados via cirúrgica, e resultados incertos foram obtidos a partir de 28% dos retratamentos endodônticos executados e de 26% dos casos indicados a cirurgia periapical; a falha do tratamento executado foi averiguada em 44% dos casos retratados via convencional e 16% dos casos indicados ao retratamento cirúrgico. Entretanto, os autores atestam ausência de diferenças estatísticas entre os grupos.

Kvist & Reit, 1999, ao compararem os índices de sucesso da reintervenção endodôntica convencional e da modalidade cirúrgica também não encontraram índices de sucesso estatisticamente diferentes, relatando índices de sucesso de 48 e 52% para a modalidade de reintervenção convencional e cirúrgica respectivamente na preservação realizada após 24 meses do tratamento, não detectando diferenças estatísticas entre as taxas de sucesso apresentadas pela modalidade.

Estudos indicam a modalidade não cirúrgica como primeira opção de tratamento para os casos de lesão periapical persistente, sendo que sua execução prévia a cirurgia parodontológica é capaz de elevar os índices de sucesso da modalidade cirúrgica (Hepworth & Friedman, 1997; Briggs & Scott, 1997)

Siqueira et al., 2005, analisaram o resultado de 2051 tratamentos endodônticos, correlacionando seu sucesso com a qualidade de obturação do SCR e a presença ou ausência de uma restauração coronária adequada. Os autores concluem que casos que possuem falhas tanto na obturação quanto no selamento coronário apresentam menores índices sucesso.

West, 2006, afirma que a endodontia evoluiu muito, e que, com as novas tecnologias, houve aumento do sucesso e da previsibilidade do tratamento endodôntico.

Imura et al., 2007, acompanharam 2000 casos indicados ao tratamento e retratamento endodôntico por razões diversas, sendo os procedimentos realizados por um único especialista. Observaram um índice de sucesso de 94% nas intervenções endodônticas; e 85,9% nas reintervenções endodônticas. A ausência de um selamento coronário definitivo mostrou-se um fator com alto grau de impacto desfavorável ao sucesso do tratamento endodôntico, assim como a ocorrência de acidentes durante a execução do procedimento. O grupo dental envolvido também foi capaz de afetar o índice de sucesso da reintervenção endodôntica, sendo que incisivos e pré-molares obtiveram maiores índices de sucesso, quando comparados aos molares.

Tian et al., 2008, analisaram os resultados de 124 retratamentos endodônticos realizados sob a magnificação do microscópio operatório e a utilização de insertos ultrassônicos. Observaram índices de sucesso de 82,93%, evidenciando a importância da tecnologia aplicada ao tratamento endodôntico e seu impacto positivo sobre os índices de sucesso do tratamento.

Ng et al., 2011, avaliaram o índice de sucesso do tratamento endodôntico primário e da reintervenção endodôntica de 702 casos associados a infecção primária e 750 casos associados a infecção secundária. Realizaram um acompanhamento clínico e radiográfico anual desses casos por um período de 4 anos, constatando sucesso do tratamento endodôntico em 83% dos casos associados a infecção primária e 80% dos casos associados a infecção secundária. Os autores também relataram a influência de fatores como existência prévia de periodontites apicais crônicas, tamanho da rarefação óssea presente, presença de fístula, patência do canal radicular, comprimento de trabalho do tratamento executado, limite de obturação, uso de EDTA durante a irrigação final, no índice de sucesso dos tratamentos endodônticos.

Van der Borden et al., 2013, ao analisarem o sucesso do tratamento endodôntico, visaram comparar a efetividade das radiografias periapicais e da tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) na detecção de periodontites apicais crônicas. Nesse estudo, os autores acompanharam o resultado do tratamento endodôntico de 50 dentes (71 raízes) associados infecções primárias por um período de 10-37 meses, classificando os casos em relação a presença de lesão periapical como: lesão não detectada; lesão reduzida em tamanho; lesão inalterada e lesão

umentada. Houve concordância entre a classificação dos casos em 54,9% dos casos (39/71 raízes). Os métodos avaliados demonstraram diferenças estatisticamente significantes no que diz respeito a detecção das periodontites apicais crônicas, sendo que a radiografia periapical inicial revelou ausência de sinais radiográficos da doença em 45,1% dos casos e a TFCF inicial em apenas 15,5%. Quando foi definido sucesso com ausência ou regressão da lesão periapical inicial não houveram diferenças estatísticas significantes entre os métodos, que apresentaram índices de 77,5% na análise da TFCF e 88,7% nas radiografias periapicais, respectivamente.

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

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

Al-Nuaimi et al., 2018, avaliaram o índice de sucesso de tratamentos endodônticos primários e reintervenções endodônticas convencionais através da aquisição de imagens tomográficas (TCFC) e radiografias periapicais. Para isso, os

autores realizaram a preservação de 354 casos após 1 ano da execução do tratamento, sendo desses 123 associados a infecção primária e 231 a infecção secundária. O índice de sucesso obtido a partir da análise da TCFC foi de 84,7% para os casos de infecção primária (104/123) e 77,9% para os casos de infecção secundária (180/231), não havendo diferenças estatísticas entre os índices obtidos no tratamento endodôntico primário e na reintervenção endodôntica convencional. No geral, os índices de sucesso descritos pela análise das radiografias periapicais foi de 91%, enquanto a análise da TCFC revelou índices menores, 80%, sendo essa diferença estatisticamente significativa. Os autores concluíram que a análise de TCFC revelou um menor número de resultados favoráveis em relação as radiografias periapicais.

Laukkanen et al., 2021, avaliaram, através da aquisição de imagens radiográficas periapicais, a relação do grupo dentário tratado e a qualidade de obturação com o índice de sucesso, em 426 tratamentos endodônticos realizados por clínicos gerais. O estudo incluiu dentes anteriores, pré-molares e molares, sendo que foram analisados 142 tratamentos realizados em cada um dos grupos dentários do estudo. Os índices de sucesso obtidos foram de 76,8%, 69,7% e 55,6% para anteriores, pré-molares e molares, respectivamente, sendo o grupo dentário a ser tratado um fator influente no índice de sucesso. O limite de obturação e a presença de periodontite apical crônica prévia ao tratamento também se mostraram fatores críticos para o índice de sucesso do tratamento.

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

2.2 ETIOLOGIA DO INSUCESSO E DO RETRATAMENTO ENDODÔNTICO

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

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

Embora fatores não microbianos, como a ocorrência de reações de corpo também já tenham sido apontados como um dos responsáveis pela formação e manutenção das lesões perirradiculares (Nair et al., 1999ab), sem sombra de dúvida que a permanência de microrganismos no sistema de canais radiculares e a recontaminação dos canais são os fatores mais importantes no insucesso do tratamento endodôntico (Molander et al., 1998; Sundqvist et al., 1998; Siqueira & Roças 2004; Gomes et al., 2006; 2008ab; Endo et al., 2013).

A persistência de microrganismos no interior do SCR pode ser favorecida pela presença de falhas no tratamento endodôntico prévio, como complexidades anatômicas diversas, canais radiculares não encontrados, controle asséptico inadequado do campo operatório, limite apical de obturação insatisfatório e selamento coronário ineficiente e a negligência dos protocolos estabelecidos na literatura para limpeza e desinfecção do SCR (Sjögren et al., 1990; Chugal et al., 2003; Siqueira et al., 2005; Gomes et al., 2008; Gomes et al., 2015).

O insucesso do tratamento endodôntico também pode ser observado, embora com uma menor incidência, em casos onde o tratamento endodôntico prévio apresenta-se radiograficamente satisfatório. Isso pode ser oriundo da presença de complexidades anatômicas como istmos, canais laterais e deltas apicais, que são áreas menos acessíveis aos instrumentos e substâncias empregadas durante o tratamento endodôntico; como também da existência de microrganismos resistentes as manobras de descontaminação empregadas durante o tratamento endodôntico (Siqueira, 2001; Siqueira et al., 2014; Zuolo et al., 2019).

Sendo assim, a descontaminação do sistema de canais radiculares se mostra a principal diretriz para o sucesso das intervenções endodônticas, uma vez que a

permanência de bactérias e seus subprodutos no SCR pode resultar na formação ou na perpetuação de patologias periapicais.

A reintervenção endodôntica não cirúrgica é a primeira opção de tratamento nos casos de insucesso do tratamento endodôntico por abranger uma maior área a ser tratada e por possuir índices de sucessos satisfatórios quando bem planejada e indicada (Bystrom et al., 1997; Mollet et al., 1981; Siqueira et al., 2001; Roças et al., 2008; Gomes et al., 2008b; Endo et al., 2013; Roças et al., 2016).

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

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

A infecção extrarradicular pode ser caracterizada como dependente ou independente da infecção intra-radicular.

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

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

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

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

2.2.1 A IMPORTÂNCIA DO TRATAMENTO RESTAURADOR NO SUCESSO DA TERAPIA ENDODÔNTICA

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

Diversos estudos apontam uma relação positiva entre o índice de sucesso do tratamento endodôntico e uma boa qualidade de obturação e selamento coronário

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

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

Gomes et al., 2006, analisaram a microbiota presente no SCR de 50 dentes portadores de necrose pulpar e periodontite apical crônica 50 dentes associados às infecções secundárias e periodontite apical crônica. Os autores também relatam alta prevalência de restaurações coronárias deficientes, portadoras de sinais clínicos característicos de microinfiltração nesses casos, ressaltando mais uma vez o papel da microinfiltração no desenvolvimento e perpetuação da doença periapical.

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

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

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

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

2.3 PERFIL MICROBIOLÓGICO DE DENTES ASSOCIADOS A INFECÇÕES SECUNDÁRIAS/PERSISTENTES

Tendo-se estabelecido a relação de causa e efeito entre a presença de microrganismos no interior do sistema de canais radiculares e o desenvolvimento das patologias pulpares e periapicais, torna-se impreterível o conhecimento do perfil da comunidade microbiana residente no interior do SCR de dentes endodonticamente comprometidos, para o desenvolvimento de substâncias, técnicas e recursos capazes de otimizar o índice de sucesso da intervenção e da reintervenção endodôntica (Kakehashi et al., 1965; Sundqvist et al., 1998; Molander et al., 1998; Siqueira et al., 2001; Gomes et al., 2008b; Barbosa-Ribeiro et al., 2016a Prada et al., 2019).

A microbiota descrita como residente dos canais radiculares de dentes previamente tratados difere-se daquela encontrada nos casos relatados de infecção primária, visto que o tratamento endodôntico modifica as condições ambientais e seleciona os microrganismos residuais. Esses são os que conseguem sobreviver num ambiente inóspito, escasso de nutrientes, em que as interações ecológicas são mínimas, e que sejam capazes de manterem-se em estado de latência por grandes períodos de escassez e de se reativarem na presença de nutrientes. (Sundqvist et al., 1992; 1998; Siren et al., 1997; Molander et al., 1998; Hancock 2001; Roças et al., 2008; Gomes et al., 2008; 2013b; Ricucci & Siqueira 2011; Endo et al., 2013; Prada et al., 2019).

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

predominantemente compostas por bactérias anaeróbias estritas, contendo bactérias Gram-negativas e positivas (Haapasalo., 1989; Gomes et al., 1994; 2004)

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

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

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

Pinheiro et al., 2003a, analisaram, através do método de cultura, o conteúdo microbiológico presente em 60 dentes endodonticamente tratados com presença de periodontite apical crônica. Os autores relataram a presença de 83,3% de bactérias

Gram-positivas e 57,4% de anaeróbios facultativos, sendo o *E. faecalis* a espécie encontrada com maior frequência nestes casos (45%). Os autores destacaram a presença de espécies anaeróbias estritas, sendo o gênero *Peptostreptococcus* o mais frequentemente isolado.

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

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

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

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

detectadas em 35 amostras. Das 22 amostras sem periodontite apical, bactérias foram detectadas em 17 casos, sugerindo uma maior prevalência de bactérias em casos associados a periodontite apical.

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

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

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

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

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

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

Barbosa-Ribeiro et al., 2016, analisaram a comunidade bacteriana presente nos casos de infecção secundária e a suscetibilidade desta comunidade microbiana à reintervenção endodôntica em 20 dentes já tratados endodonticamente acometidos por periodontite apical crônica através dos métodos de cultura microbiológica e contagem de UFC. Os autores revelaram uma grande eficiência do tratamento endodôntico na redução da carga microbiana presente nos casos de insucesso do tratamento endodôntico.

Barbosa-Ribeiro et al., 2020b, objetivando analisar a eficiência da reintervenção endodôntica não cirúrgica; e a comunidade microbiana presente nos casos de infecção secundária analisaram, através da contagem de UFC e do Nested-PCR, o conteúdo microbiológico de 20 dentes indicados ao retratamento endodôntico. Foram realizadas coletas logo após o acesso ao canal radicular (Inicial), após a execução do preparo químico-mecânico (Pós-PQM) e, após o uso de medicação intracanal, a base de hidróxido de cálcio por 30 dias (Pós-MIC). Os autores relataram uma redução de 99,4% na contagem de UFC obtida a partir das amostras Pós-PQM e Pós-MIC em relação à coleta inicial. As bactérias detectadas com maior frequência nas amostras

iniciais foram *E. faecalis* (20/20), *P. gingivalis* (20/20) e *F. nucleatum* (17/20). Os autores concluíram que o tratamento endodôntico é eficaz em reduzir a carga bacteriana presente no interior do sistema de canais radiculares nos casos de insucesso do tratamento endodôntico primário. Além disso, a infecção secundária possui um perfil polimicrobiano, tendo alta prevalência de *E. faecalis* e *P. gingivalis* durante todas as etapas do tratamento endodôntico, o que evidencia a grande resistência destas espécies.

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

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

Siqueira et al., 2016, investigando o conteúdo infeccioso associado as lesões periapicais, coletaram amostras do terço apical e das lesões periapicais presentes em 10 casos indicados ao retratamento endodôntico cirúrgico. A análise das amostras através do Next Generation Sequencing (NGS) revelou a presença de microrganismos pertencentes a 11 filos e 103 gêneros distintos, compostos de 538 OTUs distintas. O filo predominante em 6/10 foram as Proteobactérias. Os gêneros detectados em maior frequência foram *Fusobacterium* e *Pseudomonas*. *Enterococcus* foi detectado em apenas 4/10 amostras, sempre em concentrações baixas.

Sánchez-Schueza et al., 2018, coletaram amostras do conteúdo microbiológico presente nos canais radiculares de 24 dentes indicados a reintervenção endodôntica devido à presença de periodontite apical crônica. A análise do conteúdo infeccioso foi realizada através do NGS. Foram detectadas 86 OTUs distintas nas amostras analisadas, sendo que a maior parte dos microrganismos detectados foi pertencente ao filo Proteobacteria. Os autores correlacionam a presença simultânea de um maior

número de microrganismos no interior do SCR a casos sintomáticos, e a maiores níveis de destruição periapical.

Revisando a literatura, pode-se observar que o avanço de técnicas moleculares permite uma maior definição do perfil microbiológico presente nos canais radiculares infectados, ampliando o espectro de detecção das espécies presentes. Entretanto, os gêneros e espécies reportados pela cultura são confirmados pelas técnicas moleculares, e novas espécies, incluindo as não cultiváveis vêm se tornando conhecidas como parte desta população microbiana.

2.4 O MÉTODOS DE CULTURA MICROBIANA NO ESTUDO DAS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS SECUNDÁRIAS

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

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

Sundqvist et al., 1998, analisaram o conteúdo microbiológico de 45 amostras de dentes associados ao insucesso do tratamento endodôntico através da cultura microbiológica. Houve a predominância de monoinfecções caracterizadas pela predominância de bactérias anaeróbias facultativas, Gram-positivas, sendo o *E. faecalis* a espécie mais comumente isolada dos canais radiculares. Esses resultados estão de acordo com a literatura (Molander et al., 1998; Pinheiro et al., 2003; Gomes et al., 2004; Gomes et al., 2006b).

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

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

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

Ressalta-se que a diversidade bacteriana e a contagem de microrganismos obtidas através dos métodos de cultura são geralmente subestimados. Dessa maneira, um resultado negativo na cultura não necessariamente está associado a ausência completa de microrganismos no SCR, visto que 60% dos microrganismos capazes de colonizar o sistema de canais radiculares ainda não são passíveis de cultivo. A ausência de microrganismos no meio de cultura pode representar algumas limitações inerentes a coleta microbiológica e as condições nutricionais, gasosas e de temperatura. Uma cultura negativa pode ainda significar que existem microrganismos

presentes em concentrações abaixo daquelas necessárias para que sejam detectados através da cultura (Gomes et al., 1994ab; Jacinto et al., 2003; Gomes et al., 2004; Gomes et al., 2005; Gomes et al., 2008; Endo et al., 2013)

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

2.6 O MÉTODO DE NESTED-PCR NO ESTUDO DAS INFECÇÕES ASSOCIADAS A DENTES TRATADOS ENDODONTICAMENTE.

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

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

A sensibilidade da técnica do Nested-PCR é maior (10 células) em comparação aos métodos de PCR convencional (10^2 células) e da cultura (10^4 - 10^5 células) (Spratt 2004), sendo muito utilizada na detecção de espécies encontradas nos canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico (Gomes et al. 2008b, Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al. 2020ab). Entretanto, possui algumas limitações como a possibilidade de contaminação da amostra durante as diversas etapas da reação, a existência de resultados falso-positivos por reações cruzadas, e falhas no desenho dos primers utilizados na reação (Singh et al., 2006; Gomes et al., 2008b).

Nested-PCR é uma técnica molecular que envolve a realização de duas reações de polimerase em cadeia (PCR), sendo assim mais sensível e específico que

a reação de PCR convencional. A primeira reação de PCR objetiva amplificar o gene 16S rRNA a partir do DNA bacteriano extraído das amostras clínicas (Song et al., 2005). O produto da primeira reação é submetido a uma reação subsequente que utiliza um primer bacteriano espécie-específico, resultando no anelamento de uma sequência de DNA presente no interior do primeiro amplicon (Singht et al., 2006; Barbosa-Ribeiro2020ab).

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

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

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

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivos:

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar a microbiota encontrada nos canais radiculares (CR) de dentes submetidos ao RE devido a presença de periodontite apical crônica (PAC) e por motivos protéticos nas diversas fases do RE.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar nos canais radiculares de dentes submetidos ao retratamento endodôntico devido à presença de periodontite apical crônica e por motivos protéticos.

a) Monitorar a eficácia de cada etapa do RE através da redução da carga microbiana por meio da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC);

b) Descrever a microbiota presente em ambos os casos e em cada etapa do RE através da técnica de Nested-PCR;

c) Investigar associações entre pares de bactéria e entre bactérias específicas com os aspectos clínicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Alguns dos métodos aplicados para realização desta pesquisa foram previamente descritos por Gomes et al., 2008b; Endo et al., 2012; 2013; Delboni et al., 2017; Francisco et al., 2019; Barbosa-Ribeiro et al., 2020ab).

4.1 – Autorização para realização da pesquisa

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP). Para participação desse estudo, os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, conforme as normas vigentes no referido Comitê de Ética em pesquisa envolvendo seres humanos, sob o protocolo CAAE: 48374615.7.0000.5418, conforme regulamentação da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (Apêndice 1).

4.2 – Local da Pesquisa

Inicialmente, foram analisadas as fichas dos pacientes disponíveis na Área de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP) dos Cursos de Atualização e Especialização. Os procedimentos de coleta foram realizados na clínica de extensão da Faculdade de Odontologia de Piracicaba e, posteriormente, processados no laboratório de microbiologia da área de endodontia (FOP/UNICAMP)

4.3 – Seleção dos voluntários da pesquisa

O presente estudo foi observacional (estudo transversal). Inicialmente, foram analisadas as fichas clínicas e radiografias dos pacientes encaminhados para especialização em Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba FOP/UNICAMP. Foram selecionados primeiramente 207 pacientes com necessidade de reintervenção endodôntica convencional. Destes, 15 dentes indicados ao retratamento endodôntico devido à presença de lesão periapical (G1) e 15 dentes indicados ao retratamento exclusivamente por razões protéticas, livres de alterações periapicais, portadores ou não de falhas técnicas na obturação do tratamento endodôntico prévio (G2) foram incluídos no presente estudo. Fatores que poderiam interferir na microbiota do canal radicular foram excluídos na tentativa de se controlar e minimizar as possibilidades de viés.

A figura 1 esquematiza o processo de seleção e agrupamento dos voluntários incluídos no presente estudo por meio de um fluxograma.

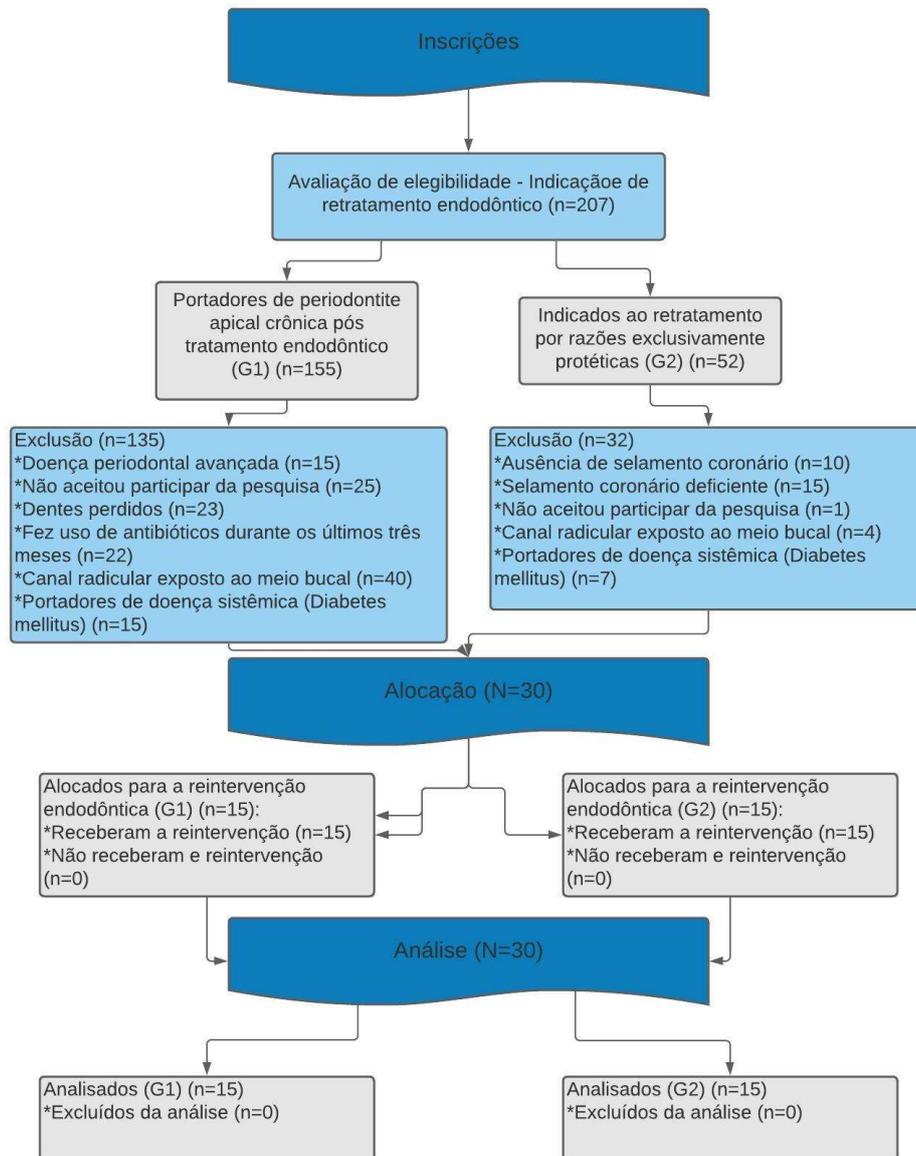


Figura 1. Fluxograma representando todas as etapas da seleção e inclusão dos voluntários para realização do estudo.

4.4 Critérios de inclusão e exclusão

Participaram do estudo pacientes:

- Que apresentavam dentes tratados endodonticamente, sendo a presença de T.E. prévio confirmada radiograficamente;
- Com diagnóstico de periodontite apical crônica seguindo os critérios de Gutmann et al., 2009;
- Livres de qualquer alteração periapical, indicados a reintervenção por motivos exclusivamente protéticos;
- Aqueles que apresentavam boas condições de saúde (classificação I ou II da American Society of Anesthesiologists);
- Que não tinham passado por antibioticoterapia prévia nos últimos 3 meses;
- Com ausência de doença periodontal avançada e que não apresentassem bolsas periodontais com profundidade superior a 4 mm;
- Dentes com rizogênese completa;
- Sem histórico de traumatismos dentário;

E como **critérios de exclusão**:

- Pacientes que não se apresentaram para as etapas do tratamento endodôntico nas datas estabelecidas;
- Dentes portadores de infecções endodônticas primárias;
- Dentes que impossibilitaram o isolamento absoluto;
- Dentes que sofreram fraturas coronárias e/ou radiculares;
- Dentes sem restauração ou que perderam selamento coronário entre as consultas.

4.5 – Exame clínico, aspectos clínicos e radiográficos

Foram anotados dados pessoais dos pacientes tais como idade e gênero, história médica e dentária (incluindo o tempo que foi realizado o tratamento endodôntico prévio). Durante o exame clínico, foram registradas informações sobre o dente a ser retratado e sua condição atual segundo Pinheiro et al. (2003ab), em relação à qualidade e tipo da restauração ou coroa, à presença de cáries, infiltrações

coronárias e fraturas. Quanto à sintomatologia, foi averiguada a presença ou ausência de dor, natureza da dor, história de dor prévia, dor à percussão (horizontal e vertical) e dor à palpação. Dados como presença ou ausência de edema dos tecidos periapicais, fístulas, mobilidade dental e bolsa periodontal também foram avaliados. No processo de coleta, o aspecto físico do canal radicular também foi registrado, tais como canal seco ou molhado e tipo de exsudato (claro, hemorrágico ou purulento).

Todas essas características clínicas referentes ao dente investigado foram devidamente relatadas na ficha clínica de cada paciente. Na radiografia periapical, foi realizada a avaliação dos seguintes aspectos:

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

4.6 – Procedimentos clínicos e Coletas das amostras

As coletas clínicas dos canais radiculares foram executadas na Clínica de Especialização da FOP/UNICAMP, e as amostras processadas no Laboratório de Microbiologia Endodôntica. Foram coletadas amostras iniciais após o preparo químico-mecânico e após a medicação intracanal dos canais radiculares. O método de coleta utilizado neste estudo já foi descrito previamente em detalhes por Pinheiro et al., 2003a; Gomes et al., 2008b; Endo et al., 2013; Delboni et al., 2017; Francisco et al., 2019; Barbosa-Ribeiro et al., 2020ab.

A coleta de todas as amostras foi realizada por um único operador.

Tabela 1 mostra o resumo das coletas realizadas ao longo dos procedimentos endodônticos e suas respectivas siglas.

Tabela 1. Resumo das coletas realizadas ao longo dos procedimentos endodônticos e suas respectivas siglas.

Amostras	Quantidade de pontas de papel absorvente	Altura da coleta	Coletas		
			1ª Sessão		2ª Sessão
			Inicial	PQM	MIC
Microbiológica (cultura)	3	Forame apical	CC1	CC2	CC3
Microbiológica (molecular)	2	Forame apical	CM1	CM2	CM3

Legenda: CC- Coletas microbiológicas armazenadas em VMGA III; CM – Coletas microbiológicas armazenadas em TE.

4.6.1 – Procedimentos iniciais

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

A desinfecção das superfícies do dente foi monitorada através da coleta de esfregaço destas superfícies com um *swab* estéril, previamente molhado em soro fisiológico estéril, para otimizar a cultura. Em seguida, foi semeada em uma placa contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado e *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA - LAB M, Heywood, Lancashire, Reino Unido) antes de ser incubado anaerobicamente e aerobicamente, respectivamente, por até 14 dias, seguido de extração de DNA do esfregaço e da corrida de PCR usando primers bacterianos universais. Caso fosse detectada qualquer cultura positiva ou presença de bandas no gel de agarose, o paciente seria excluído do estudo.

A abertura coronária foi realizada com uso de caneta de alta rotação com sistema de irrigação do equipo fechado. Dessa forma, para reduzir o aquecimento da ponta esférica diamantada (KG Sorensen) #1012, #1014 ou #1016, utilizou-se soro fisiológico 0,9% estéril. Ao adquirir a forma de contorno e conveniência da abertura coronária, utilizando a broca tronco-cônica (KG Sorensen) #3082, o campo operatório e a câmara pulpar foram descontaminados novamente, com as mesmas soluções descritas anteriormente, e neutralizados.

4.6.2 – Procedimentos endodônticos e coleta das amostras

Primeira sessão de atendimento

Finalizada a abertura coronária, procedeu-se a remoção da guta percha sem utilização de solventes ou substâncias químicas auxiliares, utilizando lima Reciproc

R25 (VDW, Munich, Germany). Uma lima K#25 foi utilizada para exploração inicial do canal radicular (Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suíça) em seguida levada ao comprimento do canal radicular, determinado na radiografia pré-operatória. Em seguida, o localizador apical foi utilizado (VDW Gold Reciproc, Munique, Alemanha) para obter o comprimento real do canal radicular, equivalente a posição zero no localizador apical. A seguir, procedeu-se as primeiras coletas microbiológicas dos canais radiculares (CC1 e CM1) utilizando-se 5 cones de papel absorventes estéreis (Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) e apirogênicos.

Nos casos em que o canal radicular estivesse seco, esse era então umedecido com soro fisiológico 0,9% estéril para assegurar melhor absorção do seu conteúdo. Em casos de dentes bi ou tri-radiculares, a coleta foi procedida no canal radicular associado à lesão radiográfica de maior tamanho (G1) ou mais amplo (G2), de maneira a confinar o exame microbiológico em um único ambiente ecológico. Os dentes seriam excluídos do estudo se o cone de papel não alcançasse todo o comprimento do canal radicular.

Coletas endodônticas inicialmente foram realizadas utilizando um total de 3 cones de papel absorvente estéreis/apirogênicos de calibre FM (Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) introduzidos um a um no comprimento total do canal, permanecendo por 1 minuto cada um. Esses cones foram transferidos para tubos do tipo *ependorfs* previamente esterilizados, contendo 1,0 mL do meio de transporte pré-reduzido VMGA III – Viability Medium Goteberg Agar (Moller 1966; Dahlen et al., 1993) e transportados em jarros a vácuo para o Laboratório de Microbiologia da disciplina de Endodontia da FOP-UNICAMP para posterior processamento. O tempo médio entre a coleta das amostras e o processamento laboratorial para obtenção das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi de 4 horas. A seguir os *ependorfs* foram congelados em freezer - 80°C para futuras análises.

O reparo do SCR foi realizado em todos os dentes utilizando a lima R40 do sistema Reciproc (VDW, Munich, Germany), montada em motor VDW Gold (VDW, Munich, Germany), seguindo as recomendações do fabricante. Foi considerado o uso das demais limas (R40 e R50) do sistema quando necessário, podendo ser utilizadas limas manuais do tipo K para complementar a instrumentação.

Durante todo o preparo químico-mecânico, fez-se o uso clorexidina 2% gel como substância química auxiliar (0,2 mL a cada troca de lima) e abundante irrigação

com soro fisiológico 0,9% (5 mL). Foi utilizada uma lima de pequeno calibre para manter a patência do canal.

Após a instrumentação, realizou-se a confirmação do comprimento real do trabalho utilizando a lima anatômica final. Os canais foram irrigados com clorexidina 2% gel e soro fisiológico.

Foram inseridos 5,0 mL de EDTA 17% no interior do canal radicular, por 3 vezes, com troca a cada minuto, sob agitação ultrassônica passiva utilizando-se o inserto Irrisonic (Helse Ultrasonic, Riberão Preto, SP, Brasil), com a finalidade de remover a camada residual de smear layer e permitir a abertura dos túbulos dentinários para difusão da medicação intracanal. A seguir, os canais foram devidamente irrigados com 5 mL de solução Tween a 0,5% + lecitina de soja a 0,07%, (neutralizante específico da clorexidina) e 5 mL de soro fisiológico estéril, aspirados e então foram realizadas as segundas coletas microbiológicas (CC2 e CM2).

Após o término das coletas, os canais foram novamente irrigados com 10mL de soro fisiológico, aspirados e secos com cones de papel absorventes estéreis. Eles foram então preenchidos com medicação intracanal composta por hidróxido de cálcio (Biodinâmica, Ibioporã, PR, Brasil) e clorexidina 2% gel, na proporção de 3 medidas de hidróxido de cálcio pó para 0,2mL de clorexidina gel 2%, na consistência de uma pasta similar a um creme dental. A inserção de medicação intracanal foi realizada com auxílio de uma espiral de lentulo (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça). Esta medicação permaneceu por um período de 30 dias no interior dos canais radiculares. As cavidades de acesso foram seladas com uma camada de 2 mm de Coltosol (Vigodent, Coltene, Rio de Janeiro, RJ) na embocadura dos canais, aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos em toda a cavidade, adesivo 3M Single Bond (3M Dental Products, St. Paul, MN, EUA) e inserção de resina fotopolimerizável Z 350 (3M Dental Products, St. Paul, MN, EUA) pela técnica incremental.

Segunda sessão de atendimento

Numa segunda sessão, após o período de 30 dias, foram novamente realizados os procedimentos pré-operatórios, de anestesia, isolamento e descontaminação do campo operatório e de acesso a cavidade endodôntica anteriormente descritos. Os canais foram irrigados com 10mL de solução fisiológica, e suas paredes instrumentadas levemente no intuito de remover a MIC e possibilitar uma nova coleta microbiológica dos canais radiculares (CC3 e CM3), seguindo o descrito

anteriormente. Os dentes foram então re-instrumentados, secos e obturados, se os canais estivessem secos e os pacientes sem sintomatologia dolorosa. A obturação do canal radicular foi realizada com cones de guta-percha acessórios Fine Medium extra-longo e Medium (Konne Indústria e Comércio de Materiais Odontológicos Ltda., Belo Horizonte, MG) e cimento endodôntico Endomethasone (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés Cedex, France) pela técnica do cone modelado apical, complementada com condensação lateral. Logo em seguida, o procedimento restaurador de todos os dentes foi realizado através da colocação de 2 mm de Coltosol (Vigodent, Coltene, Rio de Janeiro, RJ) na embocadura dos canais, aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos em toda a cavidade, adesivo 3M Single Bond (3M Dental Products, St. Paul, MN, EUA) e inserção de resina fotopolimerizável Z 350 (3M Dental Products, St. Paul, MN, EUA) pela técnica incremental. Ao final desse procedimento, foi realizada a radiografia final do tratamento endodôntico.

4.7 – Processamentos Laboratoriais

4.7.1 Cultura microbiológica e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)

Os frascos contendo VMGA III foram agitados no interior da câmara de anaerobiose, por 1 minuto para facilitar a dispersão dos microrganismos. A seguir, realizaram-se diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) utilizando *Fastidious Anaerobe Broth* (FAB-LabM, Bury, UK). Cinquenta μL da amostra “mãe” (sem diluição) e 50 μL de cada diluição foi inoculada em placas contendo o meio de cultura *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA-LabM, Bury, UK), acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado suplementados por hemina (5 mg/L), e vitamina K1 (1 mg/L). Essas placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 10% de H_2 , 10% de CO_2 , 80% de N_2 até 14 dias, para permitir a detecção de microrganismos anaeróbios estritos. Após a incubação, cada placa foi examinada em lupa estereoscópica (Lambda Let 2, Atto, Instruments, CO, Hong Kong) em aumento de 3 vezes para contagem das unidades formadoras de colônias contadas (UFC).

Para a obtenção do número de UFC/mL presentes na amostra inicial, foi necessário multiplicar o número de UFCs presentes na placa por 2000 - 20.000 dependendo da diluição analisada. Foram selecionadas para a contagem de UFCs placas nas quais se fizesse possível contabilizar individualmente as UFCs presentes, o que geralmente poderia ser visualizado nas diluições 10^{-2} ou 10^{-3} ; sendo assim, quando a diluição 10^{-2} foi a diluição escolhida, o número de UFCs presentes na placa era 100 vezes menor que na placa mãe (sem diluição). Nos casos em que a diluição de escolha foi a 10^{-3} , o valor obtido era 1000 vezes menor que o da placa mãe. A alíquota utilizada para o plaqueamento das amostras foi de 50 μL , ou seja, 20 vezes menor que 1,0mL; portanto, o fator de multiplicação para obtenção do resultado em UFC/ml foi de 2000 nos casos em que a diluição de escolha foi a 10^{-2} e 20.000 nos casos onde a diluição escolhida para contagem de UFC foi a 10^{-3} .

4.7.2 - Identificação microbiana pelo método molecular *Nested* – PCR

Extração de DNA e *Nested-PCR*

As extrações de DNA das amostras foram realizadas com o QIA amp DNA kit (QYAGEN, Valencia, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após extração, foi realizada a leitura da concentração de DNA presente nas amostras

coletadas dos canais radiculares a 260 nm através de espectrofotometria (Nanodrop 2000; Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

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

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

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

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

As reações de PCR para a primeira amplificação foram processadas na quantidade total de 50 μ L para cada amostra contendo 5 μ L de tampão para reação de PCR (10x Reaction Buffer, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 5 μ L de uma mistura de deoxiribonucleotídeos fosfatados (2mM) (dNTPs, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 6 μ L de solução de cloreto de magnésio (25 mM) ($MgCl_2$, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 1,25 μ L de uma solução 100 μ M de Primer Forward (20 mM) (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 1,25 μ L de uma solução 100 μ M de Primer Reverse (20 mM) (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil); 29,3 μ L de água ultrapura livre de DNAase e RNAase; 0,25 μ L da enzima Taq DNA Polimerase (Taq Platinum, Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil) e 2 μ L de DNA extraído da amostra coletada do canal radicular.

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

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

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

Verificado o sucesso da reação universal, uma alíquota do produto dessa reação foi utilizada para realização de outra reação PCR, agora usando um *primer* espécie-específico forward (16S) juntamente com o L189R (23S) (SEGUNDA AMPLIFICAÇÃO). Foram investigadas as 17 seguintes espécies: *A. actinomycetemcomitans*, *A. naeslundii*, *D. pneumosintes*, *E. faecalis*, *F. alocis*, *F. nucleatum*, *G. morbillorum*, *P. micros* (*P. micra*), *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. tanneriae*, *S. sobrinus*, *T. forsythia*, *T. denticola* e *T. socranskii* (Quadro 1).

As cepas de bactérias de referência usadas neste estudo foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC, Baltimore, MD, EUA) e são listadas a seguir: *Enterococcus faecalis* (ATCC 4034), *Filifactor alocis* (ATCC 35896), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Gemella morbillorum* (ATCC 27824), *Parvimonas micra* (ATCC 33270), *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Prevotella nigrescens* (ATCC 51236ae), *Prevotella tanner59e*, *Tannerella forsythia* (ATCC 43037), *Treponema denticola* (ATCC 35405) e *Treponema socranskii* (ATCC 35536).

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

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

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

Tabela 2. Sequências dos primer espécie-específico utilizados nas reações de PCR.

Bacteria	Primer	Ciclo
<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans</i>	GAAGAAGAACTCAGAGATGGGTTT	File 12
<i>Actinomyces naeslundii</i>	TGGAGACGGGGTTTCCTCCTTTGG	File 12
<i>Dialister pneumosintes</i>	CCTTGACATTGATCGCAATCCATAGAAATAT	File 12
<i>Enterococcus faecalis</i>	GTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCA	File 12
<i>Fillifactor alocis</i>	ACATAACCAATGACAGCCTTTTTAA	File 12
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	TTCGGGGAAACCTAAAGACAGGTGG	File 12
<i>Gemella morbilorum</i>	CGAGAGTCAGCCAACCTCATA	File 12
<i>Peptostreptococcus micros</i> (<i>Parvimonas micra</i>)	AACGAGAAGCGAGATAGAGATGTTA	File 12
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	TTTAGATGATGGCAGATGAGAG	File 12
<i>Porphyromonas gingivallis</i>	CATCGGTAGTTGCTAACAGTTTTTC	File 12
<i>Prevotella intermedia</i>	TGTTAGCGCCTTGCGCTA	File 12
<i>Prevotella nigrescens</i>	CGTTGGCCCTGCCTGCGG	File 12
<i>Prevotella tanneriae</i>	CCAAGAGTGCGGAGTGCAGAGATGCGC	File 12
<i>Streptococcus sobrinus</i>	TTTTTCTTCGGAACATCGGAG	File 12
<i>Tannerella forsythia</i>	TGCGATATAGTGTAAGCTCTACAG	File 12
<i>Treponema denticola</i>	CAACAGCAATGAGATATGG	File 12
<i>Treponema socrankii</i>	ATGTACACTGGGCGTGTGCG	File 12
L 189 (Un Forward) 23S	GGTACTTAGATGTTTCAGTTC	File 12

4.7 – Análise Estatística

A presença e ausência de bandas nos estudos de *Nested* -PCR, foi convertida em uma matriz que considerou *zero* para ausência e *um* para presença de bandas, ou seja, de produto amplificado. Essa matriz foi submetida a uma análise de correlação estatística com o software SPSS 23 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A normalidade dos dados quantitativos foi averiguada através do teste de Shapiro-Wilk.

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

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

A eficiência do preparo químico mecânico foi avaliada através da comparação das medianas da contagem de UFC detectadas nos diferentes tempos do tratamento endodôntico pelo teste de Wilcoxon. A hipótese de que se existiam diferenças entre a carga microbiana detectada nos grupos 1 e 2 foi averiguada pelo teste de Mann-Whitney.

5 RESULTADOS

5.1 PERFIL GERAL DOS CASOS SELECIONADOS

Foram incluídos 30 pacientes de faixa etária compreendida entre 30 e 70 anos (média 51 anos), sendo 74% (22) pertencentes ao sexo feminino e 26% (8) pertencentes ao sexo masculino. Desses pacientes, 15 necessitavam do retratamento endodôntico devido ao insucesso do tratamento anterior, evidenciado pela presença de lesão periapical crônica (G1), e 15 foram indicados a reintervenção endodôntica exclusivamente por razões protéticas, sem a evidência radiográfica de lesão periapical (G2). A média de tempo transcorrido do tratamento endodôntico prévio foi de 10 anos. Não houve diferença estatística significativa quanto a idade dos indivíduos dos grupos G1 e G2 ($p>0,05$).

5.1.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SINAIS CLÍNICOS E RADIOGRÁFICOS DOS CASOS INDICADOS AO RETRATAMENTO PELA PRESENÇA DE LESÃO PERIAPICAL CRÔNICA (G1)

Quinze dentes indicados a reintervenção endodôntica devido à presença de periodontite apical crônica pós-tratamento foram inclusos neste grupo, sendo 85% (86,5%) unirradiculares e 13,5% (2) multirradiculares. A idade dos pacientes estava compreendida entre 30 e 69 anos (média 50,5), destes 80% (12) eram do gênero feminino e 20% (3) do gênero masculino. A média de tempo decorrido desde o tratamento anterior foi de 12,6 anos, sendo o tempo mínimo de 2 anos e o máximo de 30 anos. 26,6% (4) dos pacientes apresentaram resposta dolorosa ao teste de percussão vertical. Em nenhum dos casos, foi detectada presença de dor a palpação; edema facial, fístula ou exsudato no interior do sistema de canais após a desobturação do conduto. A profundidade de sondagem periodontal dos dentes incluídos nessa pesquisa variou de 1 a 3mm em todos os casos, excluindo bolsas periodontais maiores que 3mm. O tamanho da lesão periapical radiográfica variou entre 1 e 8,3mm (média 3,5mm) sendo destas 33,3% (5) menores que 2mm, 46,7% (7) entre 2 e 5mm e 20% (3) maiores que 5mm. Quanto ao selamento coronário, sinais de microinfiltração foram detectados em 46,6% (7) casos. O limite apical de obturação foi identificado como insatisfatório em 73,3% (11) casos.

Tabela 3. Descrição das características clínicas e radiográficas detectadas nos pacientes pertencentes do G1

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Dente	Sintomatologia				EDM	FIST	EX	TTA (anos)	Lesão	TAMLES (mm)	MC	QO
				DE	DA	PERC	PALP								
1	44	Feminino	25	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	5	Presente	1	Ausente	Insatisfatória
2	38	Feminino	11	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	2	Presente	2,1	Presente	Satisfatória
3	52	Masculino	25	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	16	Presente	1	Ausente	Insatisfatória
4	63	Feminino	23	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	15	Presente	3,1	Presente	Insatisfatória
5	39	Feminino	45	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	8	Presente	5,6	Ausente	Satisfatória
6	48	Feminino	36	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	10	Presente	5	Presente	Insatisfatória
7	30	Feminino	35	Ausente	Ausente	Positivo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	4	Presente	4	Ausente	Insatisfatória
8	69	Feminino	22	Ausente	Ausente	Positivo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	30	Presente	5,5	Ausente	Insatisfatória
9	52	Feminino	46	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	3	Presente	3,2	Presente	Insatisfatória
10	59	Feminino	21	Ausente	Ausente	Positivo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	13	Presente	4	Ausente	Insatisfatória
11	40	Masculino	21	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	8	Presente	1,6	Presente	Insatisfatória
12	56	Feminino	35	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	10	Presente	2	Ausente	Insatisfatória
13	66	Masculino	12	Ausente	Ausente	Positivo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	30	Presente	3,7	Presente	Satisfatória
14	50	Feminino	11	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	20	Presente	8,3	Presente	Insatisfatória
15	49	Feminino	12	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	15	Presente	1,5	Ausente	Satisfatória

Legenda: DE (dor espontânea); DA (dor anterior); PERC (percussão); PALP (palpação); EDM (edema); FIST (fístula); EX (exsudato); TTA (tempo do tratamento anterior); TAMLES (tamanho da lesão periapical radiográfica); MC (microninfiltração coronária); QO (qualidade de obturação)

5.1.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SINAIS CLÍNICOS E RADIOGRÁFICOS DOS CASOS INDICADOS A RE-INTERVENÇÃO ENDODÔNTICA POR MOTIVOS PROTÉTICOS (G2)

Foram selecionados 15 casos indicados ao retratamento endodôntico exclusivamente por motivos protéticos, livres de alterações periapicais. A faixa etária dos pacientes inclusos no G2 variou entre 32 e 70 anos, sendo que destes 10 pertenciam ao sexo feminino e 5 ao sexo masculino. O grupo foi composto em 80% (12) por dentes unirradiculares e 20% (3) dentes multirradiculares. A média de tempo decorrida desde o tratamento endodôntico prévio foi de 7,5 anos, sendo o tempo mínimo decorrido de 2 e o máximo de 22 anos. A presença de dor espontânea prévia ou estimulada não foi relatada por nenhum dos pacientes. Em relação à sintomatologia estimulada, nenhum dos pacientes apresentou respostas positivas aos testes de palpação ou percussão. A presença de sinais clínicos como edema, fístula, mobilidade dentária, exsudato no interior dos canais radiculares não foi detectada. Evidências radiográficas como descontinuidade de lâmina dura, espaçamento do ligamento periodontal ou a presença de lesão periapical foram ausentes em todos os casos. Quanto ao selamento coronário, 100% (15) dos casos apresentavam restaurações definitivas realizadas em resina composta fotopolimerizável. Sinais clínicos ou radiográficos de microinfiltração coronária não foram detectados em nenhum dos casos.

Tabela 4. Descrição das características clínicas e radiográficas detectadas nos pacientes pertencentes do G2

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Dente	Sintomatologia				EDM	FIST	EX	TTA (anos)	Lesão	MC	QO
				DE	DA	PERC	PALP							
1	40	Masculino	46	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	5	Ausente	Ausente	Insatisfatória
2	42	Feminino	24	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	2	Ausente	Ausente	Satisfatória
3	57	Masculino	22	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	16	Ausente	Ausente	Insatisfatória
4	45	Feminino	22	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	15	Ausente	Ausente	Satisfatória
5	32	Feminino	45	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	8	Ausente	Ausente	Insatisfatória
6	62	Feminino	14	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	10	Ausente	Ausente	Satisfatória
7	51	Masculino	44	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	4	Ausente	Ausente	Insatisfatória
8	70	Feminino	12	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	30	Ausente	Ausente	Satisfatória
9	61	Feminino	12	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	3	Ausente	Ausente	Satisfatória
10	54	Feminino	46	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	13	Ausente	Ausente	Insatisfatória
11	42	Masculino	35	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	8	Ausente	Ausente	Insatisfatória
12	61	Masculino	32	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	10	Ausente	Ausente	Insatisfatória
13	53	Feminino	27	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	30	Ausente	Ausente	Satisfatória
14	47	Feminino	11	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	20	Ausente	Ausente	Satisfatória
15	60	Feminino	34	Ausente	Ausente	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausente	15	Ausente	Ausente	Satisfatória

Legenda: DE (dor espontânea); DA (dor anterior); PERC (percussão); PALP (palpação); EDM (edema); FIST (fístula); EX (exsudato); TTA (tempo do tratamento anterior); TAMLES (tamanho da lesão periapical radiográfica); MC (microninfiltração coronária); QO (qualidade de obturação)

5.2 QUANTIFICAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA (UFC) NOS GRUPOS G1 E G2 DURANTE AS ETAPAS DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO

A tabela 4 traz o resumo dos dados quantitativos de carga microbiana obtidos através da contagem de UFC expressos por meio de mediana, mínimo e máximo, assim como as análises do efeito da reintervenção endodôntica sobre a carga bacteriana presente no interior dos canais.

Tabela 5. Mediana, mínima e máximo de UFC/ml nos grupos G1 e G2 durante as etapas do tratamento endodôntico.

Variável	Grupo	Inicial (C1)	Pós-MIC	
			Pós-PQM (C2)	(C3)
UFC/ml	G1	1400 (200-5200)Aa	0 (0-380)Ba	0 (0-0)Ba
	G2	90 (0-220)Ab	0 (0-120)Ba	0 (0-0)Ba

Letras maiúsculas iguais indicam resultados estatisticamente semelhantes nas linhas, letras minúsculas iguais representam ausência de diferença estatísticas entre os resultados da mesma coluna.

A concentração de UFC/ml detectada nos três diferentes tempos de coleta microbiológica revelou a eficiência do tratamento endodôntico em reduzir a carga microbiana presente no interior do sistema de canais radiculares, sendo que, em ambos os grupos, a concentração bacteriana obtida nas coletas iniciais foi significativamente mais elevada que aquelas detectadas nas coletas realizadas após a execução do PQM.

Diferenças estatisticamente significantes foram detectadas entre a carga microbiana presente inicialmente nos grupos G1 e G2, sendo que, nas amostras iniciais, a concentração microbiana presente nos casos portadores de periodontite apical aguda mostrou-se maior que a encontrada nos casos indicados a reintervenção por razões protéticas. Após a execução do preparo químico-mecânico e o uso de medicação intracanal, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre a carga bacteriana detectada nos grupos G1 e G2.

5.3 PERFIL MICROBIOLÓGICO DOS DENTES INDICADOS A RE-INTERVENÇÃO ENDODÔNTICA DEVIDO A PRESENÇA DE LESÃO PERIAPICAL CRÔNICA (G1)

Bactérias foram detectadas em todas as amostras iniciais. Dos 17 *primers* testados, 13 foram detectados através do *Nested-PCR* no grupo G1. Os *primers* não detectados foram: *Prevotella intermedia*; *Dialister pneumosintes*; *Treponema denticola* e *Treponema socranskii*.

Uma média de 4,7 espécies por caso foram detectadas inicialmente nos casos portadores de periodontite apical crônica, sendo o mínimo de 1 e o máximo de 6 microrganismos detectados por caso (Tabela 5).

Tabela 6. Distribuição de frequência e porcentagem dos casos incluídos no G1 em função do número de microrganismos detectados conjuntamente no mesmo paciente através do *Nested-PCR*

	Número de Microrganismos detectados			
	1	2 a 3	4 a 5	6
Frequência (n)	0	3	9	3
Porcentagem (%)	0%	20%	60%	20%

Um total de 71 cepas bacterianas foram detectadas nas coletas iniciais do G1, representando 71% do total de cepas identificadas. Dessas, 33 eram bactérias Gram-positivas e 38 Gram-negativas (Tabela 6).

Tabela 7. Frequência e porcentagem dos microrganismos identificados nos casos indicados ao retratamento devido a presença de lesão periapical crônica em função da coloração de Gram.

	Microrganismos detectados	
	Gram-positivos	Gram negativos
Frequência (n)	33	38
Porcentagem (%)	46,5%	53,5%

Os microrganismos identificados com maior frequência no interior do canal radiculares dos casos associados a presença de lesão periapical foram *Enterococcus faecalis* (13/15); *Fusobacterium nucleatum* (10/15); *Porphyromonas gingivalis* (10/15); *Parvimonas micra* (5/15) e *Aggregatibacter actinocetemcomitans* (5/15).

Após a realização do preparo químico-mecânico, as bactérias mais prevalentes foram *Enterococcus faecalis* (12/15); *Porphyromonas gingivalis* (8/15); *Fusobacterium nucleatum* (6/15); *Aggregatibacter actinocetemcomitans* (4/20) e *Parvimonas micra* (2/15). A espécie *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas endodontalis* deixaram de ser detectadas nessa etapa do tratamento endodôntico.

Nas amostras obtidas após o uso de medicação intracanal, *Enterococcus faecalis* foi a bactéria detectada com maior frequência (9/15), seguido por *Porphyromonas gingivalis* (6/15); *Fusobacterium nucleatum* (6/15) e *Aggregatibacter actinocetemcomitans* (2/15). *Prevotella tanneriae*, *Actinomyces naeslundii* e *Gemella morbillorum* deixaram de ser identificados nas amostras após o uso de medicação intracanal.

A figura 2 descreve a frequência de detecção dos *primers* testados no grupo G1 durante as diferentes etapas do tratamento endodôntico

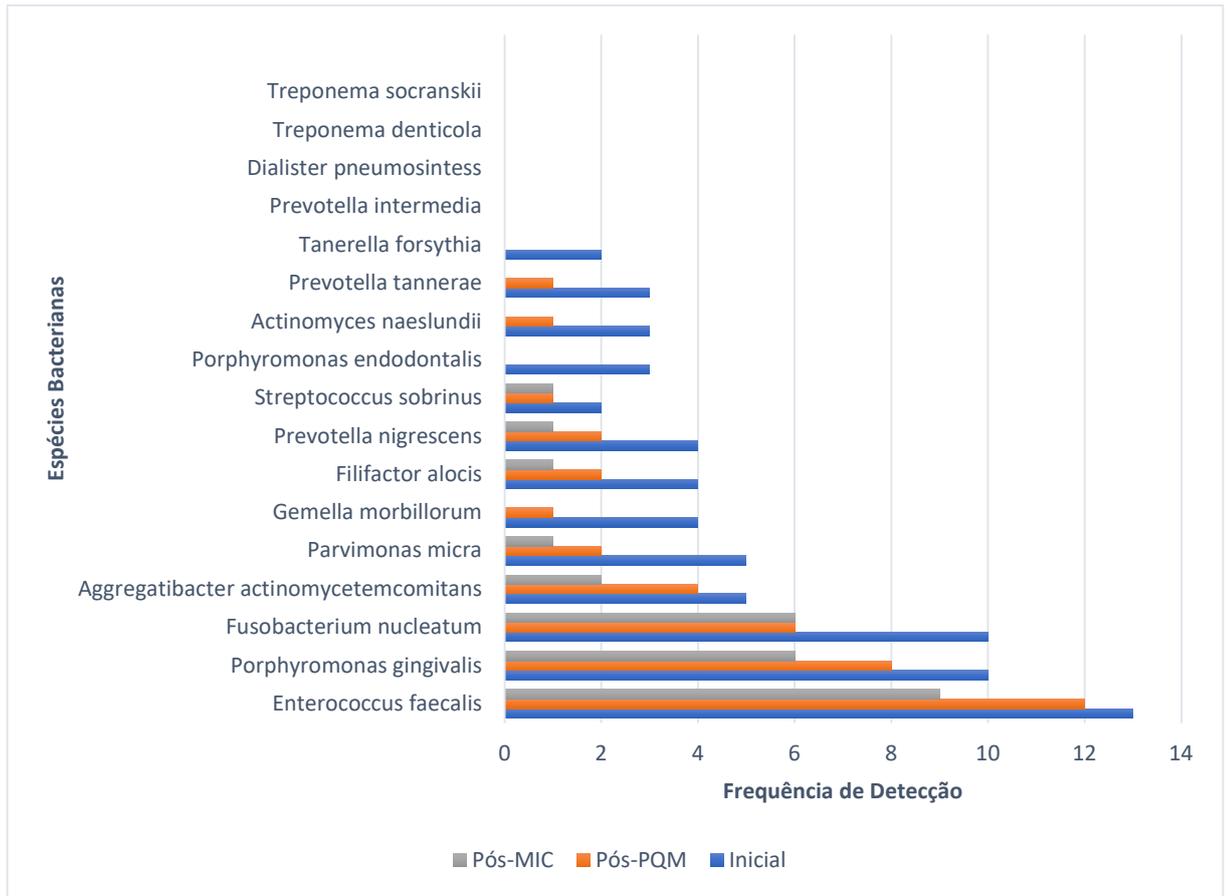


Figura 2 - Frequência de detecção dos primers testados no grupo G1 durante as diferentes etapas do tratamento endodôntico.

5.4 PERFIL MICROBIOLÓGICO DOS DENTES INDICADOS A RE-INTERVENÇÃO ENDODÔNTICA POR MOTIVOS PROTÉTICOS (G2)

Bactérias foram identificadas em 100% dos casos indicados ao retratamento devido a razões protéticas. Dos 17 *primers* testados 10 foram detectados nas amostras iniciais dos canais radiculares. Os *primers* que não foram detectados foram *Prevotella intermedia*, *Prevotella tannerae*; *Tannerella forsythia*; *Dialister pneumosintes*; *Actinomyces naeslundii*; *Treponema denticola*; *Treponema socranskii*; *Prevotella intermedia*.

Uma média de 1,9 espécies por caso foi detectada nos casos indicados ao retratamento por motivos exclusivamente protéticos, sendo o mínimo registado de 1 espécie bacteriana por caso e o máximo de 4 espécies por caso.

Tabela 8. Distribuição de frequência dos casos inclusos no G2 em função do número de espécies detectadas por caso.

	Número de Microrganismos detectados			
	1	2 a 3	4	5 ou mais
Frequência (n)	6	7	2	0
Porcentagem (%)	40%	46,5%	13,5%	0%

Nas amostras pertencentes ao G2, foram detectados 29 microrganismos, o equivalente a 29% dos microrganismos identificados no presente estudo. Bactérias Gram-negativas foram detectadas em 46,5% dos casos indicados ao retratamento por motivos protéticos. A tabela abaixo mostra a revela a frequência e porcentagem de detecção dos microrganismos Gram-positivos e negativos no G2.

Tabela 10. Distribuição de frequência dos microrganismos detectados em função da coloração de Gram.

	Microrganismos detectados	
	Gram-positivos	Gram negativos
Frequência (n)	10	19
Porcentagem (%)	34,5%	65,5%

As bactérias detectadas com maior prevalência logo após a desobturação do conduto radicular foram *Enterococcus faecalis* (13/15); *Porphyromonas gingivalis* (3/15); *Fusobacterium nucleatum* (2/15); *Aggregatibacter actinocetemcomitans* (2/15).

Após o preparo químico-mecânico do canal radicular, a frequência de detecção dos microrganismos investigados foi alterada. *Enterococcus faecalis* foi detectado com maior frequência (9/15) seguido de *Porphyromonas gingivalis* (2/15) e *Fusobacterium nucleatum* (1/15). As bactérias *Filifactor alocis*, *Gemella morbillorum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella nigrescens* deixaram de ser detectadas.

Dentre as bactérias detectadas com maior frequência após a medicação intracanal, encontraram-se *Enterococcus faecalis* (8/15); *Porphyromonas gingivalis* (1/15) e *Fusobacterium nucleatum* (1/15).

A figura 3 descreve a frequência de detecção dos *primers* testados no grupo G2 durante as diferentes etapas do tratamento endodôntico.

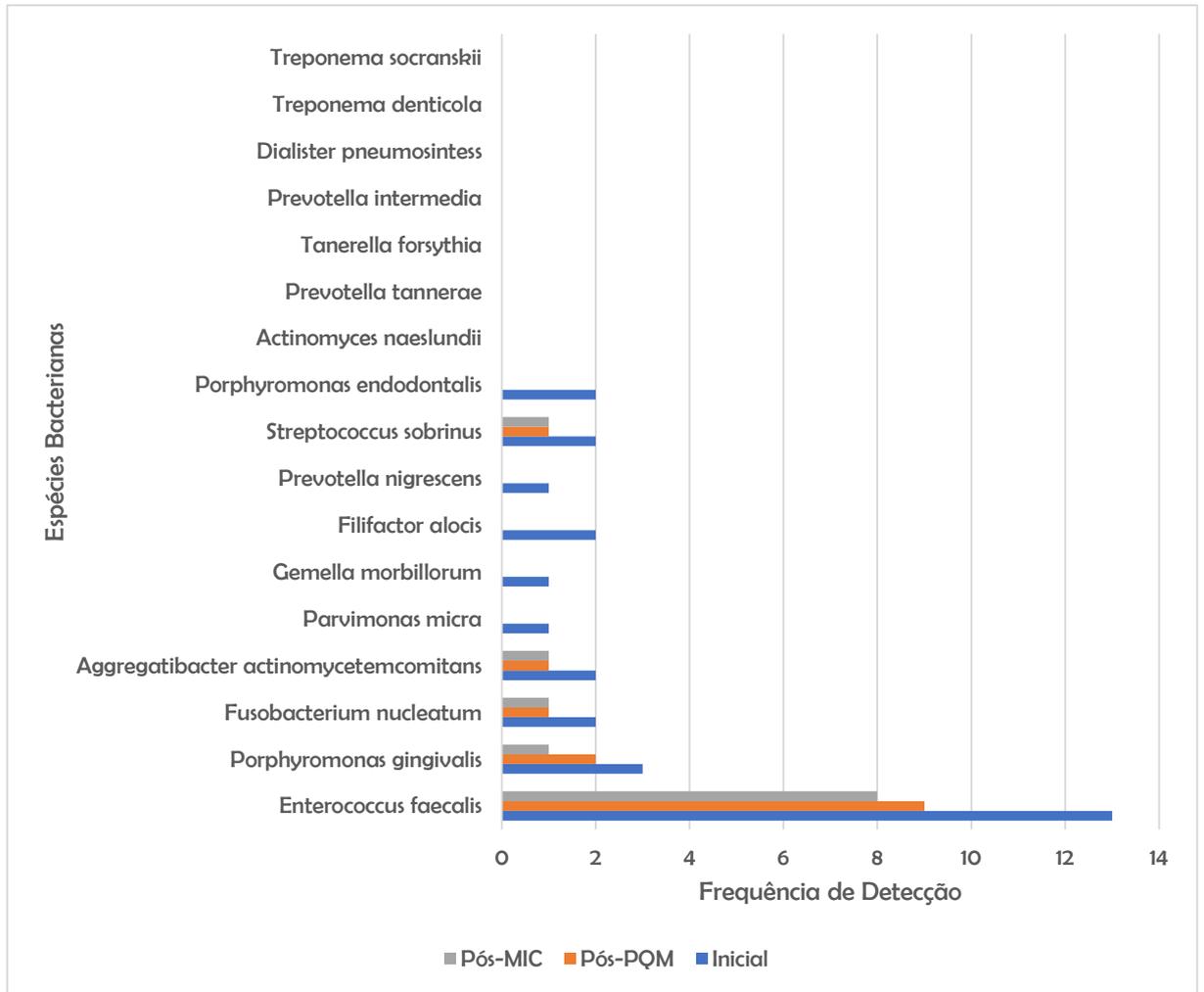


Figura 3 - Frequência de detecção dos *primers* testados no grupo G2 durante as diferentes etapas do tratamento endodôntico.

5.5. ANÁLISE DAS FREQUÊNCIAS E PORCENTAGENS DE DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS ATRAVÉS DO NESTED-PCR NOS DOIS GRUPOS INVESTIGADOS

Analisando-se o comportamento da microbiota nos grupos G1 e G2, em todos os tempos do tratamento endodôntico, pôde-se constatar que diferenças estatisticamente significativas foram encontradas em relação a prevalência de *Porphyromonas gingivalis*, encontrado em 67% dos casos do G1 (10/15) e 20% dos casos inclusos no G2 (3/15) e *Fusobacterium nucleatum*, encontrado em 67% (10/15) dos casos do G1 e 13% (2/15) dos casos do grupo G2.

A frequência e porcentagem de resultados positivos na detecção de microrganismos nos grupos G1 e G2 nas coletas realizadas durante o tratamento endodôntico são descritas na tabela 9 a seguir.

Tabela 10. Frequência e porcentagem dos resultados positivos obtidos nos grupos G1 e G2 detectados através do Nested-PCR nos diferentes tempos de coleta.

Bactéria	Grupo	Frequência e porcentagem de detecção		
		Inicial (C1)	Pós-PQM (C2)	Pós-MIC (C3)
<i>Enterococcus faecalis</i>	G1	13 (87%)	12 (80%)	9 (60%)
	G2	13 (87%)	9 (60%)	8 (53%)
p-valor:		1,000	0,427	1,000
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	G1	10 (67%)	8 (53%)	6 (40%)
	G2	3 (20%)	2 (13%)	1 (6,5%)
p-valor:		0,025	0,05	0,08
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	G1	10 (67%)	6 (40%)	6 (40%)
	G2	2 (13%)	1 (6,5%)	1 (6,5%)
p-valor:		0,008	0,08	0,215
<i>Parvimonas micra</i>	G1	5 (33%)	2 (13%)	1 (6,5%)
	G2	1 (6,5%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
p-valor:		0,169	0,483	1,000

Tabela 10. Frequência e porcentagem dos resultados positivos obtidos nos grupos G1 e G2 detectados através do Nested-PCR nos diferentes tempos de coleta (continuação)

Frequência e porcentagem de detecção				
Bactérias	Grupo	Inicial (C1)	Pós-PQM (C2)	Pós-MIC (C3)
<i>Gemella morbillorum</i>	G1	5 (33%)	2 (13%)	0 (0,00%)
	G2	1 (6,5%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
p-valor:		0,169	0,483	-
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	G1	6 (40%)	4 (27%)	2 (13%)
	G2	2 (13%)	1 (6,5%)	1 (6,5%)
p-valor:		0,215	0,33	1,000
<i>Prevotella nigrescens</i>	G1	4 (27%)	2 (13%)	1 (6,5%)
	G2	1 (6,5%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
p-valor:		0,33	0,483	1,000
<i>Filifactor alocis</i>	G1	4 (27%)	2 (13%)	1 (6,5%)
	G2	2 (13%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
p-valor:		0,651	0,483	1,000
<i>Actinomyces naeslundii</i>	G1	3 (20%)	1 (6,5%)	0 (0,00%)
	G2	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
p-valor:		0,224	1,000	-
<i>Prevotella tanneriae</i>	G1	3 (20%)	1 (6,5%)	0 (0,00%)
	G2	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
p-valor:		0,224	1,000	-

Tabela 10. Frequência e porcentagem dos resultados positivos obtidos nos grupos G1 e G2 detectados através do Nested-PCR nos diferentes tempos de coleta (continuação)

		Frequência e porcentagem de detecção		
Bactérias	Grupo	Inicial (C1)	Pós-PQM (C2)	Pós-MIC (C3)
<i>Streptococcus sobrinus</i>	G1	3 (20%)	1 (6,5%)	1 (6,5%)
	G2	2 (13%)	1 (6,5%)	1 (6,5%)
p-valor:		1,000	1,000	1,000
<i>Pophyromonas endodontalis</i>	G1	3 (20%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
	G2	2 (13%)	1 (6,5%)	1 (6,5%)
p-valor:		1,000	-	-
<i>Tannerella forsythia</i>	G1	2 (13%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
	G2	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
p-valor:		0,483	-	-

*Difere-se do tempo antes do preparo-químico-mecânico

5.6 ASSOCIAÇÕES ENTRE A PRESENÇA DE ESPÉCIES BACTERIANAS ESPECÍFICAS NO INTERIOR DOS CANAIS RADICULARES E A PRESENÇA DE SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS E RADIOGRÁFICOS

A investigação de correlações entre a presença de espécies bacterianas específicas e sinais e sintomas clínicos e radiográficos presentes nos casos incluídos no presente estudo revelaram uma série de associações positivas. A presença de dor a percussão foi associada à presença dos microrganismos *P. micra* e *P. gingivalis* no interior do SCR.

O diagnóstico de periodontite apical crônica mostrou correlação estatisticamente significativa com a presença de *F. nucleatum*, *P. gingivalis* e bactérias Gram-negativas no interior do conduto radicular. A patologia também foi associada à presença de microinfiltração coronária e a tratamentos primários realizados a mais de 8 anos.

A presença de patologias apicais também mostrou correlação negativa com as monoinfecções, sendo que, em nenhum dos casos em que apenas uma espécie fora detectada, havia presença de periodontite apical crônica, a qual está associada positivamente à presença de poli-infecções compostas de 4-5 microrganismos.

A presença de *P. gingivalis* no interior do conduto foi associada a casos em que existia a presença de microinfiltração coronária e lesão periapical com tamanho de 2-5mm.

Microrganismos Gram-negativos também foram associados a infecções compostas por 4-5 espécies bacterianas, sendo que não foram detectadas bactérias Gram-negativas nos casos de monoinfecções.

Os dados de frequência e porcentagem dos sinais e sintomas clínicos e radiográficos e espécies bacterianas que revelaram correlações estatisticamente significantes entre si encontram-se descritos na tabela 11.

Tabela 11. Correlações positivas entre a presença de bactérias e sinais e sintomas clínicos e/ou radiográficos apresentados pelos pacientes.

		Dor a Percussão		
		Presença	Ausência	p-valor
<i>P. gingivalis</i> Inicial (C1)	Presença	4 (13,3%)	9 (30%)	0,026
	Ausência	0 (0,00%)	17 (56,7%)	
<i>P. micra</i> Inicial (C1)	Presença	4 (13,3%)	2 (6,7%)	0,001
	Ausência	0 (0,00%)	24 (80%)	
		Periodontite Apical Crônica		
		Presença	Ausência	p-valor
<i>F. nucleatum</i> Inicial (C1)	Presença	10 (33,3%)	2 (6,7%)	0,008
	Ausência	5 (16,7%)	13 (43,3%)	
<i>P. gingivalis</i> Inicial (C1)	Presença	10 (33,3%)	3 (10%)	0,025
	Ausência	5 (16,7%)	12 (40%)	
Bactérias Gram-negativas	Presença	13 (43,3%)	3 (10%)	0,001
	Ausência	2 (6,7%)	12 (40%)	
Monoinfecção	Presença	0 (0,00%)	6 (20%)	0,017
	Ausência	15 (50%)	9 (30%)	
4-5 Microrganismos	Presença	9 (30%)	2 (6,7%)	0,021
	Ausência	6 (20%)	13 (43,3%)	
Tratamento prévio a mais de 8 anos	Presença	12 (40%)	5 (16,7%)	0,025
	Ausência	3 (10%)	10 (33,3%)	

Tabela 11. Correlações positivas entre a presença de bactérias e sinais e sintomas clínicos e/ou radiográficos apresentados pelos paciente (continuação).

Lesão Periapical de 2-5mm				
		Presença	Ausência	p-valor
<i>P. gingivalis</i> Inicial (C1)	Presença	6 (20%)	7 (23,3%)	0,025
	Ausência	1 (3,3%)	16 (53,3%)	
Microinfiltração Coronária				
		Presença	Ausência	p-valor
<i>P. gingivalis</i> Inicial (C1)	Presença	6 (20%)	7 (23,3%)	0,025
	Ausência	1 (3,3%)	16 (53,3%)	
Periodontite apical crônica	Presença	7 (23,3%)	8 (26,7%)	0,006
	Ausência	0 (0,00%)	15 (50%)	
Bactérias Gram-negativas				
		Presença	Ausência	
Monoinfecção	Presença	0 (0,00%)	6 (20%)	0,005
	Ausência	16 (53,3%)	8 (26,7%)	
4-5 microrganismos	Presença	10 (33,3%)	1 (3,3%)	0,002
	Ausência	6 (20%)	13 (43,3%)	

6 DISCUSSÃO

O presente estudo procurou investigar a microbiota presente em casos indicados ao retratamento endodôntico e monitorar a efetividade das diversas fases

Dos 15 dentes indicados à reintervenção endodôntica pela presença de periodontite apical crônica (G1), 46,6% (7/15) possuíam sinais evidentes de falha no selamento coronário, reforçando a microinfiltração como um fator crítico para o sucesso do tratamento endodôntico (Shetty et al., 2015; Pedro et al., 2016; Delboni et al., 2017). Os 15 dentes indicados ao retratamento por razões unicamente protéticas (G2), isentos de sinais e sintomas clínicos ou radiográficos de patologias periapicais possuíam restaurações coronárias de qualidades satisfatórias com materiais definitivos.

A presença de microrganismos em casos de dentes tratados endodonticamente e portadores de periodontite apical crônica (G1) está bem fundamentada na literatura endodôntica (Pinheiro et al., 2003; Gomes et al., 2004; 2006; 2008b; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro 2020ab; Gomes et al., 2021). Entretanto, pouco se sabe sobre a microbiota presente em canais radiculares de dentes tratados endodonticamente e sem patologias periapicais detectadas por radiografias periapicais.

A reintervenção endodôntica por motivos protéticos é embasada no fato de que o material obturador presente no SCR sofre degradação com o tempo, afetando diretamente sua capacidade de selamento (Maníglia-Ferreira et al., 2007). Sendo assim, visando melhorar o prognóstico e estender a longevidade de tratamentos reabilitadores protéticos a serem realizados, recomenda-se a realização do retratamento endodôntico não cirúrgico prévio à instalação de coroas protéticas, mesmo nos casos isentos de comprometimento periapical visualizados radiograficamente (Maniglia-Ferreira et al., 2007; Landys et al., 2015; Shetty et al., 2015; Pedro et al., 2016).

A seleção de casos e a distribuição da população estudada nos dois grupos de estudo analisados no presente trabalho foi pautada na análise dos dados clínicos e radiográficos de cada caso conforme descrito. Tendo-se em vista as recomendações Associação Europeia de Endodontia, a tomografia computadorizada *Cone-Beam* tem sua requisição indicada na reintervenção endodôntica em casos de diagnósticos obscuros, nos quais os sinais clínicos e radiográficos são contraditórios e as

informações obtidas são insuficientes para execução do caso no planejamento de tratamentos complexos por conta de anatomias desfavoráveis ou complicações como a presença de perfurações radiculares e iatrogenias (Patel et al., 2019). Ademais, nota-se que essas condições não foram encontradas nos casos selecionados para o presente estudo.

Outrossim, vale ressaltar que tanto o crescimento bacteriano quanto a presença de bandas reativas nos géis de eletroforese foram negativas na análise das amostras utilizadas como controle negativo das coletas, atestando ausência de contaminação.

A cultura bacteriana foi positiva em 100% das coletas iniciais (C1) realizada nos casos incluídos no G1 (15/15), corroborando com os estudos de Pinheiro et al., 2003; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2020 e Gomes et al., 2021 que também encontraram microrganismos em prevalências de 85%-100% em suas amostras iniciais utilizando metodologias semelhantes. Dos 15 casos incluídos no grupo G2, 4 (26,6%), apresentaram crescimento negativo nas amostras iniciais (C1). Ressalta-se também que a cultura microbiológica negativa não atesta a esterilidade do SCR, mas pode representar limitações inerentes a técnica, podendo ser resultante da presença de baixas concentrações de carga bacteriana, ou até mesmo de microrganismos ainda não cultivados (Gomes et al., 1994a; Sundqvist et al., 1998; Gomes et al., 2004; Gomes et al., 2005; Siqueira & Roças 2005; Vianna et al., 2005; Endo et al., 2013).

A concentração bacteriana presente foi avaliada através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). A carga microbiana detectada nas amostras C1 dos casos pertencentes ao G1 foi maior do que aquela detectada nas amostras iniciais do G2, sendo a diferença de concentração (CFU/ml) estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Tal fato sugeriu, dessa maneira, que a carga microbiana presente no interior do conduto radicular está diretamente associada ao desenvolvimento e à perpetuação das periodontites apicais.

A coleta pós-PQM (C2), realizada após o preparo químico mecânico, revelou uma concentração microbiana estatisticamente inferior àquela obtida durante as coletas iniciais (C1) tanto no G1 quanto no G2. Tal fato confirma a eficiência do preparo químico mecânico na descontaminação do SCR, corroborando com os resultados apresentados por Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016; Barbosa-Ribeiro et al., 2020b, que utilizaram protocolos similares para execução do PQM em

seus estudos. Após o PQM, não houve mais diferença estatisticamente significativa entre a carga microbiana encontrada nos grupos G1 e G2.

Em todos os casos após o PQM, foi realizada a colocação de medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio P.A. (Ca(OH)₂] e digluconato de clorexidina gel 2% por um período de 30 dias com intuito de se averiguar a eficácia da medicação em promover descontaminação adicional ao PQM. As análises estatísticas revelaram ausência de diferença estatística entre os valores de carga microbiana obtidos na coleta pós-MIC (C3) nos grupos G1 e G2. O emprego da medicação intracanal foi eficiente em manter e complementar a desinfecção promovida pelo PQM, sendo que diferenças estatisticamente significantes foram detectadas entre a carga bacteriana presente nas coletas C1 e C3 em ambos os grupos. Diferenças estatisticamente significantes entre a carga microbiana apresentada nas coletas C2 e C3 foram ausentes em ambos os grupos. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios (Gomes et al., 2009; Roças & Siqueira 2011; Endo et al., 2012; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016; Barbosa-Ribeiro et al., 2020b).

A análise molecular do conteúdo microbiológico foi realizada através do *Nested-PCR* objetivando identificar a presença de 17 espécies frequentemente associadas as infecções endodônticas e bucais no interior do contudo radicular dos dentes inclusos nesta pesquisa. A aplicação do método, com a finalidade de se realizar a identificação das espécies associadas a dentes já tratados endodonticamente, pautou-se na alta eficiência, especificidade e sensibilidade descrita em estudos prévios (Siqueira et al., 2004; Gomes et al., 2008b; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2020ab). Além disso, a metodologia proposta contorna dificuldades já descritas inerentes aos métodos de identificação bacteriana dependentes da cultura (Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2020ab; Gomes et al., 2020).

O grupo G1 apresentou resultados positivos na detecção de 13/17 (76,5%) primers testados. As bactérias não detectadas foram *P. intermedia*, *D. pneumosintess*, *T. denticola* e *T. socranskii*. No grupo G2, além das espécies citadas, também não foram detectadas *A. naeslundii*, *P. tanneriae*, *T. forsythia*.

Dez espécies estiveram presentes nos dois grupos, a saber: *E. faecalis*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. micras*, *G. morbillorum*, *P. nigrescens*, *F. alocis*, *S. sobrinus*, *A. actinocetemcomitans* e *Tanerella forsythia*

A principal diferença entre os casos portadores e não portadores de periodontites apical crônica, além da carga bacteriana, foi a frequência de detecção dos microrganismos e a diversidade microbiana.

Das 100 cepas detectadas nas amostras iniciais coletadas nos dentes incluídos ao G1 e ao G2 através do método molecular, 52% eram espécies Gram-positivas e 48% de espécies Gram-negativas, com presença de microrganismos anaeróbios facultativos e estritos, caracterizando uma infecção predominantemente mista. Tal comunidade polimicrobiana é relatada em estudos moleculares (Gomes et al., 2008; Sakamoto et al., 2008; Siqueira et al., 2008; Endo et al., 2012; Endo et al., 2013; Zandi et al., 2018; Barbosa-Ribeiro et al., 2020ab).

No presente estudo, encontrou-se uma correlação estatisticamente significativa entre bactérias Gram-negativas e a presença de periodontite apical crônica. 86,7% (13/15) das amostras pertencentes ao G1 possuíam microrganismos Gram-negativos nas coletas C1, enquanto apenas 20% (3/15) das amostras oriundas do G2 possuíam Gram-negativos.

Ademais, bactérias Gram-negativas apresentam fatores de virulência únicos tais como os lipopolissacarídeos (LPS), presentes na membrana externa da parede celular. Essas moléculas são responsáveis por danos teciduais e reabsorção óssea de maneira indireta (Gomes et al., 2012; Marinho et al., 2014; Martinho et al., 2014; Cardoso et al., 2016).

Em relação à frequência de detecção dos microrganismos, o grupo G1 foi responsável pela identificação de 71% (71/100) do total de cepas detectadas no presente estudo, enquanto apenas 29% (29/100) das cepas isoladas foram provenientes do grupo G2. Tal fato indica uma maior frequência de detecção dos microrganismos no grupo G1 que no grupo G2, sendo a média de espécies por no G1 de 4,7 e no G2 de 1,9, o que pode ser associado com o nível de concentração microbiana (CFU/ml).

Monoinfecções foram detectadas em 6/30 (20%) casos incluídos neste estudo, sendo todos esses inclusos no grupo G2 (livre de alterações periapicais), sugerindo a importância das interações bacterianas interespecíficas no desenvolvimento e na perpetuação das patologias periapicais.

A presença simultânea de 4 ou 5 espécies nas amostras iniciais foi associada à presença de lesões periapicais crônicas. A literatura reporta que, quanto maior a

população microbiana presente nos canais radiculares, maior a possibilidade de causarem danos ao hospedeiro (Siqueira et al., 2016).

O microrganismo detectado com maior prevalência em ambos os grupos foi o *E. faecalis*, sendo encontrado em 86,7% dos casos pertencentes tanto ao G1 (13/15) quanto ao G2 (13/15). Prevalências similares (70-100%) foram relatadas por autores que usaram metodologias semelhantes (Gomes et al., 2006; Gomes et al., 2008b; Sakamoto et al., 2008; Roças et al., 2008; Barbosa-Ribeiro 2016; Barbosa-Ribeiro 2020ab; Gomes et al., 2021).

A presença de *E faecalis* em canais de dentes tratados endodonticamente pode ser explicada pela sua habilidade de penetrar no interior dos túbulos dentinários, os quais possuem diâmetro aproximadamente três vezes maior que a bactéria (Hapasalo et al., 1987; Gomes et al., 1996). A *E. faecalis* também é capaz de se organizar em forma de biofilme, de se manter em períodos de latência em ambientes desfavoráveis a sua sobrevivência, além de se mostrar extremamente resistente ao hidróxido de cálcio, principal medicação usada como curativo intracanal de demora (Distel et al., 2002; Gomes et al., 2006; Francisco et al., 2021).

A espécie anaeróbia estrita *P. gingivalis* foi detectada em 43,3% (13/30) das amostras incluídas no estudo. Distribuindo-se de maneira heterogênea entre as amostras pertencentes ao grupo G1 e G2, ela foi detectada em 10/15 (66,7%) casos associados à periodontite apical crônica (G1) e em 3/15 (20%) casos indicados à reintervenção por razões protéticas, revelando-se mais prevalente nos casos associados a patologia periapical. A presença de *P gingivalis* nos canais de dentes com insucesso do tratamento endodôntico foi relatada por Barbosa-Ribeiro et al., 2016 e Barbosa-Ribeiro et al., 2020ab, que também observaram sua persistência durante todas as etapas do retratamento. Por outro lado, Endo et al. (2013) não detectaram essa bactéria.

Jansen et al., 1996, destacam que as bactérias do gênero *Porphyromonas* e *Prevotella* possuem um papel importante no desenvolvimento das doenças endodônticas pelo fato de serem proteolíticas, gerando nutrientes requeridos por uma variedade de espécies, incluindo *F. nucleatum*, resultando em uma relação sinérgica descrita na literatura, a qual é capaz de aumentar os efeitos citotóxicos dos microrganismos sobre os tecidos. (Feuille et al., 1996; Chavez de Páz et al., 2002).

Fusobacterium nucleatum foi detectado em 12/30 (40%) dos casos analisados, sendo 10/15 (66,7%) no G1 e 2/15 (13,2%) no G2. Autores como Roças et al., 2011; Pereira et al., 2017 e Barbosa-Ribeiro 2020ab também descreveram a prevalência desse microrganismo entre 60-85% dos casos, diferindo-se de estudos prévios que relataram índices de detecção inferiores do microrganismo, entre 0-25% (Siqueira et al., 2004; Roças & Siqueira., 2012 Endo et al., 2013).

F. nucleatum possui a capacidade de produzir subprodutos metabólicos citotóxicos, além de possuir interações sinérgicas com outras espécies bacterianas como *P. gingivalis* e *P. micra* (Chavéz de Paz et al., 2002). A espécie já foi caracterizada na literatura como um microrganismo-chave, crucial para o desenvolvimento da colonização bacteriana do SCR (Kolenbrander et al., 1989).

F. nucleatum foi associado à presença de periodontite apical crônica. Bronzato et al., 2020, analisando amostras de lesões periapicais coletadas de dentes indicados a cirurgia parodontológica, detectaram a presença desse microrganismo em 70% de sua amostra através do Nested-PCR, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo.

Parvimonas micra foi detectada em 5/15 (33,3%) casos pertencentes ao G1 e 1/15 (6,6%) casos inclusos no G2. O microrganismo, previamente classificado como pertencente ao gênero *Peptostreptococcus*, é conhecido como parte integrante da microbiota endodôntica desde a década de 90, sendo encontrada tanto nas infecções primárias quanto nas secundárias, principalmente em casos sintomáticos (Wayman et al., 1992; Gomes et al., 1994; Gomes et al., 1996ab; Sundqvist et al., 1998; Sakamoto et al., 2006; Roças & Siqueira 2008; Endo et al., 2012; Endo et al., 2013; Sousa et al., 2014; Gomes et al., 2015; Barbosa-Ribeiro et al., 2020ab).

Estudos recentes indicam que a espécie *P. micra* é capaz de se associar a *F. nucleatum* e *P. gingivalis*, sendo essa associação importante para a formação de biofilme bacteriano, favorecendo o desenvolvimento e a perpetuação da doença periapical (Roças & Siqueira et al., 2018; Horiuchi et al., 2020).

A análise da frequência e porcentagem de detecção das espécies pelo *Nested-PCR* durante as etapas do tratamento endodôntico não revelou diminuição estatisticamente significativa dos microrganismos investigados. Entretanto, ressalta-se que a detecção de DNA bacteriano no interior do conduto radicular não implica necessariamente na viabilidade da espécie detectada (Endo et al., 2012; Endo et al.,

2013), o que torna a contagem de CFU um método muito confiável para avaliação dos efeitos da terapia endodôntica. Ademais, a metodologia *Nested-PCR* possibilita apenas a realização de análises qualitativas, as quais possuem um caráter menos sensível se comparadas as análises quantitativas.

O presente estudo comparou a carga e a diversidade microbiana presente em dentes tratados endodonticamente associados ao insucesso do tratamento endodôntico evidenciado pela presença de periodontite apical crônica (G1) e de dentes indicados a reintervenção por motivos exclusivamente protéticos, sem alterações periapicais (G2), revelando em ambos os grupos infecções de caráter misto e heterogêneo, composto de microrganismos anaeróbios estritos e facultativos, Gram-positivos e negativos.

Além disso, o presente estudo mostrou grande semelhança entre a diversidade microbiana encontrada nos grupos estudados, o que nos permitiu sugerir que a principal diferença entre o perfil microbiológico dos grupos estudados encontra-se na frequência de detecção dessas espécies e na carga microbiana associada à infecção intra-radicular. Sugere-se que a realização de estudos futuros analisando a concentração de fatores de virulência bacterianos, como o LTA e o LPS, e a expressão de citocinas inflamatórias nesses casos possa complementar a literatura atual, possibilitando um maior entendimento sobre o potencial infeccioso do conteúdo microbiológico associado a dentes tratados endodonticamente.

7 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo permitiram concluir que:

1. A comunidade microbiana associada ao insucesso do tratamento endodôntico evidenciado pela presença de periodontite apical crônica, e aquela apresentada nos casos indicados a reintervenção por indicação protética sem alterações periapicais é mista e heterogênea;
2. Microrganismos foram detectados em todas as amostras iniciais do presente estudo através do Nested-PCR, independente da condição periapical do dente em questão;
3. O perfil microbiológico de ambos os quadros clínicos estudados é semelhante em relação às espécies detectadas no interior do SCR. Entretanto, difere-se no número dessas espécies detectadas por canal;
4. A carga microbiológica associada a dentes tratados endodonticamente portadores de periodontite apical crônica é superior àquela detectada nos casos sem periodontite apical;
5. A reintervenção endodôntica foi altamente eficaz na redução da carga microbiana intra-radicular presente em ambos os grupos, não havendo diferenças estatisticamente significantes entre a concentração microbiana detectada nas coletas pós-PQM e pós-MIC;
6. Foram encontradas associações entre determinadas espécies com os aspectos clínicos.

REFERÊNCIAS

- Al-Nuaimi N, Patel S, Davies A, Bakhsh A, Foschi F, Mannocci F. Pooled analysis of 1-year recall data from three root canal treatment outcome studies undertaken using cone beam computed tomography. *Int Endod J* 2018;51:e216–26. <https://doi.org/10.1111/iej.12844>.
- Aw V. Discuss the role of microorganisms in the aetiology and pathogenesis of periapical disease. *Aust Endod J* 2016;42:53–9. <https://doi.org/10.1111/aej.12159>.
- Barbosa-Ribeiro M. Microbiological investigation in teeth with persistent/secondary endodontic infection in different stages of endodontic retreatment. *Eur Endod J* 2020. <https://doi.org/10.14744/eej.2020.73626>.
- Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, dos Santos DG, Andreote FD, Gomes BPF. Microbiological analysis of endodontically treated teeth with apical periodontitis before and after endodontic retreatment. *Clin Oral Investig* 2020. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03510-2>.
- Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPF. Quantification of Lipoteichoic Acid Contents and Cultivable Bacteria at the Different Phases of the Endodontic Retreatment. *J Endod* 2016;42:552–6. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.01.002>.
- Basmaci F, Oztan MD, Kiyani M. Ex vivo evaluation of various instrumentation techniques and irrigants in reducing *E. faecalis* within root canals. *Int Endod J* 2013;46:823–30. <https://doi.org/10.1111/iej.12067>.
- Bicego-Pereira EC, Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, et al. Evaluation of the presence of microorganisms from root canal of teeth submitted to retreatment due to prosthetic reasons and without evidence of apical periodontitis. *Clin Oral Investig* 2020;24:3243–54. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03200-z>.
- van der Borden WG, Wang X, Wu M-K, Shemesh H. Area and 3-dimensional Volumetric Changes of Periapical Lesions after Root Canal Treatments. *J Endod* 2013;39:1245–9. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.07.001>.
- Briggs PF, Scott BJ. Evidence-based dentistry: endodontic failure--how should it be managed? *Br Dent J* 1997;183:159–64. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4809455>.
- Bystrom A, Happonen R-P, Sjogren U, Sundqvist G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Dent Traumatol* 1987;3:58–63. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1987.tb00543.x>.
- Cardoso FG da R, Chung A, Martinho FC, Camargo CHR, Carvalho CAT, Gomes BPF de A, et al. Investigation of Bacterial Contents From Persistent Endodontic Infection and Evaluation of Their Inflammatory Potential. *Braz Dent J* 2016;27:412–8. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201600520>.

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

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

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

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

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

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

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

Delboni MG, Gomes BPFA, Francisco PA, Teixeira FB, Drake D. Diversity of *Enterococcus faecalis* Genotypes from Multiple Oral Sites Associated with Endodontic Failure Using Repetitive Sequence-based Polymerase Chain Reaction and Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction. *J Endod* 2017;43:377–82. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.10.042>.

DISTEL J, HATTON J, GILLESPIE M. Biofilm Formation in Medicated Root Canals. *J Endod* 2002;28:689–93. <https://doi.org/10.1097/00004770-200210000-00003>.

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

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

Estrela C, Silva JA, Decurcio DA, Alencar AHG, Estrela CR, Faitaroni LA, et al. Monitoring Nonsurgical and Surgical Root Canal Treatment of Teeth with Primary and Secondary Infections. *Braz Dent J* 2014;25:494–501. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302437>.

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

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

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

Francisco PA, Fagundes PI da G, Lemes-Junior JC, Lima AR, Passini MRZ, Gomes BPFA. Pathogenic potential of *Enterococcus faecalis* strains isolated from root canals after unsuccessful endodontic treatment. *Clin Oral Investig* 2021. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-03823-w>.

GOMES B, MONTAGNER F, JACINTO R, ZAIA A, FERRAZ C, SOUZAFILHO F. Polymerase Chain Reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in Primary Endodontic Infections. *J Endod* 2007;33:1049–52. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.05.017>.

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

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

Gomes BPFA. GAKPWBLE. Molecular and culture analysis of bacteria in infected root canals. *J Dent Res* 2004;83:1040.

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

GOMES BPFA, DRUCKER DB, LILLEY JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J* 1994;27:291–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.1994.tb00271.x>.

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

- Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:211–5. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2005.00214.x>.
- Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dent* 1996;24:47–55. [https://doi.org/10.1016/0300-5712\(95\)00042-9](https://doi.org/10.1016/0300-5712(95)00042-9).
- GOMES BPFA, LILLEY JD, DRUCKER DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J* 1996;29:235–41. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.1996.tb01375.x>.
- Gomes BPFA, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, de Almeida JFA, et al. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent* 2009;37:76–81. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2008.09.009>.
- Gomes BPFA, Montagner F, Jacinto RC, Pinheiro ET, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. *Gemella morbillorum* in primary and secondary/persistent endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 2008a;105:519–25. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.10.005>.
- Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:71–6. <https://doi.org/10.1046/j.0902-0055.2003.00116.x>.
- Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Microbial Analysis of Canals of Root-filled Teeth with Periapical Lesions Using Polymerase Chain Reaction. *J Endod* 2008b;34:537–40. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.01.016>.
- Gomes BPFA, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 2006b;102:247–53. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.11.031>.
- Gomes BPFA, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JFA, Souza-Filho FJ, Ferraz CCR. Chlorhexidine in Endodontics. *Braz Dent J* 2013;24:89–102. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302188>.
- Haapasalo M. *Bacteroides* spp. in dental root canal infections. *Dent Traumatol* 1989;5:1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1989.tb00330.x>.
- Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 2001;91:579–86. <https://doi.org/10.1067/moe.2001.113587>.
- Hepworth MJ, Friedman S. Treatment outcome of surgical and non-surgical management of endodontic failures. *J Can Dent Assoc* 1997;63:364–71.

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

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

Imura N, Pinheiro ET, Gomes BPFA, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. The Outcome of Endodontic Treatment: A Retrospective Study of 2000 Cases Performed by a Specialist. *J Endod* 2007;33:1278–82. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.07.018>.

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

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

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

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

Landys Borén D, Jonasson P, Kvist T. Long-term Survival of Endodontically Treated Teeth at a Public Dental Specialist Clinic. *J Endod* 2015;41:176–81. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.10.002>.

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

Louzada LM, Arruda-Vasconcelos R, Duque TM, Casarin RCV, Feres M, Gomes BPFA. Clinical Investigation of Microbial Profile and Levels of Endotoxins and Lipoteichoic Acid at Different Phases of the Endodontic Treatment in Teeth with Vital Pulp and Associated Periodontal Disease. *J Endod* 2020;46:736–47. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.02.005>.

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

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

Martinho FC, Chiesa WMM, Leite FRM, Cirelli JA, Gomes BPFA. Antigenic Activity of Bacterial Endodontic Contents from Primary Root Canal Infection with Periapical Lesions against Macrophage in the Release of Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor α . *J Endod* 2010;36:1467–74. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.06.012>.

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

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

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

MÖLLER ÅJR, FABRICIUS L, DAHLÉN G, ÖHMAN AE, HEYDEN G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Eur J Oral Sci* 1981;89:475–84. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1981.tb01711.x>.

Moreno JO, Alves FRF, Gonçalves LS, Martinez AM, Rôças IN, Siqueira JF. Periradicular Status and Quality of Root Canal Fillings and Coronal Restorations in an Urban Colombian Population. *J Endod* 2013;39:600–4. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.12.020>.

Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and Cultural Analysis of the Microflora Associated with Endodontic Infections. *J Dent Res* 2002;81:761–6. <https://doi.org/10.1177/0810761>.

Nair PNR, Sjögren U, Figdor D, Sundqvist G. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 1999;87:617–27. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(99\)70145-9](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(99)70145-9).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ricucci D, Siqueira JF. Recurrent Apical Periodontitis and Late Endodontic Treatment Failure Related to Coronal Leakage: A Case Report. *J Endod* 2011;37:1171–5. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.05.025>.

Ricucci D, Siqueira JF. Apical Actinomycosis as a Continuum of Intraradicular and Extraradicular Infection: Case Report and Critical Review on Its Involvement with Treatment Failure. *J Endod* 2008;34:1124–9. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.06.002>.

Ricucci D, Siqueira JF, Bate AL, Pitt Ford TR. Histologic Investigation of Root Canal-treated Teeth with Apical Periodontitis: A Retrospective Study from Twenty-four Patients. *J Endod* 2009;35:493–502. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.12.014>.

ROCAS I, SIQUEIRAJR J, SANTOS K. Association of *Enterococcus faecalis* With Different Forms of Periradicular Diseases. *J Endod* 2004;30:315–20. <https://doi.org/10.1097/00004770-200405000-00004>.

Rôças IN, Hülsmann M, Siqueira JF. Microorganisms in Root Canal–treated Teeth from a German Population. *J Endod* 2008;34:926–31. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.05.008>.

Rôças IN, Provenzano JC, Neves MAS, Siqueira JF. Disinfecting Effects of Rotary Instrumentation with Either 2.5% Sodium Hypochlorite or 2% Chlorhexidine as the Main Irrigant: A Randomized Clinical Study. *J Endod* 2016;42:943–7. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.03.019>.

Rocas IN, Siqueira JF. Characterization of Microbiota of Root Canal-Treated Teeth with Posttreatment Disease. *J Clin Microbiol* 2012;50:1721–4. <https://doi.org/10.1128/JCM.00531-12>.

Rôças IN, Siqueira JF. Comparison of the In Vivo Antimicrobial Effectiveness of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Used as Root Canal Irrigants: A Molecular Microbiology Study. *J Endod* 2011;37:143–50. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.11.006>.

Rumpf RW, Griffen AL, Wen B-G, Leys EJ. Sequencing of the Ribosomal Intergenic Spacer Region for Strain Identification of *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol* 1999;37:2723–5. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.8.2723-2725.1999>.

S Kakehashi, H R Stanley RJF. The effects of surgical exposures of dental pulps in germfree and conventional laboratory rats. *J South Calif Dent Assoc* 1965;34:449–51. <https://doi.org/5221556>.

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

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

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

Schirrmeister JF, Liebenow A-L, Pelz K, Wittmer A, Serr A, Hellwig E, et al. New Bacterial Compositions in Root-filled Teeth with Periradicular Lesions. *J Endod* 2009;35:169–74. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.10.024>.

SEDGLEY C, BUCK G, APPELBE O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at Multiple Oral Sites in Endodontic Patients Using Culture and PCR. *J Endod* 2006;32:104–9. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.022>.

Semenoff-Segundo A, Kuga MC, Tonetto MR, Pedro FM, Marques A, Pereira TM, et al. Status of Endodontic Treatment and the Correlations to the Quality of Root Canal Filling and Coronal Restoration. *J Contemp Dent Pract* 2016;17:830–6. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1939>.

- Shetty K, Habib Va, Shetty Sv, Khed J, Prabhu V. An assessment of coronal leakage of permanent filling materials in endodontically treated teeth: An in vitro study. *J Pharm Bioallied Sci* 2015;7:607. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.163566>.
- Singh A, Goering R V., Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:512–30. <https://doi.org/10.1128/CMR.00025-05>.
- Siqueira JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001;34:1–10. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2001.00396.x>.
- Siqueira JF, Antunes HS, Rôças IN, Rachid CTCC, Alves FRF. Microbiome in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-Treatment Apical Periodontitis. *PLoS One* 2016;11:e0162887. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162887>.
- Siqueira JF, Rocas IN. Uncultivated Phylotypes and Newly Named Species Associated with Primary and Persistent Endodontic Infections. *J Clin Microbiol* 2005;43:3314–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3314-3319.2005>.
- Siqueira JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction–based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 2004;97:85–94. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(03\)00353-6](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(03)00353-6).
- Siqueira JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radicidentis* in primary and persistent endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 2003;96:215–22. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(03\)00158-6](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(03)00158-6).
- Siqueira JF, Rôças IN, Alves FRF, Campos LC. Periradicular status related to the quality of coronal restorations and root canal fillings in a Brazilian population. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 2005;100:369–74. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.03.029>.
- Siqueira JF, Rôças IN, Ricucci D, Hülsmann M. Causes and management of post-treatment apical periodontitis. *Br Dent J* 2014;216:305–12. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2014.200>.
- Siren EK, Haapasalo MPP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo ENJ. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J* 1997;30:91–5. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1997.00057.x>.
- Sjögren U, Hägglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990;16:498–504. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(07\)80180-4](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(07)80180-4).
- Socransky SS, Gibbons RJ, Dale AC, Bortnick L, Rosenthal E, Macdonald JB. The microbiota of the gingival crevice area of man—I. *Arch Oral Biol* 1963;8:275–80. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(63\)90019-0](https://doi.org/10.1016/0003-9969(63)90019-0).

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

Song Y. PCR-based diagnostics for anaerobic infections. *Anaerobe* n.d.;11:79–91. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2004.10.006>.

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

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

STUART C, SCHWARTZ S, BEESON T, OWATZ C. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. *J Endod* 2006;32:93–8. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.049>.

SUNDE P, OLSEN I, DEBELIAN G, TRONSTAD L. Microbiota of Periapical Lesions Refractory to Endodontic Therapy. *J Endod* 2002;28:304–10. <https://doi.org/10.1097/00004770-200204000-00011>.

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

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 1998;85:86–93. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(98\)90404-8](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(98)90404-8).

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

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

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

Torabinejad M, Corr R, Handysides R, Shabahang S. Outcomes of Nonsurgical Retreatment and Endodontic Surgery: A Systematic Review. *J Endod* 2009;35:930–7. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.04.023>.

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

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

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

Villanueva LEC de P. *Fusobacterium nucleatum* in endodontic flare-ups. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 2002;93:179–83. <https://doi.org/10.1067/moe.2002.120803>.

WALTIMO TMT, SIRÉN EK, TORKKO HLK, OLSEN I, HAAPASALO MPP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J* 1997;30:96–101. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.1997.tb00681.x>.

Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effectiveness of Endodontic Disinfecting Solutions against Young and Old *Enterococcus faecalis* Biofilms in Dentin Canals. *J Endod* 2012;38:1376–9. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.06.035>.

WEST J. Endodontic Update 2006. *J Esthet Restor Dent* 2006;18:280–300. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8240.2006.00039.x>.

Zandi H, Kristoffersen AK, Ørstavik D, Rôças IN, Siqueira JF, Enersen M. Microbial Analysis of Endodontic Infections in Root-filled Teeth with Apical Periodontitis before and after Irrigation Using Pyrosequencing. *J Endod* 2018;44:372–8. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.11.019>.

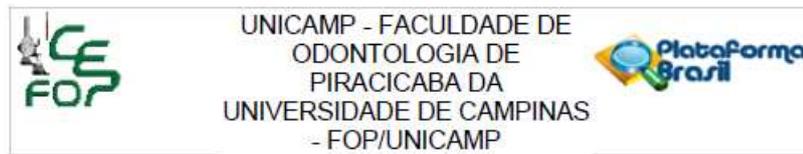
Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. *J Endod* 2015;41:1207–13. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.04.008>.

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

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

ANEXOS

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Investigação microbiológica e de seus fatores de virulência nas diferentes patologias pulpares e perirradiculares e sua interação com o sistema imunológico inato

Pesquisador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Área Temática:

Versão: 10

CAAE: 48374615.7.0000.5418

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.301.708

Apresentação do Projeto:

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

Trata-se de SOLICITAÇÃO DE EMENDA (E4) em protocolo originalmente aprovado em 21/10/2015, emendado em 30/01/2018 (E1), em 07/05/2018 (E2) e em 30/09/2019 (E3). A descrição detalhada da solicitação está ao final do parecer. Destaca-se que há pendências relativas ao protocolo listadas ao longo do parecer.

Pendência 1 de emenda 4 (atendida em 24/09/20): A LISTA ATUAL DE PESQUISADORES (E4) no projeto de pesquisa, em sequência alfabética, exceto pesquisadora responsável, inclui BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES (Cirurgiã-Dentista, Docente Titular da área de Endodontia da FOP-UNICAMP, Pesquisadora responsável), ANTONIO AIRTON LEONCIO DE MOURA FILHO (Cirurgião-Dentista, Mestrando no PPG em Clínica Odontológica, Área de Endodontia, da FOP-Unicamp, Incluído em E4), AUGUSTO RODRIGUES LIMA (Cirurgião-Dentista, Mestrando no PPG em Clínica Odontológica, Área de Endodontia, da FOP-Unicamp), EDERALDO PIETRAFESA DE GODOI

Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52
 Bairro: Areião CEP: 13.414-903
 UF: SP Município: PIRACICABA
 Telefone: (19)2106-5349 Fax: (19)2106-5349 E-mail: cep@fop.unicamp.br

Anexo 2. Verificação de Originalidade e Prevenção de Plágio.

EDERALDO MESTRADO

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

9% ÍNDICE DE SEMELHANÇA	8% FONTES DA INTERNET	1% PUBLICAÇÕES	0% DOCUMENTOS DOS ALUNOS
-----------------------------------	---------------------------------	--------------------------	------------------------------------

FONTES PRIMÁRIAS

1	pct.capes.gov.br Fonte da Internet	3%
2	repositorio.unesp.br Fonte da Internet	2%
3	ged1.capes.gov.br Fonte da Internet	1%
4	onlinelibrary.wiley.com Fonte da Internet	1%
5	www.finersistemas.com Fonte da Internet	1%
6	Brenda P.F.A. Gomes, Priscila Amanda Francisco, Ederaldo Pietrafesa Godoi Jr, Marcos Sergio Endo et al. "Identification of Culturable and Nonculturable Microorganisms, Lipopolysaccharides, and Lipoteichoic Acids From Root Canals of Teeth With Endodontic Failure", Journal of Endodontics, 2021 Publicação	1%