



TIAGO PEREIRA DA ROSA

**“PREVALENCE OF *TREPONEMA* SPP. IN ENDODONTIC
RETREATMENT-RESISTANT APICAL PERIODONTITIS.”**

**“*PREVALÊNCIA DE TREPONEMA SPP. EM LESÕES
PERIAPICAIS ASSOCIADAS AO INSUCESSO DO
RETRATAMENTO ENDODÔNTICO.*”**

Piracicaba
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

TIAGO PEREIRA DA ROSA

**“PREVALENCE OF *TREPONEMA SPP.* IN ENDODONTIC
RETREATMENT-RESISTANT APICAL PERIODONTITIS.”**

Orientador: Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto

Co-orientadora: Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

**“PREVALÊNCIA DE *TREPONEMA SPP.* EM LESÕES PERIAPICAIS
ASSOCIADAS AO INSUCESSO DO RETRATAMENTO
ENDODÔNTICO.”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica na área de Endodontia.

Masters thesis presented to the Dental Clinic Postgraduation Programme of the Piracicaba Dental School of the University of Campinas to obtain the MSc grade in Dental Clinic in Endodontics.

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluno Tiago Pereira da Rosa, e orientada pelo Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto.

Assinatura do Orientador

A handwritten signature in black ink, appearing to read "R. Jacinto", is written over a horizontal line. A vertical line extends downwards from the end of the signature.

PIRACICABA
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

R71p Rosa, Tiago Pereira da, 1984-
Prevalência de *Treponema* spp. em lesões periapicais associadas ao insucesso do retratamento endodôntico / Tiago Pereira da Rosa. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Rogério de Castilho Jacinto.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. 2. Microbiologia. 3. Biologia molecular. 4. Espiroqueta. I. Jacinto, Rogerio de Castilho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Prevalence of *Treponema* spp. in endodontic retreatment-resistant apical periodontitis

Palavras-chave em Inglês:

Endodontics
Microbiology
Molecular biology
Spirochaeta

Área de concentração: Endodontia

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

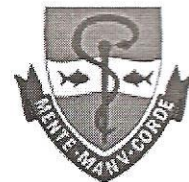
Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes
Francisco Montagner
Rafael Nobrega Stipp

Data da defesa: 27-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2013, considerou o candidato TIAGO PEREIRA DA ROSA aprovado.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "BPA", written above a horizontal line.

Profa. Dra. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "F. Montagner", written above a horizontal line.

Prof. Dr. FRANCISCO MONTAGNER

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Rafael Nobrega Stipp", written above a horizontal line.

Prof. Dr. RAFAEL NOBREGA STIPP

Dedico esta conquista especialmente aos meus pais, **Arlete e Pedro**, pelos anos de incentivo e por seu amor incondicional. Obrigado por sua dedicação, apoio e por me ensinar valores como honestidade, perseverança, responsabilidade, humildade, respeito e tolerância. Admiro e amo muito vocês!

Aos meus irmãos, **Maurício e Daniel**, certos laços são mais fortes que a distância.

Deus foi generoso comigo ao me colocar em uma família tão maravilhosa, amo todos vocês!

Dedico também aos meus demais familiares, agregadas, amigos, professores e mestres, pelo imenso carinho e apoio.

*"Saudade é um sentimento que quando não cabe no coração,
escorre pelos olhos."*

Bob Marley

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Deus por tudo, sempre!

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do diretor **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior** e do diretor associado **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**.

À **Profª. Drª. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, coordenadora geral dos cursos de Pós-Graduação e ao **Prof. Dr. Márcio de Moraes**, coordenador do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto** pela grande oportunidade de aprendizado, pelos ensinamentos transmitidos, pelos conselhos e ajudas nas tomadas de decisão. Obrigado por sua dedicação, respeito e confiança dedicados a mim.

À minha co-orientadora **Profª. Drª. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes** pelo carinho, atenção, apoio, confiança, por seus ensinamentos e pelas oportunidades. Obrigado pelas conversas e conselhos, a senhora é para mim um grande exemplo de dinamismo e dedicação ao trabalho.

Aos professores da disciplina de Endodontia, **Prof. Dr. Francisco José de Souza-Filho**, **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**, **Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz** e **Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida**, conhecer e conviver com cada um de vocês tem sido um privilégio. A nossa convivência me proporcionou momentos de muita alegria e amadurecimento pessoal e profissional.

Ao amigo **Prof. Dr. Rafael Nóbrega Stipp** da Área de Microbiologia e Imunologia pela convivência e disposição com que me auxiliou em diversos momentos deste e de outros trabalhos. Sua dedicação à pesquisa e sua humildade são exemplos para mim. Agradeço por sua amizade, respeito e por sua contribuição preciosa à minha formação.

Aos professores examinadores da banca de qualificação: **Dr^a. Vanessa Bellocchio Berber Haddad, Dr. Frederico Canato Martinho, Dr^a. Érika Nikitza Shiauha Harth Chu** e à professora suplente **Dr^a. Adriana de Jesus Soares**. Agradeço por aceitarem tão prontamente o convite para participar da banca e por suas colaborações para este trabalho.

Aos professores examinadores da banca de defesa: **Dr^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, minha co-orientadora, **Dr. Francisco Montagner, Dr. Rafael Nobrega Stipp** e aos professores suplentes **Dr. Caio Cezar Randi Ferraz** e **Dr^a. Vanessa Bellocchio Berber Haddad**. Agradeço por aceitarem tão prontamente o convite para participar da banca e por suas colaborações para este trabalho.

Aos professores **Dr. Braulio Pasternak Jr., Dr^a. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro, Dr. Ricardo Ferreira** por sua amizade, seus ensinamentos e por sua admirável dedicação a docência. Seu exemplo serve de incentivo para dar continuidade à vida acadêmica. Aos professores **César Augusto Pereira Oliveira** e **Guy Martins Pereira** do curso de especialização em endodontia da EAP/SC por sua amizade, auxílio e pelo conhecimento repassado durante os dois anos de curso.

Aos meus amigos e amigas da pós-graduação, **Ana Carolina Pimentel, Ana Mascarenhas, Aniele Lacerda, Ariane Marinho, Carlos Augusto Pantoja, Carolina Santos, Cláudia Suzuki, Cimara Brum, Érika Clavijo, Daniel Herrera, Daniela Miyagaki, Emmanuel João da Silva, Fernanda Lins, Fernanda Signoretti, Francisco Montagner, Frederico Martinho, Giselle Abi Rached,**

Jefferson Marion, Juliana Nagata, Karine Schell, Letícia Nóbrega, Maira do Prado, Marcos Endo, Maria Raquel Monteiro, Thais Mageste Duque e Thiago Farias por compartilhar de sua alegria, companheirismo, amizade e experiências.

As funcionárias da Endodontia da FOP/UNICAMP **Ana Cristina Godoy, Geovania Almeida, Ana Elídia, Ana Paula e Jéssica** por sua ajuda, conselhos e ensinamentos.

À todas as pessoas maravilhosas que Deus colocou em minha vida, seus sorrisos fizeram com que esse período passasse voando e se prendesse em minha memória!

Enfim, agradeço a todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, colaboraram em minha formação e crescimento enquanto profissional.

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito: Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto, hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.”

Tenzin Gyatso, 14^o Dalai Lama

RESUMO

Infecções extrarradiculares representam um obstáculo para o reparo dos tecidos apicais após o retratamento endodôntico não-cirúrgico. *Treponemas* são espiroquetas anaeróbias estritas, fastidiosas, de difícil cultivo em condições laboratoriais, que já foram encontradas em canais radiculares infectados e em abscessos apicais agudos. Este estudo investigou a presença de *T. socranskii*, *T. maltophilum*, *T. amylovorum*, *T. medium*, *T. lecithinolyticum*, *T. denticola*, *T. vicentii* e *T. pectinovorum* em lesões periapicais associadas ao insucesso do retratamento endodôntico; sua associação com as características clínicas/radiográficas; e a associação entre essas espécies. Amostras microbiológicas foram coletadas das lesões periapicais de 25 pacientes adultos encaminhados para cirurgia apical após o insucesso do retratamento endodôntico. Nested-PCR e PCR convencional foram utilizados para a detecção das espécies. Vinte e três amostras apresentaram níveis de DNA bacteriano detectáveis. *Treponemas* foram identificados em 28% (7/25) dos casos. A espécie mais frequentemente encontrada foi *T. socranskii* (6/25), seguida por *T. maltophilum* (3/25), *T. amylovorum* (3/25), *T. Lecithinolyticum* (3/25), *T. denticola* (3/25), *T. pectinovorum* (2/25) e *T. medium* (2/25). *T. vicentii* não foi detectado em nenhuma amostra. Foi encontrada uma associação estatística positiva entre *T. socranskii* e *T. denticola*, *T. maltophilum* e *T. Lecithinolyticum*. Nenhuma associação significativa foi observada entre os microrganismos pesquisados e as características clínicas e radiográficas. Conclui-se que *Treponemas* são encontrados em lesões perirradiculares de dentes com insucesso do retratamento endodôntico e podem participar da comunidade microbiana associada à manutenção do processo inflamatório nos tecidos periapicais.

Palavras-chaves: Insucesso endodôntico, Nested-PCR, *Treponema*.

ABSTRACT

Extraradicular root canal infections represent an obstacle to the resolution of the infectious process after nonsurgical endodontic retreatment. *Treponema* species, which are fastidious strict anaerobic spirochetes difficult to grow under current laboratory conditions, have been found in root canal infections and acute apical abscesses. This study investigated the presence of *Treponema* species in endodontic retreatment-resistant apical periodontitis; their association with the clinical/radiographic features; and the association between the target species. Microbial samples of periradicular lesions were collected from twenty-five adult patients referred to endodontic surgery after unsuccessful root canal retreatment. Nested-PCR and conventional PCR were used for *Treponema* detection. Twenty-three periradicular tissue samples showed detectable levels of bacterial DNA. *Treponema* species were detected in 28% (7/25) of cases. The most frequently species were *T. socranskii* (6/25) followed by *T. maltophilum* (3/25), *T. amylovorum* (3/25), *T. lecithinolyticum* (3/25), *T. denticola* (3/25), *T. pectinovorum* (2/25) and *T. medium* (2/25). *T. vicentii* was not detected in any sample. Positive statistical association was found between *T. socranskii* and *T. denticola*, *T. maltophilum* and *T. lecithinolyticum*. No association was detected between any target microorganism and the presence of clinical or radiographic features. In conclusion, *Treponema* spp. are present in periapical lesions from teeth with failure of the endodontic retreatment and can participate in the microbial communities associated with the maintenance of the inflammatory process in the apical tissues.

Key Words: Endodontic failure, Nested PCR, *Treponema*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1: Molecular Detection of Treponema spp. in Endodontic Retreatment-resistant Apical Periodontitis.....	9
CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS.....	25
APÊNDICE 1	32
APÊNDICE 2	44
ANEXO.....	45

INTRODUÇÃO

Desde que Kakehashi *et al.* (1965) demonstraram que as alterações pulpares e periapicais estão diretamente relacionadas à contaminação microbiana do sistema de canais radiculares, a endodontia tem se concentrado na busca por meios de eliminar esses microrganismos (Carrotte, 2004) e permitir o restabelecimento da saúde dos tecidos periapicais.

De uma forma geral, o tratamento de canal pode ser definido pela combinação da instrumentação mecânica do sistema de canais radiculares com o debridamento químico e preenchimento do espaço pulpar com materiais inertes (Ng *et al.* 2008a). Seu sucesso pode ser avaliado de diferentes formas por diversas perspectivas: para o paciente, por exemplo, o sucesso está relacionado à ausência de sintomas (Bender *et al.*, 1966a,b), à funcionalidade do dente (Friedman & Mor, 2004) e aos benefícios em sua qualidade de vida (Dugas *et al.*, 2002). Para os planos de saúde o sucesso inclui, geralmente, a permanência do elemento dental (Stoll *et al.*, 2005; Lumley *et al.*, 2008) e a qualidade radiográfica do preenchimento radicular (Lazarski *et al.*, 2001; Salehrabi & Rotstein, 2004). Contudo, de forma clássica, o sucesso no tratamento de canais radiculares é avaliado pela presença clínica e radiográfica dos sinais de manutenção ou reparo da saúde dos tecidos periapicais (Ng *et al.*, 2007). Algumas condições estão significativamente associadas ao melhor prognóstico do reparo periapical como: a ausência de lesão periapical; a extensão e qualidade do preenchimento radicular e; a presença de uma restauração coronária adequada (Ng *et al.* 2008a,b; Ng *et al.*, 2011).

Durante as últimas décadas diversos estudos observaram altos índices de sucesso na terapia endodôntica tanto em infecções primárias quanto em infecções secundárias (Imura *et al.*, 2007; Ng *et al.*, 2008a,b; Ng *et al.*, 2011). Embora os insucessos estejam relacionados, na maioria das vezes, a má qualidade do tratamento endodôntico (Sjögren, 1996; Sundqvist *et al.*, 1998), os

erros de procedimento, de forma geral, não comprometem o resultado do tratamento a menos que haja uma infecção concomitante (Siqueira *et al.*, 2001). Dessa forma, os principais fatores apontados como responsáveis pelos insucessos nas terapias endodônticas e consequente perpetuação das periodontites apicais estão relacionados à recontaminação ou à permanência de infectantes no interior dos canais radiculares (Nair *et al.*, 1990; Gomes *et al.*, 2004) em complexidades anatômicas como istmos, ramificações, deltas, irregularidades e os túbulos dentinários que podem dificultar o completo debridamento e desinfecção dos canais contaminados (Siqueira *et al.* 1996; Siqueira & Uzeda, 1996). Essas áreas inacessíveis podem representar nichos microbianos de longo prazo para infecções subsequentes (Appelbe & Sedgley, 2007).

Por outro lado, mesmo quando obedecidos criteriosamente os maiores padrões técnicos de tratamento, estima-se que 10% a 20% das lesões periapicais não respondem as terapias locais (Salehrabi & Rotstein, 2004; Su *et al.*, 2010). Nesses casos, um dos potenciais fatores etiológicos do insucesso pode estar relacionado ao estabelecimento de bactérias na região extrarradicular (Nair, 2006). Essas infecções não costumam ser solucionadas com facilidade pelas terapias endodônticas não-cirúrgicas e podem representar um obstáculo na resolução do processo infeccioso.

Muitos estudos têm demonstrado que bactérias podem ser encontradas aderidas a lacunas de reabsorção na superfície externa da raiz (Nair, 2006; Ricucci & Siqueira, 2010) ou serem isoladas do interior de lesões apicais (Gatti *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2004; Fujii *et al.*, 2009; Subramanian & Mickel, 2009; Signoretti *et al.* 2013). Assim, é provável que bactérias possam penetrar para além do forame apical pela própria extensão da infecção, ou como uma consequência da manipulação durante a terapia endodôntica (Baumgartner *et al.*, 1976; Baumgartner *et al.*, 1977; Gatti *et al.*, 2000).

Diversos métodos foram utilizados para avaliar a microbiota das lesões periapicais persistentes (Block *et al.*, 1976; Walton & Ardjmand, 1992; Adib *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2007; Fujii *et al.*, 2009). Embora algumas pesquisas iniciais

utilizando microscopia de luz e métodos de cultura microbiana demonstrassem uma carga microbiana insignificante ou até mesmo ausente em lesões periapicais (Block *et al.* 1976; Walton & Ardjmand, 1992), ocasionalmente, elas revelavam a presença de inúmeros microrganismos morfológicamente distintos (Hamp, 1957; Brown & Rudolph, 1957). Entretanto, por apresentarem diversas limitações tais como a utilização de amostras, metodologia e critérios de análise inadequados, esses estudos não forneciam informações relevantes sobre as comunidades bacterianas envolvidas em infecções endodônticas, sobretudo, àquelas envolvidas na permanência das lesões periapicais assintomáticas mesmo após o adequado tratamento dos canais radiculares.

Com a evolução dos meios de cultura, de técnicas de coleta e cultivo bacteriano foi possível isolar e identificar com maior eficácia as bactérias presentes nas lesões periapicais (Adib *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2007; Fujii *et al.*, 2009). Contudo, frequentemente as formas morfológicas predominantes nos estudos por microscopia não eram cultivadas devido a problemas associados a manutenção da cultura e identificação definitiva dos microrganismos (Brown & Rudolph, 1957). Numerosas possibilidades justificam as limitações do cultivo bacteriano: (1) Meios artificiais podem não conter os nutrientes específicos necessários para o crescimento de determinadas espécies; (2) o crescimento lento de alguns microrganismos pode ser inibido pelos produtos metabólicos daqueles que possuem crescimento rápido; (3) a relação ecológica de cooperação entre bactérias em biofilme possibilita a degradação de substratos complexos. Dessa forma, é possível que algumas dessas espécies sejam completamente dependentes umas das outras em seu suporte nutricional, inviabilizando seu crescimento isolado (Munson *et al.*, 2002); (4) bactérias utilizam mecanismos de comunicação de *quorum sensing* para regular um conjunto diversificado de atividades fisiológicas (Miller & Bassler, 2001), essas moléculas sinalizadoras possuem um importante papel na aquisição de hemina e na formação de biofilme (Loo *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2001). Nesse sentido, é possível que algumas bactérias não possam ser cultivadas por sua incapacidade de crescer *in vitro* na

privação dessa rede sinalizadora (Munson *et al.*, 2002); (5) Durante o processo de coleta, transporte ou no momento subsequente de cultivo e identificação há possibilidade de significativas perdas, principalmente das espécies fastidiosas, produzindo resultados falso-negativos (Gatti *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2007).

Métodos cultura-independentes baseados na análise do gene 16S rRNA vêm complementando e/ou substituindo os estudos de cultura na identificação de microrganismos (Dewhirst *et al.*, 2010). Uma vez que são independentes do controle das condições anaeróbicas durante a coleta, não requerem um meio de transporte especial ou mesmo a realização do cultivo das amostras (Gatti *et al.*, 2000), esses métodos são capazes de identificar microrganismos de difícil cultivo ou mesmo não-cultiváveis (Dewhirst *et al.*, 2010). O desenvolvimento e a popularização dessas técnicas moleculares de identificação microbiana expandiu o conhecimento sobre a composição das comunidades bacterianas da cavidade oral e vem demonstrando que a microbiota de infecções endodônticas pode ser ainda mais complexa do que antes imaginado (Gomes & Montagner, 2010; Nóbrega, 2012).

A cavidade oral é um ambiente colonizado por uma diversidade enorme de microrganismos em que estão presentes mais de 800 espécies (Siqueira & Rôças, 2010). Aproximadamente 50% dessas espécies são bactérias ainda não cultivadas e apenas uma pequena parte dessa microbiota já foi isolada de canais radiculares (Baumgartner *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2004; Nóbrega, 2012).

Estudos da diversidade bacteriana por meio da clonagem do gene 16S rRNA identificaram nas infecções de origem endodôntica microrganismos pertencentes a 6 filotipos, dentre os 11 já encontrados na cavidade oral. São eles: Firmicutes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobactéria, Spirochaetes, Bacteroidetes (Munson *et al.*, 2002; Siqueira & Rôças 2005; Nóbrega, 2012).

Treponemas são microrganismos anaeróbios estritos, espiralados, membros do filo *Spirochaetes*, um subtipo que agora se acredita ser diferente de ambas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Paster & Dewhirst, 2006). Todas as espécies do filo *Spirochaetes* identificadas na cavidade oral são

membros do gênero *Treponema*. Existem listadas atualmente no banco de dados do *Human Oral Microbiome* 49 taxa de *Treponemas* orais (Dewhirst *et al.*, 2010), contudo, as espécies melhor caracterizadas são *Treponema denticola*, *Treponema amylovorum*, *Treponema lecithinolyticum*, *Treponema maltophilum*, *Treponema medium*, *Treponema parvum*, *Treponema pectinovorum*, *Treponema socranskii* e *Treponema vicentii* (Dashper *et al.*, 2011).

A análise genotípica de algumas dessas espécies tem proporcionado uma visão única de sua virulência, adaptação hospedeira e evolução, no entanto, os mecanismos que permitem sua sobrevivência e progressão em diversas infecções crônicas e agudas na cavidade oral ainda não estão completamente elucidados (Dahle *et al.*, 2003; Dashper *et al.*, 2011).

Morfologicamente, além de uma membrana plasmática bacteriana típica rodeada por uma parede celular contendo peptidoglicanos, bactérias do filo *Spirochaetes* possuem uma membrana externa lipídica disposta em bicamada, também referida como “bainha de membrana externa” ou “*outer membrane sheath*”. No interior dessa bainha se encontra uma organela protoplasmática cilíndrica e flagelos periplasmáticos (Charon & Goldstein, 2002; Leschine *et al.* 2006), estruturas essas responsáveis por conferir mobilidade e quimiotaxia aos membros do filo. Embora essa característica não seja considerada um fator de virulência clássico, no contexto da doença periodontal ou de infecções extrarradiculares, ela pode ter um papel na sobrevivência e progressão da lesão no hospedeiro (Dashper *et al.*, 2011).

Outro fator que pode estar relacionado com a progressão das infecções crônicas por espiroquetas está na variação antigênica das moléculas de sua superfície externa. Essa heterogenicidade dificulta o reconhecimento do agente infeccioso e o permite escapar do sistema imunológico do hospedeiro. LaFond *et al.* (2003) observou essa heterogenicidade na sequência do gene *tprK* encontrado na superfície do *Treponema pallidum*. Acredita-se que os genes da família *tpr* possuem um papel central na patogênese e imunogenicidade durante as infecções sífilíticas. A expressão de novas proteínas *TprK* pode, em parte, explicar como *T.*

pallidum foge das respostas imunes intensas em um hospedeiro infectado e é capaz de re-infectar indivíduos previamente expostos. Alguns desses genes são homologos dos genes *msp* encontrados em *T. denticola* (Centurion-Lara *et al.*, 1999).

Dentre os fatores de virulência de *Treponema spp.* está incluída também sua capacidade de associação com outras espécies, o que aumenta sua patogenicidade na infecção (Fenno & McBride, 1998; Chan & McLaughlin, 2000; Dashper *et al.* 2011).

Muitas das espécies de espiroquetas são extremamente exigentes no que se refere à requisição gasosa e nutricional. Isso dificulta ou mesmo impossibilita seu cultivo e identificação fenotípica em nível de espécie (Fenno & McBride, 1998). Diante disso, os métodos moleculares têm sido a opção de escolha na identificação dessas espécies em infecções endodônticas e periodontais. A prevalência desses microrganismos parece variar conforme o tipo de infecção e a sensibilidade do método utilizado para a detecção.

Nas doenças periodontais os *Treponemas* são colonizadores tardios que habitam bolsas profundas (Kolenbrander *et al.*, 2002). A prevalência desse gênero pode chegar a 50% em biofilmes subgingivais de pacientes portadores de periodontite (Wyss *et al.*, 1996; Fenno & McBride, 1998; Chan & McLaughlin, 2000).

Rôças *et al.* (2001) ao investigar por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) a presença de patógenos periodontais do “complexo vermelho” (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*) descrito por Socransky (1998) em infecções endodônticas primárias observaram que ao menos 1 membro do complexo vermelho estava presente em 33 de 50 casos. Dentre as três bactérias analisadas, *T. denticola* foi a mais prevalente sendo encontrada em 44% dos casos, sugerindo que esses microrganismos possam também possuir um papel na patogênese das doenças perirradiculares. Da mesma forma, Gomes *et al.* (2006) identificaram a prevalência de *T. denticola* em 38% dos canais radiculares com infecção primária e 24% daqueles com infecção

secundárias, observaram também uma associação da presença dessas espécies com sinais e sintomas clínicos.

Nóbrega *et al.* (2013) ao investigar por meio do método de Nested-PCR a presença de *T. denticola*, *T. amylovorum*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. pectinovorum*, *T. socranskii*, *T. vicentii* e *T. lecithinolyticum* em 40 dentes com lesão periapical diante do insucesso do tratamento endodôntico, observaram a presença de pelo menos uma espécie de *Treponema* em 56,5% das amostras. *T. denticola* e *T. maltophilum* foram as mais prevalentes (30%). Os autores descrevem também a associação positiva ($p < 0,05$) entre *T. denticola* e *T. amylovorum*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. socranskii*; entre *T. medium* e *T. socranskii*, *T. maltophilum*; entre *T. maltophilum* e *T. socranskii*, *T. lecithinolyticum*; e uma correlação entre *T. lecithinolyticum* e presença de retentor intra-radicular ($p < 0,05$).

Alguns outros estudos avaliaram também a prevalência de espécies do gênero *Treponema* em casos de abscesso apical agudo (Baumgartner *et al.*, 2003; Siqueira & Rôças, 2004; Montagner *et al.*, 2010).

Siqueira & Rôças (2004) ao utilizar Nested-PCR para avaliar a prevalência de *Treponemas* em amostras de abscessos de origem endodôntica coletadas pela aspiração do exsudato purulento observaram que espécies de *Treponema* estavam presentes em 89% das amostras avaliadas. Montagner *et al.* (2010) utilizando o mesmo método verificou uma prevalência de 90% de espécies desse gênero no ambiente intrarradicular e 95% no ambiente extrarradicular de dentes diagnosticados com abscesso apical agudo.

Apesar de existirem trabalhos na literatura avaliando a presença de *Treponema spp.* em infecções endodônticas (Rôças *et al.*, 2001; Baumgartner *et al.*, 2003; Siqueira & Rôças, 2004; Gomes *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2007; Montagner *et al.*, 2010) pouco se sabe sobre o seu papel nos insucessos endodônticos e sua presença no ambiente extrarradicular de lesões periapicais persistentes. Uma vez que essas bactérias possuem fatores de virulência responsáveis por sua sobrevivência e progressão em diversas infecções crônicas

e agudas na cavidade oral (Dashper *et al.*, 2011), é possível questionar se bactérias do gênero *Treponema* podem se instalar no ambiente extrarradicular e permanecer além do alcance dos tratamentos endodônticos não-cirúrgicos, representando assim, um potencial obstáculo para o reparo dos tecidos apicais.

A caracterização do perfil bacteriano de lesões persistentes é essencial para a melhor compreensão dos insucessos em endodontia. Essas espécies podem estar associadas ao insucesso do retratamento endodôntico exercendo um papel importante nas periodontites apicais persistentes. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi investigar a presença de *T. socranskii*, *T. maltophilum*, *T. amylovorum*, *T. medium*, *T. lecithinolyticum*, *T. denticola*, *T. vicentii* e *T. pectinovorum* no ambiente extrarradicular de lesões periapicais que não regrediram mesmo após o retratamento endodôntico, identificar possíveis associações entre as espécies e/ou entre uma determinada espécie e as características clínicas e radiográficas.

CAPÍTULO 1

Molecular Detection of *Treponema* spp. in Endodontic Retreatment-resistant Apical Periodontitis.

Abstract

Introduction: Extraradicular root canal infections represent an obstacle to the resolution of the infectious process after nonsurgical endodontic retreatment. *Treponema* species, which are fastidious strict anaerobic spirochetes difficult to grow under current laboratory conditions, have been found in root canal infections and acute apical abscesses. This study investigated the presence of *Treponema* species in endodontic retreatment-resistant apical periodontitis; their association with the clinical/radiographic features; and the association between the target species. **Methods:** Microbial samples of periradicular lesions were collected from twenty-five adult patients referred to endodontic surgery after unsuccessful root canal retreatment. Nested-PCR and conventional PCR were used for *Treponema* detection. **Results:** Twenty-three periradicular tissue samples showed detectable levels of bacterial DNA. *Treponema* species were detected in 28% (7/25) of cases. The most frequently species were *T. socranskii* (6/25) followed by *T. maltophilum* (3/25), *T. amylovorum* (3/25), *T. lecithinolyticum* (3/25), *T. denticola* (3/25), *T. pectinovorum* (2/25) and *T. medium* (2/25). *T. vicentii* was not detected in any sample. Positive statistical association was found between *T. socranskii* and *T. denticola*, *T. maltophilum* and *T. lecithinolyticum*. No association was detected between any target microorganism and the presence of clinical or radiographic features. **Conclusion:** *Treponema* spp. are present in periapical lesions from teeth with failure of the endodontic retreatment and can participate in the microbial communities associated with the maintenance of the inflammatory process in the apical tissues.

Key Words: Endodontic failure, Nested PCR, *Treponema*.

Introduction

Endodontic treatment failures are related, generally, to the establishment of levels beneath the clinical and radiographic acceptable standards (1, 2). However, the etiology of apical periodontitis is strongly associated with the presence of bacteria within the root canal system (3, 4), and procedural errors do not affect the outcome of endodontic treatment unless a concomitant infection is present (5). Nevertheless, a small percentage of conventional endodontic nonsurgical treatment and retreatment can be unsuccessful even when accurately executed (6).

Microbiologic studies using either culture-dependent or independent methods have demonstrated that primary endodontic infections are polymicrobial and dominated by anaerobic bacteria, while infections associated with failure of the endodontic treatment have shown a reduced number of species, most of them gram-positive facultative anaerobes (7). Microorganisms can also cross the threshold of the apical foramen through the apical tissues, either by extending the infected area, or, as a consequence of manipulation during root canal therapy (8, 9). They have been detected in apical lesions (9, 10), or settling at the surface of root end into resorption gaps promoted by the periradicular inflammatory infiltrate and bacterial toxins (11, 12).

Sensitive molecular techniques have detected *Treponema* species in primary endodontic infections (13, 14), failed endodontic treatment (15) and acute apical abscess (16) suggesting their potential role in the etiology of chronic and acute endodontic diseases. *Treponema* spp. are strictly anaerobic, motile, helically shaped bacteria (17) members of the *Spirochaetes* phylum, a clade now believed to be distinct from both Gram-positive and Gram-negative bacteria (18). Many *Spirochaetes* are fastidious in their nutrient and environmental requirements and are difficult or impossible to culture (17).

Although *Treponema* species has been related to several periodontal and endodontic infections, no study has addressed their presence in the

extraradicular environment of persistent apical periodontitis and their relationship with the failure of nonsurgical endodontic retreatment. Therefore, the aim of this study was to investigate the presence of *T. socranskii*, *T. maltophilum*, *T. amylovorum*, *T. medium*, *T. lecithinolyticum*, *T. denticola*, *T. vicentii* and *T. pectinovorum* on the extraradicular environment of persistent root canal infections and to determine possible associations between species as well between specific species and the presence of clinical and radiographic features.

Materials and Methods

Subject Selection

Twenty-five adult patients referred to the Endodontic Department of Piracicaba Dental School, Piracicaba, SP, Brazil, for root-end surgery were included in this research. Subjects with any contributory systemic diseases or treated with antibiotics or antifungals over the last 3 months were excluded from the study. The endodontic status of each tooth was evaluated clinically for pain, percussion and palpation sensitivity, mobility, extra and intraoral swelling. The clinical crowns were examined for restorative integrity, open canals, cracks, and carious lesions. Radiographically, all teeth had satisfactory previous root canal filling with apical obturation limit at 2mm or less from the apex and persistent apical lesions after at least 1 year follow up of the nonsurgical endodontic retreatment. No tooth presented sinus tract, discernible broken instruments, ledges, perforations, or blockages. The periodontal status was evaluated by radiographs and periodontal probing; teeth with periodontal probing depths over 4mm were not included.

The present study was approved by the Research Ethical Committee of the Piracicaba Dental School (State University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil). Part of the samples included in this research had previously been investigated for the presence of bacterial species and no *Treponemas* spp. could be cultivated (19)

Sample Collection

The apical lesions samples were collected as previously described by Signoretti *et al.* (20). The surgical site was disinfected by oral rinse with 0,2% chlorhexidine gluconate, and the carryover effect was reduced by local rinse with 5% Tween 80 and 0,07% soy lecithin. A proper anesthesia was applied and a full thickness mucoperiosteal flap was reflected. The root-end access ostectomy, if necessary, was performed using a surgical bur cooled with sterile water. The lesion tissue was curetted and part of the excised tissue was immediately placed in a 10% formalin solution and sent to histopathologic analysis at the Oral Pathology Department of State University of Campinas. The other part was pooled into sterile tube containing 1 mL of VMGA III (21) and frozen at -80°C for subsequent microbial analysis. In order to check for cross contamination, an adjacent periosteal area was sampled using curettes and paper points.

***Treponema* Species Detection**

DNA Amplification for Nested-PCR (nPCR)

The genomic DNA purification of the samples was performed by the QIAamp DNA Minikit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. Nested-PCR protocol used in this study to identify *Treponema* species was followed as described previously (16, 22).

At the first set of reactions, 1.5µL of the DNA isolated from persistent apical periodontitis tissue was amplified by universal prokaryotic ribosomal 16S primer (Table 1). The PCR mix reactions with total volume of 25µL were performed with 2.5µL of 10 X PCR buffer (500mmol/L KCl, 200mmol/L Tris-HCl, pH 8.4; Invitrogen, Eugene, OR, USA) plus 1.25µL of 50mmol/L MgCl₂, 0.125µL of 5U/µL Platinum Taq DNA polymerase, 0.25µL of a mixture of each deoxynucleoside triphosphate (100mmol/L solution, in a 10-fold dilution) and 0.25µL 25mmol/L of each forward and reverse primers. Samples were submitted to an initial denaturation at 97°C for 1min and 26 cycles of denaturation for 45s at 97°C,

annealing for 45s (temperature listed in Table 1) and extension for 1min at 72°C, followed by a final extension at 72°C for 4min in an automated thermal cycler (GenePro Thermal Cycler, Bioer Technology, Hangzhou, China). Universal PCR products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide (Invitrogen, Eugene, OR). Inserts of ≈1500bp viewed under ultraviolet transillumination were considered as positive (Table 1).

At the second set of reactions *Treponema* primers were used to amplify a specific target in an internal region of 16S amplified sequence. At this second group of reactions, 1.5 μL of universal reactions products were used as target for specific primers in the same amplification conditions described for the universal set. Positive controls were performed with previous positive clinical samples. Negative controls corresponded to the reaction mixture without DNA template. The total volume of each nPCR product was analyzed by electrophoresis in 1% agarose gel stained with ethidium bromide. Positive detection was determined by the presence of bands of the predicted size (Table 1). To confirm the target bacterial DNA absence in all negative samples, the second set of reactions was repeated with twice the initial universal product volume.

All primers were synthesized by Invitrogen (Eugene, OR) and tested against all control bacteria, no bands of the predicted size were produced with nontarget DNA. Primer sequences and corresponding annealing temperatures are shown in Table 1.

DNA Amplification for PCR

The nPCR positive samples were also submitted to conventional PCR reactions in order to verify if any of these samples had sufficient *Treponema* spp. DNA to reach the detection threshold of conventional PCR. This set followed the same parameters of *Treponema* specific reactions but without the previously amplification of the 16S sequence.

Tissue Processing

Samples stored in formalin were washed in running water for 5 minutes and processed for embedding in paraffin. Five-micrometer thick sections were cut from the paraffin blocks, stained with hematoxylin and eosin (H&E), and examined under light microscopy for diagnostic confirmation of cyst or granuloma. The following features were observed: presence and distribution of acute (polymorphonuclear leukocytes) and chronic inflammatory cells, granulomatous tissue, lining epithelium and fibrous connective tissue capsule.

Data Analysis

The data collected for each patient (clinical and radiographic features) were typed onto a spreadsheet and statistically analyzed by using SPSS for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). The Pearson chi-square or the Fisher's Exact test, as appropriate, was chosen to test the null hypothesis that there was no statistical association between the presence of a specific species and clinical and radiographic features, and to determine if there was no statistical relationship between *Treponema* species in the same environment. The significance level was set at 5%.

Results

All 25 subjects presented mild to moderate discomfort on palpation and/or percussion, mostly of them (92%) were associated with intraoral swelling. Fifteen lesions exhibited more than 5mm in its widest diameter. The histopathologic analysis of the excised tissue showed that 68% lesions were compatible with apical cysts formations and 32% with apical granuloma.

Samples from periosteal tissues collected subjacent to the surgical site did not show bacterial DNA, confirming that the surgical site was sterile.

Detectable levels of bacterial DNA were found in all but two periradicular tissue samples. The nPCR method detected *Treponema* species in 28% (7/25) of cases. The number of species per positive case ranged from 1 to 7 (mean 2.86). The most frequently detected species was *T. socranskii* (6/25) followed by *T. maltophilum* (3/25), *T. amylovorum* (3/25), *T. lecithinolyticum* (3/25), *T. denticola* (3/25), *T. pectinovorum* (2/25) and *T. medium* (2/25). *T. vicentii* was not detected in any sample. *T. socranskii* was commonly recovered in association with *T. denticola*, *T. maltophilum* and *T. lecithinolyticum* ($p=0.009$). No statistically significant relationship was detected between the presence of any target microorganism and the clinical or radiographic features. Conventional PCR did not detect any of the species investigated.

Discussion

All subjects of this research had previously received nonsurgical endodontic retreatment, which did not obtain signals of regression of the apical lesion in radiographic follow-up. The majority of these retreatment-resistant apical lesions enclosed bacterial DNA, with the exception of two samples. On the other hand, eukaryotic DNA was detected by a fluorometer (Qubit 2.0, Invitrogen, Eugene, OR), which confirms that DNA had not been lost during the isolation procedure (data not shown). Therefore, it can be suggested that at the time of sampling these two cases could be bacteria free. Similar findings were reported by Subramanian & Mickel (23), who found that 18.2% of the excised lesion did not present bacterial DNA.

The primers specificity was previously determined by the reference studies (14, 21). In our study reactions with cross-hybridization was observed, this may be explained by the presence of the first reaction primers which might continue to anneal at the second set of reactions. However, no bands of the predicted size were produced, agreeing with Siqueira & Rôças (24).

To our knowledge, no previous studies have attempted to identify spirochetes at the species level in the tissue of retreatment-resistant apical

periodontitis. In the present study, we were successful in detecting seven of the eight target species, all of them have already been found in primary, secondary and acute root canal infections (14-16, 24).

The prevalence of *Treponema* species varies with the type of infection (25). Root canal samples in acute apical abscesses cases present significantly higher prevalence of spirochetes (90%) (16) than chronic root canal primary (37.4%) (26) and secondary infections (56.5%) (15). The same seems to happen onto extraradicular environment. Siqueira & Rôças (24) and Montagner *et al.* (16) using nPCR to analyze the presence of *Treponema* species on purulent exudate of acute apical abscess found 89% to 95% of prevalence. In our study, *Treponema* species were detected in only 28% of cases. The most frequently species detected was *T. socranskii* (20%). It was commonly recovered in association with *T. denticola*, *T. maltophilum* and *T. lecithinolyticum* ($p=0.009$). Similar relation was observed by Baumgartner *et al.* (26) that found significant association between *T. maltophilum* and *T. socranskii* as well as between *T. maltophilum* and *T. denticola*.

T. socranskii and *T. denticola* are the most common *Treponema* species encountered in acute apical abscesses with prevalence values varying from 26% to 79% (16, 24). These microorganisms have several virulence determinants that enable them to interact with other pathogenic bacteria and the host immune system in ways that are likely to promote disease progression (17). The features that represent their major virulence factors are motility and low immunogenicity, which enable the bacterium to rapidly colonize new sites and penetrate into the tissue (17). *T. denticola* is also a putative periodontal pathogen which in association with *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* form the “red complex” described by Socransky *et al.* (27) as a bacterial complex strongly related to clinical parameters of periodontitis diagnosis.

The complex growing requirements made the molecular methods such as nested-PCR (16, 22) a frequent choice on detection of *Treponema* species from endodontic infections. The two steps nPCR assay used in the present study, previously described by Willis *et al.* (22), has been demonstrated to be effective in

detecting *Treponema* species directly in clinical samples. Nested-PCR is a powerful variant of the PCR technique. It differs from the standard PCR protocol, mainly by the conceptual primer design, which involves two sets of DNA amplification (28). This assay can be useful to amplify extreme low quantities of template DNA. However, great care must be taken at the execution of this method, in order to avoid contamination during the transfer of the product from the first reaction into the new tube for reamplification (16).

While the sensitivity limit of conventional PCR reaches 10^3 of target cells, nPCR can take the detection limit down to about 10 cells (29). Melo *et al.* (30) has succeeded in detecting *Schistosoma mansoni* DNA up to 0.1fg. This represents 10 000 to 100 000 times the sensibility of conventional PCR. Therefore, in the present study, it seems logical to suggest that the number of bacteria cells detected accounted less than 10^3 of each species found, as any of them were detected by conventional PCR. Low-abundant members may exert community ecological functions or might simply be the product of historical ecological changes with the potential of becoming dominant in response to shifts in environmental conditions (e.g., local environmental changes might favor their growth) (31).

Another concern about molecular methods is that they did not provide direct evidence pertaining to the viability of the bacteria in the lesions tissue. Several studies have addressed this issue (32, 33). Investigators using animal models observed that bacterial DNA and DNA from intact but nonviable bacteria do not persist in an amplifiable form for more than 30 days, whereas viable microorganisms were detected by PCR for months (33).

The properties that enable bacteria to establish in the periapical tissues are not fully understood, but appear to involve the ability to build cohesive colonies that enables them to escape host defense systems (34). These chronic infections might also have their source in biofilms on the surface of the root end that is protected from host defenses and resistant to antibiotic therapy (35). In these cases bacteria would be a transitory inhabitant of the periapical lesions.

The results of this study show that at the time of sampling the majority of endodontic retreatment-resistant apical periodontitis contained bacterial DNA, with a low predominance of *Treponema* spp. Seven of the eight target species were successfully detected. *T. socranskii* was the most frequently recovered species found statistically associated with *T. denticola*, *T. maltophilum* and *T. lecithinolyticum*. None of the target species were associated with clinical and radiographic features. In conclusion, *Treponema* spp. are present in periapical lesions from teeth with failure of the endodontic retreatment and can participate in the microbial communities associated with the maintenance of the inflammatory process in the apical tissues.

Table

TABLE 1. PCR Primer Pairs Used for Detection of *Treponema* Species.

Target	Sequences (5'-3')	Position (bp)	Tm (°C)	Reference
Universal 16S rRNA	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT	8 - 1,513 (1,505)	55	(21)
<i>T. amylovorum</i>	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG CTC ACG CCT TTA TTC CGT GAG	8 - 211 (193)	54	(21)
<i>T. denticola</i>	TAA TAC CGT ATG TGC TCA TTT ACA T TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	193 - 508 (316)	60	(21)
<i>T. lecithinolyticum</i>	CTT GCT CCT TTC TGA GAG TGG CGG ACG CAT CCG TAT CTC TAC GAA CTT	54 - 1003 (950)	65	(14)
<i>T. maltophilum</i>	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG CCT ATT GTG CTT ATT CAT CAG GC	8 - 446 (438)	54	(21)
<i>T. medium</i>	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG CCT TAT GAA GCA CTG AGT GTA TTC	8 - 200 (192)	54	(21)
<i>T. pectinovorum</i>	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG ATA TAT CTC CAA CTT ATA TGA CCT	8 - 205 (194)	53	(21)
<i>T. socranskii</i>	GAT CAC TGT ATA CGG AAG GTA GAC A TAC ACT TAT TCC TCG GAC AG	179 - 468 (285)	53	(21)
<i>T. vicentii</i>	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG AAT ACT TCT TAT GAA CAT TGA GAC	8 - 201 (193)	56	(21)

References

1. Sjögren U. Success and failure in endodontics. Odontological Dissertations: Umea University, Sweden; 1996.
2. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren 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;85:86-93.
3. Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol* 2005;13:589-95.
4. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.
5. Siqueira JF, Jr., Rôças IN, Oliveira JC, Santos KR. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA-directed polymerase chain reaction. *J Endod* 2001;27:164-7.
6. Salehrabi R, Rotstein I. Endodontic treatment outcomes in a large patient population in the USA: an epidemiological study. *J Endod* 2004;30:846-50.
7. Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, *et al.* Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:71-6.
8. Baumgartner JC, Heggors JP, Harrison JW. Incidence of bacteremias related to endodontic procedures. II. Surgical endodontics. *J Endod* 1977;3:399-402.
9. Gatti JJ, Dobeck JM, Smith C, White RR, Socransky SS, Skobe Z. Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA-DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol* 2000;16:197-204.

10. Fujii R, Saito Y, Tokura Y, Nakagawa KI, Okuda K, Ishihara K. Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:502-5.
11. Lomcali G, Sen BH, Cankaya H. Scanning electron microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. *Endod Dent Traumatol* 1996;12:70-6.
12. Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 2010;36:1277-88.
13. Rôças IN, Siqueira JF, Jr., Andrade AF, Uzeda M. Oral treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR. *Int Endod J* 2003;36:20-6.
14. Siqueira JF, Jr., Rôças IN. PCR-based identification of *Treponema maltophilum*, *T amylovorum*, *T medium*, and *T lecithinolyticum* in primary root canal infections. *Arch Oral Biol* 2003;48:495-02.
15. Nóbrega LMM, Delboni MG, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BPFA. *Treponema* diversity in root canals with endodontic failure. *Eur J Dent* 2013;7:61-68.
16. Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, Gomes BP. *Treponema* species detected in infected root canals and acute apical abscess exudates. *J Endod* 2010;36:1796-9.
17. Dashper SG, Seers CA, Tan KH, Reynolds EC. Virulence factors of the oral spirochete *Treponema denticola*. *J Dent Res* 2011;90:691-703.
18. Paster BJ, Dewhirst FE. The phylogenetic diversity of the genus *Treponema*. In: Radolf JD, Lukehart SA, editors. *Pathogenic Treponema: molecular and cellular biology*. Wymondham, Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2006. p.9-18.

19. Signoretti, FGC. Avaliação microbiológica de lesões periapicais crônicas associadas ao insucesso do tratamento endodôntico. Odontological Dissertations: State University of Campinas, Brazil; 2013.
20. Signoretti FG, Endo MS, Gomes BP, Montagner F, Tosello FB, Jacinto RC. Persistent extraradicular infection in root-filled asymptomatic human tooth: scanning electron microscopic analysis and microbial investigation after apical microsurgery. J Endod 2011;37:1696-700.
21. Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. Odontol Tidskr 1966;74:1–380.
22. 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;37:867-9.
23. Subramanian K, Mickel AK. Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. J Endod 2009;35:950-7.
24. Siqueira JF, Jr., Rôças IN. *Treponema* species associated with abscesses of endodontic origin. Oral Microbiol Immunol 2004;19:336-9.
25. Siqueira JF, Jr., Rôças IN. *Treponema socranskii* in primary endodontic infections as detected by nested PCR. J Endod 2003;29:244-7.
26. Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections. J Endod 2003;29:794-7.
27. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998;25:134-44.
28. Lok kS, Lee PP, Kwok YC, Nguyen NT. Nested PCR in magnetically actuated circular closed-loop PCR microchip system. Microchim Acta 2012:111-7.
29. Spratt DA. Significance of bacterial identification by molecular biology methods. Endod Topics 2004:5-14.

30. Melo FL, Gomes AL, Barbosa CS, Werkhauser RP, Abath FG. Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006;100:1049-55.
31. 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;20:870-8.
32. Aul JJ, Anderson KW, Wadowsky RM, Doyle WJ, Kingsley LA, Post JC, *et al.* Comparative evaluation of culture and PCR for the detection and determination of persistence of bacterial strains and DNAs in the Chinchilla laniger model of otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1998;107:508-13.
33. Wicher K, Abbruscato F, Wicher V, Collins DN, Auger I, Horowitz HW. Identification of persistent infection in experimental syphilis by PCR. *Infect Immun* 1998;66:2509-13.
34. Figdor D, Sjogren U, Sorlin S, Sundqvist G, Nair PN. Pathogenicity of *Actinomyces israelii* and *Arachnia propionica*: experimental infection in guinea pigs and phagocytosis and intracellular killing by human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7:129-36.
35. Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:73-7.

CONCLUSÃO

Diante da metodologia aplicada, os resultados desta pesquisa demonstram que no momento das coletas a maioria das lesões periapicais associadas ao insucesso do retratamento endodôntico continham DNA bacteriano, com baixa predominância de *Treponema* spp. Sete das oito espécies de *Treponema* investigadas foram detectadas. A espécie mais frequentemente foi *T. socranskii* encontrado em forte associação com *T. denticola*, *T. maltophilum* e *T. lecithinolyticum*. No entanto, não houve associação entre as espécies investigadas e os aspectos clínicos e radiográficos. Treponemas são encontrados em lesões perirradiculares de dentes com insucesso do retratamento endodôntico e participam da comunidade microbiana associada à manutenção do processo inflamatório nos tecidos periapicais.

REFERÊNCIAS

1. Adib V, Spratt D, Ng YL, Gulabivala K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *Int Endod J* 2004;37(8):542-51.
2. Appelbe OK, Sedgley CM. Effects of prolonged exposure to alkaline pH on *Enterococcus faecalis* survival and specific gene transcripts. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22(3):169-74.
3. Baumgartner JC, Hegggers JP, Harrison JW. The incidence of bacteremias related to endodontic procedures. I. Nonsurgical endodontics. *J Endod* 1976;2(5):135-40.
4. Baumgartner JC, Hegggers JP, Harrison JW. Incidence of bacteremias related to endodontic procedures. II. Surgical endodontics. *J Endod* 1977;3(10):399-402.
5. Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections. *J Endod* 2003;29(12):794-7.
6. Bender IB, Seltzer S, Soltanoff W. Endodontic success – a reappraisal of criteria. 1. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1966a;22(6):780–9.
7. Bender IB, Seltzer S, Soltanoff W. Endodontic success – a reappraisal of criteria. II. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1966b;22(6):790–802.
8. Block RM, Bushell A, Rodrigues H, Langeland K. A histopathologic, histobacteriologic, and radiographic study of periapical endodontic surgical specimens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976;42(5):656-78.
9. Brown LR, Rudolph CE. Isolation and identification of microorganisms from unexposed canals of pulp-involved teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1957;10(10):1094-9.

10. Carrotte P. Endodontics: Part 1. The modern concept of root canal treatment. *Br Dent J* 2004;197(4):181-3.
11. Centurion-Lara A, Castro C, Barrett L, Cameron C, Mostowfi M, Van Voorhis WC, Lukehart SA. *Treponema pallidum* major sheath protein homologue TprK is a target of opsonic antibody and the protective immune response. *J Exp Med* 1999;189(4):647–656.
12. Chan EC, McLaughlin R. Taxonomy and virulence of oral spirochetes. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15(1):1-9.
13. Chan S, Mohammed N, Dobeck JM, White RR, Socransky SS, Skobe Z. Evaluation of the whole genome DNA-DNA hybridization technique to identify bacteria in histological sections of periradicular lesions. *J Endod* 2004;30(7):518-22.
14. Charon NW, Goldstein SF. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annu Rev Genet* 2002;36:47–73.
15. Chung WO, Park Y, Lamont RJ, McNab R, Barbieri B, Demuth DR. Signaling system in *Porphyromonas gingivalis* based on a LuxS protein. *J Bacteriol* 2001;183(13):3903-9.
16. Dahle UR, Sunde PT, Tronstad L. Treponemes and endodontic infections. *Endod Topics* 2003;6(1):160-170.
17. Dashper SG, Seers CA, Tan KH, Reynolds EC. Virulence factors of the oral spirochete *Treponema denticola*. *J Dent Res* 2011;90(6):691-703.
18. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, *et al.* The human oral microbiome. *J Bacteriol* 2010;192(19):5002-17.
19. Dugas NN, Lawrence HP, Teplitzky P, Friedman S. Quality of life and satisfaction outcomes of endodontic treatment. *J Endod* 2002;28(12):819–27.
20. Fenno JC, McBride BC. Virulence factors of oral treponemes. *Anaerobe*. 1998;4(1):1-17.

21. Friedman S, Mor C. The success of endodontic therapy – healing and functionality. J Calif Dent Assoc 2004;32(6):496–503.
22. Fujii R, Saito Y, Tokura Y, Nakagawa KI, Okuda K, Ishihara K. Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol 2009;24(6):502-5.
23. Gatti JJ, Dobeck JM, Smith C, White RR, Socransky SS, Skobe Z. Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA-DNA hybridization. Endod Dent Traumatol 2000;16(5):197-204.
24. 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 2006;32(10):937-40.
25. 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;33(9):1049-52.
26. Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, *et al.* Microbiological examination of infected dental root canals. Oral Microbiol Immunol 2004;19(2):71-6.
27. Gomes BPF, Montagner F. O papel do diagnóstico molecular no estudo das infecções de origem endodôntica: conceitos, técnicas e aplicações. . In: Ferrari, PDPHP, Bombana PDAC, editors. A Infecção Endodôntica e sua Resolução. 1 ed. São Paulo: Livraria Santos; 2010. p. 22-45.
28. Hamp EG. Isolation and identification of spirochetes obtained from unexposed canals of pulp-involved teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1957 10(10):1100-4.
29. 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;33(11):1278-82.

30. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.
31. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ, Jr. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev: MMBR*. 2002;66(3):486-505.
32. Lazarski MP, Walker WA III, Flores CM, Schindler WG, Hargreaves KM. Epidemiological evaluation of the outcomes of non-surgical root canal treatment in a large cohort of insured dental patients. *J Endod* 2001;27(12):791–6.
33. LaFond RE, Centurion-Lara A, Godornes C, Rompalo AM, Van Voorhis WC, Lukehart SA. Sequence diversity of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* tprK in human syphilis lesions and rabbit-propagated isolates. *J Bacteriol* 2003;185(21):6262-8.
34. Leschine S, Paster BJ, Canale-Parola E. Free-Living Saccharolytic Spirochetes: The Genus *Spirochaeta*. *Prokaryotes* 2006;7:195–210.
35. Lin S, Sela G, Sprecher H. Periopathogenic bacteria in persistent periapical lesions: an in vivo prospective study. *J Periodontol* 2007;78(5):905-8.
36. Loo CY, Corliss DA, Ganeshkumar N. *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. *J Bacteriol* 2000;182(5):1374-82.
37. Lumley PJ, Lucarotti PS, Burke FJ. Ten-year outcome of root fillings in the General Dental Services in England and Wales. *Int Endod J* 2008; 41(7):577–85.
38. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:165-99.
39. Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, Gomes BP. *Treponema* species detected in infected root canals and acute apical abscess exudates. *J Endod* 2010;36(11):1796-9.

40. Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res* 2002;81(11):761-6.
41. Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J* 2006;39(4):249-81.
42. Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990;16(12):580-8.
43. Nóbrega LMM. Estudo da diversidade bacteriana de canais radiculares infectados em casos de abscesso apical agudo por cultura, clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA. [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2012.
44. Nóbrega LMM, Delboni MG, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BPFA. Treponema diversity in root canals with endodontic failure. *Eur J Dent* 2013;7:61-68.
45. Ng Y-L, Mann V, Rahbaran S, Lewswy J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature – part 1. Effects of study characteristics on probability of success. *Int Endod J* 2007;40:12–39.
46. Ng YL, Mann V, Gulabivala K. Outcome of secondary root canal treatment: a systematic review of the literature. *Int Endod J* 2008a;41(12):1026-46.
47. 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;44(7):583-609.
48. Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature -- Part 2. Influence of clinical factors. *Int Endod J* 2008b;41(1):6-31.

49. Paster BJ, Dewhirst FE. The phylogenetic diversity of the genus *Treponema*. In: Radolf, JD, Lukehart SA, editors. Pathogenic *Treponema*: molecular and cellular biology. Wymondham, Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2006. p.9-18.
50. Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 2010;36(8):1277-88.
51. Rôças IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR, Coelho AM. "Red complex" (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91(4):468-71.
52. Salehrabi R, Rotstein I. Endodontic treatment outcomes in a large patient population in the USA: an epidemiological study. *J Endod* 2004;30(12):846-50.
53. Signoretti, FGC. Avaliação microbiológica de lesões periapicais crônicas associadas ao insucesso do retratamento endodôntico. [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2013.
54. Siqueira JF Jr, De Uzeda M, Fonseca ME. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod*. 1996 Jun;22(6):308-10.
55. Siqueira JF, Jr., Rôças IN. *Treponema* species associated with abscesses of endodontic origin. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19(5):336-9.
56. Siqueira JF, Jr., Rôças IN, Oliveira JC, Santos KR. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA-directed polymerase chain reaction. *J Endod* 2001;27(3):164-7.
57. Siqueira JF, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1 - current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod* 2005;31(6):411-23.

58. Siqueira JF Jr, Rôças IN. The oral microbiota: general overview, taxonomy, and nucleic acid techniques. *Methods Mol Biol* 2010;666:55-69.
59. Siqueira JF Jr, de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod* 1996;22(12):674-6.
60. Sjögren U. Success and failure in endodontics. *Odontological Dissertations: Umea University, Sweden; 1996.*
61. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25(2):134-144.
62. Stoll R, Betke K, Stachniss V. The influence of different factors on the survival of root canal fillings: a 10-year retrospective study. *J Endod* 2005;31(11):783–90.
63. 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(1):e40-4.
64. Subramanian K, Mickel AK. Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. *J Endod* 2009;35(7):950-7.
65. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren 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;85(1):86-93.
66. Walton RE, Ardjmand K. Histological evaluation of the presence of bacteria in induced periapical lesions in monkeys. *J Endod* 1992;18(5):216-27.
67. Wyss C, Choi BK, Schupbach P, Guggenheim B, Gobel UB. *Treponema maltophilum* sp. nov., a small oral spirochete isolated from human periodontal lesions. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46(3):745-52.

APÊNDICE 1

DETALHAMENTO DA METODOLOGIA

Para este estudo foram utilizadas amostras microbiológicas pertencentes ao Banco de Coletas Clínicas do Laboratório de Microbiologia aplicada a Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. Todas as amostras estudadas foram coletadas de lesões periapicais associadas a dentes que passaram anteriormente pelo retratamento endodôntico não-cirúrgico e não apresentavam sinais de regressão da lesão após o acompanhamento radiográfico mínimo de um ano.

Pacientes portadores de doença sistêmica ou que fizessem uso de antibiótico ou antifúngicos à menos de três meses da cirurgia foram excluídos do estudo. A avaliação clínica de cada dente foi realizada para verificar a presença de dor, sensibilidade a palpação e percussão, mobilidade e edema intra e extra oral. Dentes sem a integridade das restaurações, com os canais expostos a cavidade oral, ou portadores de fístula, trincas, fraturas e lesões cariosas não foram incluídos no estudo. Radiograficamente, todos os dentes apresentavam lesão periapical que não regrediu ou aumentou de tamanho após no mínimo um ano de acompanhamento do retratamento não-cirúrgico com um preenchimento do canal radicular satisfatório em que o limite apical de obturação foi estabelecido aquém do ápice por 2mm ou menos (Figura 1A-B). Nenhum dente apresentava instrumentos fraturados, degraus, perfurações ou bloqueios discerníveis ao exame radiográfico. O exame periodontal foi realizado pela avaliação das radiografias e pela sondagem periodontal. Dentes com profundidade de sondagem maiores que 4mm não foram incluídos no estudo.

Amostras clínicas de 25 pacientes, armazenadas em freezer -80°C, foram utilizadas para a investigação genotípica de oito espécies do gênero *Treponema* pelo método de Nested-PCR e PCR convencional. Os procedimentos envolvidos nesta pesquisa estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em

Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, conforme certificado (Anexo).

1. Micro-cirurgia periapical e procedimentos de coleta

O método utilizado neste estudo foi descrito anteriormente por Signoretti *et al.* (2011). A desinfecção intra-oral do campo operatório foi realizada através de bochecho com solução aquosa de digluconato de clorexidina 0,12% por um minuto e de esfregaço da região com gaze estéril umedecida em clorexidina 2% gel (Figura 1C), seguida de neutralização do efeito residual da clorexidina com solução de 5% Tween 80 e 0,07% de lecitina de soja. Após anestesia troncular e complementação com infiltração local, ambos com lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000, foi rebatido um retalho total muco-periosteal composto por uma incisão intra-sulcular e uma ou duas verticais, de acordo com a necessidade de acesso (Figuras 1D). Amostras de tecido periosteal foram coletadas de áreas adjacentes ao sítio cirúrgico usando curetas e cones de papel absorvente estéril para testar se houve contaminação bacteriana do local.

A região apical do dente envolvido foi acessada com uma broca esférica em alta rotação refrigerada com solução salina estéril. O tecido periradicular foi removido por curetagem e colocado sobre gaze estéril, foi seccionado em duas partes com auxílio de uma lâmina de bisturi 15C estéril (Swann Morton, Sheffield, Inglaterra) (Figuras 1E-F). Parte dele foi armazenada em eppendorf contendo 1,0 ml de meio de transporte VMGA III – Viability Medium Göteborg Agar (Möller, 1966; Dahlén *et al.*, 1993) (Figura 1G). Outra parte do tecido foi armazenada em formol 10% e enviada para diagnóstico histopatológico (Figura 1H). Três milímetros do ápice radicular foram removidos através de apicectomia realizada com broca Zekrya (Dentsply/Maillefer, Ballaigues, Suíça) num ângulo o mais próximo possível de 90° em relação ao longo eixo do dente. Quando possível esse fragmento apical foi armazenado em tubo plástico do tipo eppendorf podendo ser utilizado para futuras pesquisas.

A decisão pela execução do preparo retrógrado foi resultante da avaliação do tratamento endodôntico e da condição clínica de selamento apical da

guta-percha. Quando necessário, pontas de ultrassom foram utilizadas em aparelho ProfiClass (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil) para o preparo da cavidade. As retropontas utilizadas foram T0F-1 e T0F-2 (CVDVale, São José dos Campos, SP, Brasil) com o adaptador UA-3 (CVDVale, São José dos Campos, SP, Brasil). O operador aplicou movimentos suaves de introdução e retirada na retrocavidade até atingir a profundidade de três milímetros. Todos os procedimentos foram realizados por um mesmo operador auxiliado por um microscópio operatório (DM 2003, Opto Corp, North Miami, FL, EUA). Para obturação desta cavidade foi utilizado MTA (Angelus, Londrina, PR, Brasil) manipulado de acordo com as recomendações do fabricante. O retalho foi reposicionado e suturado com fio de nylon 5-0 não reabsorvível através de múltiplas suturas simples nas incisões verticais e em suspensório nas papilas.

Foi realizada uma radiografia periapical final com o uso de posicionador e o paciente foi orientado para os cuidados pós-operatórios. A medicação pré-operatória consistiu de dose única de 4 mg de dexametasona administrada via oral trinta minutos antes do início do procedimento. Após o atendimento foi prescrito dipirona sódica 500 mg, um comprimido a cada quatro horas por até 48 horas, apenas no caso da dor se manifestar ao cessarem os efeitos da anestesia. A remoção da sutura foi realizada depois de um período de sete dias.

2. Processamento histológico

Os segmentos das lesões periapicais armazenados em formalina foram incorporados em parafina e preparados para o exame histológico da maneira usual. Os blocos de parafina foram cortados de forma seriada em secções longitudinais de 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE). A análise das lâminas em microscopia de luz foi realizada para confirmação do diagnóstico entre cisto e granuloma. Os parâmetros histomorfológicos examinados foram: presença e distribuição de células inflamatórias agudas (polimorfonucleares, leucócitos) e crônicas, tecido granulomatoso, epitélio linear e cápsula de tecido conjuntivo fibroso.

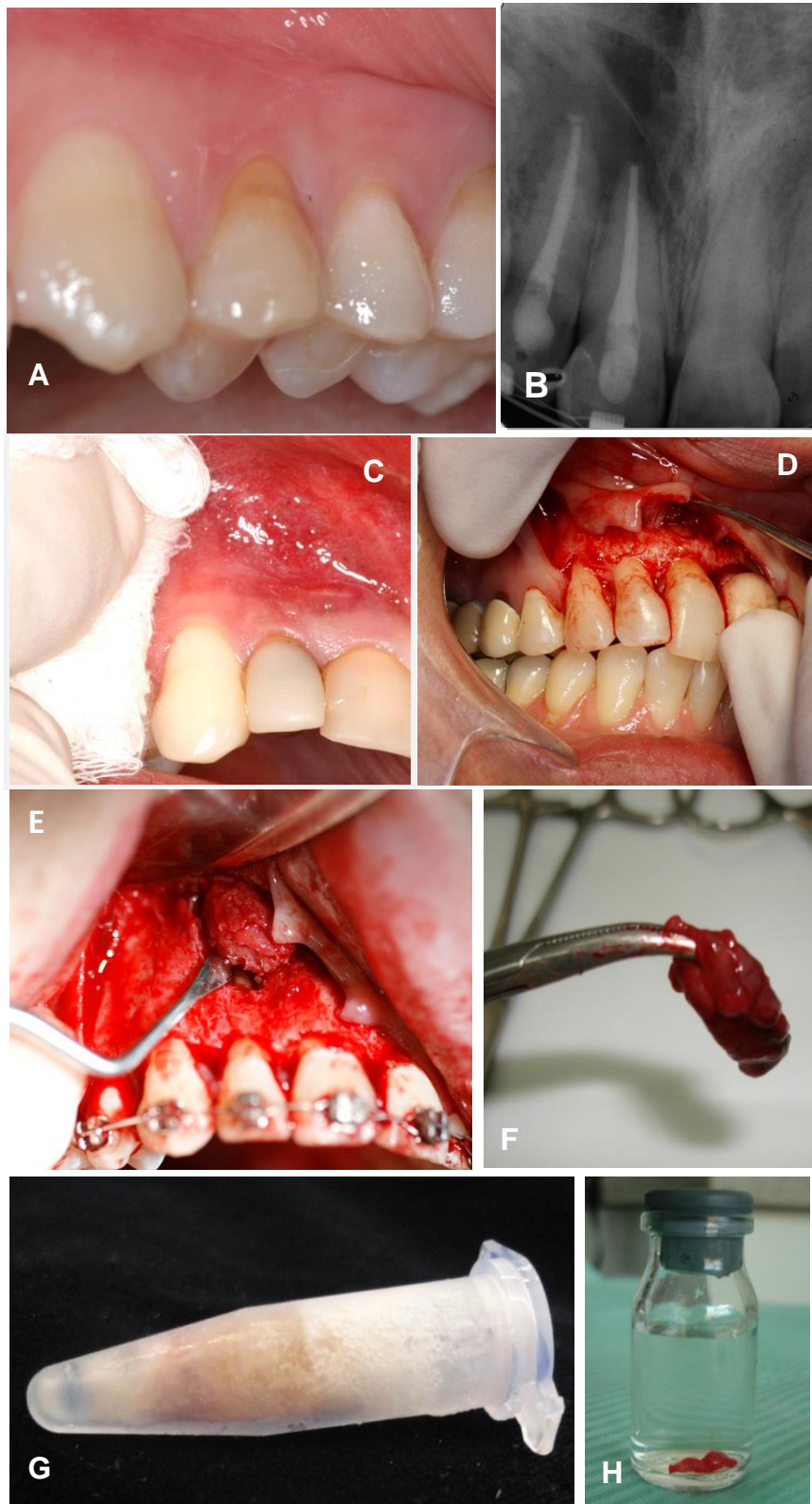


Figura 1. A-B. Aspecto clínico e radiográfico de um dente com insucesso no retratamento endodôntico e com preenchimento adequado do canal radicular; C. Desinfecção do campo operatório; D. Descolamento muco-periosteal após incisão intra-sulcular; E-F. Remoção do tecido periapical; G. Armazenamento em VMGA III; H. Armazenamento em formol 10%.

3. Investigação Genotípica de Oito Espécies do Gênero *Treponema*

3.1. Purificação do DNA genômico das amostras

As vinte e cinco coletas clínicas de lesões periapicais persistentes, armazenadas a -80°C em tubos de eppendorf com meio de transporte VMGA III foram utilizadas nesta etapa da pesquisa. Para a purificação do DNA genômico das amostras foi utilizado o kit “QIAamp DNA mini kit” (QIAGEN, Hilden, Alemanha, Ref. 51306 – 250 reações) (Figura 2A) seguindo o protocolo de purificação de DNA em tecidos, fornecido pelo fabricante no manual “QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook”. Os tubos contendo as lesões foram descongelados em temperatura ambiente e agitados por cerca de 5 minutos para a homogeneização do VMGA III e para que as bactérias impregnadas no tecido se desprendessem e misturassem ao meio. Após agitação, uma série de tampões, centrifugações e filtrações indicadas pelo kit “QIAamp DNA mini kit” foram realizadas para que o material genético fosse purificado e ao final re-suspendido em uma solução eluente. Após purificação, a qualidade e a concentração do DNA de cada amostra foi avaliada através do espectrofotômetro para ácidos nucleicos NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, EUA) e o DNA recém purificado foi armazenado a -20°C.

3.2. Nested-PCR

O Nested-PCR é uma variação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que consiste na realização de reações de amplificação subsequentes.

3.2.1. Amplificação do gene 16S rRNA - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A partir do DNA purificado das amostras coletadas, *primers* universais para procariontes do domínio Bactéria, propostos por Willis *et al.* (1999) e destinados a anelar em regiões externas do gene 16S rRNA (Quadro 1) foram utilizados em uma primeira reação de amplificação.

Quadro 1. Primers específicos utilizados na reação de PCR universal

Primer	Sequência	Fragmento	Referência
Univ. Forward	5' AG AGT TTG ATY MTG GCT CAG 3'	1,505 bp	Willis <i>et al.</i> , 1999
Univ. Reverse	5' ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 3'		

Em um termociclador GenePro Thermal Cycler (Bioer Technology, Hangzhou, China) (Figura 2C) as reações de PCR com o volume total de 25µL, contendo 23,5µL de uma mistura de reagentes (Master Mix) (Quadro 2 e Figura 2B) e 1,5µL do DNA, foram submetidas a desnaturação inicial à 97°C por 1min. e 26 ciclos de desnaturação à 97°C por 45s., anelamento por 45s. à 55°C e extensão por 1min. à 72°C, seguido de um passo para extensão final de 4min. à 72°C. O produto das reações foram armazenados a -20°C até sua análise por eletroforese em gel de agarose.

Quadro 2. Proporções dos reagentes no Master Mix.

Reagentes	Volume (µL)
Tampão (10 x Reaction buffer Invitrogen® - Life Technology do Brasil)	2,5
dNTP 10mM (Invitrogen® - Life Technology do Brasil)	0,25
MgCl ₂ 50mM (Invitrogen® - Life Technology do Brasil)	1,25
H ₂ O Ultrapura (UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water, Sigma-Aldrich, USA)	18,875
Primer Forward 25µM (Invitrogen® - Life Technology do Brasil)	0,25
Primer Reverse 25µM (Invitrogen® - Life Technology do Brasil)	0,25
Platinum Taq DNA polymerase 5U/µL (Invitrogen® - Life Technology do Brasil)	0,125

3.2.2. Eletroforese

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% (Invitrogen - Life Technology do Brasil) em tampão de Tris-borato EDTA (pH 8,0) (TBE) e corado com brometo de etídio (5ug/mL).

Foi incluído em cada gel, um padrão de peso molecular de 1Kb (DNA ladder, Invitrogen - Life Technology do Brasil). Após o término de cada corrida (90 volts por 45 min) (Figura 2D-E), as bandas foram observadas com auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta. A documentação fotográfica dos géis foi obtida com o sistema MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel) e a captura das imagens foi realizada pelo programa *GelCapture Acquisition Software* (Figura 2F).

As reações foram consideradas positivas se bandas do tamanho apropriado estivessem presentes (≈ 1500 pares de base). Para comprovar se a reação estava realmente correta foi utilizado um controle positivo com DNA purificado de uma bactéria referência (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212), e um controle negativo, em que não era acrescentado DNA bacteriano, para verificar se não havia contaminação em nenhum dos componentes utilizados na reação.



Figura 2 – PCR – A. Kit de purificação de DNA (QIAamp); **B.** Componentes para reação de PCR (Master Mix); **C.** Amostras em Termociclador (GenePro Thermal Cycler); **D.** Inoculação do produto da reação de PCR em gel de agarose a 1% em tampão de Tris-borato EDTA; **E.** Fonte de eletroforese (PWSys PW300) e cuba para eletroforese horizontal; **F.** Análise do gel de agarose demonstrando o produto da amplificação do DNA bacteriano de algumas amostras, com o controle positivo (+) e negativo (-).

3.2.3. Reação de PCR com *Primers* Específicos para *Treponema* spp.

Verificado o sucesso da reação com os *primers* universais, seus produtos foram submetidos a uma segunda amplificação em que *primers* espécie-específicos se anelam a uma sequência interna do gene 16S rRNA, amplificado pela reação universal.

As espécies de treponemas investigadas foram *T. denticola*, *T. amylovorum*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. socranskii*, *T. pectinovorum*, *T. vicentii*, *T. lecithinolyticum*.

Esse segundo conjunto de reações para a amplificação das sequências específicas de cada espécie foi realizado de forma semelhante à primeira reação de PCR. O volume total das novas reações foi de 25µL, sendo 1,5µL de produto da reação universal, 18,875µL de água ultrapura (UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water, Sigma-Aldrich, USA) e 4,875µL do mix de reagentes composto por 2,5µL de Buffer 10X PCR; 1,25µL de Cloreto de Magnésio (50mM) ; 0,5µL de dNTP (10mM) ; 0,25µL de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*) (25µM); e 0,125µL de Platinum Taq DNA Polymerase. Em termociclador GenePro Thermal Cyclers (Bioer Technology, Hangzhou, China) o segundo conjunto de reações foi submetido a desnaturação inicial à 97°C por 1min. e 26 ciclos de desnaturação à 97°C por 45s., anelamento por 45s. à (temperatura listada na tabela 1) e extensão por 1min. à 72°C, seguido de uma extensão final por 4min. à 72°C. O produto das reações foram armazenados a -20°C até sua análise por eletroforese em gel de agarose.

Os *primers* específicos para detecção de cada espécie de *Treponema*, o tamanho do fragmento amplificado e as temperaturas de anelamento encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Pares de Primers de PCR específicos para a detecção de *Treponema* spp.

Target	Sequences (5'-3')	Position (bp)	Tm (°C)	Reference
<i>T. amylovorum</i>	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG CTC ACG CCT TTA TTC CGT GAG	8 - 211 (193)	54	(21)

<i>T. denticola</i>	TAA TAC CGT ATG TGC TCA TTT ACA T TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	193 - 508 (316)	60	(21)
<i>T. lecithinolyticum</i>	CTT GCT CCT TTC TGA GAG TGG CGG ACG CAT CCG TAT CTC TAC GAA CTT	54 - 1003 (950)	65	(14)
<i>T. maltophilum</i>	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG CCT ATT GTG CTT ATT CAT CAG GC	8 - 446 (438)	54	(21)
<i>T. medium</i>	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG CCT TAT GAA GCA CTG AGT GTA TTC	8 - 200 (192)	54	(21)
<i>T. pectinovorum</i>	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG ATA TAT CTC CAA CTT ATA TGA CCT	8 - 205 (194)	53	(21)
<i>T. socranskii</i>	GAT CAC TGT ATA CGG AAG GTA GAC A TAC ACT TAT TCC TCG GAC AG	179 - 468 (285)	53	(21)
<i>T. vicentii</i>	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG AAT ACT TCT TAT GAA CAT TGA GAC	8 - 201 (193)	56	(21)

3.2.4. Eletroforese

De forma semelhante ao primeiro conjunto de reações, os produtos amplificados nas novas reações foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% (Invitrogen - Life Technology do Brasil) em tampão de Tris-borato EDTA (pH 8,0) (TBE) e corado com brometo de etídio (5ug/mL).

Foi incluído em cada gel, um padrão de peso molecular de 100bp (DNA ladder, Invitrogen - Life Technology do Brasil) e o volume total de cada reação acrescido do corante (BlueJuice Gel Loading Buffer, Invitrogen) foi distribuído nos poços do gel. Após o término de cada corrida (90 volts por 45 min), as bandas foram observadas com auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta. A documentação fotográfica dos géis foi obtida com o sistema MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel) e a captura das imagens foi realizada pelo programa *GelCapture Acquisition Software*.

As reações foram consideradas positivas na presença de bandas do tamanho apropriado (Tabela 1 e Figura 3). Como controle positivo foram utilizados os produtos da reação de PCR universal de amostras positivas para cada espécie em estudos anteriores. As amostras que serviram de controle foram testadas

previamente para comprovar a presença de bandas do tamanho apropriado (Figura 4). O controle negativo, em que não era acrescentado DNA bacteriano, para verificar se não havia contaminação em nenhum dos componentes utilizados na reação.

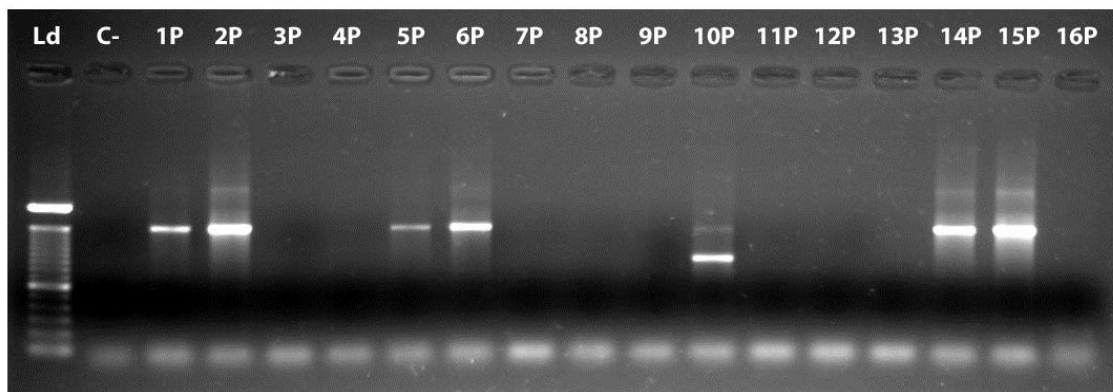


Figura 3 – Resultado da eletroforese em gel de agarose demonstrando o produto da reação com o primer para *T. lecithinolyticum* (950bp) de 16 amostras.

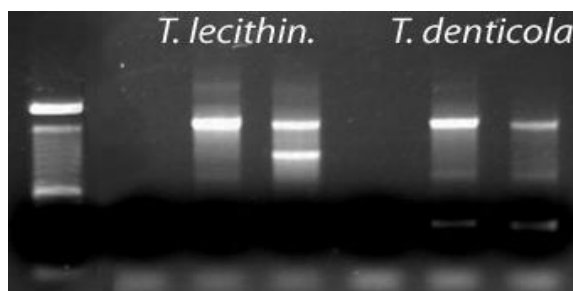


Figura 4 – Resultado da eletroforese em gel de agarose demonstrando o produto da reação com o primer para *T. lecithinolyticum* (950bp) e *T. denticola* em amostras testadas para o controle positivo.

Todas as amostras negativas à reação espécie-específica foram repetidas com o dobro do volume inicial do produto da reação universal para confirmar a ausência de DNA da espécie alvo. As amostras positivas foram submetidas ao PCR convencional utilizando diretamente os *primers* específicos para as espécies de *Treponema*, sem a amplificação prévia do gene 16S rRNA,

isso para verificar se alguma dessas amostras possuía níveis de DNA da espécie suficiente para atingir o limite de detecção do PCR convencional.

3.3.1. Reação de PCR Convencional com *Primers* Específicos para *Treponema* spp.

A partir do DNA purificado das amostras coletadas que apresentaram resultados positivos na detecção de cada espécie específica, foram realizadas reações de PCR convencional utilizando diretamente os *primers* específicos para as espécies de *Treponema*. As espécies de treponemas investigadas foram *T. denticola*, *T. amylovorum*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. socranskii*, *T. pectinovorum*, *T. lecithinolyticum*. A espécie *T. vicentii* não foi investigada nesse momento por não apresentar amostras positivas às reações de Nested-PCR.

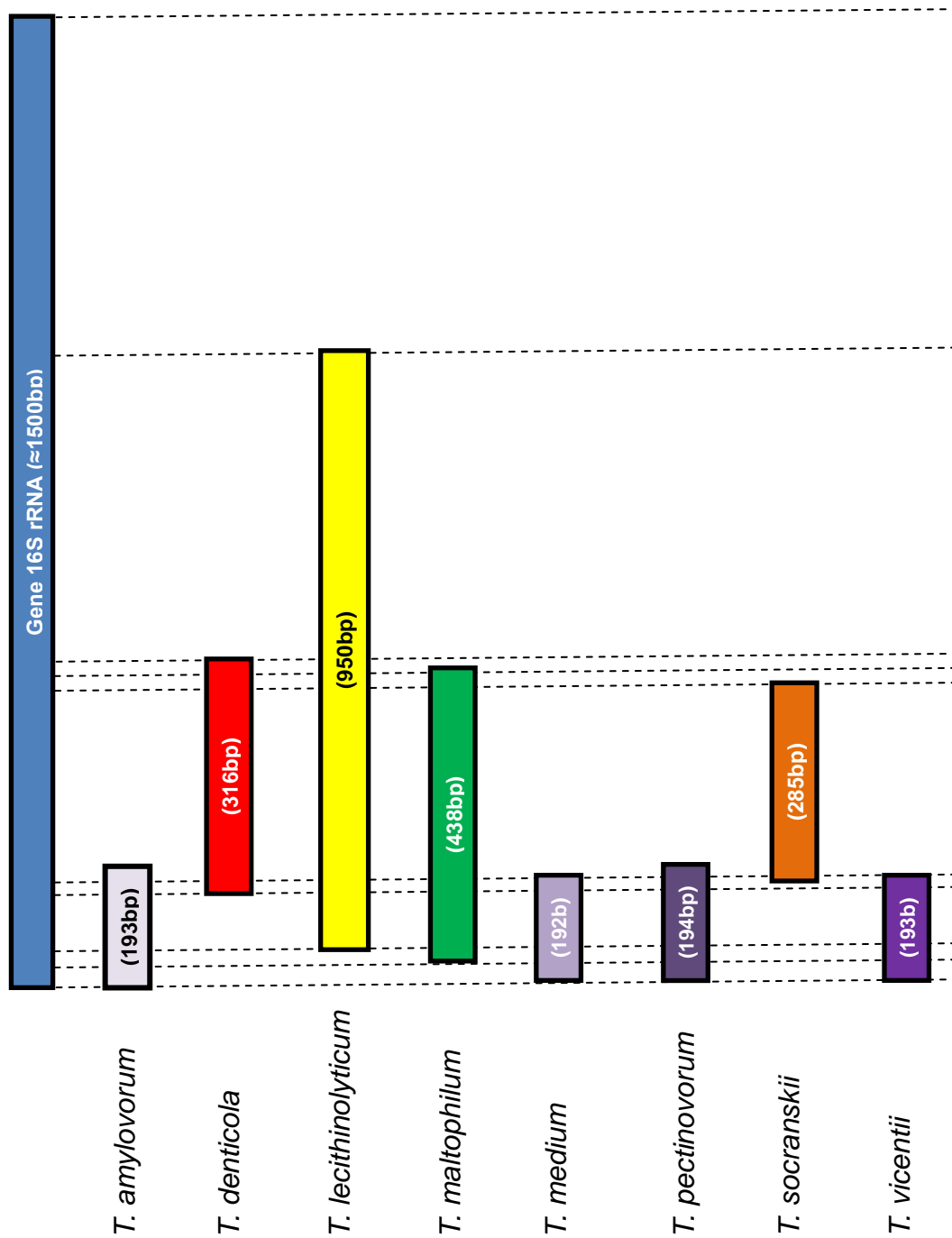
Em um termociclador GenePro Thermal Cycler (Bioer Technology, Hangzhou, China) as reações contendo 23,5 µL da mistura de reagentes descrita anteriormente (Master Mix) (Quadro 2) e 1,5 µL do DNA, foram submetidas a desnaturação inicial à 97°C por 1 min. e 26 ciclos de desnaturação à 97°C por 45 seg., anelamento por 45 seg. à (temperatura listada na tabela 1) e extensão por 1 min. à 72°C, seguido de um passo para extensão final de 4 min. à 72°C. O produto das reações foram armazenados a -20°C até sua análise por eletroforese em gel de agarose.

3.3.2. Eletroforese

A eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR convencional foi realizada e analisada da mesma forma descrita no item 3.2.4. Para confirmar a ausência de DNA da bactéria alvo, todas as amostras negativas à reação espécie-específica foram repetidas com o dobro do volume inicial do DNA purificado das amostras coletadas.

APÊNDICE 2

POSIÇÃO DOS PRIMERS ESPÉCIE-ESPECÍFICOS EM RELAÇÃO AO GENE 16S rRNA





**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**




CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Avaliação microbiológica de lesões periapicais crônicas associadas ao insucesso do retratamento endodôntico**", protocolo nº 065/2010, dos pesquisadores Fernanda Graziela Corrêa Signoretti, Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Rogério de Castilho Jacinto e Tiago Pereira da Rosa, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 07/07/2012.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Bacteriological evaluation of periapical lesions associated with endodontic retreatment failures**", register number 065/2010, of Fernanda Graziela Corrêa Signoretti, Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Rogério de Castilho Jacinto and Tiago Pereira da Rosa, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 07/07/2012.


Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.