



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

**Guilherme Augusto Albuquerque de Sousa**

**Identificação molecular de espécies fúngicas em dentes indicados  
a reintervenção endodôntica pelo insucesso do tratamento  
endodôntico primário, ou por motivos exclusivamente protéticos**

PIRACICABA  
2024

**Guilherme Augusto Albuquerque de Sousa**

**Identificação molecular de espécies fúngicas em dentes indicados  
a reintervenção endodôntica pelo insucesso do tratamento  
endodôntico primário, ou por motivos exclusivamente protéticos**

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

Orientador: Profª Drª Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Coorientadores: Ederaldo Pietrafesa de Godoi Júnior

Pedro Ivo da Graça Fagundes

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO  
PELO ALUNO GUILHERME AUGUSTO ALBUQUERQUE DE  
SOUSA E ORIENTADO PELA PROFA. DRA. BRENDA  
PAULA FIGUEREIDO DE ALMEIDA GOMES.

PIRACICABA  
2024

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

So85i Sousa, Guilherme Augusto Albuquerque de, 2000-  
Identificação molecular de espécies fúngicas em dentes indicados a reintervenção endodôntica pelo insucesso do tratamento endodôntico primário, ou por motivos exclusivamente protéticos / Guilherme Augusto Albuquerque de Sousa. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.

Coorientadores: Ederaldo Pietrafesa de Godoi Júnior e Pedro Ivo da Graça Fagundes.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. 2. Periodontite periapical. 3. Microbiologia. 4. Retratamento. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida, 1961-. II. Godoi Júnior, Ederaldo Pietrafesa de, 1994-. III. Fagundes, Pedro Ivo da Graça, 1992-. IV. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. V. Título.

Informações adicionais complementares

**Palavras-chave em inglês:**

Endodontics

Periapical periodontitis

Microbiology

Retreatment

**Titulação:** Cirurgião-Dentista

**Data de entrega do trabalho definitivo:** 31-01-2024

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho minha mãe, Gilmara Alves de Sousa, por todo apoio, amor, companheirismo e incentivo para estudar e me tornar o profissional que sempre sonhei. Sem você a concretização desse sonho não seria possível.

Aos meus tios Gilson e Gislene, por toda amizade, carinho e por serem fonte de força e inspiração no meu caminho acadêmico. Obrigado por todo carinho e compreensão, principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos meus avós José Maria e Diciola por serem um exemplo a ser seguido, mesmo distantes, sendo um exemplo de perseverança e sucesso.

À minha querida irmã Júlia, pela torcida constante em cada etapa percorrida. Sua fé em mim me impulsiona a ser melhor a cada dia. Obrigado por ser a melhor irmã que alguém poderia ter.

À mulher que rouba meu coração todos os dias, Isabella França Quadrado, por ser a minha maior incentivadora e fonte de inspiração diária, por tornar cada conquista minha mais especial com seu sorriso, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos e por sempre depositar sua confiança em mim. Obrigado por me ensinar o significado do amor.

Aos meus queridos companheiros de República, Guilherme Muricy, Matheus Bortolotto, Marcelo Cunha, Lucas Manzano, Leonardo Bueno e Eduardo Bandeira, que estiveram sempre presentes nos momentos de alegria e também nos períodos de estudo e dedicação. Obrigado por fazerem desta jornada uma experiência ainda mais rica e inesquecível.

Dedico este trabalho à minha fiel companheira de quatro patas, Molly. Durante todos esses anos de estudo, você sempre esteve ao meu lado para me dar muito amor, carinho e diversão nas horas de descanso. Sua presença calorosa foi fundamental para amenizar a carga de tensão dos períodos de provas e de trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

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

Ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, cuja orientação, paciência e conhecimento foram fundamentais para o sucesso desta pesquisa. Muito obrigada por toda dedicação e apoio nos últimos anos. Sinto-me honrado e grato por ter tido a senhora como professora orientadora.

Aos professores da área de Endodontia, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana de Jesus Soares, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz, Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariana Angélica Marciano da Silva pelos seus ensinamentos e por participarem de minha trajetória acadêmica.

À minha amiga Beatriz Safady Lopes, muito obrigado pelos ensinamentos e por sempre me ajudar.

Aos colegas de graduação, Gabriela Sanches, Guilherme Santos, Laura Dutra, Luana Melo, muito obrigado por todos os momentos, risadas e aventuras.

Aos pós-doutorandos, Érica Mendes Lopes e Juliana Delatorre Bronzato.

Aos meus coorientadores, Ederaldo Pietrafesa Godoi Jr e Pedro Ivo Fagundes, muito obrigado por estarem sempre presente e me ensinarem tanto.

## RESUMO

O desenvolvimento de infecções secundárias/persistentes está associado a presença de microrganismos resistentes no interior do canal radicular (CR) de dentes endodonticamente tratados. O perfil microbiológico associado ao insucesso do tratamento endodôntico é amplamente investigado. Estudos relatam o envolvimento de espécies fúngicas, principalmente *Candida* spp em casos de infecção secundária/persistente. O objetivo do presente estudo foi determinar a prevalência das espécies fúngicas específicas (*C. glabrata*, *C. kruseii* e *C. parapsilosis*) em casos indicados ao retratamento endodôntico (RE) devido ao insucesso do tratamento endodôntico primário evidenciado pela presença de periodontite apical crônica (grupo CL), ou por motivos exclusivamente protéticos, em dentes sem lesão periapical radiograficamente visível (grupo SL), através do método molecular de Nested-PCR. Foram coletadas amostras de canais radiculares de 20 dentes, sendo 10 indicados a RE devido ao insucesso do tratamento endodôntico e 10 por motivo protético. As amostras foram coletadas após a desobturação do canal radicular. DNA foi extraído e em seguida as amostras foram submetidas ao método de *Nested-PCR* para detecção de *C. glabrata*, *C. kruseii* e *C. parapsilosis*. A espécie *C. glabrata* foi detectada em 10/10 casos do grupo CL, enquanto *C. kruseii* em 01/10 casos do grupo SL. *C. parapsilosis* não foi detectada em nenhum caso. Associação significativa foi encontrada entre *C. kruseii* e lesão periapical de 2-5 mm. Concluiu-se que espécies de *Candida* podem estar presentes em dentes com insucesso do tratamento endodôntico, contribuindo para sua patologia.

**Palavras-chave:** Endodontia. Retratamento. Periodontite apical. Microbiologia.

## ABSTRACT

The development of secondary/persistent infections is associated with the presence of resistant microorganisms inside the root canal (RC) of endodontically treated teeth. The microbiological profile associated with the failure of endodontic treatment is widely investigated. Studies report the involvement of fungal species, mainly *Candida* spp in cases of secondary/persistent infection. The objective of the present study was to determine the prevalence of specific fungal species (*C. glabrata*, *C. kruseii* and *C. parapsilosis*) in cases indicated for endodontic retreatment (RE), due to the failure of primary endodontic treatment evidenced by the presence of chronic apical periodontitis (CL group), or for exclusively prosthetic reasons, in teeth without radiographically visible periapical lesions (SL group), using the molecular method of Nested-PCR. Root canal samples were collected from 20 teeth, 10 of which were recommended for RE due to unsuccessful endodontic treatment and 10 for prosthetic reasons. Samples were collected after root canal filling removal. DNA was extracted and then the samples were subjected to the Nested-PCR method to detect *C. glabrata*, *C. kruseii* and *C. parapsilosis*. The species *C. glabrata* was detected in 10/10 cases in the CL group, while *C. kruseii* in 01/10 cases in the SL group. *C. parapsilosis* was not detected in any cases. Significant association was found between *C. kruseii* and 2-5 mm periapical lesion. It was concluded that *Candida* species may be present in teeth with unsuccessful endodontic treatment, potentially playing a role in the associated pathology.

**Key words:** Endodontics. Retreatment. Periapical periodontitis. Microbiology.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Frequência de detecção das espécies no grupo indicado ao retratamento pela presença de lesão periapical (CL). 35
- Figura 2 - Frequência de detecção das espécies no grupo indicado ao retratamento por motivo protético (SL). 35

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Frequência e porcentagem dos resultados obtidos nos grupos CL e SL detectados através do Nested PCR 36
- Tabela 2 - Correlações positivas entre a presença de bactérias e sinais e sintomas clínicos e/ou radiográficos apresentados pelos pacientes. 37

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Etiologia do insucesso endodôntico.	15
2.2 Indicações para o retratamento.	16
2.3 Análise microbiológica de dente indicados ao retratamento pela presença de lesão periapical ou por motivos protéticos.	18
2.3.1 Presença de fungos.	21
2.4 O método de microbiologia clássica no estudo de infecções associadas a dentes tratados endodônticamente.	23
2.5 O método de microbiologia molecular Nested-PCR para estudo de infecções secundárias/persistentes.	25
3 PROPOSIÇÃO	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Autorização da pesquisa	28
4.2 Local da pesquisa	28
4.3 Levantamento e seleção das amostras em casos indicados ao retratamento endodôntico	28
4.4 Descrição da coleta e obtenção das amostras incluídas no presente estudo	28
4.5 Procedimentos laboratoriais	31
4.6 Análises estatísticas	32

5 RESULTADOS	33
5.1 Características gerais dos pacientes	33
5.2 Aspectos clínicos e radiográficos dos casos indicados ao retratamento devido a presença de lesão periapical (CL)	33
5.3 Aspectos clínicos e radiográficos dos casos indicados ao retratamento por motivos protéticos (SL)	34
5.4 Detecção de <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. parapsilosis</i> em casos indicados ao retratamento devido a presença de lesão periapical (CL)	34
5.5 Detecção de <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. parapsilosis</i> em casos indicados ao retratamento por motivos protéticos (SL)	35
5.6 Frequência de <i>Candida</i> nos grupos indicados ao retratamento pela presença de lesão periapical (CL) e por motivos protéticos (SL)	36
5.7 Associação entre a presença de microrganismos no interior dos canais radiculares e os sinais e sintomas clínicos e radiográficos nas amostras	36
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXOS	51
Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio	51
Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa	52
Anexo 3 – Iniciação Científica	53

## 1 INTRODUÇÃO

O principal objetivo do tratamento endodôntico é prevenir ou tratar as doenças pulpares e periapicais com intuito de promover a manutenção do dente em função na cavidade oral. Por outro lado, a persistência de microrganismos no canal radicular, assim como sua recontaminação podem acarretar o insucesso do tratamento endodôntico primário. Devido a seu caráter menos invasivo a reintervenção endodôntica, i.e. retratamento (RE) é a primeira opção terapêutica para o tratamento de periodontites apicais persistentes/recorrentes (Gomes et al., 2008a,b; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016, 2020; Gomes et al., 2021). O retratamento é também indicado previamente a instalação de reabilitações protéticas em dentes tratados endodonticamente livres de alterações periapicais com intuito de se promover descontaminação adicional ao canal radicular visando maior longevidade do tratamento reabilitador (Bícego-Pereira et al., 2020; Godoi-Jr et al., 2023).

O perfil microbiológico associado a infecções secundárias/persistentes foi inicialmente traçado a partir de estudos que utilizaram métodos de microbiologia clássica, baseados no cultivo e isolamento de microrganismos, revelando alta prevalência de bactérias anaeróbias facultativas, Gram-positivas, sendo o *Enterococcus faecalis* o microrganismo mais frequentemente associado a estes casos (Molander et al., 1998; Sundvist et al., 1998; Siqueira et al., 2001; Pinheiro et al., 2003a,b). Apesar de serem detectadas em menor prevalência, as espécies fúngicas também foram isoladas no insucesso endodôntico, destacando-se um predomínio de *Candida* spp. no microbioma associado as infecções secundárias/persistentes (Peciulienė et al., 2001; Egan et al., 2002; Pinheiro et al., 2003a,b; Mindere et al., 2010; Pourhajibagher et al., 2017).

Os fungos encontram-se comumente na mucosa oral, contudo o seu papel em outras regiões bucais ainda não é totalmente esclarecido. Durante as últimas décadas diversas investigações têm relatado a presença de leveduras, com ênfase nas espécies em quadros de infecções endodônticas. Dentre as espécies fúngicas que fazem parte do microbioma humano, destaca-se o gênero *Candida*, sendo que as espécies de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* dominam a hierarquia (Mergoni et al., 2018; Alberti et al., 2021).

Apesar de serem valiosos para análise do conteúdo microbiológico associado as infecções endodônticas, métodos de microbiologia clássica sofrem de limitações inerentes a dificuldade de se mimetizar o ambiente propício para o desenvolvimento simultâneo de todos os microrganismos associados a infecção. Tal fato pode fazer com que a comunidade

microbiana seja subestimada, se analisada exclusivamente através da cultura (Gomes et al., 2008a,b; Endo et al., 2013; Gomes et al., 2021; Godoi-Jr et al., 2023).

Métodos moleculares possuem como principal vantagem o fato de serem independentes do cultivo microbiano, sendo desta forma capazes de contornar as limitações inerentes aos métodos de microbiologia clássica (Gomes et al., 2008a,b; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016, 2020; Gomes et al., 2021). A técnica de *PCR* é uma técnica altamente sensível e específica capaz de detectar a presença de material genético de microrganismos mesmo quando em baixas concentrações, o que a torna efetiva na detecção de microrganismos de difícil cultivo (Gomes et al., 2008a,b; Endo et al., 2013; Bronzato et al., 2021).

A aplicação de métodos moleculares para determinação da comunidade microbiana associada a infecções endodônticas secundárias/persistentes reafirmou a presença de *Candida* spp. nos casos de insucesso do tratamento endodôntico, revelando maiores prevalências do gênero que as previamente relatadas através de métodos de cultura (Siqueira et al., 2004; Dumani et al., 2012; Poptani et al., 2013; Pourhajibagher et al., 2017).

A técnica de Nested-PCR mostrou-se efetiva na identificação de espécies fúngicas em infecções endodônticas. Esse método de microbiologia molecular permite detectar com mais sensibilidade a presença de fungos, permitindo também a identificação da espécie através da análise do material genético, o que reflete em um maior entendimento acerca da microbiota associada as infecções endodônticas, podendo nortear o desenvolvimento de novas técnicas, substâncias químicas e protocolos de tratamento afim de favorecer a descontaminação do canal radicular. Além disso, a técnica de PCR não depende da viabilidade celular e pode identificar fungos não cultiváveis por métodos de cultura. Esses benefícios da PCR são relevantes para o adequado manejo de infecções endodônticas complexas envolvendo fungos (Al- Sakati et al., 2021; Tzanetakis et al., 2022).

Uma vez descrito o envolvimento de espécies fúngicas em casos de insucesso do tratamento endodôntico primário, torna-se prudente a aplicação de métodos de biologia molecular visando detectar sua presença em casos indicados ao retratamento endodôntico, visando compreender a importância das espécies fúngicas na formação microbioma patogênico associado aos casos de infecção endodôntica secundária (Mergoni et al., 2018; Alberti et al., 2021).

O presente estudo teve como principal objetivo analisar e comparar através do método molecular de *Nested-PCR* o envolvimento das espécies *Candida glabrata*, *Candida kruseii* e *Candida parapsilosis*, em 10 casos indicados a reintervenção endodôntica devido a

infecção secundária/persistente evidenciada pela presença de periodontite apical crônica, e em 10 casos indicados a reintervenção endodôntica por motivos exclusivamente protéticos, sendo estes livres de alterações periapicais, com intuito de se fornecer um maior entendimento, sobre o microbioma associado ao insucesso endodôntico, e seu papel no desenvolvimento das periodontites apicais crônicas em dentes endodonticamente tratados.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Etiologia do insucesso endodôntico

Em 1965, Kakehashi et al. conduziram um estudo que monitorava os efeitos da exposição cirúrgica a polpa dentária de ratos convencionais e estéreis. No primeiro grupo houve inflamação e necrose da polpa, enquanto no segundo grupo a polpa se manteve saudável após a exposição, indicando que microrganismos são necessários para o desenvolvimento de lesões inflamatórias e necróticas na polpa dental exposta. O estudo atribuiu para o entendimento que bactérias e seus subprodutos são os principais fatores etiológicos no desenvolvimento e persistência das lesões periodontais e pulpares.

Ray e Trope (1995) realizaram exames radiográficos de 1010 dentes que apresentavam tratamento endodôntico prévio e recebido restaurações definitivas. Durante o estudo, avaliaram a relação entre a qualidade do selamento coronário e da obturação endodôntica com a presença de sinais radiográficos de periodontite apical crônica. Encontraram taxas de sucesso em 30,2% em dentes com restaurações coronárias deficientes. As piores taxas de sucesso foram observadas quando uma restauração insatisfatória estava associada a uma obturação insatisfatória (18,1%), demonstrando a importância de ambos para evitar a reinfecção do espaço periapical. Assim, os autores concluíram que o material obturador presente no sistema de canal radicular (SCR) não é uma barreira eficiente contra a microinfiltração, sendo o selamento coronário um fator crucial para o sucesso do tratamento endodôntico.

Em 2005, Siqueira et al. avaliaram a correlação entre a presença de periodontite apical crônica, qualidade de obturação dos canais e o selamento coronário em 2051 dentes que haviam realizado tratamento endodôntico. Os pesquisadores observaram que um selamento coronário eficaz é fundamental para o resultado positivo do tratamento, uma vez que dentes sem selamento apresentaram lesão óssea em 52% dos casos, mesmo com a técnica de obturação adequada. Contudo, diferentemente dos achados de Ray e Trope (1995), este estudo observou que a qualidade de obturação dos canais radiculares é o fator determinante para a taxa de sucesso do tratamento endodôntico. Assim, apesar da importância do selamento coronário, a forma como é realizada a obturação do SCR se apresenta como aspecto preponderante para o prognóstico do procedimento.

O principal objetivo do tratamento endodôntico é prevenir ou tratar dentes com doenças pulpares e periapicais com o intuito de manter o elemento dental na cavidade oral com saúde e função. recorrentes (Gomes et al., 2008a,b; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro

et al., 2016, 2020; Gomes et al., 2021). Entretanto, a persistência de bactérias (intra e extra-canal) no canal radicular, assim como a sua recontaminação após a intervenção endodôntica podem levar ao insucesso do tratamento endodôntico primário, sendo o retratamento não cirúrgico a primeira opção terapêutica para o tratamento de periodontites apicais persistentes/recorrentes (Gomes et al., 2008a,b; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016, 2020; Gomes et al., 2021).

O insucesso da terapia endodôntica possui etiologias distintas descritas na literatura, entretanto fatores microbiológicos são os principais responsáveis pelo insucesso do tratamento endodôntico, sendo evidenciados pela formação ou pela não remissão das periodontites apicais crônicas (Siqueira et al., 2001; Nair, 2004; Gomes et al., 2008a, 2021).

Imura et al. (2007) acompanharam 2000 casos submetidos a tratamento endodôntico inicial ou retratamento, realizados por um único especialista. Observou-se um índice de sucesso de 94% nos tratamentos iniciais e 85,9% nos retratamentos. A ausência de selamento coronário definitivo mostrou-se um importante fator ao resultado do tratamento endodôntico, assim como também influenciou no sucesso dos retratamentos endodônticos. Os achados dessa pesquisa evidenciaram importantes aspectos que podem impactar o resultado das intervenções endodônticas.

Siqueira et al. (2014) classificaram as periodontites apicais crônicas que acometem os dentes já tratados endodonticamente, segundo elas são classificadas como : emergentes, 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 persistentes, nos casos em que a terapia realizada apesar de se mostrar radiograficamente adequada e o dente bem restaurado, não conseguiu reverter o processo patológico em presente, contendo microrganismos nos túbulos dentinários e suas ramificações; e secundária, nos casos onde o após a resolução da patologia inicial o elemento dentário for acometido novamente pela doença, sendo geralmente relacionada à microinfiltração das restaurações e presença de cárie (Ray e Trope 1995; Siren et al., 1997; Molander et al., 1998; Sundqvist et al., 1998; Hancock et al., 2001; Rôças et al., 2004; Ricucci e Siqueira, 2011; Siqueira et al., 2014 Delboni et al., 2017).

## **2.2 Indicações para o Retratamento**

De acordo com Siqueira (2001), a terapia endodôntica primária pode resultar em insucesso quando apresenta padrão de qualidade aquém do aceitável. Entretanto portadores

de tratamentos endodônticos satisfatórios, embora em menores prevalências, também podem ser portadores de infecções endodônticas secundárias/persistentes, sendo o insucesso evidenciado pelo surgimento de uma lesão periapical.

Em 2016, Tabassum e Khan descreveram que a experiência do operador; uso de tecnologias e o grau de dificuldade do tratamento implicam significativamente no sucesso do tratamento endodôntico primário. Além disso, alguns fatores como, microinfiltração coronária, canais não tratados; obturação inadequada; e intercorrências durante o tratamento (fratura de instrumentos, perfurações e desvios) podem influenciar negativamente no sucesso da terapia endodôntica.

A preservação da determinação é determinante para avaliação do sucesso ou do insucesso da terapia endodôntica (Tabassum e Khan, 2016). Clinicamente o sucesso é definido pela ausência de sintomatologia dolorosa, desaparecimento de edema, exsudato e das fistulas nos casos em que se fizeram presente antes da terapia endodôntica primária e o reestabelecimento da função do elemento dentário. Os aspectos radiográficos avaliados são a remissão completa da radioluscências periapical e lâmina dura com aspecto normal (Prada et al., 2019).

Em 2011, Ng et al. investigaram dentes com lesões primárias e secundárias assim como a probabilidade e os fatores que influenciam na sobrevivência do periápice. Proservando esses casos de 2 a 4 anos, observaram que de 759 dentes com lesões primárias, o índice de sucesso foi 572 pacientes, já nas lesões secundárias de 858 dentes, 642 pacientes obtiveram sucesso no período de 4 anos. Ambas as situações clínicas foram avaliadas com testes clínicos e radiográficos durante todo este período, pode-se observar que o estudo obteve sucesso de 95%. Os autores também descrevem fatores que influenciam na taxa de sucesso do tratamento endodôntico, as condições descritas foram: a 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.

Conforme destacado por Friedman e Stabholtz (1986), ao planejar uma nova reabilitação protética em casos de tratamento endodôntico bem sucedidos, nos quais não há evidência radiográfica de lesão periapical, mas a obturação se mostra insatisfatória, a recomendação é optar pelo retratamento endodôntico convencional.

A terapia endodôntica na maioria dos casos possui alto índice de sucesso. Contudo, o insucesso pode ocorrer em alguns casos e está vinculado a possíveis falhas nos procedimentos de desinfecção dos canais. Mesmo quando realizado de forma adequada, em

algumas situações pode não surtir o efeito desejado. Isso porque determinados canais podem apresentar regiões onde os microrganismos permanecem, devido às limitações das técnicas de remoção total do biofilme (Nair, 2004). Acidentes durante o trabalho clínico, como perfurações e quebras de instrumentos utilizados no interior dos canais, também correlacionam diretamente com o insucesso, dificultando a consecução do tratamento de forma adequada (Siqueira et al., 2001).

Em 2007, Maníglia-Ferreira et al. realizaram um estudo com objetivo de analisar a degradação do material obturador (guta-percha) ao longo do tempo por meio da análise de obturações removidas durante procedimentos de retratamento convencional. Foram avaliadas 51 amostras de obturações retiradas de dentes tratados endodonticamente há diferentes períodos de tempo: menos de 2 anos, entre 2-5 anos e mais de 5 anos. As amostras foram submetidas a análise por espectroscopia infravermelha para caracterização química dos materiais. Os resultados mostraram que ao longo do tempo dentes com tratamento endodôntico acabam perdendo seu selamento satisfatório devido a degradação da gutapercha, essas microinfiltrações favorecem o desenvolvimento de uma nova infecção nos sistemas de canais radiculares e afetam o sucesso a longo prazo da terapia endodôntica.

Bícego-Pereira et al. (2020) ao analisarem amostras microbiológicas coletadas de canais radiculares que livres de alterações periapicais que foram indicadas para retratamento endodôntico por razões exclusivamente protéticas, foi observado, por meio de cultura, o crescimento bacteriano em 100% das amostras. Esses resultados reiteram a importância da reintervenção endodôntica previamente a instalação de próteses fixas mesmo em dentes livres de lesão periapical radiográfica, visando trazer descontaminação adicional ao canal radicular, e proporcionar uma maior previsibilidade para o tratamento protético a ser executado.

### **2.3 Análise microbiológica de dentes indicados ao retratamento pela presença de lesão periapical ou por motivos protéticos**

Uma vez que a relação causal entre a presença de microrganismos nos canais radiculares e o surgimento de patologias pulpares e periapicais é bem estabelecida. É essencial adquirir conhecimento sobre o perfil da comunidade microbiana presente nos canais radiculares de dentes comprometidos endodonticamente. Isso se torna crucial para o desenvolvimento de substâncias, técnicas e recursos que possam aprimorar a eficácia das intervenções endodônticas, bem como das reintervenções, visando otimizar os índices de

sucesso (Takehashi et al., 1965; Molander et al., 1998; Sundqvist et al., 1998; Siqueira et al., 2001; Gomes et al., 2008b; Barbosa-Ribeiro et al., 2016; Prada et al., 2019).

A microbiota encontrada em canais radiculares previamente tratados difere em relação aos canais que sofrem de infecções primárias. O tratamento endodôntico acaba por alterar as condições ambientais e selecionar os microrganismos remanescentes. Esses microrganismos possuem a capacidade de sobreviver em ambientes desfavoráveis e carentes de nutrientes, nos quais as interações ecológicas são mínimas. Tais microrganismos conseguem manter-se em um estado de latência por períodos prolongados, até mesmo em condições de escassez, e têm a habilidade de se reativar na presença de nutrientes (Sundqvist et al., 1992, 1998; Siren et al., 1997; Molander et al., 1998; Hancock et al., 2001; Rôças et al., 2008; Gomes et al., 2008a,b, 2013; Ricucci e Siqueira, 2011; Endo et al., 2013; Prada et al., 2019).

Gomes et al. (2008b) analisaram o conteúdo microbiológico do sistema de canais radiculares (SCR) de 45 dentes submetidos a retratamento endodôntico devido à presença de periodontite apical crônica. Utilizando o método de Nested PCR, os pesquisadores constataram que *E. faecalis* foi o microrganismo mais frequentemente identificado. Além disso, os autores destacaram a presença de microrganismos Gram-negativos anaeróbios estritos, como *T. denticola*, *P. nigrescens*, *P. gingivalis* e *T. forsythia*, que são comumente associados a casos de infecção primária. Surpreendentemente, esses microrganismos também foram detectados em alguns casos de infecção secundária, sugerindo uma possível correlação com a sintomatologia associada.

Em 1998, Molander et al. avaliaram o conteúdo microbiológico em 100 dentes tratados previamente tratados com a presença de lesão periapical crônica, utilizando técnicas de cultura. Paralelamente, examinaram 20 dentes indicados ao retratamento devido a falhas técnicas, sem envolvimento periapical. O grupo com lesão periapical apresentou microrganismos em 68% dos casos, enquanto no grupo sem lesão, bactérias foram recuperadas de canais radiculares em 45% dos casos. Observou-se predominância de bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas, representando 70% das cepas isoladas, com uma baixa variedade de microrganismos, a maioria composta por uma ou duas espécies, sendo o *Enterococcus faecalis* a mais frequente em ambos os grupos. O perfil das infecções secundárias diferiu das características das infecções primárias, que são polimicrobianas, principalmente compostas por bactérias anaeróbias estritas, incluindo Gram-negativas e positivas (Haapasalo, 1989; Gomes et al., 1994a,b, 2004a,b).

Em 2001, Peciulienė et al. realizaram a coleta de amostras microbiológicas de 40 dentes submetidos a tratamento endodôntico com periodontite apical crônica, analisando-as por meio do método de cultura. Utilizaram a identificação fenotípica e testes bioquímicos para a identificação microbiana. Dentre as 40 amostras, microrganismos foram identificados em 33. *E. faecalis* foi identificado em 21 amostras, destacando-se como o microrganismo mais frequentemente detectado. A espécie fúngica *Candida albicans* foi observada em 6 casos, corroborando com a literatura existente (Waltimo et al., 1997; Molander et al., 1998). Bacilos Gram-negativos foram identificados em apenas 3 casos, estando sempre associados à presença de *E. faecalis*. O autor ressalta a predominância de bactérias sobre outros microrganismos nos canais relacionados ao insucesso do tratamento endodôntico prévio, enfatizando o papel ecológico significativo do *E. faecalis* no desenvolvimento e estabelecimento de infecções secundárias/persistentes.

Quando analisadas por métodos dependente de cultura, o perfil das infecções secundárias revelou distinções em relação às características das infecções primárias. Estas últimas são tipicamente polimicrobianas, compostas predominantemente por bactérias anaeróbias estritas e incluindo tanto bactérias Gram-negativas quanto positivas (Haapasalo, 1989; Gomes et al., 1994a,b, 2004).

Com o propósito de avaliar a eficácia da reintervenção endodôntica não cirúrgica e a comunidade microbiana em casos de infecção secundária, Barbosa-Ribeiro et al. (2020) conduziram uma análise utilizando contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e Nested-PCR no conteúdo microbiológico de 20 dentes indicados para retratamento endodôntico. As coletas foram realizadas imediatamente após o acesso ao canal radicular (inicial), após a execução do preparo químico-mecânico (pós-PQM) e após o uso de medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio por 30 dias (pós-MIC). Os resultados destacaram uma redução significativa de 99,4% na contagem de UFC nas amostras pós-PQM e pós-MIC em comparação com a coleta inicial. As bactérias mais frequentemente detectadas nas amostras iniciais foram *E. faecalis* (20/20), *P. gingivalis* (20/20) e *F. nucleatum* (17/20). Conclui-se que o tratamento endodôntico demonstrou eficácia ao reduzir a carga bacteriana presente nos canais radiculares em casos de falha no tratamento endodôntico primário. Além disso, a infecção secundária exibiu um perfil polimicrobiano, com alta prevalência de *E. faecalis* e *P. gingivalis* em todas as etapas do tratamento endodôntico, indicando a notável resistência dessas espécies.

Bicego-Pereira et al. (2020) trouxeram importantes contribuições sobre a importância do uso do PCR na análise de dentes indicados ao retratamento endodôntico por motivos protéticos. O PCR, ou reação em cadeia da polimerase é uma técnica molecular

poderosa que permite a detecção e identificação precisa de microrganismos em dentes submetidos ao retratamento exclusivamente por razões protéticas, sem evidência de periodontite apical crônica. Através do uso do PCR os autores foram capazes de identificar e quantificar de forma precisa os microrganismos presente nos canais radiculares desses dentes. Isso é de extrema importância, pois fornece uma melhor compreensão da microbiota que podem estar relacionados ao insucesso do tratamento endodôntico anterior, mesmo na ausência de lesões periapicais visíveis. Portanto, esse estudo ressalta a importância do PCR como ferramenta diagnóstica valiosa para a análise de dentes indicados para retratamento por motivos protéticos, fornecendo informações relevantes para o planejamento e execução do tratamento adequado.

Godoi-Jr et al. (2023) coletaram amostras de 30 dentes indicados ao retratamento endodôntico, que foram divididos em dois grupos o primeiro composto por 15 dentes submetidos à reintervenção devido à presença de lesão periapical e o segundo com 15 indicados ao retratamento por motivos exclusivamente protéticos sem a evidência radiográfica de periodontite apical. Utilizando técnicas avançadas de identificação molecular, as amostras foram coletadas durante três etapas do tratamento endodôntico, antes do preparo químico mecânico (PQM), após o PQM e após a medicação intracanal com hidróxido de cálcio e clorexidina 2%. A Avaliação da redução microbiana foi feita por meio da técnica de UFC. Revelou-se que bactérias foram identificadas em 100% dos casos antes da instrumentação dos canais radiculares, em ambos os grupos. As espécies mais comumente presentes nesta etapa, em ambos os grupos, foram *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Parvimonas micra*. Nas amostras iniciais, a carga microbiana dos dentes que apresentavam lesão periapical foi superior à do segundo grupo. O retratamento endodôntico demonstrou eficácia na redução da carga microbiana em ambos os grupos. Os autores constataram que comunidade microbiana encontrada nos canais radiculares dos dentes indicados para retratamento endodôntico é diversificada e heterogênea. Há diferenças entre os dois grupos tanto no número de espécies por caso quanto na carga microbiana.

### **2.3.1 Presença de fungos**

A presença de *Candida* em infecções endodônticas tem sido objeto de investigação em numerosos estudos, entretanto, sua função como patógeno endodôntico ainda é motivo de debate. Embora os fungos geralmente não tenham sido identificados na microbiota inicial de infecções no canal radicular, sua ocorrência é mais frequente em infecções persistentes após o preparo do canal radicular. Isso ocorre possivelmente como

resultado de contaminação durante o tratamento ou em situações envolvendo dentes obturados com resistência à terapia, levando a lesões periapicais (Nair et al., 1999).

Waltimo et al. (1999) demonstraram que *Candida spp.* apresentam uma considerável resistência a antissépticos e desinfetantes normalmente utilizados como irrigantes e medicamentos endodônticos. Esses microrganismos foram isolados em culturas puras de infecções do canal radicular, sugerindo a possibilidade de sua patogenicidade na periodontite apical (Waltimo et al., 1997).

Peciulienė et al. (2001) coletaram amostras de 40 dentes obturados e encontraram *Candida albicans* em 18% dos dentes estudados. Em 2003, Pinheiro et al. (2003a), empregando técnicas avançadas de cultura microbiológica, identificaram *Candida spp.* em 2 dos 60 casos investigados, corroborando os achados de Molander et al. (1998) e Sundqvist et al. (1998). Estes últimos encontraram, respectivamente, a presença desse microrganismo em 2 de 54 dentes e em 3 de 100 dentes examinados.

Pourhajbagher et al. (2017) realizaram a coleta de amostras de 36 pacientes com infecção endodôntica primária e de 14 pacientes com histórico de tratamento endodôntico. Utilizando testes bioquímicos e o sequenciamento do gene do RNA ribossômico 16S para a identificação dos microrganismos, constataram que o *Enterococcus faecalis* (36,6%) foi o microrganismo mais prevalente em infecções endodônticas secundárias. Em seguida, *Candida albicans*, *Propionibacterium acnes* e *V. parvula* foram identificados com frequências de 20%, 2% e 2%, respectivamente. A conclusão do estudo indicou que *V. parvula* e *E. faecalis* foram os microrganismos mais frequentemente encontrados em infecções endodônticas primárias e secundárias, respectivamente.

Em 2021, Alberti et al. realizaram uma revisão do bioma fúngico em infecções endodônticas, tanto primárias quanto secundárias, com foco especial na prevalência e comportamento das espécies de *Candida*. A análise meta-analítica dos dados disponíveis revelou que a prevalência média ponderada geral (WMP) de espécies fúngicas em infecções endodônticas é de 9,11%, considerando um total cumulativo de 2.003 amostras. Especificamente, a prevalência foi de 9,0% em infecções primárias (n = 1.341) e 9,3% em infecções secundárias (n = 662). A espécie fúngica mais comum foi *Candida spp.* A considerável heterogeneidade na prevalência fúngica relatada indica a necessidade de amostragem padronizada e métodos de especiação. O surgimento de plataformas analíticas de biologia molecular avançada, como o sequenciamento de próxima geração (NGS) e a espectrometria de massa por tempo de voo por ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF), possibilita a identificação e quantificação de uma ampla gama de

organismos previamente desconhecidos em infecções endodônticas, prometendo uma transformação radical em nossa compreensão do microbioma endodôntico no futuro. *Candida* spp. parece desempenhar um papel de co-patógeno com bactérias em cerca de 1 em cada 10 pacientes com infecções endodônticas. No entanto, é crucial que os clínicos compreendam a importância e o papel dos fungos nessas infecções, além de estarem cientes da necessidade de erradicar tanto bactérias quanto fungos para alcançar uma terapia bem-sucedida.

#### **2.4 O método de microbiologia clássica no estudo de infecções associadas a dentes tratados endodônticamente**

Conforme Dahlén (2002) a cultura microbiana representa o padrão de excelência para o estudo da microbiota relacionada às infecções endodônticas. Entretanto, apesar de existirem diversas técnicas de cultivo e isolamento microbiano documentadas na literatura endodôntica, nenhuma delas permite a identificação completa de todos os microrganismos presentes no SCR (Socransky et al., 1963).

Para o crescimento de microrganismos por meio da técnica de cultura é essencial a existência viável de células bacterianas. Para viabilizar a identificação bacteriana por métodos de cultura, é necessário haja crescimento microbiano e que a concentração de células microbianas seja elevada (Munson et al., 2002; Peters et al., 2002; Vianna et al., 2004; Barbosa-Ribeiro et al., 2020).

Em 1998, Sundqvist et al. utilizaram culturas microbiológicas para a análise de 45 amostras de dentes associadas a insucessos no tratamento endodôntico. Observou-se uma predominância de monoinfecções caracterizadas principalmente pela presença de bactérias anaeróbias facultativas, Gram-positivas, sendo o *E. faecalis* a espécie mais frequentemente isolada nos canais radiculares. Esses resultados corroboram com achados descritos na literatura (Molander et al., 1998; Pinheiro et al., 2003a,b; Gomes et al., 2004, 2006b).

O principal desafio do cultivo microbiano é recriar um ambiente que seja favorável para o desenvolvimento e a reprodução de microrganismos (Endo et al., 2013; Gomes e Herrera, 2018). Dessa forma, o conteúdo microbiológico presente em infecções endodônticas pode ser subavaliado quando examinado exclusivamente por meio de técnicas de cultivo bacteriano e métodos bioquímicos e fenotípicos de identificação bacteriana (Gomes et al., 2004; Gomes et al., 2008a,b; Barbosa-Ribeiro et al., 2020).

Por meio do cultivo e isolamento de microrganismos, métodos de estudos da microbiologia clássica, analisou-se que bactérias anaeróbicas facultativas, majoritariamente as Gram-positivas estão relacionadas com as infecções secundárias/persistentes (Molander et al., 1998; Sundvist et al., 1998; Siqueira et al., 2001; Pinheiro et al., 2003a,b). Embora não sejam detectadas frequentemente, espécies de fungos, como *Candida albicans* estão relacionadas com infecções secundárias/persistentes em dentes que tiveram insucesso no tratamento endodôntico primário (Peciulienė et al., 2001; Egan et al., 2002; Pinheiro et al., 2003a,b; Mindere et al., 2010; Pourhajbagher et al., 2017). Entretanto, a microbiota residente de canais radiculares indicados ao retratamento endodôntico por motivos exclusivamente protéticos é pouco descrita na literatura (Sundqvist et al., 1998; Bicego-Pereira et al., 2020).

Métodos de microbiologia clássica são muito importantes para detecção de microrganismos que estão associados com infecções endodônticas, porém apresentam limitações em mimetizar um ambiente que possa desenvolver simultaneamente todos os microrganismos envolvidos nessas infecções. Uma vez que, a microbiota dos canais radiculares é mista e complexa, os métodos de cultivo e isolamento podem apresentar resultados que falham na detecção de microrganismos que não se desenvolvem facilmente na placa de agar (Gomes et al., 2008b; Endo et al., 2013; Gomes et al., 2021).

Aproximadamente 60% dos microrganismos ainda não podem ser cultivados, assim um resultado negativo não indica necessariamente a completa ausência do microrganismo no SCR. Dessa forma, a diversidade bacteriana e a contagem de microrganismos obtidas por meio de métodos de cultura geralmente são subavaliadas. A falta de detecção de microrganismos no meio de cultura pode refletir diversas limitações inerentes à coleta microbiológica, bem como às condições ambientais, incluindo fatores nutricionais, atmosféricos e de temperatura. Uma cultura negativa também pode indicar a presença de microrganismos em concentrações abaixo do limiar necessário para detecção por meio da cultura (Gomes et al., 1994a,b, 2004, 2005, 2008a,b, 2015; Jacinto et al., 2003; Endo et al., 2013; Gomes e Herrera, 2018).

Apesar de apresentar vantagens e desvantagens é crucial reconhecer a cultura microbiológica como um método significativo e confiável para a identificação de microrganismos viáveis, bem como na avaliação da eficiência de protocolos e substâncias químicas empregadas na terapia endodôntica por meio da contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) (Endo et al., 2013).

## 2.5 O método de microbiologia molecular Nested-PCR para estudo de infecções secundárias/persistentes

O método molecular Nested-PCR representa uma variação da reação em cadeia de polimerase (PCR) caracterizada por sua alta reprodutibilidade, confiabilidade e especificidade. Além disso, destaca-se por sua capacidade de detectar microrganismos mesmo em concentrações reduzidas na amostra, tornando-se um método eficaz para a identificação bacteriana (Gomes et al., 2007; Gomes et al., 2008a,b; Louzada et al., 2020; Barbosa-Ribeiro et al., 2020).

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

A combinação simultânea de abordagens moleculares e métodos de cultura ofereceu uma ampla oportunidade para a compreensão da microbiota vinculada às infecções endodônticas. Essa abordagem é crucial para aprofundar o entendimento do ecossistema presente no sistema de canais radiculares associado a patologias pulpares e periapicais (Gomes et al., 2006a,b; Aw, 2016).

Para contornar e adquirir informações mais abrangentes diante das limitações inerentes ao método de cultura, os métodos moleculares têm sido extensivamente utilizados. Essas abordagens demonstram maior sensibilidade, especificidade e rapidez na identificação bacteriana em comparação com os métodos de cultura. Além disso, esses métodos têm a capacidade de detectar microrganismos fastidiosos e aqueles que não podem ser cultivados (Siqueira e Rôças, 2003; Gomes et al., 2008a,b; Barbosa-Ribeiro et al., 2020).

Em 2020, Barbosa-Ribeiro et al. identificaram uma elevada prevalência das espécies *E. faecalis* e *P. gingivalis* ao investigarem o conteúdo infeccioso de 20 dentes com periodontite apical crônica, submetidos a tratamento endodôntico. Utilizando os métodos de Nested-PCR e sequenciamento genético, coletas foram realizadas imediatamente após o acesso aos canais radiculares (Inicial), após o preparo químico-mecânico (Pós-PQM) e após a aplicação de uma medicação à base de hidróxido de cálcio no interior do canal radicular por 30 dias (Pós-PQM). Os resultados indicaram que a comunidade microbiana associada ao

insucesso endodôntico é diversificada e heterogênea. A persistência de *P. gingivalis* e *E. faecalis* em todas as fases do tratamento endodôntico sugere a presença de mecanismos de resistência que contribuem para a sobrevivência desses microrganismos ao tratamento. Além disso, os pesquisadores destacaram a eficácia da reintervenção endodôntica em alterar a composição da microbiota relacionada às infecções intra-radiculares.

Métodos de identificação moleculares são capazes de identificar microrganismos incultiváveis devido à sua maior sensibilidade em comparação com métodos de culturas. O método Nested-PCR tem como sua principal vantagem uma identificação mais apurada da microbiota endodôntica. (Gomes et al., 2008a,b, 2021; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016, 2020). Estudos que se apropriaram da utilização dos métodos moleculares afirmam a presença de espécies fúngicas, destacando-se *Candida* spp, associadas as infecções secundárias/persistentes. (Siqueira et al., 2004; Dumani et al., 2012; Poptani et al., 2013; Pourhajibagher et al., 2017).

A aplicação de métodos de biologia molecular permitiu a detecção de um perfil microbiológico de caráter misto, heterogêneo, poli microbiano e diversificado nos casos de infecção endodôntica secundária/persistente (Gomes et al., 2008a,b; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2016, 2020; Godoi-Jr et al., 2023).

### 3 PROPOSIÇÃO

#### Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi determinar a prevalência das espécies fúngicas específicas (*C. glabrata*, *C. kruseii* e *C. parapsilosis*) em casos indicados ao retratamento endodôntico, devido ao insucesso do tratamento endodôntico primário evidenciado pela presença de periodontite apical crônica (grupo CL), ou por motivos exclusivamente protéticos, em dentes sem lesão periapical radiograficamente visível (grupo SL), através do método molecular de Nested-PCR.

#### Objetivos específicos

a) Detectar através do *Nested-PCR* as espécies como *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*

b) Correlacionar aspectos clínicos com a presença de *C.glabrata*, *C.krusei* e *C.parapsilosis*.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Autorização da pesquisa**

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP) e aprovado (**CAAE:** 63728522.0.0000.5418). Os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) previamente a realização dos procedimentos clínicos.

### **4.2 Local da pesquisa**

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

### **4.3 Levantamento e seleção das amostras de casos indicados ao retratamento endodôntico**

Foram selecionados 20 pacientes apresentando dentes com necessidade de retratamento endodôntico pelo insucesso do tratamento anterior evidenciado pela lesão periapical (n=10) ou por motivos exclusivamente protéticos (n=10).

### **4.4 Descrição da coleta e obtenção das amostras incluídas no presente estudo**

**Foram incluídos** casos de pacientes: que apresentavam dentes tratados endodonticamente, sendo a presença de tratamento endodôntico prévio confirmada radiograficamente. Os dentes deveriam ter 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; Os pacientes 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.

**Foram excluídos:** 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. A coleta das amostras advindas dos pacientes foi realizada na clínica de Pós-graduação da Instituição por aluno de pós-graduação e o processamento destas foi realizado no Laboratório de Microbiologia aplicada à Endodontia.

Durante a realização dos procedimentos clínicos, foram utilizadas técnicas assépticas e instrumentos esterilizados e apirogênicos, remoção de contaminantes coronários, tais como cáries e restaurações, realização da descontaminação do campo operatório, isolamento absoluto, remoção de interferências.

Inicialmente, foi realizada a descontaminação da face externa do paciente com solução de clorexidina a 2%, seguida da anestesia local do dente selecionado para o estudo. Em seguida, realizou-se polimento coronário com pedra pomes e água, com auxílio de taça de borracha acoplada em micromotor de baixa rotação. Após a profilaxia do elemento dental foi realizado isolamento absoluto e selamento da interface coroa dental/lençol de borracha com cianocrilato (Super Bonder, Loctite, São Paulo, SP) com o objetivo de prevenir infiltração salivar. O protocolo de desinfecção do campo operatório consistiu em aplicar, com auxílio de swabs estéreis, água oxigenada 30% (v/v), seguida de hipoclorito de sódio 2,5% por 30 segundos cada, seguida da neutralização com solução estéril de tiosulfato de sódio 5%. A confirmação da desinfecção do campo operatório foi realizada por meio de coleta de amostra com swab estéril e plaqueamento em Fastidious Anaerobe Agar (FAA, Lab M, Bury, UK) + 5% de sangue desfibrinado de carneiro e incubados em câmara de anaerobiose por 48 horas.

A abertura coronária foi realizada por meio de brocas esféricas diamantadas (#1012HL, #1014HL; #1016HL) sem irrigação proveniente do equipo, entretanto, com solução fisiológica estéril, com o objetivo de minimizar quaisquer formas de contaminação e reduzir o aquecimento produzido durante o procedimento. As formas de contorno e conveniência foram realizadas com brocas #3082.

Finalizada a abertura coronária, realizou-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.

Nos casos em que o canal radicular estivesse seco, este foi umedecido com soro fisiológico 0,9% estéril, para assegurar melhor absorção do seu conteúdo. Em casos de dentes bi ou trirradiculares, a coleta foi realizada no canal radicular mais amplo, de maneira a confinar o exame microbiológico em um único ambiente ecológico. Casos em que o cone de papel absorvente não foi capaz de atingir o ápice, foram excluídos.

Coletas endodônticas 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. A seguir os *ependorfs* foram congelados em freezer -80°C para futuras análises moleculares.

O reparo do sistema e canal radicular 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, utilizou-se a 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). Uma lima de pequeno calibre foi utilizada para manter a patência do canal. Após a instrumentação, confirmou-se o comprimento real do trabalho utilizando a lima anatômica final. Os canais foram irrigados com clorexidina 2% gel e soro fisiológico. Foram inseridos 3 ml de EDTA 17% no interior do canal radicular por 1 minuto (com substituição a cada 30 s), sob agitação, com a finalidade de remover a camada residual de *smear layer*. A irrigação final foi realizada com 10 ml de solução fisiológica estéril. Caso o dente estivesse assintomático e o canal sem presença de exsudato, o mesmo foi obturado numa mesma sessão. Caso contrário foi colocada uma medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio e clorexidina gel, que permaneceu no interior do canal por 7 dias, para posterior obturação. Em ambas as situações o dente foi selado com uma camada de 2 mm de Coltosol (Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) na embocadura do canal radicular. Em seguida, foi aplicado ácido fosfórico 37% por 15 segundos em dentina e 30 segundos em esmalte, adesivo Single Bond 3M (3M Dental Products, St Paul, EUA) e restauração em resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products,

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

#### 4.5 Procedimentos laboratoriais

##### Extração do DNA

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

##### Reação universal de PCR

As amostras de cada grupo foram inicialmente submetidas a uma primeira reação de polimerase em cadeia visando amplificação total do gene 18S rRNA. Foram utilizados os primers Yeast universal (Haynes e Westerneng, 1996) que amplificam um fragmento de 600-640 pares de base.

As condições de amplificação, bem como as etapas de ciclagem foram realizadas como o descrito por Haynes e Westerneng (1996).

Yeast Universal (F): 5'-GCATATCAATAAGCG-GAGGAAAAG-3'

Yeast Universal (R): 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG-3'

##### Reação específicas de PCR

Os produtos da primeira reação de *PCR* foram submetidos a uma segunda reação *PCR* subsequente visando a amplificação de regiões do gene 18s rRNA hipervariáveis entre as espécies de *Candida*, caracterizando uma reação de *Semi-Nested*.

Para realização da segunda reação de *PCR* manteve-se o uso do primer Yeast Universal (R) (637-654-bp) e acrescenta-se o primer (F) específico para cada uma das espécies de *Candida* investigadas, o uso de primers sense distintos para cada variante, permitiu a diferenciação, por meio de diferentes tamanhos de fragmentos, possibilitando assim a genotipagem dos fungos em dados metagenômicos. Os primers utilizados para execução da reação específica de *PCR* seguem descritos abaixo.

a) *Candida glabrata*

*Candida glabrata* (F): 5'-GTTTTGCGCCCCTTGCCTCT-3'

Yeast Universal (R): 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG-3'

b) *Candida krusei*

*Candida krusei* (F): 5'-GACATGGGAATCGCGCACCG-3'

Yeast Universal (R): 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG-3'

c) *Candida parapsilosis*

*Candida parapsilosis* (F): 5'-GCGGTAGGATAAGTGCAC-3'

Yeast Universal (R): 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG-3'

#### 4.6 Análises estatísticas

Os dados coletados foram tabulados em uma planilha de cálculo e analisados estatisticamente usando SPSS for Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) pelos testes apropriados.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Características gerais dos pacientes**

Foram analisadas 20 amostras de pacientes com a faixa de idade de 30 a 69 anos, com a média de idade de 48,5 anos, 15 (75%) pacientes do sexo feminino e 5 (25%) do sexo masculino. Destes 20 pacientes participantes, 10 se incluíram no grupo que eram indicados para retratamento por apresentarem periodontite apical crônica e outros 10 pacientes que necessitavam de retratamento por motivos protético, onde se encontravam sem lesão periapical. A média de tempo transcorrido desde o tratamento endodôntico primário nos casos incluídos foi de 9,8 anos.

### **5.2 Aspectos clínicos e radiográficos dos casos indicados ao retratamento pela presença de lesão periapical (CL)**

Os dentes incluídos neste grupo consistiram em 10 casos que necessitavam de retratamento devido à presença de periodontite apical crônica após tratamento endodôntico prévio. A faixa etária dos pacientes variou de 30 a 69 anos, com uma média de 49,1 anos. Destes, 9 (90%) eram do sexo feminino e 1 (10%) do sexo masculino. O grupo era composto por 6 dentes unirradiculares (60%) e 4 dentes multirradiculares (40%). O intervalo de tempo transcorrido desde o tratamento anterior foi em média 10,3 anos, variando entre de 2 a 30 anos.

Nenhum paciente relatou dor à palpação, edema facial, fístula ou exsudato no sistema de canais após a desobturação do canal. Contudo, todos apresentavam lesões periapicais, com tamanhos variando de 1 a 5,6 mm (média de 3,25 mm). Dentre essas lesões, 2 (20%) eram menores que 2 mm, 6 (60%) situavam-se entre 2 e 5 mm, e 2 (20%) eram maiores que 5 mm. A profundidade de sondagem dos casos variou entre 1 mm e 3 mm, sendo que dentes com profundidade de sondagem superior a 3 mm foram excluídos do estudo.

A queixa estética relacionada à restauração dentária foi observada em 6 casos (60%). Quanto à qualidade da obturação, apenas 2 casos (20%) foram considerados bons, enquanto 8 casos (80%) apresentaram obturações de qualidade ruim. O limite apical foi considerado bom em apenas 2 casos (20%).

### **5.3 Aspectos clínicos e radiográficos dos casos indicados ao retratamento por motivos protéticos (SL)**

Os dentes incluídos neste grupo consistiram em 10 casos que requeriam retratamento exclusivamente por motivos protéticos, estando isentos de quaisquer alterações periapicais. A faixa etária dos pacientes variou de 35 a 61 anos, com uma média de 47,9 anos. Destes, 6 (60%) eram do sexo feminino, e 4 (40%) eram do sexo masculino. O grupo incluiu 4 dentes unirradiculares (40%) e 6 dentes multirradiculares (60%). A média de tempo decorrido desde o tratamento anterior foi de 9,3 anos, com o período máximo encontrado de 22 anos e o mínimo de 2 anos.

Nenhum dos pacientes relatou dor durante o teste de percussão vertical, dor à palpação, edema facial, fístula ou exsudato no interior do sistema de canais após a desobturação do canal. A queixa estética relacionada à restauração foi observada em 6 casos (60%). No que se refere à qualidade da obturação, apenas 3 casos (30%) foram considerados bons, enquanto 7 casos (70%) apresentaram obturações de qualidade ruim. O limite apical foi considerado bom em apenas 4 casos (40%). Nenhum dos casos indicados ao retratamento por motivos exclusivamente protéticos (MP), apresentou lesão, descontinuidade da lâmina dura ou espessamento do ligamento periodontal.

Os casos apresentaram profundidade de sondagem entre 1 mm e 3 mm, sendo que dentes com profundidade de sondagem superior a 3 mm foram excluídos do estudo. Quanto ao selamento coronário, todos os casos (100%) estavam restaurados em resina composta e não apresentaram nenhum sinal radiográfico de microinfiltração coronária.

### **5.4 Detecção de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* em casos indicados ao retratamento pela presença de lesão periapical (CL)**

*Candida glabrata* foi detectada em 100% dos casos (10/10). *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* não foram detectadas em nenhuma amostra do presente grupo. A frequência de detecção dos microrganismos do grupo CL está representada na figura 1.

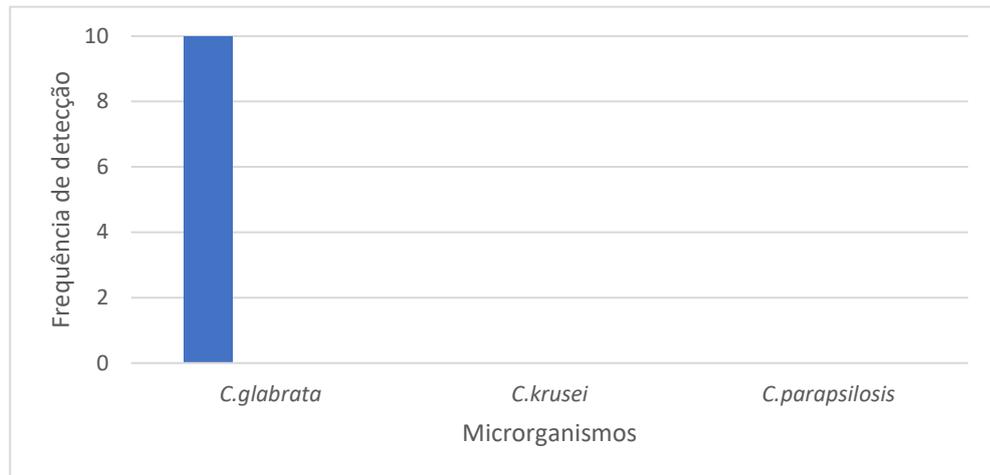


Figura 1 - Frequência de detecção das espécies no grupo indicado ao retratamento pela presença de lesão periapical (CL)

### 5.5 Detecção de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* em casos indicados ao retratamento por motivos protéticos (SL)

Nos casos indicados ao retratamento por motivos exclusivamente protéticos *Candida krusei* foi identificada em 10% dos casos. *Candida glabrata* e *parapsilosis* não foram identificadas em nenhuma amostra. A frequência de detecção dos microrganismos do grupo SL está representada na figura 2.

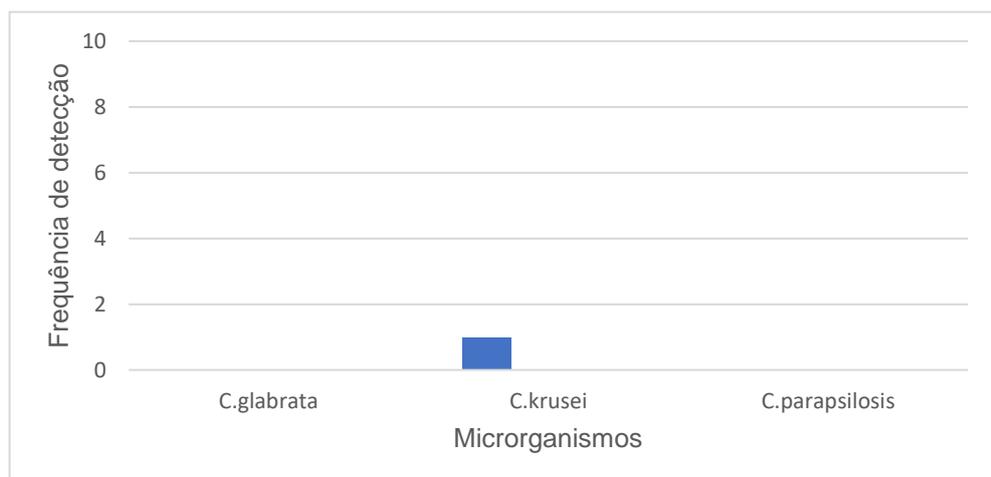


Figura 2 - Frequência de detecção das espécies no grupo indicado ao retratamento por motivos protéticos. (SL)

## 5.6 Frequência de *Candida* nos grupos indicados ao retratamento pela presença de lesão periapical (CL) e por motivos protéticos(SL)

Analisando a frequência de *Candida* spp nos dois grupos estudados, notamos que *C. glabrata* apresentou-se frequente em 50% dos casos, estando presente em 100% dos casos indicados ao retratamento pela presença de lesão periapical (CL) e não foi detectada nos casos indicados ao retratamento por motivos protéticos (SL).

*C. krusei* apresentou-se frequente em 5% dos 20 dentes estudados, sendo encontrada em 10% dos casos do grupo SL. Porém não foi detectada no grupo CL.

*C. parapsilosis* não foi encontrada em nenhum dos grupos.

Tabela 1 - Frequência e porcentagem das espécies nos grupos CL e SL detectados através do Nested PCR nos diferentes momentos de coleta.

Microrganismos	Grupos		
	Total	CL	SL
<i>C. glabrata</i>	10(50%)	10(100%)	0(0%)
<i>C. parapsilosis</i>	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<i>C. krusei</i>	1(5%)	0(0%)	1(10%)

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

O estudo analisou as associações entre a presença de espécies fúngicas estudadas com sinais e sintomas clínicos e radiográficos dos casos incluídos no presente estudo. Houve associação estatisticamente significativa entre lesão periapical e a presença de *C. glabrata* no interior dos canais radiculares, principalmente em lesão periapical de 2-5mm.

Tabela 2 -Correlações positivas entre a presença de bactérias e sinais e sintomas clínicos e/ou radiográficos apresentados pelos pacientes.

		Lesão periapical		
		Presença	Ausencia	p valor
<b><i>Candida glabrata</i></b>	Presença	10	0	0
	Ausência	0	10	
		Lesão periapical de 2-5 mm		
		Presença	Ausencia	p valor
<b><i>Candida glabrata</i></b>	Presença	5	5	0,033
	Ausência	0	10	

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como principais objetivos avaliar a presença de *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* em casos de insucesso do tratamento endodôntico evidenciado em 10 casos pela presença de periodontite apical crônica (CL) e em 10 casos por motivos protéticos (SL), buscando também correlacionar a presença de aspectos clínicos a presença destas espécies.

Na literatura existem diversos estudos que investigaram a presença de microrganismos em dentes com insucesso do tratamento endodôntico (Pinheiro et al., 2003a,b; Gomes et al., 2004, 2006a,b, 2008a,b, 2021; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2020, 2021). Entretanto, poucos investigaram a presença de microrganismos em dentes com necessidade de retratamento endodôntico por motivos protéticos sem presença de lesão periapical evidente radiograficamente, o que ressalta a importância deste estudo.

Com o passar do tempo, materiais usados para obturar os canais radiculares podem se deteriorar e comprometer a qualidade do selamento do canal radicular, facilitando sua recontaminação (Maniglia-Ferreira et al., 2007). Diante dessas evidências, o retratamento endodôntico por motivos protéticos visa melhorar o prognóstico e alongar a durabilidade de futuras próteses. Portanto é recomendável realizar o retratamento de forma não cirúrgica antes da confecção e instalação de coroas, mesmo que exames clínicos e radiográficos não mostrem alterações periapicais. Isso porque a deterioração dos materiais obturadores pode estar ocorrendo sem sinais evidentes (Maniglia-Ferreira et al., 2007; Landys et al., 2015; Shetty et al., 2015).

A presença de microrganismos no interior de dentes tratados endodonticamente com alteração periapical é bem estabelecida na literatura (Pinheiro et al., 2003a,b; Endo et al., 2013; Pereira et al., 2017; Bicego-Pereira et al., 2020). Sabe-se que os microrganismos mais prevalentes em infecções secundárias/persistentes são as bactérias anaeróbicas facultativas destacando, *E. faecalis* (Gomes et al., 2008a, 2021). Por outro lado, a presença de fungos como *Candida* spp sugere que essas infecções são mistas e heterogêneas corroborando com os achados na literatura (Pauliene et al., 2001; Pinheiro et al., 2003a,b; Mindere et al., 2010; Pourhajibagher et al., 2017; Godoi-Jr et al., 2023).

Com relação a detecção de espécies fúngicas nos grupos CL e SL, no grupo CL a *Candida* mais prevalente foi *C. glabrata* (10/10). Já no grupo SL a espécie mais prevalente foi *Candida krusei* (1/10).

As altas frequências de detecção de microrganismos do gênero *Candida* spp.

especialmente no grupo CL reforçam a importância do uso de substâncias químicas auxiliares e medicações de amplo espectro, efetivas na redução de espécies fúngicas e bacterianas.

A identificação molecular de cepas específicas de *Candida* foi realizada através do Nested-PCR. Esta metodologia apresenta alta eficiência, especificidade e sensibilidade (Siqueira et al., 2004; Gomes et al., 2008b; Endo et al., 2013; Barbosa-Ribeiro et al., 2020). Entretanto ressalta-se que apesar de sua alta sensibilidade, o método é ineficaz na detecção da viabilidade celular (Endo et al., 2013).

Houve associação estatisticamente significativa entre lesão periapical e a presença de *C. glabrata* no interior dos canais radiculares, principalmente em lesão com tamanho de 2-5mm. Tal fato ressalta a importância dos fatores de virulência presente nas espécies de fungos na formação e manutenção de lesões periapicais (Alberti et al., 2021).

O presente estudo evidenciou a presença de espécies fúngicas nos casos de insucesso do tratamento endodôntico. Trabalhos futuros envolvendo um maior número de casos são necessários para confirmar os dados aqui obtidos.

## 7 CONCLUSÃO

Concluiu-se que espécies de *Candida* podem estar presentes em dentes com insucesso do tratamento endodôntico, contribuindo para sua patologia.

## REFERÊNCIAS<sup>1\*</sup>

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

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

Aw V. Discuss the role of microorganisms in the aetiology and pathogenesis of periapical disease. *Aust Endod J*. 2016 Aug;42(2):53-9. doi: 10.1111/aej.12159.

Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of lipoteichoic acid contents and cultivable bacteria at the different phases of the endodontic retreatment. *J Endod*. 2016 Apr;42(4):552-6. doi: 10.1016/j.joen.2016.01.002.

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

Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Mendes Louzada L, Rodrigues Lima A, Marciano M, Affonso de Almeida JF, et al. Microbiological investigation in teeth with persistent/secondary endodontic infection in different stages of root canal retreatment. *Eur Endod J*. 2020 Dec;5(3):219-25. doi: 10.14744/eej.2020.73626.

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

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

---

<sup>1\*</sup> De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Bronzato JD, Davidian MES, Castro M, De-Jesus-Soares A, Ferraz CCR, Almeida JFA, et al. Bacteria and virulence factors in periapical lesions associated with teeth following primary and secondary root canal treatment. *Int Endod J*. 2021 May;54(5):660-71. doi: 10.1111/iej.13457.

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

Delboni MG, Gomes BP, 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 Mar;43(3):377-82. doi: 10.1016/j.joen.2016.10.042.

Dumani A, Yoldas O, Yilmaz S, Koksall F, Kayar B, Akcimen B, et al. Polymerase chain reaction of enterococcus faecalis and candida albicans in apical periodontitis from Turkish patients. *J Clin Exp Dent*. 2012 Feb;4(1):e34-9. doi: 10.4317/jced.50669.

Egan MW, Spratt DA, Ng YL, Lam JM, Moles DR, Gulabivala K. Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int Endod J*. 2002 Apr;35(4):321-9. doi: 10.1046/j.1365-2591.2002.00478.x.

Endo MS, Ferraz CCR, Zaia AA, Almeida JFA, Gomes BPF. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. *Eur J Dent*. 2013 Jul;7(3):302-9. doi: 10.4103/1305-7456.115414.

Friedman S, Stabholz A. Endodontic retreatment--case selection and technique. Part 1: Criteria for case selection. *J Endod*. 1986 Jan;12(1):28-33. doi: 10.1016/S0099-2399(86)80278-3.

Godoi-Jr EP, Bronzato JD, Francisco PA, Bicego-Pereira EC, Lopes EM, Passini MRZ, et al. Microbiological profile of root canals indicated for endodontic retreatment due to secondary endodontic infections or for prosthetic reasons. *Clin Oral Investig*. 2023 May;27(5):2049-64. doi: 10.1007/s00784-023-04947-x.

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

Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Associations of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J*. 1994b Nov;27(6):291-8. doi: 10.1111/j.1365-2591.1994.tb00271.x.

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

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

Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod.* 2006a Oct;32(10):937-40. doi: 10.1016/j.joen.2006.05.003.

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

Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Polymerase chain reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. *J Endod.* 2007 Sep;33(9):1049-52. doi: 10.1016/j.joen.2007.05.017.

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

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

Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J.* 2013;24(2):89-102. doi: 10.1590/0103-6440201302188.

Gomes BPFA, Francisco PA, Godoi EPJr, Endo MS, Barbosa-Ribeiro M, Delboni MG, et al. Identification of culturable and nonculturable microorganisms, lipopolysaccharides, and lipoteichoic acids from root canals of teeth with endodontic failure. *J Endod.* 2021 Jul;47(7):1075-86. doi: 10.1016/j.joen.2021.04.011.

Gutmann JL, Baumgartner JC, Gluskin AH, Hartwell GR, Walton RE. Identify and define all diagnostic terms for periapical/periradicular health and disease states. *J Endod.* 2009 Dec;35(12):1658-74. doi: 10.1016/j.joen.2009.09.028.

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

Hancock HH 3rd, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001 May;91(5):579-86. doi: 10.1067/moe.2001.113587.

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

Imura N, Pinheiro ET, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. The outcome of endodontic treatment: a retrospective study of 2000 cases performed by a specialist. *J Endod.* 2007 Nov;33(11):1278-82. doi: 10.1016/j.joen.2007.07.018.

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

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

Landys Borén D, Jonasson P, Kvist T. Long-term survival of endodontically treated teeth at a public dental specialist clinic. *J Endod.* 2015 Feb;41(2):176-81. doi: 10.1016/j.joen.2014.10.002.

Louzada LM, Arruda-Vasconcelos R, Duque TM, Casarin RCV, Feres M, Gomes BPF. 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 Jun;46(6):736-47. doi: 10.1016/j.joen.2020.02.005.

Maniglia-Ferreira C, Silva JBJr, Paula RC, Feitosa JP, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Degradation of trans-polyisoprene over time following the analysis of root fillings removed during conventional retreatment. *Int Endod J.* 2007 Jan;40(1):25-30. doi: 10.1111/j.1365-2591.2006.01172.x.

Mergoni G, Percudani D, Lodi G, Bertani P, Manfredi M. Prevalence of Candida Species in Endodontic Infections: Systematic Review and Meta-analysis. *J Endod*. 2018 Nov;44(11):1616-25.e9. doi: 10.1016/j.joen.2018.07.016.

Mindere A, Kundzina R, Nikolajeva V, Eze D, Petrina Z. Microflora of root filled teeth with apical periodontitis in Latvian patients. *Stomatologija*. 2010;12(4):116-21.

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

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 Nov;81(11):761-6. doi: 10.1177/0810761.

Nair PN, Sjögren U, Figdor D, Sundqvist G. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999 May;87(5):617-27. doi: 10.1016/s1079-2104(99)70145-9.

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

Ng YL, 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 Jul;44(7):583-609. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01872.x.

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 Sep;34(6):429-34. doi: 10.1046/j.1365-2591.2001.00411.x.

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

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol*. 2003b Apr;18(2):100-3. doi: 10.1034/j.1399-302x.2003.00058.x.

Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. *Int Endod J*. 2002 Aug;35(8):698-702. doi: 10.1046/j.1365-2591.2002.00550.x.

Poptani B, Sharaff M, Archana G, Parekh V. Detection of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in previously root-filled teeth in a population of Gujarat with polymerase chain reaction. *Contemp Clin Dent*. 2013 Jan;4(1):62-6. doi: 10.4103/0976-237X.111622.

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

Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2019 May;24(3):e364-72. doi: 10.4317/medoral.22907.

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 Jan;28(1):12-8. doi: 10.1111/j.1365-2591.1995.tb00150.x.

Ricucci D, Siqueira JFJr. Recurrent apical periodontitis and late endodontic treatment failure related to coronal leakage: a case report. *J Endod*. 2011 Aug;37(8):1171-5. doi: 10.1016/j.joen.2011.05.025.

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

Rôças IN, Hülsmann M, Siqueira JFJr. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):926-31. doi: 10.1016/j.joen.2008.05.008.

Shetty K, Habib VA, Shetty SV, Khed JN, Prabhu VD. An assessment of coronal leakage of permanent filling materials in endodontically treated teeth: An in vitro study. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015 Aug;7(Suppl 2):S607-11. doi: 10.4103/0975-7406.163566.

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

Siqueira JFJr, Rôças IN. Polymerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radidentis* in primary and persistent endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Aug;96(2):215-22. doi: 10.1016/s1079-2104(03)00158-6.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Jan;97(1):85-94. doi: 10.1016/s1079-2104(03)00353-6.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Alves FR, Campos LC. Periradicular status related to the quality of coronal restorations and root canal fillings in a Brazilian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005b Sep;100(3):369-74. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.03.029.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Ricucci D, Hülsmann M. Causes and management of post-treatment apical periodontitis. *Br Dent J.* 2014 Mar;216(6):305-12. doi: 10.1038/sj.bdj.2014.200. .

Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J.* 1997 Mar;30(2):91-5.

Socransky SS, Gibbons RJ, Dale AC, Bortnick I, Rosenthal E, Macdonald JB. The microbiota of the gingival crevice area of man. i. total microscopic and viable counts and counts of specific organisms. *Arch Oral Biol.* 1963 May-Jun;8:275-80. doi: 10.1016/0003-9969(63)90019-0.

Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod.* 1992 Sep;18(9):427-30. doi: 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 Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Jan;85(1):86-93. doi: 10.1016/s1079-2104(98)90404-8.

Tabassum S, Khan FR. Failure of endodontic treatment: the usual suspects. *Eur J Dent.* 2016 Jan-Mar;10(1):144-7. doi: 10.4103/1305-7456.175682.

Tzanetakis GN, Koletsi D, Tsakris A, Vrioni G. Prevalence of fungi in primary endodontic infections of a greek-living population through real-time polymerase chain reaction and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Endod.* 2022 Feb;48(2):200-7. doi: 10.1016/j.joen.2021.11.003.

Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, 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 Jan;97(1):79-84. doi: 10.1016/s1079-2104(03)00360-3.

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

Waltimo TM, Orstavik D, Sirén EK, Haapasalo MP. In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J*. 1999 Nov;32(6):421-9. doi: 10.1046/j.1365-2591.1999.00237.x.

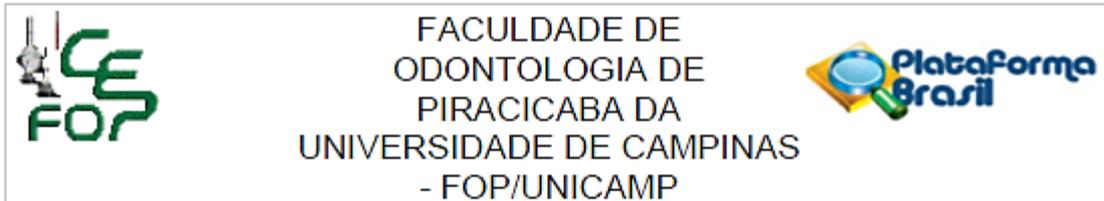
Willis SG, Smith KS, Dunn VL, Gapter LA, Riviere KH, Riviere GR. Identification of seven *Treponema* species in health- and disease-associated dental plaque by nested PCR. *J Clin Microbiol*. 1999 Mar;37(3):867-9. doi: 10.1128/JCM.37.3.867-869.1999.

## ANEXOS

### Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio



## Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** FATORES MICROBIANOS E IMUNOLÓGICOS PRESENTES NOS DIFERENTES TIPOS DE INFECÇÃO ENDODONTICA, ANÁLISES DO MOBILOMA E RESISTOMA EM METAGENOMAS DE SÍTIOS ORAIS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA/ANTI-INFLAMATÓRIA DE TÉCNICAS E MATERIAIS ENDODÔNTICOS.

**Pesquisador:** Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 63728522.0.0000.5418

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 6.154.516

#### Apresentação do Projeto:

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

A EQUIPE DE PESQUISA citada na capa do projeto de pesquisa inclui, em ordem alfabética, exceto pesquisadora responsável, BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES (Cirurgiã Dentista, Docente da área de Endodontia da FOP-UNICAMP, Pesquisadora responsável), ANA BEATRIZ SAFADY LOPES (Cirurgiã-Dentista, Mestranda no PPG de Clínica Odontológica, Área de Endodontia, da FOP /UNICAMP), ANTONIO AIRTON LEÔNIO DE MOURA FILHO (Cirurgião-Dentista, Doutorando no PPG de Clínica Odontológica, Área de Endodontia, da FOP /UNICAMP), BIANCA CARANDINA TREVISAN (Graduanda no curso de Odontologia da FOP-UNICAMP, Aluna de IC da Área de Endodontia da FOP/UNICAMP), EDERALDO PIETRAFESA DE GODÓI JUNIOR (Cirurgião-Dentista, Doutorando no PPG

#### Situação do Parecer:

Aprovado

#### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PIRACICABA, 30 de Junho de 2023

---

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

## Anexo 3 – Iniciação Científica



### Relatório Final

#### Identificação molecular de espécies fúngicas em dentes indicados a reintervenção endodôntica pelo insucesso do tratamento endodôntico primário, ou por motivos exclusivamente protéticos

Versão enviada em 06/09/2023 11:22:52

[ver relatório](#) (../arquivos/rel\_final/AlunoCod\_30389\_1-RelFinal\_2022.pdf)

— **Parecer do(a) orientador(a) emitido em 08/09/2023 00:24:24**

Desempenho do(a) aluno(a) no projeto: O aluno Guilherme demonstrou interesse, assiduidade e dedicação no desenvolvimento de sua pesquisa. Os resultados encontrados foram bastante interessantes e mostraram que a presença de espécies fúngicas nos casos de insucesso do tratamento endodôntico. A importância de PQM e o uso de substâncias químicas auxiliares nos protocolos de reintervenção endodôntica devem ser reforçados. Além disso a MIC foi eficiente em manter a descontaminação promovida pelo PQM.

Desempenho acadêmico do(a) aluno(a): O bom desempenho na execução da pesquisa do aluno também refletiu na clínica de endodontia, mostrando mais segurança no atendimento dos pacientes como também no aprendizado da filosofia do tratamento endodôntico. O mesmo pretende fazer especialização em Endodontia, o que demonstra o quanto o estágio foi importante na sua formação acadêmica.

— **Parecer do(a) Assessor(a) dado em 05/12/2023 21:38:35**

O relatório encontra-se bem estruturado e organizado. A pesquisa apresentou metodologia detalhada e clara, bem como os objetivos propostos foram alcançados. Quanto à formatação, algumas considerações: Página 4 – Nome dos meses (quadro) encontra-se quebrado devido à presença de espaço no início do nome de cada mês Páginas 5 e 6 – Alguns trechos encontram-se com tempo verbal no futuro (estudo já aconteceu) Página 7 – Na imagem apresentada, o correto seria "Figura" ao invés de "Quadro" Página 11 – Há palavras sem acento no texto da conclusão.

● **Aprovado**



### Relatório Final

Aluno(a)	Projeto	Prazo	Situação
Guilherme Augusto Albuquerque De Sousa	Identificação molecular de espécies fúngicas em dentes indicados a reintervenção endodôntica pelo insucesso do tratamento endodôntico primário, ou por motivos exclusivamente protéticos	05/12/2023	● <b>Aprovado</b>
Lara de Carvalho Tarlá	Prevalência de complexos microbianos vermelho e laranja em lesões endo-periodontais com polpa vital	11/12/2023	● <b>Aprovado</b>
Bianca Carandina Trevisan	Contaminação tripla de microrganismos em túbulos dentinários e análise de métodos de desinfecção atuais utilizando diferentes irrigantes: estudo in vitro	05/12/2023	● <b>Aprovado</b>
Júlia Nicoletti Guimarães	EFICÁCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE LPS, LTA E SUBSTANCIA P DE DENTES COM INFECÇÃO ENDODÔNTICA PRIMÁRIA	10/10/2023	● <b>Aprovado</b>