

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

SHEYLA FERRAZ GUEIROS

Microrganismos Isolados de Ápice e lesão perirradicular de dentes tratados endodonticamente pelo método SYBR Green.

VITÓRIA

2014

SHEYLA FERRAZ GUEIROS

Microrganismos Isolados de Ápice e lesão perirradicular de dentes tratados endodonticamente pelo método SYBR Green.

Projeto de pesquisa apresentado ao Comitê de ética em Pesquisa da UFES como requisito para o desenvolvimento da dissertação a ser apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da UFES na área de concentração Endodontia

Orientador(a): Prof^a Dr^a Rosana de Souza Pereira

VITÓRIA

2014

Microrganismos Isolados de Àpice e lesão perirradicular de dentes tratados endodonticamente pelo método sybr green.

Essa dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de MESTRE EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

Vitória, 22 de dezembro de 2014.

Profa. Dra. Selva Maria Gonçalves Guerra

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rosana de Souza Pereira
Orientadora

Prof. Dr. Eudes Gondim Júnior
Membro

Prof. Dr. Francisco Carlos Ribeiro
Membro

Profa. Dra. Juliana Machado Barroso Xavier
Suplente

Citação

Agradecimento

Resumo

ABSTRACT

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO GERAL	10
2. ARTIGO (VERSÃO EM PORTUGUÊS)	16
2.1. Resumo	17
2.2. Introdução	18
2.3. Materiais e Métodos	19
2.4. Resultados	22
2.5. Discussão	25
2.6. Conclusões	28
2.7. Referências	28
3. REFERÊNCIAS GERAIS	32
ANEXO	38
APÊNDICES	42

GUEIROS SF.. **Investigação de Microrganismos Isolados de Ápice e Lesão Perirradicular de Dentes Tratados Endodonticamente Pelo Método SYBR Green.** Centro de ciências da saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

Clinical Research

Investigação de Microrganismos Isolados de Ápice e Lesão Perirradicular de Dentes Tratados Endodonticamente Pelo Método SYBR Green.

Sheyla Ferraz Gueiros, *E**, Rosana de Souza Pereira, *DDS***

Resumo (Abstract)

Introdução: O objetivo desse estudo foi investigar a presença de *Porphyromonas endodontalis*, *Enterococos faecalis* e *Actinomyces israelii* em dentes com periodontite apical pós-tratamento endodôntico pela reação de polimerase em tempo real (RT-PCR), utilizando o sistema SYBR Green. **Métodos:** Foram resseccionados 3 mm apicais de trinta raízes de dentes com insucesso do tratamento endodôntico e suas lesões perirradiculares coletados durante microcirurgia apical. As amostras foram submetidas à extração de DNA e analisadas por PCR em tempo real. **Resultados:** *Porphyromonas endodontalis* foram detectados, tanto no ápice quanto nas lesões, numa porcentagem de 10,0 % (03/30), não tendo diferença significativa entre elas $p= 0,108$. *Enterococos faecalis* foi encontrada em 05 amostras das 30 coletadas do ápice (6,6 %) e de 02 amostras das 30 da lesão (16,6 %) apresentando diferença significativa de $p=0,12$. No entanto, *Actinomyces israelii* não foi encontrado nas amostras pesquisadas. **Conclusão:** Os microrganismos *Porphyromonas endodontalis*, *Enterococos faecalis* embora tenham sido detectados em pequeno número de amostras do ápice e da lesão perirradicular de dentes com tratamento endodôntico com insucesso confirma a sua etiologia microbiológica e justifica a necessidade de novos estudos para identificar a microbiota destes casos e combatê-la.

Palavras chave: Periodontite apical, reação em cadeia da polimerase.

Key Words: Apical periodontitis, polymerase chain reaction.

2. Introdução

A eliminação dos microrganismos patogênicos e de seus subprodutos do interior do sistema de canais radiculares, bem como a manutenção da sua condição asséptica pós-operatória, é fator primordial para o sucesso da terapia endodôntica ¹(SUNDQVIST, 1981), porquanto, a permanência de células bacterianas no interior desse sistema é, ainda, um dos motivos de fracasso do tratamento endodôntico ²(NAIR, 2004).

Com a modernização das técnicas e o avanço tecnológico dos materiais utilizados na endodontia, a taxa de sucesso vem crescendo. O conhecimento da anatomia interna da raiz é de extrema importância para essa especialidade. Este conhecimento, juntamente com um diagnóstico preciso, preparação apropriada e o saneamento do sistema de canais resultarão em um tratamento endodôntico de sucesso ³(LUCKMANN, 2013).

As infecções dos sistemas de canais radiculares, infecções endodônticas, podem ser primárias, casos de necrose pulpar sem tratamento endodôntico prévio ou infecções endodônticas secundárias/persistentes, que ocorrem em casos de insucessos de tratamentos endodônticos que pode ser sintomática e assintomática ⁴(TORABINEJAD; WALTON, 2002).

Periodontite apical é uma doença inflamatória de etiologia microbiana decorrente da infecção endodôntica. O objetivo final do tratamento endodôntico é prevenir o desenvolvimento da periodontite apical ou criar condições adequadas para a cicatrização do tecido perirradicular.

O conhecimento da microbiota associada às infecções endodônticas constitui requisito fundamental para o desenvolvimento de medidas terapêuticas mais efetivas. Vários microrganismos anaeróbios estritos ou facultativos têm sido apontados como os maiores responsáveis pelas periodontites apicais, conceito comprovado pelo trabalho clássico de Kakehashi et al. (1965) em ratos *germ-free* e confirmado por estudos

subsequentes (TOMAZINHO; AVILA-CAMPOS, 2007; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS 2009).

Foi sugerido que a microbiota de dentes com canais radiculares tratados apresentando lesões perirradiculares secundárias/persistentes é composta por um grupo mais restrito de espécies microbianas em comparação com infecções primárias (SIQUEIRA JÚNIOR, RÔÇAS, 2004). Todavia, as infecções endodônticas persistentes são consideradas, recentemente, essencialmente polimicrobianas (HONG et al., 2013).

O *E. faecalis*, é um microrganismo Gram-positivo anaeróbio facultativo frequentemente encontrado em infecções endodônticas primárias com prevalência variando de 30% a 90% e em infecções secundárias/persistentes variando de 3% a 18% dos casos (RÔÇAS; SIQUEIRA JÚNIOR; SANTOS, 2004; KAYAOGU; ORSTAVIK, 2004. SCHIRMEISTER et al., 2009). No entanto, estudos recentes venham demonstrando que a prevalência de outros microrganismos como *Streptococcus*, pode ser maior que do que a de *E. faecalis* (RÔÇAS; SIQUEIRA JÚNIOR, 2012).

Um microrganismo comum da cavidade oral, causador das infecções actinomicóticas, *Actinomyces israelii*, foi também isolado de infecções persistentes de dentes tratados endodonticamente. Por análise histobacteriológica e histopatológica foi verificado um caso de actinomicose extrarradicular contínua com infecção de ramificações apicais, embora o canal principal estivesse sem contaminação e radiograficamente bem tratado (RICUCCI; SIQUEIRA JÚNIOR, 2008).

Tradicionalmente, para a identificação bacteriana, têm sido utilizados métodos bacteriológicos convencionais, porém tais procedimentos são trabalhosos, caros, demorados e com limitações no que diz respeito ao diagnóstico microbiológico. A identificação dos patógenos anaeróbios, através dos citados métodos, é difícil, pois são altamente sensíveis ao oxigênio, levando-se por vezes ao tratamento empírico, com conseqüente incremento de custos, complicações iatrogênicas potenciais e aumento no padrão de resistência bacteriana (SONG, 2005; RÔÇAS et al, 2014).

Além disso, com o desenvolvimento de técnicas anaeróbicas de cultivo microbiano, o enfoque microbiológico na endodontia sofreu mudança. A microbiota

endodôntica, que antes era considerada aeróbica facultativa, demonstrou abrigar uma grande proporção de anaeróbios estritos (GOMES et al., 2004).

Atualmente, vêm sendo cada vez mais usados métodos moleculares nas pesquisas para identificação de bactérias diretamente de amostras clínicas mostrando-se rápidos, sensíveis e precisos, permitindo a detecção de microrganismos não cultiváveis. A reação em cadeia da polimerase (PCR convencional) é um método utilizado para identificar uma variedade de microrganismos, incluindo patógenos periodontais ou endodônticos (TOMAZINHO; AVILA-CAMPOS, 2007; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS 2009).

A presença de microrganismos anaeróbios estritos como *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas intermedia* e *Porphyromonas nigrescens* foi investigada em infecções endodônticas, tanto pelo método de cultura quanto pelo método molecular, mas a sua detecção ocorreu em maior proporção pelo método de PCR. *P. endodontalis* não foi detectada em infecção primária e nem em secundária quando do uso do método de cultura, mas por PCR sua prevalência foi de 28% nos casos de necrose e 22% nos casos de falha de tratamento endodôntico (GOMES, 2005). Em outro estudo, esses microrganismos anaeróbios estritos foram identificados em 33% das amostras coletadas de dentes com necrose pulpar, por meio da cultura onde o *P. endodontalis* apresentava uma prevalência de 9,1%, mas ao utilizarem o método de PCR os microrganismos foram identificados em 60% das amostras, sendo que *P. endodontalis* foi encontrado em 23,3%, demonstrando que a presença dos anaeróbios estritos parece ser frequente nas infecções endodônticas crônicas (TOMAZINHO; AVILA-CAMPOS, 2007). *P. endodontalis* foi também observado por microscopia eletrônica de varredura e análise microbiológica em amostras de tecidos periapicais e superfície de ápice radicular de dentes com periodontite apical refratária (SU et al., 2010).

As técnicas da reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR em Tempo Real ou RT-PCR) têm sido utilizadas em estudos mais recentes. Esta técnica quantifica o DNA bacteriano alvo e é mais confiável porque os produtos da reação são detectados e quantificados diretamente no equipamento, dispensando processamento posterior, minimizando, portanto, potenciais erros de análise (BUSTIN, 2000). A técnica baseia-se no monitoramento da intensidade de fluorescência originada da reação de PCR, que é

diretamente proporcional aos níveis de DNA amplificado (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Avaliando a literatura pesquisada nos deparamos com resultados divergentes apresentados por diversos autores com relação à prevalência de microrganismos e sua correlação com as infecções endodônticas dependente das metodologias utilizadas. Desta forma, nos propusemos a avaliar microrganismos frequentemente isolados de dentes com periodontite apical pós-tratamento endodôntico, tais como *P. endodontalis*, *E. faecalis* e *A. israelii*, utilizando uma técnica molecular específica, PCR em Tempo Real utilizando o sistema SYBR Green.

*Mestranda do Programa de Pós Graduação em Clínica Odontológica, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.

Departamento de Clínica odontológica, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.

** Professora e coordenadora da disciplina endodontia I do departamento de Clínica odontológica e professora clínica integrada II e II do departamento de Prótese.

Correspondência:

Rosana de Souza Pereira

Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

Av. Marechal Campus, n. 1468, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Clínica odontológica, Maruípe, Vitória, ES - Brasil

CEP: 29043-900

e-mail: rosanadesouzapereira@yahoo.com.br

Material e Métodos (Materials and Methods)

Seleção dos pacientes (Patient Selection)

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil (nº 056/11) foi obtido consentimento livre e esclarecido de 30 pacientes incluídos neste estudo, com idade entre 16 a 58 anos, média de 41 anos, (17 mulheres e 13 homens). Estes pacientes eram portadores de dente com tratamento endodôntico satisfatório, efetuados de um a 15 anos antes (média de 4 anos) mas, diagnosticados com periodontite apical crônica secundária/persistente ao exame radiográfico de acordo com os critérios estabelecidos por Torabinejad e Walton (2002). Todos os dentes apresentavam-se com ausência de sintomatologia e restaurados coronalmente sem evidência de exposição à cavidade oral do material obturador endodôntico. Não foram arrolados neste estudo pacientes que receberam terapia antibiótica nos três meses anteriores à coleta das amostras, dentes com periodontites apicais crônicas primárias, lesões endoperiodontais, dentes portadores de fraturas radiculares longitudinais e bolsas periodontais maiores que 3 mm.

Coleta das amostras (Collection of samples)

As amostras foram coletadas após acesso cirúrgico durante cirurgia apical, com o uso de microscópio operatório DFVasconcellos, (DFV, São Paulo). Após assepsia do campo operatório com solução de iodo-povidine a 7,5% e aplicação de anestesia local (), foi feita incisão, levantamento de retalho e acesso ao ápice radicular com baixa rotação equipada com broca esférica carbide-tungstênio sob aplicação de solução salina fosfatada tamponada, estéril (PBS com ph de 7,4) para resfriamento. Realizada a curetagem da lesão periapical e a exposição do ápice, 3 mm apicais da raiz foram

resseccionados perpendicularmente ao longo eixo do dente com uma broca cônica diamantada em alta rotação sob refrigeração com PBS esterilizado. Tanto as amostras dos ápices quanto das lesões periapicais foram transferidas para um tubo plástico com 200 µl de tampão TE (INVITROGEN) e mantidas a -80°C até o momento do uso. Foram divididas em: GRUPO I, composto por 30 amostras de ápices radiculares removidos durante apicetomia e GRUPO II, composto por 30 amostras coletadas do interior das lesões periapicais curetadas durante a cirurgia.

Procedimentos Laboratoriais (Laboratory Procedures)

Preparo das amostras para a extração do DNA bacteriano (Sample preparation for extraction of bacterial DNA)

As amostras dos ápices radiculares foram maceradas em placas de Petri estéreis, com a utilização de alicates de ortodontia esterilizados e, posteriormente, transferidas para tubos de plástico, para proceder à extração do DNA bacteriano. Da mesma forma, procedeu-se com as amostras coletadas das lesões periapicais, tecido mole.

Extração do DNA bacteriano (Extração do DNA bacteriano)

O DNA bacteriano das amostras foi extraído utilizando-se o EASY – DNA™ Kit (INVITROGEN) de acordo com o fabricante, sendo mantido a -20 °C até o momento de uso. A concentração e pureza do DNA das amostras foram determinadas por espectrofotômetro (NANODROP 2000c SPECTROPHOTOMETER, THERMO SCIENTIFIC, Bancroft Building, Wilmington, USA) utilizando o Software Nanodrop 2000/2000c Thermoscientific © 2009 - Thermo Sicher Scientific Inc.

Determinação Quantitativa por RT-PCR (Quantitative determination by RT-PCR)

Foi utilizado o sistema SYBR Green onde o volume final de cada reação foi de 20 µl contendo, para cada amostra, 10 µl do reagente SYBR Green Master Mix (PROMEGA, Madison, WI. USA), 7,1 µl de H₂O ultrapura (Nuclease-Free Water, ref. P119E – PROMEGA), 0,45 µl de primer forward e 0,45 µl de reverse, específicos para

cada microrganismo (sendo 100 µM de cada primer e 02 ng de µl de DNA de cada microrganismo). DNA de *Pendodontalis* (ATCC 35406), *E faecalis* (ATCC 33277), *A israeli* (ATCC 12102) foram usados como controles positivos e para obtenção das curvas-padrão. Como controle negativo foi utilizado água ultrapura esterilizada. As respectivas amplificações do DNA foram realizadas em termociclador Rotor Gene 1.7.87 (CORBETT LIFE SCIENCE, Mort Lake, New South Wales, Australia), utilizando-se o programa ROTOR GENE 6000 Software Analytical. Os primers específicos são mencionados na Tabela 1. As condições usadas na reação de PCR em tempo real (RT-PCR), para cada microrganismo estão contidas na Tabela 2

Tabela 1. Microrganismos e primers usados na reação de PCR em tempo real (RT-PCR).

Microrganismos	Sequência (5'- 3')	Amplicon (bp)	Referências
<i>P endodontalis</i> (ATCC 35406)	GCT GCA GCT CAA CTG TAG TCTTG TCA GTG TCA GAC GGA GCC TAG TAC	10	Bedran et al (2012)
<i>E faecalis</i> (ATCC 29212)	CGC TTC TTT CCT CCC GAGT GCC ATG CGG CAT AAA CTG	43	Williams et al. (2006)
<i>A israelii</i> (ATCC 12102)	TGAGTAACACGTGAGTAACC CCAAAAACACCACAAAAGTG	125	Jauh-Hsun et al (1999)

Tabela 2. Microrganismos e condições usados na reação de PCR em tempo real (RT-PCR)

Microrganismo	ciclagem	°C	tempo
<i>P. endodontalis</i> (ATCC 35406)	1 Hold	95°C	10min
	40 ciclos	95°C	15 seg
		60°C	6oseg
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	1 Hold	95°C	10min
	40 ciclos	95°C	15 seg
		60°C	6oseg
<i>A. israelii</i> (ATCC 12102)	1 Hold	95°C	10min
	40 ciclos	95°C	15 seg
		60°C	6oseg

MELTING RAMP 60°C (temperatura de anelamento usada)

5. Discussão

Os estudos de bactérias em culturas líquida e sólida são os mais utilizados em pesquisas microbiológicas, no entanto, este tipo de estudo que considera as bactérias em sua forma planctônica, não é capaz de demonstrar a atuação delas em comunidade, ou seja, quando são estudadas isoladamente não evidenciam a forma de vida em associações com outras bactérias formando biofilmes (PARSEK, 2004). Assim, muitos estudos sobre microrganismos patógenos endodônticos revelam somente a sua presença na comunidade bacteriana e não sua real participação na patogenia da doença (SIQUEIRA JUNIOR; ROÇAS, 2009).

Do mesmo modo, métodos moleculares têm sido utilizados para detectar microrganismos que são impossíveis ou difíceis de serem detectados em cultura. Contudo, são inábeis para diferenciar microrganismos mortos e vivos, especialmente na presença de biofilmes, porquanto o DNA extracelular, como parte de substâncias poliméricas dos biofilmes pode ser detectado por PCR (TENNERT et al., 2014). Desta forma, nos métodos moleculares a identificação do microrganismo determina a mera presença do DNA específico e não o microrganismo viável (SIQUEIRA JUNIOR; RÔÇAS, 2005). Como o DNA bacteriano pode permanecer PCR-detectável por tempo acima de um ano após a morte da célula *in vitro*, esses métodos podem superestimar a carga bacteriana atual (YOUNG et al., 2007).

No entanto, PCR é um teste molecular frequentemente utilizado em diagnóstico e pesquisa na endodontia. É um método *in vitro* para a replicação de sequências específicas de DNA, podendo ser usado a partir de uma quantidade muito reduzida de DNA, ou só de uma célula bacteriana (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Com base nisto, é um método indicado para investigação de microrganismos em infecções de dentes tratados

endodonticamente por detectar o pequeno número de microrganismos presentes nesses casos. Isto se explica devido ao pequeno compartimento apresentado nos canais obturados, para desenvolvimento e estabelecimento dos microrganismos e a baixa viabilidade de nutrientes essenciais para a sua sobrevivência (ALVES; SIQUEIRA JÚNIOR; CARMO, 2009).

Mais modernamente, tem sido utilizado PCR em tempo real (RT-PCR) que é uma evolução da PCR convencional. Apresenta maior reprodutibilidade, sensibilidade e precisão comparadas à PCR convencional, além de reproduzir resultados quantitativos, enquanto o convencional, resultados qualitativos (SIQUEIRA et al., 2001). As vantagens da RT-PCR incluem a rapidez do ensaio, a habilidade de quantificar e identificar diretamente sem o uso do gel de agarose e o fato de que a contaminação dos ácidos nucleicos é limitada por causa da anulação da manipulação pós-amplificação (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS, 2005).

A superioridade da PCR sobre o método de cultura foi demonstrada por vários autores que em estudos sobre infecção endodôntica em dentes necrosados ou com falhas do tratamento endodôntico, portadores de anaeróbios estritos, encontraram resultados superiores quando do uso da PCR (GOMES et al., 2005; TOMAZINHO; AVILA-CAMPOS, 2007). *P. endodontalis*, em teste de cultura, não foi detectada em infecção primária e nem secundária, mas quando aplicado o teste da PCR sua prevalência foi de 14/50 (28%) nos casos de necrose e 11/50 (22%) quando da falha de tratamento endodôntico (GOMES et al., 2005). Em estudo semelhante *P. endodontalis* foi encontrado em 9,1% das amostras de dentes com infecção primária assintomática quando foi utilizado a cultura e em 23,3% quando utilizado a PCR (TOMAZINHO; AVILA-CAMPOS, 2007).

Oliveira et al. (2000), partindo do princípio de que *P. endodontalis* tem sido isolado principalmente de dentes com infecções endodônticas sintomáticas fez um comparativo de sua ocorrência em infecções sintomáticas e assintomáticas, utilizando a PCR convencional. Em amostras obtidas de 43 dentes com necrose, *P. endodontalis* foi identificado em 17, resultando em uma porcentagem de 39,5%. Esteve presente em 4 dos 6 casos (66,7%) de abscesso dento alveolar agudo e em 13 dos outros 37 casos (33,1%).

Siqueira et al. (2001) utilizando PCR convencional, detectaram *P. endodontalis* (37%), *P. nigrescens* (11%), *P. gingivalis* (8%) e *P. intermedia* (7,4) em dentes com periodontites apicais primárias. Nesse estudo, a espécie *P. endodontalis* foi mencionada como a mais prevalente e a *P. intermedia* com a de menor prevalência. Diferentemente, estudo realizado por Tomazinho (2007), demonstrou a prevalência de *P. gingivalis* e *P. nigrescens*, em torno de 26%, sendo a *P. endodontalis* considerada a de menor prevalência, com 14%.

Ao compararmos os estudos que investigaram a presença de *P. endodontalis* em dentes com periodontites apicais observamos que existe certa discrepância nos resultados obtidos, mas, tem sido observado que a prevalência deste microrganismo é maior nos casos de periodontites apicais primárias e principalmente nas sintomáticas. No entanto, este microrganismo está presente também nas periodontites apicais pós-tratamento endodôntico, isto é, nas periodontites apicais secundárias/persistentes. No presente estudo, que avaliou dentes com insucesso do tratamento endodôntico assintomáticos, foi encontrado numa prevalência de 10% das amostras obtidas tanto do ápice radicular quanto da lesão periapical.

A coleta de amostras de microrganismos de dentes com infecções endodônticas é comumente realizada com metodologias utilizando limas ou pontas de papel absorvente introduzidas no canal principal até a sua porção apical. Assim, é feita uma coleta de microrganismos presentes em toda a extensão do canal radicular, não as diferenciando por localização, isto é, se no terço cervical, médio e apical. Por conseguinte estas metodologias não têm a capacidade de atingir bactérias localizadas em áreas distantes do canal principal, incluindo aquelas presentes em profundidade dentro dos túbulos dentinários, canais laterais, ramificações apicais e istmos (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS, 2004). Recentemente, estudos estão sendo realizados usando uma metodologia diferente onde é feita a remoção do terço apical e a sua pulverização, obtendo como amostra o conteúdo pulverizado de todo o sistema de canais radiculares deste terço para análise (ALVES; SIQUEIRA JÚNIOR; CARMO, 2009; SIQUEIRA JÚNIOR; ALVES; RÔÇAS, 2011). Nesta direção, em nosso estudo, foi feita uma trituração dos 3 mm apicais do ápice radicular resseccionado,

com alicate de ortodontia e da mesma forma foi macerada a amostra da lesão periapical circunjacente.

Achados tem sugerido que os microrganismos podem sobreviver fora dos sistemas de canais radiculares, na superfície radiculares e ou no âmago das lesões perirradiculares de dentes obturados endodonticamente, assintomáticos (NOGUCHI, 2005; LIN; SELA; SPRECHER, 2007; SU, 2010; SIGNORETTI, 2011; WANG, 2012). Porém alguns trabalhos são concordantes em afirmar que existe uma baixa prevalência de biofilmes extrarradiculares associados com periodontite apical em dentes portadores ou não de tratamentos endodônticos (RICUCCI et al., 2009; RICUCCI; SIQUEIRA JÚNIOR, 2010). Em nossa pesquisa encontramos tanto *P. endodontalis* quanto *E. faecalis* nas lesões periapicais, numa pequena concentração, confirmando que podemos encontrar microrganismos dentro das lesões periapicais de dentes tratados endodonticamente.

E. faecalis, microrganismo anaeróbio facultativo Gram positivo, capaz de sobreviver em condições extremas e é frequentemente encontrado em canais obturados, exibindo sinais de periodontite crônica apical. Siqueira e Roças (2004), comparando resultados de estudos anteriores, observou que o *E. faecalis* foi frequentemente encontrado, com prevalências de 29% a 77 % em infecções endodônticas secundária/persistente : Moller (1966) -29%, Sundqvist et al (1998) 38%, Peciulienė et al (2001) 64%, Rôças (2004)64% ,Siqueira e Rôças (2004) 77%.

Em investigação pela PCR a prevalência de microrganismo em quatorze dentes com insucesso no tratamento endodôntico numa população Sul Coreana, Rôças et al. (2004) detectaram *E. faecalis* em 64% das amostras, seguido por *streptococcus spp* (21%).

Subramanian e Mickel (2009), detectaram de forma mais consistente, uma maior quantidade de bactérias nas amostras de ponta raízes comparada com as amostras das lesões periradiculares, onde 34 pares de amostras foram analisadas em PCR.

Enterococcus faecalis foi o mais prevalente em ambas as amostras e mais observado em tecido duro do periápice, corroborando com nosso estudo.

Em estudo feito em alemães usando em ensaios de hibridização checkerboard captura reversa para avaliara 28 espécies bacterianas e a PCR para detectar *E. faecalis* em dentes que apresentavam periodontite apical secundária /persistente , observaram que o *streptococcus* spp estava presente em 8/17 casos(47%) o *E.faecalis* com o uso de sonda específica apresentou-se em 18 dos 17casos (47%). Os autores concluíram que o *E. faecalis* esteve presente, mas não se pode afirmar que foi a espécie dominante (RÔÇAS ; HÜLSMANN; SIQUEIRA JÚNIOR, 2008).

Sakamoto et al. (2008), analisaram por PCR , 9 dentes que foram indicados para retratamento endodôntico apresentando leão periapical e observaram uma alta variabilidade interindividual na composição da microbiota bacteriana. Os filotipos não cultiváveis compuseram uma fração significativa da microbiota, pois representaram 50% do numero total de clones sequenciados. *E. faecalis* foi encontrados em somente 2 dos 9 casos analisados e em nenhum deles foi o microrganismo dominante.

O *Streptococcus* e *E. faecalis* em um estudo da PCR SYBR Green e hibridização checkerboard captura reversa foram analisados e todas as amostras deram positividade para presença de microrganismo nos dois métodos de análises e nenhum deles foram a espécie mais dominante. O *Streptococcus* 41% e *E. faecalis* 38% do total da contagem bactérias com canais em dentes tratados. Desta forma foi levantado um questionamento se o e *E. faecalis* seria o principal patógeno em casos de periodontite apical pós tratamento endodôntico e reforçaram o papel do *Streptococcus* como uma nova espécie patogena em casos de infecção secundária /persistente. (RÔÇAS; SIQUEIRA JUNIOR , 2012.). Siqueira Junior (2014), em revisão literária tem sugerido a necessidade de novos estudos pois alguns achados atuais tem demonstrados que *E. faecalis* não é a espécie dominante na maioria dos casos de retratamento.

Segundo alguns autores, os biofilmes bacterianos são mais observados na parte apical do sistema de canais radiculares e são encontrados em cerca de 80% em dentes com lesões endodônticas persistentes (ARNOLD; RICUCCI; SIQUEIRA, 2013). Em

estudo histopatológico e histobacteriológico de 106 ápices de dentes com infecção periapical (42 tratados e 64 não tratados), observou-se mais de uma espécie envolvidas no biofilme, 77% no terço apical, sendo 80% de canais não tratados e 74% em canais tratados (RICUCCI, 2010).

Rôças et al.,(2010) analisando dezessete dentes com lesão periapical aderida, em método de hibridização checkerboard captura reversa, detectaram microrganismos nos segmentos apical e médio/coronal, variando o número de 1-25 (média de 8) no terço apical e 1-18 9 (média de 5) no terço médio/ coronal. O *P endodontalis* esteve frequente no terço apical e no médio/coronal, com uma prevalencia de 65%%, e o *Streptococcus* foi mais prevalente no terço médio/coronal. Algumas das espécies menos prevalentes foram encontradas exclusivamente nas amostras do terço apical entre elas o *A israelii*, mostrando assim que a microbiota do terço apical é mais completa e diferente em composição quando comparada com a do terço médio/coronal.

Em estudo realizado com microscopia imunofluorescencia indireta, *A israelii* foi o microrganismo mais frequente encontrado de trinta amostras que apresentaram infecção endodôntica, 53%. (GOHEAN; PANTERA; SCHUSTER, 1990) Espécies de *Actinomyces* têm sido associadas falha de tratamento endodôntico, em estudo da PCR foi avaliada a presença de *Actinomyces israelii* em 131 amostras coletadas do conteúdo de canais radiculares infectados, aspirados de abscessos e celulite. *A. israelii* foi detectado em 31 de 131 (23,7%) amostras clínicas. Desses 14 de 52 (26,9%) eram de raiz infectada canais, 11 de 43 (25,6%) eram de abscessos e 6 de 36 (16,7%) foram associados com celulite (XIA; BAUMGARTNER, 2003).

Em 2008, Ricucci e Siqueira Jr., analisaram histobacteriológica e histologicamente um caso de Actinomicose extrarradicular que era contínua com infecção extraradicular, cujo ápice e a lesão, que estavam aderidas, foram colhidos por apicetomia e posteriormente analisados e constataram que o canal principal não estava contaminado, mas duas ramificações apicais apresentavam biofilmes densos contínuos com agregados actinomicóticos extrarradiculares. Em nosso estudo do microrganismo *A.israelii* não foi encontrado nas amostras, tanto nos ápices, tanto nas lesões.

1. 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* 1998;85:86–93
2. NAIR, P.N.R. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Bio Med* 2004;15: 348-381.
3. Luckmann G, Dorneles LC, Grando CP. Etiologia dos insucessos dos tratamentos endodônticos. *Vivências* 2013;9: 133-139.
4. Torabinejad, M.; Walton, R.E. *Endodontics: Principles and Practice*. 4 ed; Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri. 2002
5. Kakehashi S, Stanley H, Fitzgerald R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965;20:340.
6. Tomazinho LF, Avila-Campos MJ Detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in chronic endodontic infection. , *endodontalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103: 285 -8.
7. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:870–878.
8. 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;97:85–94
9. Hong BY, Lee TK, Lim SM, Chang SW, Park J, Han SH, Zhu Q, Safavi KE, Fouad AF, Kum KY.. Microbial analysis in primary and endodontic infections by using pyrosequencing. *J Endod* 2013;39: 1136-1140.

10. Rôças IN, Siqueira JF Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.*2004;30:315.
11. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15:308-20.
12. Schirrmester JF, Liebenow AL, Pelz K, Wittmer A, Serr A, Hellwig E, Al-Ahmad A. New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions. *J Endod* 2009; **35**: 169–174.
13. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. *J Clin Microbiol* 2012;50:1721–1724.
14. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Apical Actinomycosis as continuum of intraradicular and extraradicular infection: Case report and critical review on its involvement with treatment failure. *J Endod* 2008;34: 1124–1129
15. Song
16. Rôças IN, Neves MAS, Provenzano JC, Siqueira JF Jr. Susceptibility of As-yet-uncultivated and Difficult-to-culture Bacteria to Chemomechanical Procedures. *J Endod* 2014;40:33–37.
17. Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19: 71–76.
18. Gomes BPF, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiology and Immunology* 2005;20:211-215.
19. Su L, Gao Y, Yu C, Wang H, Yu Q. Surgical endodontic treatment of refractory periapical periodontitis with extraradicular biofilm. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110:641–647.
20. Bustin, SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000; 25: 169-93.
21. Novais CM, Pires-Alves M. PCR em tempo real. Uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). *Revista Biotecnologia & Desenvolvimento* 2004;33:10-13.
22. Bedran TBL, Marcantonio RAC, Spin Neto R, Mayer MPA, Grenier D, Spolidorio LC, Spolidorio DP. *Porphyromonas endodontalis* in chronic periodontitis: a

- clinical and microbiological cross-sectional study. *Journal of Oral Microbiology* 2012; 4:1-7
23. Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J. Endod* 2006; 32:715-721.
 - 24.
 25. Jauh-Hsun C, Vinh T, Davies JK, Figdor D. Molecular approaches to the differentiation of *Actinomyces species*. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14: 250–256.
 26. Pearson K. On the criterion that a given system of deviation from the possible in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *Philosophical Magazine, London, 5th Series*, 1900;50:157-175.
 - 27.
 28. Parsek MR, Fuqua C. Biofilms 2003: Emerging Themes and Challenges in Studies of Surface-Associated Microbial Life. *Journal of Bacteriology* 2004;186:4427–4440.
 29. Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K, Hellwig E, Al-Ahmad A. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod* 2014;40:670-7.
 30. Siqueira JF Jr, Jung IY, Rôças IN, Lee CY. Differences in prevalence of selected bacterial species in primary endodontic infections from two distinct geographic locations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:641–647.
 31. Young G, Turner S, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Bacterial DNA persists for extended periods after cell death. *J Endod* 2007;33: 1417-20.
 32. Alves FR, Siqueira Jr JF, Carmo FL. Bacterial community profiling of cryogenically ground samples from the apical and coronal root segments of teeth with apical periodontitis. *J endod* 2009;35:486-492.
 33. Siqueira JF Jr, Rôças IS. Molecular detection of Black-Pigmented Bacteria in infection of endodontic. *J Endod* 2001;9:563-7.
 34. Siqueira JF Jr, Rôças I S. Uncultivated Phylotypes and Newly Named Species Associated with Primary and Persistent Endodontic Infections. *J. clin. microbiol.* 2005;43:3314–19.
 35. Oliveira JCM, Siqueira JF Jr, Alves GB, Hirata Hirata , Andrade AFB. Detection of porphyromona endodontalis in infected root canals by 16S rRNA gene-directed polymerase Chain reaction. *J Endod* 2000;26:729732.

36. Siqueira JF Jr, Rôças I S. Poly merase Chain Reaction- based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:85 -94.
37. Siqueira JF Jr, Alves FRF, Rôças IN. Pyrosequencing analysis of the apical root canal microbiota. *J Endod* 2011; 37:1499-1503.
38. Noguchi N, Noiri Y, Narimatsu M, Ebisu S. Identification and localization bacteria associated with refractory endodontic pathogens. *App Environ Microbiol* 2005;71:8738-8743.
39. Lin S, Sela G, Sprecher H. Periopathogenic bacteria in persistent periapical lesions: an in vivo prospective study. *J. Periodontol* 2007;78:905-908.
40. Signoretti FGC, Endo MS, Gomes BPF, Montagner F, Tosello FB, Jacinto RC. Persistent extraradicular infection in root-filled asymptomatic human tooth: scanning electron microscopic analysis and microbial investigation after apical microsurgery. *J Endod* 2011;12:1696-1700.
41. Wang J, Jiang Y, Chen W, Zhu C, Liang J. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. *J Endod* 2012;38:954-959.
41. Ricucci D, Siqueira JF Jr, Bate AL, Ford TRP. Histologic Investigation of Root Canal-treated Teeth with Apical Periodontitis: A Retrospective Study from Twenty-four Patients. *J Endod* 2009;35:493-502.
42. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Fate of the tissue in lateral canals and apical ramifications in response to pathologic conditions and treatment procedures. *J Endod* 2010;36:1-15.
43. Subramanian K.; Mickel, AK. Molecular Analysis of Persistent Periradicular Lesions and Root Ends Reveals a Diverse Microbial Profile. *J. endod* 2009;35:950 - 957.
44. Rôças IN, Hülsmann M, Siqueira Jr JF. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *J Endod* 2008;34:926-931.
45. Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. molecular analysis of the root canal microbiota associated treatment failures. *J Clin Microbiol Immunol* 2008; 23:275-281.
46. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Present status and future directions in endodontic microbiology. *Endodontic Topics* 2014;30:3-22
47. Arnold M, Ricucci D, Siqueira JF Jr. Infection in a complex network of apical ramifications as the cause of persistent apical periodontitis: a case report. *J Endod*

- 2013;39:1179–1184.
48. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Fate of the tissue in lateral canals and apical ramifications in response to pathologic conditions and treatment procedures J Endod 2010; 36:1–15.
 49. Rôças IN, Alves FR F, Santos AL, Rosado AS, Siqueira JF Jr. Apical root canal microbiota as determined by reverse-capture checkerboard analysis of cryogenically ground root samples from teeth with apical periodontitis. J. Endod 2010; 36:1617-1621.
 50. Gohen JR, Pantera AE Jr, Schuster GS. Indirect immunofluorescence microscopy for the identification of *Actinomyces* sp. In endodontic disease. J Endod 1990;16:318-322.
 51. Xia T, Baumgartner JC. Occurrence of *Actinomyces* in Infections of Endodontic Origin. J Endod 2003;29:548-552.
 52. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. J Clin Microbiol 2008;46:3599-3606.
 53. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of enterococcus faecalis: Relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med 2004;15:308-320.
 54. Osbek SM, Osbek A, Erdogan AS. Analysis of Enterococcus Faecalis in samples from turkish patients with primary endodontic infections and failed endodontic treatment by real-time PCR SYBR green method. J Appl Oral Sci 2009;17:370-4.
 55. Gomes BPFA, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin in primary and secondary endodontic infections J. endod 2012;38:1082-1086.
 56. Fujii R, Saito Y, Nakagawa KI, Okuda K, Ishihara K. Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol 2009; 24:502-505.
 - 57.

Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, et al. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:275–81.

Xia T, Baumgartner JC. Occurrence of *Actinomyces* in Infections of Endodontic Origin. *J Endod* 2003;29:548-552.

Peciuline V, Reynauld AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J*. 2001; 34: 429-34.

Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF Jr. Exuberant biofilm infection in a lateral canal as the cause of short-term endodontic treatment failure: report of a case. *J Endod* 2013; **39**: 712–718.

184. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Fate of the tissue in lateral canals and apical ramifications in response to pathologic conditions and treatment procedures *J Endod* 2010; **36**: 1–15.

185. Arnold M, Ricucci D, Siqueira JF Jr. Infection in a complex network of apical ramifications as the cause of persistent apical periodontitis: a case report. *J Endod* 2013; **39**: 1179–1184.

186. Vieira AR, Siqueira JF

Ricucci D, Siqueira JF Jr. Anatomic and microbiologic challenges to achieving success with endodontic treatment: a case report. *J Endod* 2008; **34**: 1249–1254.

Rôças IN, Siqueira JF Jr. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 3599–3606.

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa intitulada **Avaliação Quantitativa de Microrganismos em Ápices Radiculares e em Infecções Periapicais Crônicas Persistentes**, pois após exame de odontológico foi diagnosticado lesão que não regrediu após o tratamento de canal convencional ao qual o sr.(a) foi submetido(a).

Conforme já conversado, a seguindo-se critérios que o(a) sr.(a) se enquadra, realizar-se-á um procedimento denominado cirurgia pararendodôntica, quando se secciona alguns milímetros do ápice do dente acometido e remove-se a lesão em volta dessa raiz, permitindo, assim, a cicatrização.

Justificativa: como um ou vários microrganismos causam e mantêm essas lesões que não conseguiram ser curadas pelo tratamento de canal convencional, é muito importante que se

realize um estudo a fim de avaliar espécies de bactérias envolvidas neste processo que acomete várias pessoas.

Objetivos: esta pesquisa tem como objetivo identificar e contar algumas espécies de bactérias que podem estar envolvidas com essas lesões, oferecendo maior embasamento de como esse processo acontece no corpo humano.

Procedimentos: após o seu aceite em participar deste estudo, em data a ser definida pelo Cirurgião Dentista que lhe atende, a cirurgia parodontológica será realizada normalmente. A diferença é que participando desta pesquisa, alguns milímetros do ápice do dente doente e a lesão envolta da raiz desse dente serão submetidos, após a cirurgia, a estudos específicos em laboratórios de Microbiologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e da Universidade de São Paulo (USP) para avaliar bactérias que podem estar envolvidas no seu caso.

Benefícios: ao participar desta pesquisa, o voluntário estará auxiliando outros pacientes que tenham ou venham a ter a doença, oferecendo um melhor tratamento para essas lesões.

Desconfortos e/ou riscos esperados: os desconfortos e/ou então os riscos deste procedimento serão os mesmos de qualquer outra cirurgia parodontológica, ou seja, nesse aspecto, é indiferente de um paciente que participou de outro que não participou da cirurgia. O que muda será justamente o estudo do que será coletado.

Retirada do consentimento: O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, deixando de participar do estudo. O(a) sr.(a) pode decidir não participar deste estudo, sem que nenhum prejuízo decorra desta decisão.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento onde consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal e do Comitê de Ética que aprovou a pesquisa, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Endereço e Telefone do Pesquisador principal (Pfa. Dra. Rosana de Souza Pereira):

Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Clínica Odontológica.

Avenida Marechal Campos, 1468 - Campus de Maruípe (anexo ao Hospital das Clínicas), Bairro de Lourdes - Vitória, ES – Brasil

Telefone: (27) 3335-7228

Endereço e telefone do Comitê de Ética da UFES:

Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde

Avenida Marechal Campos, 1468 - Campus de Maruípe (anexo ao Hospital das Clínicas),
Bairro de Lourdes - Vitória, ES – Brasil
Telefone: (27) 3335-7211

Professora Doutora Rosana de Souza Pereira – Pesquisador Principal

Eu, _____, declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Identidade e CPF do voluntário:

Assinatura do Voluntário

Vitória, de de 2011

