



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 – Alfenas/MG
Fone: (35) 3299-1000, Fax: (35) 3299-1063



SUELLEN DE AZEVEDO MOREIRA

**AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA E ANTIMICROBIANA DOS MICRORGANISMOS
ENTEROCOCCUS FAECALIS E *ACTINOMYCES ISRAELII* APÓS TERAPIA
FOTODINÂMICA (aPDT)**

Alfenas/MG

2020

SUELLEN DE AZEVEDO MOREIRA

**AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA E ANTIMICROBIANA DOS MICRORGANISMOS
ENTEROCOCCUS FAECALIS E *ACTINOMYCES ISRAELII* APÓS TERAPIA
FOTODINÂMICA (aPDT)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL/MG).

Linha de pesquisa: Biologia dos tecidos do complexo Bucomaxilofacial

Orientadora: Prof. Dra. Naiana Viana Viola Nícoli

Coorientador: Prof. Dr. Fábio Antônio Colombo

Alfenas/MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

M838a Moreira, Suellen de Azevedo.
Avaliação radiográfica e antimicrobiana dos microrganismos
Enterococcus faecalis e Actinomyces israelii após terapia fotodinâmica
(aPDT) / Suellen de Azevedo Moreira - Alfenas/MG, 2020.
101 f. : il. –
Orientadora: Naiana Viana Viola Nicoli.
Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade
Federal de Alfenas, 2020.
Bibliografia.

1. Fototerapia. 2. Enterococcus faecalis. 3. Necrose da Polpa Dentária.
I. Nicoli, Naiana Viana Viola. II. Título.

CDD-617.6342

NOME COMPLETO DO AUTOR

Suellen de Azevedo Moreira

TÍTULO:

“Avaliação radiográfica e antimicrobiana dos microrganismos Enterococcus Faecalis e Actinomyces israeli após Terapia Fotodinâmica (aPDT)”

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre Ciências Odontológica pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Odontologia.

Aprovada em: 11 de Março de 2020

Profa. Dra. Naiana Viana Viola Nicoli

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - MG

Prof. Dr. Bruno Martini Guimarães

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - MG

Profa. Dra. Juliana Dos Reis Derceli

Instituição: Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos - SP



Documento assinado eletronicamente por **Naiana Viana Viola Nicoli, Professor do Magistério Superior**, em 11/03/2020, às 16:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Martini Guimarães, Professor do Magistério Superior**, em 11/03/2020, às 16:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **JULIANA DOS REIS DERCELI, Usuário Externo**, em 11/03/2020, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador

Folha de Aprovacao PPGCO 0277821 SEI 23087.001031/2020-22 / pg. 1



0277821 e o código CRC **83E4C38F**.

Aos meus pais, Magda e João Henrique,
Ao meu esposo Iago,
A minha avó, Waldete (In memoriam).

AGRADECIMENTOS

A Deus

Nem todos os dias são fáceis, mas entregá-los todas as manhãs a Deus me fez ter a certeza de que Ele está no controle de tudo.

Aos meus pais, Magda e João Henrique

Pela criação que me deram, por cada exemplo passado, por sempre apoiar minhas decisões e nunca terem duvidado de mim. Obrigada por tudo que já abdicaram e abdicam por mim. O amor que sinto por vocês transcende qualquer coisa nesse mundo.

Ao meu amado, Iago Henrique Silva Malta

Pelo amor, carinho, dedicação e companheirismo em todos os momentos. Obrigada por sempre estar ao meu lado me apoiando e me incentivando a crescer cada vez mais e a nunca desistir. Obrigada por entender meus momentos de reclusão, de raiva, de desespero e abatimento. Suas palavras e seus gestos sempre me ajudaram a sair dos momentos difíceis. Te amo, infinitamente.

À minha avó, Waldete Rozete de Azevedo

Mesmo não estando mais entre nós, sua presença é constante na minha vida, a todo momento. Sei que você olha por mim!

À minha orientadora, Profa Dra. Naiana Viana Viola Nícoli

Pela confiança em mim depositada, por compartilhar comigo toda sua experiência e por ter me tratado sempre com tanto carinho e respeito. Obrigada por me acolher na sua vida diária e em sua família. Fica aqui uma amizade eterna, um vínculo que jamais esquecerei. Hoje, o que sei de Endodontia, devo à você!

Ao meu coorientador Prof Dr. Fábio Antônio Colombo

Por todo apoio e atenção, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À aluna de doutorado Juliana Barbosa Nunes

Pela orientação, dedicação e enorme paciência ao compartilhar comigo a parte microbiológica deste trabalho.

À Profa. Dra. Natália da Silva Martins

Pela ajuda com a análise estatística do trabalho.

Ao meu amigo, Iago Ramirez

Uma das amizades mais sinceras que já conquistei. O amigo que esteve presente ao meu lado do início ao fim do Mestrado. Obrigada por cada palavra amiga, por cada gesto de carinho. Enfim, obrigada pela amizade verdadeira!

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas

Por proporcionar a seus alunos a chance de aprendizado e crescimento profissional.

Aos meus colegas de turma de Pós-graduação: Amanda e Maísa

Pelo companheirismo e por todo carinho compartilhados durante essa caminhada.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Alfenas

Pela disponibilidade.

À CAPES

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

Às empresas Labordental e FKG Dentaire

Pelo fornecimento dos materiais estudados e confiar em nossa dedicação e seriedade para o desenvolvimento desta pesquisa.

A **todos** que contribuíram, direta ou indiretamente, de alguma forma, para a realização desta pesquisa.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.

(Simone de Beauvoir)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) é um método coadjuvante ao Preparo Químico-Mecânico (PQM) e uma alternativa antimicrobiana, que pode possibilitar o alcance do efeito microbicida às áreas mais difíceis do Sistema de Canais Radiculares (SCR). Portanto, este estudo avaliou a ação da aPDT sobre *Enterococcus faecalis* e *Actinomyces israelii*. Através de amostras retiradas do SCR, com auxílio de cones de papel absorvente, em diferentes etapas dos tratamentos propostos e utilizando a metodologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real, estes microrganismos foram identificados microbiologicamente. Foram selecionados aleatoriamente 25 dentes, anteriores e posteriores (incisivos, caninos e pré-molares) com diagnóstico de Necrose Pulpar e presença de lesão periapical. Esses dentes foram distribuídos em 2 grupos: Grupo 1 (G1) – Terapia endodôntica com PQM e medicação intracanal (MIC); Grupo 2 (G2) – Terapia endodôntica com PQM, MIC e 2 aplicações de aPDT. O protocolo da aPDT foi realizado com aplicação do fotossensibilizador (FS) azul de metileno a 0,005%, luz vermelha, energia de 9 Joules (J), e comprimento de onda de 400 nm a 660 nm e 90 segundos de aplicação. As amostras foram processadas através da extração do Ácido Desoxirribonucleico (DNA). Os microrganismos foram identificados utilizando-se marcadores específicos. Também foi realizado acompanhamento radiográfico: raio-x inicial e raio-x após 60 dias do término do tratamento endodôntico. As radiografias foram avaliadas por dois examinadores, através de escores, para classificar o reparo periapical. *Enterococcus faecalis* foi encontrada com maior frequência no G1 quando comparado ao G2. *Actinomyces israelii* foi encontrado de forma igual no G1 e no G2. Quando avaliada a quantidade de *Enterococcus faecalis* e *Actinomyces israelii* entre as coletas 1, 2 e 3, observou-se que não houve diferença, tanto no G1 como no G2. A análise estatística das radiografias foi realizada primeiramente pelo Teste de concordância Kappa que foi considerado moderado e após foi realizado o Teste G, verificando-se que não houve associação entre as variáveis grupo e classificação do reparo. A aPDT não promoveu melhores resultados no tratamento endodôntico, apresentando-se semelhante ao tratamento convencional, entretanto este trabalho apontou questões metodológicas relevantes. Portanto, novos trabalhos devem ser realizados para que se consiga mostrar a possível efetividade da aPDT.

Palavras-chave: Fototerapia; *Enterococcus faecalis*; Necrose da Polpa Dentária.

ABSTRACT

Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) is an adjunct method to Chemical-Mechanical Preparation (CMP) and an antimicrobial alternative, which may enable the microbicidal effect to reach the most difficult areas of the Root Canal System (RCS). Therefore, this study evaluated the action of aPDT on *Enterococcus faecalis* and *Actinomyces israelii*. These microorganisms were identified in samples taken from the RCS, with the aid of absorbent paper cones, in different stages of the proposed treatments using the real Time Polymerase Chain Reaction (PCR) methodology. Twenty-five teeth, anterior and posterior (incisors, canines, and premolars) with a diagnosis of Pulp Necrosis and presence of periapical lesion were randomly selected. These teeth were divided into 2 groups: Group 1 (G1) - Endodontic therapy with PQM and intracanal medication (ICM); Group 2 (G2) - Endodontic therapy with CMP, MIC and 2 applications of aPDT. The aPDT protocol was performed with the application of the 0.005% methylene blue photosensitizer (PS), red light, energy of 9 Joules (J), and wavelength from 400 nm to 660 nm and 90 seconds of application. The samples were processed by Deoxyribonucleic Acid (DNA) extraction. Microorganisms were identified using specific primers. Radiographic monitoring was also performed: initial x-ray and x-ray 60 days after the endodontic treatment ended. The radiographs were evaluated by two examiners, using scores to classify the periapical repair. *Enterococcus faecalis* was found more frequently in G1 when compared to G2. *Actinomyces israelii* was found equally in G1 and G2. When the amount of *Enterococcus faecalis* and *Actinomyces israelii* was evaluated between collections 1, 2 and 3, it was observed that there was no difference, both in G1 and G2. The statistical analysis of the radiographs was performed first by the Kappa concordance test, which was considered moderate, and afterwards, the G test was performed, verifying that there was no association between the variables group and repair classification. APDT did not promote better results in endodontic treatment, being similar to conventional treatment, however this work pointed out relevant methodological issues. Therefore, new studies are required in order to show the possible effectiveness of aPDT.

Keywords: Phototherapy; *Enterococcus faecalis*; Dental Pulp Necrosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Quadro 1 - Infecções endodônticas e microrganismos mais frequentemente detectados | 18 |
| Figura 1 – Sequência clínica do G1 | 40 |
| Figura 2 – Sequência clínica do G2 | 42 |
| Figura 3 - Aparato para execução do protocolo da aPDT | 43 |
| Quadro 2 - Critérios utilizados para classificação do reparo apical | 45 |
| Figura 4 – Aparato para a realização da técnica da PCR em tempo real | 47 |
| Figura 5 – Etapas da extração de DNA das amostras do G1 e G2 | 48 |
| Figura 6 - Threshold Cycle ou Ct | 50 |
| Figura 7 - Gráfico de colunas do grupo controle (G1) e grupo tratado (G2) e a variável <i>Enterococcus faecalis</i> (presença e ausência) na coleta 1 | 52 |
| Figura 8 - Gráfico de colunas do grupo controle (G1) e grupo tratado (G2) e a variável <i>Enterococcus faecalis</i> (presença e ausência) na coleta 2 | 53 |
| Figura 9 - Gráfico de interação entre grupos e coletas, na detecção da bactéria <i>Enterococcus faecalis</i> | 56 |
| Quadro 3 - Resultados para <i>Enterococcus faecalis</i> obtidos após realização do teste de controle positivo de amplificação com β -Globulina | 58 |
| Figura 10 - Gráfico de interação entre grupos e coletas, na detecção da bactéria <i>Actinomyces israelii</i> | 60 |
| Quadro 4 - Resultados para <i>Actinomyces israelii</i> obtidos após realização do controle positivo de amplificação com β -Globulina, antes e após purificação das amostras | 62 |
| Figura 11 - Acompanhamentos radiográficos dos pacientes do G1 | 64 |
| Figura 12 - Acompanhamentos radiográficos dos pacientes do G2 | 65 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Teste Exato de Fisher para a associação das variáveis entre os grupos e arcadas na avaliação de <i>Enterococcus faecalis</i> | 51 |
| Tabela 2 - Teste Exato de Fisher para associação das variáveis entre grupos e arcadas na avaliação de <i>Actinomyces israelii</i> | 54 |
| Tabela 3 - Resultado dos testes de Wilcoxon, para avaliar se há diferença entre os grupos controle (G1) e tratado (G2), e Kruskal Wallis para avaliar se há diferença entre as coletas..... | 55 |
| Tabela 4 - Resultado dos testes de Kruskal Wallis para avaliar se há diferença das coletas dentro de cada grupo..... | 57 |
| Tabela 5 - Resultado dos testes de Wilcoxon para avaliar se há diferença para os grupos dentro de cada coleta | 57 |
| Tabela 6 - Resultado dos testes de Wilcoxon, para avaliar se há diferença entre os grupos controle (G1) e tratado (G2), e Kruskal Wallis para avaliar se há diferença entre as coletas..... | 59 |
| Tabela 7 - Resultado dos testes de Kruskal Wallis para avaliar se há diferença das coletas dentro de cada grupo..... | 61 |
| Tabela 8 - Resultado dos testes de Wilcoxon para avaliar se há diferença para os grupos dentro de cada coleta | 61 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------------|--|
| PQM | Preparo Químico-Mecânico |
| aPDT | Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| PDT | Terapia Fotodinâmica |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| CLX | Clorexidina |
| NaOCl | Hipoclorito de Sódio |
| MIC | Medicação Intracanal |
| Ca(OH) ₂ | Hidróxido de Cálcio |
| TF | Tricresol Formalina |
| PMCC | Paramonoclorofenol Canforado |
| SCR | Sistema de Canais Radiculares |
| Eh | Potencial de Oxidação Redução |
| ATP | Adenosina Tri-fosfato |
| O ₂ ⁻ | Radical Superóxido |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de Hidrogênio |
| O ₂ | Oxigênio |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| EDTA | Ácido Etilenodiamino Tetra-acético |
| FS | Corante Fotossensibilizador |
| ERO _s | Espécies reativas de oxigênio |
| CONEP | Comissão Nacional de Ética em Pesquisa |
| TCLE | Termo de consentimento livre e esclarecido |
| NiTi | Níquel Titânio |
| G1 | Grupo 1 |
| G2 | Grupo 2 |
| J | Joules |
| UFC | Unidade Formadora de Colônia |
| Ct | Limiar Cíclico |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 16 |
| 2.1 | MICROBIOLOGIA ENDODÔNTICA | 16 |
| 2.1.1 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 20 |
| 2.1.2 | <i>Actinomyces israelii</i> | 23 |
| 2.2 | PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO | 27 |
| 2.3 | TERAPIA FOTODINÂMICA..... | 30 |
| 3 | OBJETIVO | 36 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 36 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 36 |
| 4 | METODOLOGIA..... | 37 |
| 4.1 | COMITÊ DE ÉTICA | 37 |
| 4.2 | LOCAL DO ESTUDO E SELEÇÃO DOS PACIENTES | 37 |
| 4.2.1 | Critérios de inclusão | 37 |
| 4.2.2 | Critérios de exclusão | 38 |
| 4.3 | GRUPOS DE ESTUDO | 38 |
| 4.4 | PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO: G1 | 38 |
| 4.5 | PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO E TERAPIA FOTODINÂMICA: G2 ... | 40 |
| 4.6 | PROCEDIMENTOS RADIOGRÁFICOS | 44 |
| 4.6.1 | Análise Radiográfica..... | 44 |
| 4.6.2 | Análise Estatística | 45 |
| 4.7 | ANÁLISE MICROBIOLÓGICA..... | 46 |
| 4.7.1 | Extração de DNA..... | 46 |
| 4.7.2 | PCR em tempo real | 48 |
| 4.7.3 | Interpretação dos resultados | 49 |
| 4.7.4 | Análise estatística..... | 50 |
| 5 | RESULTADOS..... | 51 |
| 5.1 | ANÁLISE MICROBIOLÓGICA..... | 51 |
| 5.1.1 | Bactéria <i>Enterococcus faecalis</i> | 54 |
| 5.1.2 | Bactéria <i>Actinomyces israelii</i> | 59 |

| | | |
|----------|----------------------------|-----------|
| 5.2 | ANÁLISE RADIOGRÁFICA | 63 |
| 5.2.1 | G1..... | 63 |
| 5.2.2 | G2..... | 64 |
| 6 | DISCUSSÃO | 66 |
| 7 | CONCLUSÃO..... | 72 |
| | REFERÊNCIAS..... | 73 |
| | ANEXOS | 95 |

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos são considerados os principais fatores etiológicos das patologias pulpares e perirradiculares (SJOGREN *et al.*, 1997). Dentre os microrganismos que podemos encontrar como constituintes da microbiota oral residente estão: bactérias, vírus, leveduras e protozoários. Porém, as bactérias são os microrganismos mais dominantes (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2005).

O objetivo do tratamento endodôntico é obter a máxima desinfecção do Sistema de Canais Radiculares (SCR) e prevenir a sua reinfecção. Porém, mesmo quando o tratamento endodôntico é realizado dentro do máximo rigor técnico, infecções secundárias e/ou persistentes podem ocorrer, gerando o insucesso do tratamento (STUART *et al.*, 2006).

Cáries dentárias, doenças periodontais, infecções endodônticas e numerosas patologias da cavidade oral têm sido atribuídas à proliferação de bactérias orais e sua capacidade de formar e participar de biofilmes polimicrobianos estáveis (DOTSCH *et al.*, 2012).

Durante o Preparo Químico-Mecânico (PQM) dos canais radiculares, realiza-se a irrigação química dos canais, com o objetivo de alcançar um efeito bactericida adequado; (MOHAMMADI; ABBOTT, 2009a; MOHAMMADI; ABBOTT, 2009b) entretanto, as soluções de irrigação usadas na Endodontia: Clorexidina (CLX) e Hipoclorito de Sódio (NaOCl) e Medicação intracanal (MIC): Hidróxido de Cálcio (Ca(OH)_2), Tricresol Formalina (TF) e Paramonoclorofenol Canforado (PMCC), não conseguem erradicar completamente os microrganismos presentes nos canais infectados (KISHEN; SHRESTHA, 2015).

Alguns microrganismos são resistentes ao tratamento endodôntico. Dentre esses microrganismos inclui-se várias espécies anaeróbias Gram-negativas tais como espécies do gênero *Prevotella spp.* e espécies anaeróbias Gram-positivas facultativas como *Streptococcus gordonii*, *Enterococcus faecalis*, espécies do gênero *Actinomyces spp.*, entre outras (BERUTTI; MARINI; ANGERETTI, 1997).

O *Enterococcus faecalis* tem sido o microrganismo mais comumente encontrado no SCR nos casos de infecções endodônticas (GOMES *et al.*, 2006; ZOLETTI; SIQUEIRA; SANTOS, 2006), devido a características específicas, tais como: capacidade de colonizar a dentina e os túbulos dentinários, o que dificulta sua

remoção pelos meios químicos e mecânicos (GEORGE; KISHEN; SONG, 2005; DUGGAN; SEDGLEY, 2007), podendo inclusive resistir à MIC (SALAH *et al.*, 2008) e às soluções irrigadoras (OLIVEIRA *et al.*, 2007) e potencial de invasão intratubular mesmo em casos de escassez nutricional (DUGGAN; SEDGLEY, 2007; SALAH *et al.*, 2008).

Os gêneros *Actinomyces* e *Propionibacterium* também foram associados à casos de insucesso da terapia endodôntica e presença de lesões periapicais assintomáticas (SUNDQVIST; REUTERVING, 1980; HAPPONEN, 1986; BYSTROM *et al.*, 1987; SJOGREN *et al.*, 1988).

Métodos têm sido pesquisados, na tentativa de eliminar os microrganismos com eficácia do interior do SCR; dentre estes, destaca-se a combinação da terapia endodôntica convencional associada ao uso da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) (FOSCHI *et al.*, 2007; GEORGE; KISHEN, 2008; ROSA, 2008).

Os irrigantes antibacterianos convencionais mostraram uma relativa citotoxicidade, que deve ser levada em conta quando se considera o tecido perirradicular (RAHIMI *et al.*, 2014). Para reduzir esses efeitos colaterais desfavoráveis, a desinfecção endodôntica assistida por *laser* ganhou atenção especial (BENEDICENTI *et al.*, 2008).

Ademais, investigações por microscopia eletrônica de varredura demonstraram e revelaram a penetração de bactérias até 1000 µm em túbulos dentinários em um modelo de laboratório e, portanto, é muito difícil para os irrigantes químicos usados no PQM penetrarem até esta profundidade (BERKITEN; BERKITEN; OKAR, 2000).

Vários estudos relataram o uso bem sucedido da aPDT em redução de contagens bacterianas no SCR, recomendando-o como um procedimento antimicrobiano coadjuvante no tratamento endodôntico convencional (GARCEZ *et al.*, 2010; RIOS *et al.*, 2011; VAZIRI *et al.*, 2012; ZAND *et al.*, 2014; MUHAMMAD *et al.*, 2014).

Diante disso, é importante avaliar a efetividade da aPDT, já que ela tem se mostrado um método coadjuvante ao tratamento endodôntico que demonstra resultados promissores na desinfecção do SCR.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICROBIOLOGIA ENDODÔNTICA

Microrganismos e seus produtos são os principais agentes etiológicos de patologias pulpares e periapicais (KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1965; SUNDQVIST, 1976). A infecção endodôntica ocorre com a proliferação de bactérias no interior dos canais radiculares que adentraram nesse meio através da exposição do dente ao ambiente oral, devido a lesões cariosas ou traumáticas, causando a formação de lesões periradiculares persistentes (MARINIC *et al.*, 2015; SUSILA *et al.*, 2016).

Os microrganismos precisam de vias de acesso para adentrarem o SCR e iniciar o processo de infecção endodôntica. Essas vias de acesso podem ser: exposição pulpar em consequência de lesões cariosas, restaurações iatrogênicas ou trauma; exposição dos túbulos dentinários em recessões gengivais e fissuras de esmalte; vias anatômicas como o forame apical, canais laterais e região de furca e a via anacorética (SIQUEIRA JR, J.F. et Rôças, I.N., 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2011; RODRÍGUEZ-NIKLITSCHK *et al.*, 2015).

O tratamento endodôntico deve ser realizado como medida para eliminar e desagregar os biofilmes bacterianos e seus subprodutos facilitando assim a reparação dos tecidos apicais (MARINIC *et al.*, 2015; TENNERT *et al.*, 2015).

Apesar da prevalência de bactérias anaeróbias dentro dos canais radiculares (HAAPASALO, 1989), espécies aeróbias ou anaeróbias facultativas também são encontradas na microbiota endodôntica (SUNDQVIST *et al.*, 1998). As bactérias anaeróbias facultativas têm se mostrado mais resistentes às substâncias auxiliares utilizadas no PQM e à MIC quando comparadas às bactérias anaeróbias estritas (MOLANDER *et al.*, 1998).

Quando microrganismos atingem a cavidade pulpar, fatores como o potencial de oxirredução, disponibilidade de nutrientes e interações microbianas promovem uma pressão seletiva sobre eles. Desse modo, esses fatores são determinantes para a seleção de quais microrganismos colonizarão o sistema de canais radiculares (SUNDQVIST, 1992).

Após o processo de aporte sanguíneo, que gera uma menor disponibilidade de oxigênio no local, seguindo de uma diminuição do Potencial de Oxidação-Redução (Eh), ocorre a necrose do tecido pulpar e posterior instalação da infecção endodôntica, que contribui para a predominância de bactérias anaeróbias no interior dos canais radiculares (PASSOS, 2014).

De acordo com o Eh do ambiente, é possível classificar o predomínio das bactérias locais: aeróbias – necessitam de Eh positivo para seu crescimento (presença de oxigênio); anaeróbias – necessitam de Eh negativo no ambiente para seu crescimento (ausência de oxigênio); facultativos: multiplicam-se tanto com Eh positivo ou negativo. No caso das bactérias anaeróbias, a presença de oxigênio se torna tóxico para a células, devido a formação de peróxidos letais (PASSOS, 2014).

Na presença de infecção endodôntica, as bactérias anaeróbias facultativas são prevalentes apenas no primeiro estágio da infecção. No segundo estágio, há predominância de bactérias anaeróbias estritas (FABRICIUS *et al.*, 1982).

Menezes *et al.* (2004) investigaram estudos sobre a dinâmica das infecções endodônticas que apontaram para uma relativa proporção de microrganismos facultativos na fase inicial da infecção, que condiz com a presença de maior quantidade de oxigênio nos tecidos. Após o início da necrose tecidual, a tensão de oxigênio diminui devido à ausência da microcirculação sanguínea local, ocorrendo assim, a diminuição da quantidade de bactérias anaeróbias facultativas e, por conseguinte um aumento na quantidade de bactérias anaeróbias estritas. O aumento das bactérias anaeróbias estritas se dá devido ao aumento do consumo de oxigênio, que cria condições restritas e acaba por sustentar o crescimento dessa microbiota anaeróbia estrita.

As infecções endodônticas podem ser divididas em três tipos: primárias, secundárias e persistentes. As infecções primárias são causadas após os primeiros microrganismos atingirem as vias de acesso para os canais radiculares e então iniciar o processo de colonização do SCR causando a necrose pulpar (ALVES, 2001; SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2008; SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2009). As infecções secundárias são aquelas causadas por microrganismos que não estavam presentes na ocorrência da infecção primária. Esses microrganismos adentraram o canal radicular durante ou entre as sessões de tratamento ou até após a conclusão do tratamento endodôntico, devido à quebra da cadeia asséptica, seja pelo isolamento absoluto inadequado ou até pela sua ausência durante o tratamento, utilização de

instrumentos endodônticos não estéreis, fratura ou perda do selamento coronário (ALVES, 2001; SAKAMOTO *et al.*, 2008; SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2008, SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2009; LACERDA *et al.*, 2016). Já as infecções persistentes são aquelas causadas por microrganismos que resistiram ao tratamento endodôntico e aos protocolos de desinfecção do SCR, microrganismos estes que apresentam grande potencial de resistir a período longos de privação de nutrientes e assim sobreviver dentro do SCR (SAKAMOTO *et al.*, 2008; SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2008, SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2009; SUNDQVIST; FIGDOR, 2003).

No Quadro 1 abaixo estão apresentados os microrganismos mais frequentemente detectados nas infecções endodônticas, de acordo com o tipo de infecção:

Quadro 1 - Infecções endodônticas e microrganismos mais frequentemente detectados

| INFECÇÃO PRIMÁRIA | INFECÇÃO SECUNDÁRIA | INFECÇÃO PERSISTENTE |
|---------------------------|----------------------|---------------------------------|
| <i>Fusobacterium</i> | <i>Enterococcus</i> | <i>Actinomyces</i> |
| <i>Streptococcus</i> | <i>Klebsiella</i> | <i>Enterococcus Eubacterium</i> |
| <i>Prevotella</i> | <i>Enterobacter</i> | <i>Propionibacterium</i> |
| <i>Eubacterium</i> | <i>Pseudomonas</i> | Fungos |
| <i>Actinomyces</i> | <i>Acinetobacter</i> | |
| <i>Campylobacter</i> | <i>Escherichia</i> | |
| <i>Propionibacterium</i> | Fungos | |
| <i>Porphyromonas</i> | | |
| <i>Peptostreptococcus</i> | | |

Fonte: SIQUEIRA JR.; LOPES, 1999

A presença de oxigênio no interior dos canais radiculares é algo essencial para a sobrevivência de bactérias aeróbias, porém altamente tóxica para as bactérias anaeróbias. A respiração aeróbia ocorre através da geração de energia (sob a forma de Adenosina Tri-fosfato (ATP)) em sítios específicos da cadeia de transporte de elétrons via fosforilação oxidativa, tendo o oxigênio como receptor final de elétrons. O fator que causa a sensibilidade das bactérias anaeróbias ao oxigênio é o fato de que elas não apresentam mecanismos protetores, ao contrário das bactérias aeróbias que

possuem uma grande variedade de enzimas que as protegem (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006b).

Quando há oxigênio local, dois subprodutos das atividades das enzimas oxidativas são formados: radical superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esses subprodutos são formados durante a síntese de ATP. Ocorre uma reação onde o radical superóxido é convertido em oxigênio (O_2) e em H_2O_2 , através da enzima superóxido dismutase. Essa reação ocorre em todas as bactérias aeróbias estritas e na maioria das bactérias anaeróbias facultativas. O peróxido de hidrogênio é convertido em oxigênio molecular e água pela enzima catalase, lembrando que algumas bactérias anaeróbias facultativas não possuem a enzima catalase em sua composição. O que explica o fato das bactérias anaeróbias estritas morrerem em presença de oxigênio é devido ao fato de que elas não produzem a enzima catalase e nem a enzima superóxido dismutase, assim, se tornam sensíveis aos efeitos tóxicos do superóxido e do peróxido de hidrogênio (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006a).

O controle efetivo da infecção bacteriana no SCR é crítico para o sucesso pós-tratamento da terapia endodôntica. Foi demonstrado que a infecção endodôntica em dentes com necrose pulpar e periodontite apical é de natureza polimicrobiana com alta prevalência de microrganismos anaeróbios, particularmente bactérias gram-negativas (ASSED *et al.*, 1996), que se disseminam pelo SCR e alcançam a superfície radicular externa (biofilme apical) (LEONARDO *et al.*, 2002).

A infecção extra radicular é inacessível aos procedimentos de limpeza e modelagem, permitindo a persistência e multiplicação dos microrganismos e levando a baixas taxas de sucesso quando nenhuma medicação antibacteriana é usada e uma terapia endodôntica de uma consulta é realizada (LEONARDO *et al.*, 1993).

Embora o desbridamento quimiomecânico do canal radicular seja bastante eficaz, a completa desinfecção de áreas inacessíveis é por vezes difícil de alcançar e continua a ser um desafio devido a anatomia complexa e resistência do biofilme (SHEN *et al.*, 2012).

Dentre as causas de insucesso após o tratamento endodôntico está a persistência de microrganismos no interior do SCR. Esse insucesso se deve à presença de metabólitos tóxicos e a formação de biofilme, que agem como foco de infecção, perpetuando-a (GOMES *et al.*, 2006)

Diferentes técnicas têm sido utilizadas para a avaliação de bactérias na cavidade oral e SCR (ZAND *et al.*, 2014), incluindo cultura bacteriana e contagem de colônias como uma das mais antigas técnicas. No entanto, as limitações destas técnicas incluem a natureza incultivável de alguns microrganismos, a alta sensibilidade da técnica durante a amostragem e transferência para o laboratório, dependência da habilidade e perícia do técnico (SEDGLEY *et al.*, 2005).

Técnicas moleculares foram introduzidas para identificação de microrganismos com várias vantagens, incluindo a detecção de espécies cultiváveis e incultiváveis, alta precisão e especificidade, alta sensibilidade, não necessidade de controlar condições anaeróbias, a capacidade para realizá-las durante a terapia antimicrobiana, fácil transferência das amostras para o laboratório e detecção de microrganismos viáveis. Vários estudos utilizaram técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificar os microrganismos presentes no interior do SCR (DUMANI *et al.*, 2012; SEELAN *et al.*, 2015; GUPTA-WADHWA; WADHWA; DUHAN, 2016).

2.1.1 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis é um anaeróbio facultativo que tem sido evidenciado em aproximadamente 77% dos casos de falhas dos tratamentos endodônticos, representando uma ameaça ao sucesso do tratamento (TENNERT *et al.*, 2015). Isso está associado a resistência contra os efeitos bactericidas dos agentes mais utilizados durante o tratamento endodôntico, como o NaOCl e a CLX (GOMES *et al.*, 2006; SUSILA *et al.*, 2016). Portanto, torna-se necessário novas Ca(OH)_2 formas de combater a infecção endodôntica (SHETESTHA; KISHEN, 2014; JURIC *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2016).

Enterococcus faecalis é o microrganismo mais comumente encontrado em infecções persistentes, quando comparado às infecções primárias (ROÇAS *et al.*, 2004; TENNERT *et al.*, 2014). No estudo de Roças *et al.* (2004), ao utilizar a técnica da PCR para análise microbiológica, ele relata uma menor porcentagem de *Enterococcus faecalis* em infecções primárias. *Enterococcus faecalis* foi encontrada

em 20 (67%) de 30 dentes que apresentavam insucesso no tratamento endodôntico já realizado e 9 (18%) de 50 dentes que apresentavam infecção primária.

Essa bactéria apresenta resistência à maioria das medicações intracanaís, principalmente ao Ca(OH)_2 , tolerando um Potencial Hidrogeniônico (pH) de até 11,5, e têm capacidade de proliferação e desenvolvimento de infecção, o que dificulta a sua eliminação do SCR através de métodos convencionais (SIQUEIRA *et al.*, 2008).

Na maioria das vezes, *Enterococcus faecalis* apresenta resistência aos agentes microbianos e antibióticos empregados durante o tratamento endodôntico. Essa resistência se deve ao fato de que *Enterococcus faecalis* possui capacidade de formar biofilme no SCR, tornando-o um microrganismo altamente resistente aos antimicrobianos (DUNAVANT *et al.*, 2006; STUART *et al.*, 2006).

Em uma revisão de literatura feita por Gilbert, Das & Foley (1997), foi abordado quais os mecanismos usados pelos biofilmes bacterianos que dão a eles maior resistência ao uso de agentes microbianos e antibióticos. Foi relatado que, apesar de alguns aspectos da resistência do biofilme ainda não serem esclarecidos, acredita-se que os mecanismos dominantes estão relacionados a ambientes nutricionalmente modificados e à supressão do crescimento no interior da comunidade. O biofilme bacteriano favorece a recorrência de infecções devido à sua baixa susceptibilidade aos agentes antimicrobianos.

Outro fator que favorece a recorrência de infecções é que o sistema de defesa do hospedeiro ou a administração sistêmica de antibióticos não conseguem acessar os microrganismos remanescentes que se encontram dentro do SCR (DUNAVANT *et al.*, 2006; JOHNSON; FLANNAGAN; SEDGLEY, 2006).

O estudo de Costerton, Stewart & Greenberg (1999) definiu biofilme bacteriano como uma comunidade estruturada de células bacterianas, envolvida em uma matriz polimérica hidratada, aderida a uma superfície inerte ou viva. O modo de crescimento bacteriano confere a essas comunidades uma forma de crescimento protegido, que permite sua sobrevivência em ambientes com carência nutricional e confere alta resistência aos agentes antimicrobianos. Este estudo ainda ressaltou que essa formação é encontrada na maioria das raízes com infecções bacterianas persistentes e crônicas e, devido ao crescimento lento, o paciente também apresenta sintomas lentamente. Outra observação, é que as células bacterianas desenvolvidas em uma superfície sofrem adesão, formam um biofilme e adotam um fenótipo diferente de sua célula planctônica.

Algumas hipóteses são levantadas para explicar a reduzida susceptibilidade do biofilme aos agentes antimicrobianos, como: a dificuldade de penetração dos agentes microbianos, a possibilidade de inativação do agente microbiano e a existência de microrganismos com crescimento lento ou em estado de repouso. Há também evidências de que o biofilme bacteriano tende a resistir também às forças mecânicas de remoção durante o PQM e às defesas específicas e não específicas do hospedeiro (SOUKOS *et al.*, 2003).

Microrganismos do gênero *Enterococcus spp.* podem permanecer em fase latente, com uma baixa taxa metabólica por um período de tempo. Essa fase latente é inativada quando ocorrem mudanças ambientais, como uma infiltração coronária, que pode modificar as condições nutricionais do ambiente e contribuir para a ativação destes microrganismos e conseqüente proliferação dos mesmos (CHÁVEZ DE PAZ *et al.*, 2003).

A presença da *Enterococcus faecalis* no SCR é associado a um prognóstico desfavorável para o tratamento endodôntico. A alta prevalência de cepas isoladas de *Enterococcus faecalis* em dentes com lesões perirradiculares associadas, sugere que essa espécie está envolvida na patogênese de lesões endodônticas recorrentes (ZOLETTI; SIQUEIRA; SANTOS, 2006).

O gênero *Enterococcus spp.* pode ser isolada de áreas do corpo ricas em nutrientes, mas pobre em oxigênio, como a flora normal do trato gastrointestinal e a cavidade oral. Dentre as espécies que apresentam importância clínica estão *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, que são responsáveis por grande parte das infecções de origem endodôntica (TORTORA; FUNKE; CASE, 2008).

O microrganismo *Enterococcus faecalis* é altamente resistente ao PQM e é geralmente encontrado em casos de falha do tratamento do canal radicular (PINHEIRO *et al.*, 2003). Este microrganismo tem vários fatores de virulência e capacidade de resistir a períodos prolongados de limitação de nutrientes, persistindo como um patógeno no canal radicular (TENDOLKAR; BAGHDAYAN; SHANKAR, 2003; FIGDOR; DAVIES; SUNDQVIST, 2003).

Foi descrito na literatura, que *Enterococcus faecalis* é a espécie mais frequentemente encontrada em casos de retratamento com prevalência de até 90%; enquanto outras bactérias menos frequentes, como estreptococos, também foram encontradas em casos de retratamento (ROÇAS *et al.*, 2004).

Enterococcus faecalis possui capacidade de penetrar nos túbulos dentinários, aderir ao colágeno, além de ser capaz de catabolizar uma grande variedade de fontes de energia, permitindo sua sobrevivência por longos períodos de tempo em ambientes de extremo pH alcalino (TENDOLKAR; BAGHDAYAN; SHANKAR, 2003; CHIVATXARANUKUL; DASHPER; MESSER, 2008), sem interagir com outros microrganismos (STUART *et al.*, 2006) e com ausência de nutrientes, através da diminuição de seu estado metabólico (FIGDOR *et al.*, 2003). Possui enzimas líticas, substância de agregação, adesinas de superfície, citolisinas e ácido lipoteicóico, produção extracelular de superóxido. Apresenta a capacidade de distribuir sua virulência entre outras espécies bacterianas, formando um biofilme, que dificulta sua destruição por células fagocíticas (JETT; HUYCKE; GILMORE, 1994; KAYAOGLU; ORSTAVIK, 2004).

Portanto, atualmente *Enterococcus faecalis* tem sido o microrganismo de escolha para a realização de testes antimicrobianos *in vitro* de diferentes soluções irrigadoras, medicamentos e cimentos endodônticos (VIANNA *et al.*, 2004; ESTRELA *et al.*, 2008; GUERREIRO-TANOMARU *et al.*, 2011; SABRAH; YASSEN; GREGORY, 2013; BAILÓN-SÁNCHEZ *et al.*, 2014; DU *et al.*, 2014).

2.1.2 *Actinomyces israelii*

Espécies *Actinomyces* exibem diferentes graus de patogenicidade. *Actinomyces israelii* é de longe a espécie mais comum envolvida em humanos, causando além de infecções dentárias, infecções cervico-facial, torácica e abdominal (SLACK; GERENCSEK, 1975).

Em 1878 foi descrito o primeiro caso de infecção cervico-facial e torácico com envolvimento da espécie *Actinomyces*. A partir daí, foi introduzido então o termo “actinomicose” (ISRAEL, 1878). Em 1889, outro caso foi apresentado seguido do isolamento da espécie *Actinomyces israelii* (BUJWID, 1889).

Podemos encontrar na microbiota bucal dois tipos de classificação para as espécies *Actinomyces*, a maioria delas são anaeróbias facultativas e outras são anaeróbias estritas. São bactérias que utilizam o carboidrato do meio para produzir

ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico e ácido succínico (MAIDEN; LAI; TANNER, 1992; BOWDEN, 1998).

A actinomicose é descrita como uma doença infecciosa granulomatosa, acompanhada de supuração, formação de abscessos e drenagem através dos tratos sinusais, que podem irromper na pele ou na mucosa oral. A drenagem é composta por supuração que contém “grânulos de enxofre”, que são pequenas colônias de bactérias (SMEGO JR; FOGLIA, 1998).

O crescimento das espécies *Actinomyces* nos tecidos do hospedeiro se dá em aglomerados microscópicos ou macroscópicos, que podem atingir diâmetros de 3 a 4 mm (SLACK; GERENCSEK, 1975). Quando ocorre a drenagem pelos tecidos moles através dos tratos sinusais, a supuração apresenta uma aparência amarelada, por isso é dado o nome de “grânulos de enxofre”, mesmo que não haja uma evidência certa que contenha enxofre na composição da supuração (SUNDE *et al.*, 2002). Os “grânulos de enxofre” se apresentam como uma massa de filamentos bacterianos ramificados e entrelaçados entre si, que são unidos por uma matriz extra-celular e os bastões irradiam-se através da periferia. Ao analisar microscopicamente um aglomerado de espécies *Actinomyces* é possível ver que os “grânulos de enxofre” formam “raios” que se projetam a partir da massa de filamentos. Devido a essa aparência, deu-se o nome à espécie de *Actinomyces* ou “*ray fungus*”. A formação dos “grânulos de enxofre” se deve em resposta às defesas do hospedeiro, de modo que isso dê ao microrganismo uma proteção contra respostas imunológicas e ao processo de fagocitose (BOWDEN, 1998). Não é em todos os casos que podemos afirmar que, a partir da drenagem da supuração com presença de “grânulos de enxofre”, se trata de uma actinomicose. Não é só as espécies *Actinomyces* que apresentam essa aparência, mas também outras espécies de bactérias (SLACK; GERENCSEK, 1975).

Apesar de a *Actinomyces* apresentar uma baixa patogenicidade, quando ocorrem traumas bucais, procedimentos cirúrgicos ou até uma infecção prévia, esses acontecimentos geram um meio aberto para a entrada desses microrganismos. Assim, o local pode ficar propício ao estabelecimento de uma infecção crônica, com conseguinte formação de secreção purulenta, podendo se espalhar pelos tecidos circundantes do hospedeiro (HIRSHBERG *et al.*, 2003). A partir desse momento, pode haver a instalação de um Abscesso Agudo. Nos casos onde haja o risco de uma co-infecção, as outras bactérias que também invadiram o local podem influenciar na patogenicidade da *Actinomyces*, aumentando assim a sua virulência, e por

consequente a sua patogenicidade que no início da infecção era baixa (PETERS; WESSELINK; VAN WINKELHOFF, 2002).

Actinomyces é um microrganismo que compõem normalmente a microbiota bucal indígena e tem sido apontado como um causador da infecção endodôntica (HIRSHBERG *et al.*, 2003; RICUCCI; SIQUEIRA JR, 2008).

Nos estágios iniciais da infecção endodôntica, espécies do gênero *Actinomyces* raramente estão presentes. Elas são encontradas com mais frequência em infecções persistentes e lesões extra-radulares (SUNDE *et al.*, 2002; SIQUEIRA *et al.*, 2002a; SIQUEIRA; ROÇAS, 2003; XIA; BAUMGARTNER, 2003; SIGNORETTI *et al.*, 2011). São considerados a causa exclusiva da infecção extraradicular, também chamada de actinomicose periapical. Alguns estudos analisaram a microbiota de dentes que já possuíam tratamento endodôntico e apresentavam Periodontite Apical após o tratamento e confirmaram a existência de espécies *Actinomyces* nesses dentes em uma faixa de 3% a 24% (MOLANDER *et al.*, 1998; ROLPH *et al.*, 2001; PINHEIRO *et al.*, 2003). Contudo, no estudo de Haapasalo, Udnaes e Endal (2003), foi relatado que o gênero *Actinomyces spp.* pode ser frequentemente isolado de casos de periodontite apical primária, além de outras bactérias, como: *Prevotella spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Streptococcus spp* e *Lactobacillus spp.*

A actinomicose periapical é provocada pela espécie *Actinomyces* e acredita-se que seja uma lesão periapical não resolvida associada à infecção actinomicótica e foi sugerida como fator contribuinte na perpetuação de imagens radiolúcidas periapicais após o tratamento endodôntico (SAKELLARIOU, 1966; SJOGREN *et al.*, 1988). O diagnóstico da actinomicose periapical só pode ser confirmado após a remoção cirúrgica da lesão e realização do exame histopatológico (SMEGO JR; FOGLIA, 1998).

Nos estudos de Sundqvist & Reuterving (1980) e O'Grady & Reade (1988), a *Actinomyces israelii* foi apontado como um microrganismo que repetidamente é encontrado nos tecidos periapicais de casos que não obtiveram sucesso clínico após o tratamento endodôntico convencional e que está diretamente implicado nos casos de actinomicose periapical.

Um estudo isolou repetidamente uma linhagem de *Actinomyces israelii* do canal radicular de um caso resistente à terapia e mostrou a presença do mesmo organismo no tecido periapical por uma técnica imuno-histoquímica (SUNDQVIST; REUTERVING, 1980).

Alguns estudos analisaram as taxas de detecção de *Actinomyces* em amostras clínicas endodônticas, e os resultados variaram de 9% entre 53 amostras examinadas por uma análise que verifica o Ácido Desoxirribonucleico (DNA), chamado DNA-DNA checkerboard (SIQUEIRA *et al.*, 2002a) a 56% entre 129 amostras examinadas pela PCR (XIA; BAUMGARTNER, 2003).

Ainda não há um completo entendimento da relação entre o tratamento endodôntico e o desenvolvimento e propagação da infecção actinomicótica. A espécie *Actinomyces* se apresenta normalmente como um parasita oral, dessa forma, quando ocorre a perda do selamento coronário e a obturação do canal radicular fica exposta ao contato da saliva, o microrganismo pode atingir o tecido perirradicular e causar a actinomicose periapical (SIQUEIRA JR, 2001). Devido ao fato de a *Actinomyces* se agregar por meio de colônias, isso facilita o seu escape do sistema de defesa do hospedeiro, podendo então persistir na região periapical por mais tempo (FIGDOR *et al.*, 1992).

Ainda se discute muito sobre como funciona o mecanismo patogênico da *Actinomyces*. Algumas evidências podem ser úteis na explicação de como funciona a infecção actinomicótica. O tecido necrosado da polpa dentária não oferece resistência durante a invasão por esses microrganismos, exceto quando ocorrem pressões seletivas que são exercidas por condições ambientais, que acabam por ser um meio adequado para as espécies *Actinomyces*. Algumas espécies do gênero *Actinomyces* possuem estruturas fimbriais que desempenham papel importante na co-agregação bacteriana no interior do SCR, tornando o meio adequado para a sobrevivência desses microrganismos no interior da lesão periapical. As fímbrias presentes na estrutura desse microrganismo permitem a sua adesão à parede do canal radicular e aos restos dentinários que são levados para fora do forame apical durante o PQM. As fímbrias também contribuem para que esses microrganismos se agarrem a outras bactérias presentes dentro do SCR, logo, avançando para os tecidos periapicais do hospedeiro (FIGDOR *et al.*, 1992).

Nos casos em que há a confirmação de infecção pelo gênero *Actinomyces*, não é necessário o uso de antibioticoterapia, devido a confirmação de que essas espécies são sensíveis ao NaOCl e ao Ca(OH)₂ (BARNARD; DAVIES; FIGDOR, 1996).

Actinomyces israelii é um microrganismo que apresenta a alta capacidade de escapar da destruição e eliminação pelas células fagocíticas do hospedeiro devido ao fato de ser estabelecer dentro do SCR em forma de colônias coesivas e de apresentar

como característica estrutural as fímbrias que se ramificam no tecido periapical, se tornando a chave principal para a sua patogenicidade (FIGDOR *et al.*, 1992).

2.2 PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO

O PQM é uma etapa do tratamento endodôntico que engloba o uso da instrumentação mecânica associada a uma substância química irrigadora do canal radicular. Esse método foi considerado por muito tempo o método mais eficiente de desinfecção endodôntica e resolução de infecções intrarradiculares (AKCAY *et al.*, 2016). Atualmente, é observado que apesar do PQM convencional, utilizando instrumentação mecânica e soluções químicas, ter eficiência comprovada, o tratamento endodôntico convencional pode apresentar insucessos frente a casos de infecção persistente (VERA *et al.*, 2012).

A limpeza e modelagem dos canais radiculares é realizada através do PQM utilizando instrumentos endodônticos e substâncias químicas. A limpeza é realizada objetivando a remoção de todo o tecido pulpar vivo ou necrosado, eliminação ou redução da carga microbiana presente no sistema de canais radiculares, proporcionando assim, um meio favorável à reparação dos tecidos perirradiculares (LOPES; SIQUEIRA JR; ELIAS, 2004).

Através da instrumentação, irrigação e MIC, buscamos a completa limpeza do SCR. Esses três procedimentos devem ser usados de forma combinada no tratamento (CARDOSO, 2008).

Para que o tratamento endodôntico obtenha sucesso é necessário que seja realizado um correto PQM e que a obturação dos canais radiculares esteja hermética e tridimensional (AKCAY *et al.*, 2016).

O PQM do canal radicular é uma etapa muito importante durante todo o tratamento endodôntico, pois, quando se tem a presença de infecção endodôntica e bactérias localizadas no interior do SCR, os mecanismos de defesa do hospedeiro, normalmente, não conseguem combater sozinho essa infecção. Assim, o PQM utiliza de recursos químicos (solução irrigadora), físicos (irrigação e aspiração) e mecânicos (instrumentação) na tentativa de remover bactérias localizadas tanto na luz do canal

como no interior dos túbulos dentinários, aumentando o potencial de sanificação dos canais radiculares (LEONARDO, 2005).

Para que se obtenha a sanificação dos canais radiculares, é necessário o efeito tanto químico como mecânico das soluções irrigadoras (BERBER *et al.*, 2006). A eficiência de uma solução irrigadora depende de vários fatores, como: volume empregado, temperatura, tempo de contato, profundidade de penetração da agulha irrigadora, calibre da agulha, tensão superficial do irrigante e o tempo decorrido de sua fabricação (LEONARDO, 2005).

O procedimento de irrigação dos canais radiculares durante o tratamento endodôntico tem um importante papel na eliminação ou redução dos microrganismos. O objetivo das soluções irrigadoras é de remover debris, lubrificar as paredes dentinárias, dissolver matéria orgânica e atuar com poder antibacteriano (SIQUEIRA JR *et al.*, 2000; SIQUEIRA JR *et al.*, 2002b).

As soluções irrigadoras são empregadas durante o tratamento endodôntico, como forma de tentar eliminar os agentes patológicos resistentes ao PQM, atuando então não só como um agente antimicrobiano, mas também como potencializador na remoção de detritos, aumentando as taxas de sucesso da instrumentação dos canais. Durante o tratamento endodôntico é possível utilizar diversos tipo de substâncias irrigadoras. As mais comuns na prática clínica são: NaOCl, CLX e Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (EDTA) (ABRAHAM, 2015).

O uso de soluções irrigadoras durante o tratamento endodôntico proporciona um alcance maior a sítios de difícil acesso, em que a instrumentação não conseguiu chegar. Entre os maiores obstáculos para se conseguir a completa sanificação e modelagem dos canais radiculares está: a presença de inúmeros túbulos dentinários nas raízes, presença de microrganismos em biofilme e na região de túbulos dentinários e formação de smear layer durante a instrumentação (TORABNEJAD, 2002).

A etapa de irrigação dos canais radiculares deve ser realizada de forma crítica, pois o canal radicular é composto por terços (cervical, médio e apical) e cada um destes terços apresenta características próprias que exigem uma abordagem diferente para cada um (IRALA *et al.*, 2012).

A MIC é utilizada para eliminação de bactérias remanescentes após o PQM, diminuição da dor e inflamação dos tecidos periapicais, neutralização dos restos teciduais, como barreira de preenchimento temporário e para ajudar a remover

exsudatos persistentes (CHAN *et al.*, 1992; GHODDUSI *et al.*, 2006; MOLANDER *et al.*, 2007).

Um importante papel desempenhado pela MIC é de impedir a proliferação de microrganismos dentro do SCR, que poderá ocorrer caso haja um restabelecimento de um ambiente de anaerobiose, após realização de um selamento coronário provisório, caso ainda existam microrganismos remanescentes ao PQM (GAMA *et al.*, 2008).

O uso da MIC como agente desinfectante em dentes portadores de lesão perirradicular é muito importante, já que se concluiu que o PQM sozinho não é capaz de erradicar a infecção do SCR (SIQUEIRA JR; RÔÇAS; LOPES, 2002; SIQUEIRA JR *et al.*, 2002b).

No estudo de Tuncer *et al.* (2014), os autores afirmaram que o sucesso do tratamento endodôntico está diretamente ligado ao adequado desbridamento químico-mecânico. Contudo, em seu estudo, verificou-se que cerca de 35% das superfícies radiculares são inacessíveis à instrumentação por conta de sua complexa anatomia.

O maior desafio atual na Endodontia é conseguir a completa sanificação do SCR e com isso a preservação do dente tratado endodonticamente na cavidade oral (SCHOOP *et al.*, 2006).

Mesmo seguindo todos os protocolos do tratamento endodôntico de forma correta, o sucesso clínico do tratamento não é certo, devido a existência de muitos fatores que não estão sob o controle do operador. Dentre esses fatores estão: composição tubular da estrutura dentinária – que favorece a formação de um biofilme bacteriano em seu interior, complexidade morfológica do SCR e a presença de situações patológicas ou anormais como calcificações ou reabsorções internas. Todos esses fatores podem contribuir para o insucesso do caso clínico (PLOTINO; GRANDE; MERCADE, 2019).

A complexidade do SCR – existência de istmos, ramificações e rede de microtúbulos, dificulta a completa sanificação do canal radicular durante o PQM convencional. Uma sanificação completa em canais que apresentam infecção se torna complicada se for realizada apenas com abordagens convencionais (VERA *et al.*, 2012).

Portanto, atualmente vem sendo introduzido durante o PQM dos canais radiculares, métodos coadjuvantes que buscam aumentar o sucesso clínico do

tratamento endodôntico, de forma a impedir a proliferação microbiana (LEONARDO; LEONARDO, 2016).

2.3 TERAPIA FOTODINÂMICA

A PDT foi relatada na literatura médica, pela primeira vez, em 1941, sendo definida como uma reação entre Fotossensibilizador (FS) e luz, gerando efeito citotóxico através de reações oxidativas. Nessa terapia, um agente químico (corante) é utilizado e ativado por luz (sensibilização) causando morte celular, principalmente, por apoptose (FAN *et al.*, 1996; WAINWRIGHT, 1998; MACHADO, 2000; ACKROYD *et al.*, 2001 LEE; BIRD; WALSH, 2004; ALFENAS *et al.*, 2011).

Na revisão de literatura escrita por Ackroyd *et al.* (2001) fala-se que o conceito da PDT é conhecido por mais de 100 anos, quando Oscar Raab publicou o primeiro artigo falando sobre efeitos fotodinâmicos e ao utilizar o corante de acridina observou que sua baixa concentração na presença de luz podia ser letal aos paramécios, o protozoário causador da malária. O efeito letal era causado pela transferência da energia da luz para a substância química, similar ao que ocorre nas plantas pela absorção da luz pela clorofila. Os autores também relataram que a primeira aplicação da PDT na Medicina foi atribuída a Tappeiner e Jesionek em 1903, que utilizaram a aplicação tópica do corante eosina e exposição à luz para tratamento de câncer cutâneo. Em 1907, Von Tappeiner denominou este fenômeno de ação fotodinâmica. A partir disso, deram início às pesquisas nesta área, principalmente no combate ao câncer, na busca de novos fotossensibilizantes e novas fontes de luz.

Na Endodontia, o uso do *laser* foi relatado por Weichman & Johnson em 1971, mas apenas recentemente o seu uso tem sido reconhecido e indicado. Os *lasers* são considerados segundo a literatura, um eficiente coadjuvante na redução bacteriana intracanal (WALSH, 2003).

A utilização de *lasers* de alta potência oferece bons resultados na descontaminação dos canais radiculares, porém, o aumento de temperatura, inerente ao processo, torna o procedimento um tanto quanto duvidoso, devido à possibilidade de causar injúrias ao tecido adjacente. Por outro lado, os *lasers* de baixa potência requerem uma tecnologia menos complexa, são mais compactos e apresentam um

custo reduzido, o que favorece seu uso durante a prática clínica (GARCEZ *et al.*, 2003).

Alguns estudos têm demonstrado resultados satisfatórios e demonstram uma redução bacteriana significativa no SCR (BONSOR *et al.*, 2006; SOUKOS *et al.*, 2006; WILLIAMS; PEARSON; COLLES, 2006).

Para atingir a completa sanificação do SCR, vem sendo necessário a utilização de técnicas coadjuvantes à técnica de instrumentação dos canais radiculares. Desse modo, a inserção do uso da irradiação *laser* de baixa intensidade, vem sendo apontada como uma nova abordagem para auxiliar na eliminação de microrganismos presentes no SCR. Diferentemente do uso dos instrumentos endodônticos e soluções irrigadoras, a luz *laser* pode ser redirecionada, em virtude de sua transmissão através dos prismas de esmalte e túbulos dentinários, agindo efetivamente ao longo de todo o canal, assim, a técnica utilizando o *laser* não vê a complexidade anatômica como um obstáculo à eliminação dos microrganismos presentes no SCR (SEAL *et al.*, 2002).

O uso do *laser* de baixa intensidade como terapia antimicrobiana, não promove aumento na temperatura do tecido circundante. A sua aplicação não altera a temperatura do tecido circundante em mais de 7° C, o que impossibilita qualquer dano tecidual, favorecendo assim a sua utilização durante o tratamento endodôntico (GUTKNECHT *et al.*, 2005).

Os *lasers* de baixa potência são as fontes de luz mais utilizadas, eles são monocromáticos em um comprimento de onda específico para a ativação do FS (O'NEIL; WILSON; WAINWRIGHT, 2003; GAD *et al.*, 2004).

A terapia com *laser* de baixa intensidade não oferece risco de resistência microbiana, sendo assim considerado um método coadjuvante ao tratamento antimicrobiano (GARCEZ *et al.*, 2007)

A aPDT é um procedimento em duas etapas, incluindo a aplicação de um FS (passo 1: fotossensibilização do tecido infectado) que é seguido pela iluminação de luz deste tecido (passo 2: irradiação do tecido fotossensibilizado) resultando em fotoquímica tóxica e lise celular (KISHEN, 2012).

A ativação do FS ocorre através de exposição à luz com um comprimento de onda na presença de oxigênio e gera oxigênio singlete e radicais livres, levando a dano letal das células bacterianas, por exemplo danos no DNA e danos na membrana citoplasmática (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007; GURSOY *et al.*, 2013).

A aPDT deve ser realizada baseada na tríade: fonte de luz, FS e oxigênio, uma vez que a energia absorvida pelo FS é transferida à molécula de oxigênio, dando origem à reação oxidativa. Como o oxigênio reage com qualquer micromolécula, qualquer microrganismo pode ser alvo da PDT (SCHACKLEY *et al.*, 1999).

O *laser* de baixa intensidade só consegue ação bactericida se associado a um FS (WILSON, 2004). A maior parte das espécies bacterianas não apresenta componentes fotossensíveis, assim, se torna necessário a utilização de um composto para atrair a luz e iniciar a formação de radicais livres. A habilidade de um componente em absorver luz incidente não significa necessariamente que ele possa atuar como um FS. Para produzir efeito antimicrobiano, o FS deve apresentar picos de absorção próximos ao comprimento de onda da luz utilizada e não devem apresentar toxicidade ao hospedeiro (WILSON *et al.*, 1992). Portanto, as células que não apresentam componentes fotossensíveis endógenos podem se tornar sensíveis a luz quando coradas com substâncias como o azul de toluidina, azul de metileno, eosina e hematoporfirinas (WILSON, 1993).

Durante a aPDT ocorre um processo fotoquímico em que a excitação eletrônica do FS provoca dois mecanismos: tipo I – transferência de elétrons - e tipo II – transferência de energia. No mecanismo tipo I, há a formação de produtos oxidados e ocorre em cerca de 5% da reação. Nos outros 95%, ocorre o mecanismo tipo II, mais desejável e responsável pela apoptose que, diferentemente da necrose, não provoca injúria aos tecidos adjacentes. Na apoptose, a célula tem morte programada e formação de vesículas (corpos apoptóticos) que são fagocitadas por macrófagos posteriormente. Como não há lise celular, não há extravasamento do conteúdo citoplasmático, evitando assim, lesão tecidual. Isso torna a aPDT uma terapia eficaz e segura (KRISTIANSEN; AMARAL, 1997; KUBLER *et al.*, 1998; GAD *et al.*, 2004).

Além disso, ao contrário dos antibióticos, que têm um único alvo na célula microbiana, as espécies reativas de oxigênio (ERO_s) geradas a partir da reação fotodinâmica podem danificar múltiplas estruturas celulares, reduzindo as chances de desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes à aPDT (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007).

Como qualquer modalidade de tratamento, a aPDT deve idealmente ter a capacidade de destruir os microrganismos responsáveis pela doença sem causar danos aos tecidos saudáveis circundantes do hospedeiro. Baixa toxicidade e efeito rápido são qualidades desejáveis da aPDT (SOUKOS; GOODSON, 2011). Foi

estabelecido que os FS, que tem uma forte carga catiônica, pode rapidamente se ligar e penetrar nas células bacterianas e, assim, estes compostos apresentam um alto grau de seletividade de microrganismos sobre as células hospedeiras (MAISCH *et al.*, 2005).

A aPDT se destacou rapidamente, por ser uma alternativa antimicrobiana, com largo espectro e grande potencial de ação (SANTIN *et al.*, 2014), além de possibilitar o alcance do efeito microbicida às áreas mais difíceis dentro do SCR, onde muitas vezes nem mesmo os agentes de defesa do hospedeiro conseguem chegar (DUNAVANT *et al.*, 2006). Esses fatores, associados à fácil aplicabilidade e viabilidade clínica, colaboraram para aumentar o número de profissionais que a utilizam, bem como o reconhecimento da técnica (DE MIRANDA; COLOMBO, 2018).

A aPDT parece ser um método coadjuvante eficaz no tratamento endodôntico, uma vez que os relatórios mostraram um grau adicional de redução microbiana *in vitro* e *in vivo* quando o uso de aPDT é feita após o PQM (GARCEZ *et al.*, 2007; FIMPLE *et al.*, 2008; GARCEZ *et al.*, 2010; SABINO *et al.*, 2015; KOSARIEH *et al.*, 2016).

Foi confirmado que a aPDT leva a uma significativa redução da carga bacteriana intracanal, se comparado à terapia convencional. Estudos comprovam a efetividade da aPDT aos grandes causadores de persistência da infecção endodôntica: resultados mostram que ela foi capaz de eliminar mais de 80% da carga microbiana, se comparado à carga inicial; a combinação do PQM à aPDT foi capaz de eliminar 9 cepas diferentes de bactérias multirresistentes a medicamentos em infecções radiculares (GARCEZ *et al.*, 2008; SINGH *et al.*, 2015; DE MIRANDA; COLOMBO, 2018); a aPDT se mostrou eficiente contra o *E. faecalis* (MEIRE *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2018) e a *C. albicans* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Garcez *et al.* (2008) avaliou o efeito da aPDT como terapia coadjuvante ao tratamento endodôntico. Em seu estudo foram selecionados 20 pacientes que apresentavam diagnóstico de Necrose Pulpar e Periodontite Apical. Foram retiradas amostras microbiológicas durante as fases do tratamento e enviadas posteriormente para análise. Os resultados sugeriram que o uso da aPDT como coadjuvante ao tratamento endodôntico diminui significativamente a carga bacteriana, podendo ser considerada uma terapia adequada para o tratamento de infecções endodônticas.

Os FS mais utilizados são o azul de toluidina e o azul de metileno, que são FS sintéticos. Cada um possui um espectro de ação da luz sobre um comprimento de onda de máxima absorção (SCHACKLEY *et al.*, 1999).

Para que o azul de metileno proporcione maior liberação de oxigênio singlete e por conseguinte melhor efeito antibacteriano, a concentração ideal varia entre 0,001% e 0,01% (KOMINE; TSUJIMOTO, 2013).

Outro estudo avaliou o efeito da aPDT com azul de metileno em 64 canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis in vitro*. A contaminação foi confirmada através de microscopia eletrônica de varredura 3 dias após a inoculação das cepas no interior dos canais radiculares. Os canais foram irrigados com azul de metileno e aguardado um tempo de 5 minutos, então foram expostos à luz emitida por *laser* de diodo e fibra óptica. Após aplicação do *laser* o conteúdo do canal foi coletado e as amostras diluídas de maneira seriada e cultivadas em ágar sangue. A aPDT promoveu redução bacteriana de 77,5% (FOSCHI *et al.*, 2007).

Para aPDT mediada por azul de metileno em células de *Enterococcus faecalis*, foram relatados, comprometimento funcional da parede celular, dano extensivo do DNA cromossômico e degradação das proteínas da membrana (GEORGE; KISHEN, 2008).

Pourhajibagher & Bahador (2018) avaliaram *in vivo* a ação da aPDT, uma terapia que vem sendo introduzida junto ao tratamento endodôntico, como forma de evitar a resistência microbiana, devido a natureza polimicrobiana das infecções endodônticas primárias estar associada à diversidade microbiana e ao aumento da resistências ao agentes antimicrobianos utilizados durante o tratamento, e para diminuir as falhas do tratamento endodôntico. Neste estudo, foi avaliado o efeito da aPDT, através da coleta de amostras microbiológicas do canal radicular, na redução da contagem microbiana de pacientes que apresentavam infecções endodônticas primárias. Após análise microbiológica, foram isoladas 45,4% de bactérias anaeróbicas estritas, que incluía: *Veillonella parvula*, *Porphyromonas gingivalis*, *Propionibacterium acnes*, *Lactobacillus acidophilus*, *Campylobacter rectus* e *Slackia exigua*, em ordem de frequência; e 45,4% de bactérias anaeróbicas facultativas; e 9,2% era bactérias microaerofílicas (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). O estudo mostrou uma significativa redução na diversidade microbiana após uso da aPDT e concluiu que ela é eficaz na redução microbiana nas infecções endodônticas primárias.

Em uma pesquisa experimental com dentes humanos extraídos, *in vitro*, avaliou-se os efeitos fotodinâmicos do azul de metileno de canais radiculares infectados com microrganismos multiespécie como: *Actinomyces israelii*,

Fusobacterium nucleatum, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. Eles alcançaram até 80% de redução de unidades formadoras de colônias e concluiu-se que a aPDT pode ser um complemento eficaz ao tratamento antimicrobiano padrão (FIMPLE *et al.*, 2008).

O uso da aPDT coadjuvante ao tratamento endodôntico convencional, pode reduzir a microbiota endodôntica. Dentre as vantagens da aPDT está a de ser uma terapia seletiva e de fácil aplicabilidade (ALFENAS *et al.*, 2011).

Após a finalização do tratamento endodôntico, os exames clínicos e radiográficos é que apontam sobre o sucesso do tratamento e remissão dos processos patológicos (GARCEZ *et al.*, 2007; SMAIL *et al.*, 2014).

O sucesso do tratamento endodôntico deve ser baseado em uma análise clínica e radiográfica (BARCELOS *et al.*, 2012). O tratamento é considerado efetivo quando toda a sintomatologia clínica desaparece e nos casos onde havia presença de lesão periapical há reparo e regeneração óssea (CANCIO *et al.*, 2017).

Alguns estudos realizaram a análise radiográfica de lesões periapicais após finalização do tratamento endodôntico, onde afirmam a importância de se realizar o acompanhamento das condições periapicais para se firmar um prognóstico (SEWELL *et al.*, 1999; SOARES; CESAR, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2005).

No estudo de Lopes *et al.* 2019, foi realizado o tratamento de dois dentes necróticos com presença de lesão periapical, utilizando o protocolo da aPDT. Para avaliar a eficácia do tratamento, foram realizados acompanhamentos radiográficos com 30, 60, 90 e 365 dias e a partir de 60 dias foi possível observar o início do reparo ósseo. Este trabalho, portanto, sugere que a aPDT pode ser uma terapia coadjuvante eficaz, que pode resultar na redução microbiana e favorecer o prognóstico dos tratamentos.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo clínico foi realizar uma avaliação radiográfica e antimicrobiana dos microrganismos *Enterococcus faecalis* e *Actinomyces israelii* após uso da aPDT, como coadjuvante na desinfecção do sistema de canais radiculares.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- a) Identificar a presença de *Enterococcus faecalis* e *Actinomyces israelii* nos canais radiculares antes e durante o tratamento endodôntico através da análise microbiológica das amostras em PCR em tempo real;
- b) Avaliar os efeitos na susceptibilidade desses dois microrganismos, após aplicação da aPDT;
- c) Realizar acompanhamento radiográfico dos pacientes para classificar o reparo periapical.

4 METODOLOGIA

4.1 COMITÊ DE ÉTICA

O presente projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética envolvendo pesquisa em humanos da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, com parecer aprovado sob número: 3.071.511 (ANEXO A). Todos os procedimentos foram conduzidos e submetidos com base à Resolução 466/12 e nas Normas Operacionais emanadas da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido de cada sujeito (ANEXO B).

4.2 LOCAL DO ESTUDO E SELEÇÃO DOS PACIENTES

O presente estudo foi realizado na Clínica de Endodontia da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG. Os pacientes que se apresentaram na Clínica de Endodontia para tratamento endodôntico foram considerados para este estudo. Vinte e cinco dentes foram selecionados, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão.

4.2.1 Critérios de inclusão

Dentre os critérios de inclusão para a pesquisa estão: dentes anteriores e posteriores (incisivos, caninos e pré-molares); diagnóstico de Necrose Pulpar após realização do teste térmico com frio; presença de lesão periapical; ápices fechados. Uma radiografia periapical foi feita para cada caso para determinar a presença de lesão periapical, morfologia do canal, comprimento e número de canais.

4.2.2 Critérios de exclusão

Dentre os critérios de exclusão para a pesquisa estão: molares, presença de abscesso agudo; pacientes com necessidade de retratamento do canal radicular; pacientes sob uso de antibioticoterapia sistêmica; pacientes portadores de diabetes *mellitus*; imunocomprometidos; grávidas; lactantes e pacientes que se recusaram a assinar o TCLE.

4.3 GRUPOS DE ESTUDO

Inicialmente foi estipulado a seleção de 30 dentes. 15 dentes foram alocados aleatoriamente no Grupo 1 (G1), porém no Grupo 2 (G2) foi possível alocar somente 10 dentes. Portanto, os dois grupos apresentam tamanhos diferentes, caracterizando um conjunto de dados desbalanceados.

G1 foi o grupo onde se realizou apenas o PQM convencional e uso de MIC entre sessões. Nesse grupo foram obtidas 45 amostras microbiológicas, retiradas do canal por meio de cones de papel absorvente: 15 amostras iniciais, 15 amostras após PQM e 15 amostras após 15 dias de ação da MIC.

G2 foi submetido ao PQM convencional, uso de MIC entre sessões e 2 aplicações de aPDT. Nesse grupo foram obtidas 30 amostras microbiológicas, retiradas do canal por meio de cones de papel absorvente: 10 amostras iniciais, 10 amostras após PQM e 1ª aplicação da aPDT e após 15 dias com a MIC, o paciente retornou para 2ª aplicação da aPDT e a retirada de mais 10 amostras microbiológicas.

4.4 PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO: G1

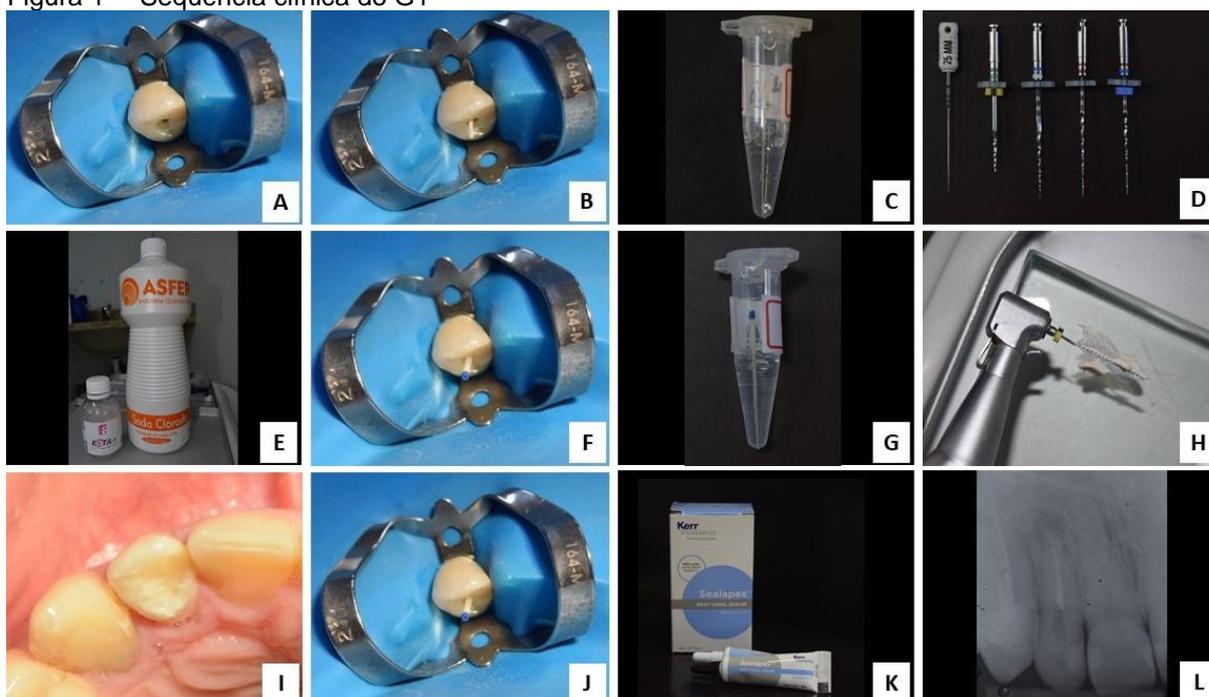
O acesso à câmara pulpar foi obtido após a instalação de isolamento absoluto com lençol de borracha (Figura 1A). Após realizado o acesso ao canal, foi introduzido no canal um cone de papel absorvente estéril fino nº 15 (Maillefer, Ballaigues, Suíça),

compatível com o diâmetro inicial do canal, por 1 minuto (Figura 1B). Este procedimento forneceu a primeira amostra microbiológica, representando a contaminação inicial do canal radicular. O cone de papel absorvente foi retirado do canal, e depositado em microtubo, com soro fisiológico 0,9% (Eurofarma, Itapevi, Brasil) (Figura 1C).

Em seguida, foi realizado o preparo cervical com lima rotatória IRace 35.08 (FKG Dentaire SA, Suíça), realização do *Glide Path* com uma lima manual 15 CPilot (VDW, Munique, Alemanha), para posterior realização da odontometria. O preparo apical do canal foi realizado com lima rotatória IRace na sequência: 15.06, 25.04 e por último 30.04 (Figura 1D), sempre com irrigação constante com solução de NaOCl 2,5%, e a irrigação final com NaOCl 2,5% + EDTA 17% + NaOCl 2,5% (Figura 1E). O canal foi irrigado com soro fisiológico 0,9% e secado com cone de papel absorvente estéril, ficando dentro do canal por 1 minuto (segunda amostra microbiológica) (Figura 1F). O cone de papel absorvente foi retirado do canal, e depositado em microtubo, com soro fisiológico 0,9% (Eurofarma, Itapevi, Brasil) (Figura 1G).

Foi aplicada no interior do canal, MIC Callen PMCC (SSWhite, Rio de Janeiro, Brasil) com auxílio de broca Lentulo (Maillefer, Ballaigues, Suíça) (Figura 1H). Uma bola de algodão esterilizada foi colocada na câmara pulpar, e o dente selado com material restaurador temporário (Inglass, Maquira Indústria de Produtos Odontológicos, Maringá, Paraná - Brasil) (Figura 1I). Em uma consulta subsequente, após 15 dias, foi removida a restauração provisória e a MIC com irrigação com NaOCl 2,5%. O canal foi novamente irrigado com soro fisiológico 0,9% e seco com cone de papel absorvente estéril, ficando dentro do canal por 1 minuto (terceira amostra microbiológica) (Figura 1J). O cone de papel absorvente foi retirado do canal, e depositado em microtubo, com soro fisiológico 0,9% (Eurofarma, Itapevi, Brasil). Cada canal radicular foi então obturado usando a técnica do cone único e cimento Sealapex (Kerr Corporation, United States) (Figura 1K). Ao final da obturação o dente foi selado com material restaurador temporário (Inglass; Maquira Indústria de Produtos Odontológicos S.A, Maringá, Paraná - Brasil). Em seguida, uma radiografia periapical foi feita para análise do tratamento endodôntico final (Figura 1L). Com 60 dias, o paciente retornou à clínica para nova radiografia periapical para acompanhamento do reparo da região periapical.

Figura 1 – Sequência clínica do G1



Fonte: Autora.

Nota: A) acesso à câmara pulpar após instalação de isolamento absoluto.

B) cone de papel absorvente estéril n° 15 no canal radicular.

C) primeira amostra microbiológica depositada em micro tubo.

D) sequência de limas rotatórias utilizadas durante o tratamento.

E) substâncias utilizadas durante a irrigação final.

F) cone de papel absorvente estéril n° 30 no canal radicular.

G) segunda amostra microbiológica depositada em micro tubo.

H) carregamento da MIC com broca Lentulo.

I) selamento provisório do dente.

J) cone de papel absorvente estéril n° 30 no canal radicular, terceira amostra microbiológica.

K) cimento utilizado para obturação do canal radicular.

L) radiografia periapical do tratamento endodôntico final.

4.5 PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO E TERAPIA FOTODINÂMICA: G2

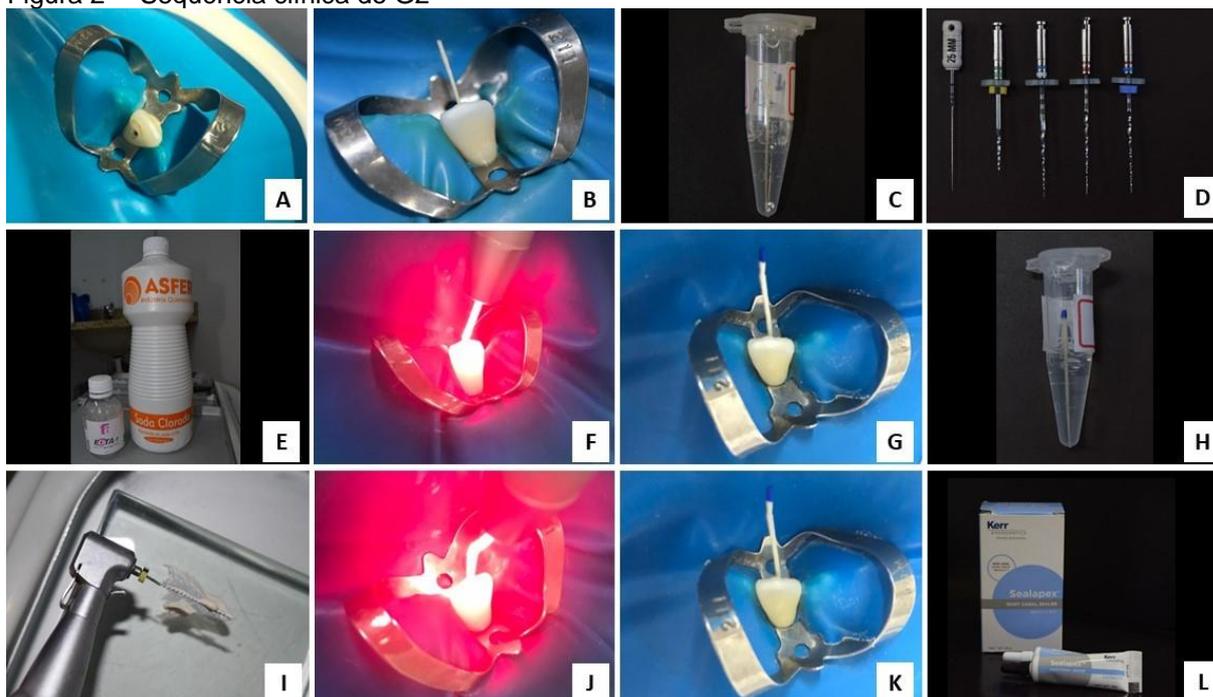
O acesso à câmara pulpar foi obtido após a instalação de isolamento absoluto com lençol de borracha (Figura 2A). Após realizado o acesso ao canal, foi introduzido no canal um cone de papel absorvente estéril fino n° 15 (Maillefer, Ballaigues, Suíça), compatível com o diâmetro inicial do canal, por 1 minuto (Figura 2B). Este procedimento forneceu a primeira amostra microbiológica, representando a contaminação inicial do canal radicular.

Todos os cones de papel absorvente estéreis, retirados dos canais, durante os tratamentos, foram depositados em microtubo, com soro fisiológico 0,9% (Eurofarma, Itapevi, Brasil) (Figura 2C).

Em seguida, foi realizado o preparo cervical com lima rotatória IRace 35.08 (FKG Dentaire SA, Suíça), realização do *Glide Path* com uma lima manual 15 CPilot (VDW, Munique, Alemanha), para posterior realização da odontometria. O preparo apical do canal foi realizado com lima rotatória IRace na sequência: 15.06, 25.04 e por último 30,04 (Figura 2D), sempre com irrigação constante com solução de NaOCl 2,5%, e a irrigação final com NaOCl 2,5% + EDTA 17% + NaOCl 2,5% (Figura 2E). O canal foi seco com cone de papel absorvente estéril.

O protocolo da aPDT escolhido para o G2 foi com aplicação de FS azul de metileno a 0,005% (Pharma Blue 5, 0,005 %, MMO – Distribuído por MMOptics, São Carlos, Brasil) (Figura 3A), o mais comumente usado na prática clínica (MULLER *et al.*, 2007) - e irradiado com o aparelho *Laser Duo* (MMO – Tecnologia para a saúde, São Carlos Brasil) (Figura 3B), emitindo luz vermelha no espectro visível, com energia de 9 Joules (J), e comprimento de onda de 400nm a 660nm. Primeiramente o conduto foi seco, para posterior preenchimento com o FS, com auxílio de sua própria seringa. Após a deposição do FS, o mesmo foi agitado com uma lima manual K#30 (Maillefer, Ballaigues, Suíça) para evitar formação de bolhas que poderiam impedir o seu contato completo com as paredes dentinárias (GARCEZ *et al.*, 2008). Foi dado tempo de pré-irradiação de 5 minutos para que o FS se dispersasse ao máximo, entrando em contato com toda superfície do conduto, penetrando efetivamente na parede celular bacteriana. Durante a aplicação do *laser*, paciente e operador utilizaram óculos de proteção próprios. O tempo de aplicação da aPDT foi de 90 segundos (Figura 2F) (WAINWRIGHT; CROSSLEY, 2002). Além disso, foi realizada a irradiação por meio de movimentos de apical para cervical, como pede o protocolo do aparelho, utilizando ponta difusora específica para aplicação intracanal (Figura 3C), sendo posicionada inicialmente o mais apical possível. Foi usada uma ponta difusora nova para cada paciente.

Figura 2 – Sequência clínica do G2



Fonte: Autora.

Nota: A) acesso à câmara pulpar após instalação de isolamento absoluto.

B) cone de papel absorvente estéril n° 15 no canal radicular.

C) primeira amostra microbiológica depositada em micro tubo.

D) sequência de limas rotatórias utilizadas durante o tratamento.

E) substâncias utilizadas durante a irrigação final.

F) 1ª aplicação da aPDT.

G) cone de papel absorvente estéril n° 30 no canal radicular.

H) segunda amostra microbiológica depositada em micro tubo.

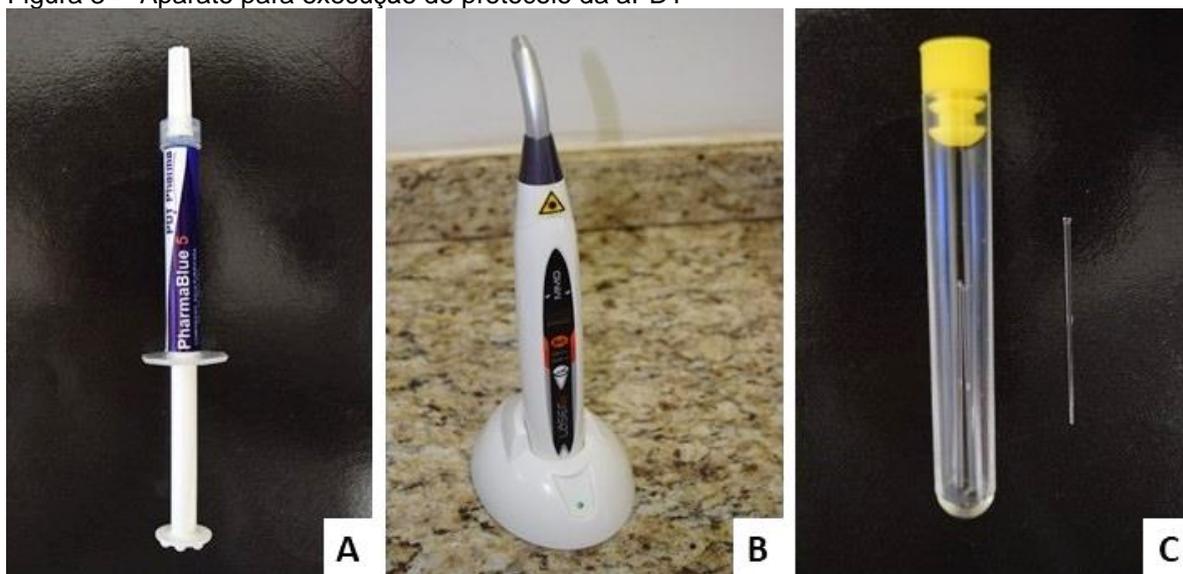
I) carregamento da MIC com broca Lentulo.

J) 2ª aplicação da aPDT.

K) cone de papel absorvente estéril n°30 no canal radicular, terceira amostra microbiológica.

L) cimento utilizado para obturação do canal radicular.

Figura 3 - Aparato para execução do protocolo da aPDT



Fonte: Autora.

Nota: A) corante Azul de Metileno 0,005% - PharmaBlue;

B) aparelho Laser Duo – MMOptics;

C) ponta difusora intracanal para aplicação de laser.

O canal radicular foi novamente irrigado com soro fisiológico 0,9% para remover o FS e seco com cone de papel absorvente estéril, ficando dentro do canal por 1 minuto (segunda amostra microbiológica) (Figura 2G). O cone de papel absorvente foi retirado do canal, e depositado em microtubo, com soro fisiológico 0,9% (Eurofarma, Itapevi, Brasil) (Figura 2H).

Foi aplicada no interior do canal, MIC Callen PMCC (SSWhite, Rio de Janeiro, Brasil) com auxílio de broca Lentulo (Maillefer, Ballaigues, Suíça) (Figura 2I). Uma bola de algodão esterilizada foi colocada na câmara pulpar, e o dente selado com material restaurador temporário (longlass; Maquira Indústria de Produtos Odontológicos S.A, Maringá, Paraná - Brasil).

Em uma consulta subsequente, após 15 dias, foi removida a restauração provisória e a MIC com irrigação com NaOCl 2,5%. O canal foi novamente irrigado com soro fisiológico 0,9% e uma segunda aplicação da aPDT foi realizada (Figura 2J), seguindo os mesmos passos descritos anteriormente e após a aplicação, o canal radicular foi novamente irrigado com soro fisiológico 0,9% para remover o FS e seco com cone de papel absorvente estéril, ficando dentro do canal por 1 minuto (terceira amostra microbiológica) (Figura 2K).

Cada canal radicular foi então obturado usando a técnica do cone único e cimento Sealapex (Kerr Corporation, Estados Unidos) (Figura 2L). Ao final da

obturação o dente foi selado com material restaurador temporário (Inglas; Maquira Indústria de Produtos Odontológicos S.A, Maringá, Paraná - Brasil). Em seguida, uma radiografia periapical foi feita para análise do tratamento endodôntico final. Com 60 dias, o paciente retornou à clínica para nova radiografia periapical para acompanhamento do reparo da região periapical.

4.6 PROCEDIMENTOS RADIOGRÁFICOS

Foi realizado acompanhamento radiográfico: raio-x inicial e raio-x após 60 dias do término do tratamento endodôntico, para acompanhamento do reparo da região periapical.

Foram realizadas radiografias intrabucais periapicais, pela técnica da Bisettriz, de 18 dentes que foram submetidos ao tratamento endodôntico. As radiografias foram tomadas pela técnica do paralelismo e bisettriz, com filmes Kodak Ultra-Speed (Kodak Company, Rochester, Estados Unidos), tempo de exposição de 0,6 segundos e aparelho de raios-x com 10 mA e 60 kV (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) e o paciente foi protegido por meio de avental de chumbo e protetor de tireóide. O processamento das radiografias periapicais foi realizada de maneira manual, através do método temperatura/tempo, utilizando-se soluções reveladora e fixadora (Carestream Dental, São Paulo, Brasil).

4.6.1 Análise Radiográfica

A análise das radiografias foi realizada através de uma inspeção visual comparativa entre a radiografia inicial e radiografia obtida após 60 dias da finalização do tratamento.

Inicialmente seriam avaliadas 25 radiografias, referentes ao número de dentes alocados em cada grupo. Porém, alguns pacientes não retornaram para o acompanhamento radiográfico. O número de dentes acompanhados radiograficamente ficou no total de 10 dentes para o G1 e 8 dentes para o G2. Dessa

forma, os dois grupos apresentam tamanhos diferentes, caracterizando um conjunto de dados desbalanceados.

As imagens radiográficas do G1 e G2 foram analisadas por dois examinadores cegos, especialistas em Endodontia. A análise radiográfica foi realizada atribuindo-se escores de 1 a 4 (FRIEDLANDER; LOVE; CHANDLER, 2002; ATHAR *et al.*, 2008), para classificar o reparo periapical, de acordo com as imagens radiográficas obtidas. No Quadro 2, é possível observar as quatro categorias onde as condições de reparo foram enquadradas.

Quadro 2 - Critérios utilizados para classificação do reparo apical

| ESCORE | CLASSIFICAÇÃO DO REPARO | DESCRIÇÃO |
|--------|-------------------------|--|
| 1 | Reparo total | Estrutura periapical normal com presença de lâmina dura |
| 2 | Reparo parcial | Ausência de lâmina dura, com pequeno espessamento do ligamento periodontal |
| 3 | Reparo duvidoso | Presença de área radiolúcida menor do que a anterior |
| 4 | Ausência de reparo | Presença de área radiolúcida igual ou maior do que a anterior |

Fonte: NERY *et al.*, 2012

4.6.2 Análise Estatística

Após análise das imagens pelos examinadores cegos, foi realizado o Teste de concordância Kappa e interpretado de acordo com os autores Landis & Koch (1977).

Após a realização do Teste de concordância Kappa, realizou-se o teste G para avaliar a associação entre a classificação do reparo e grupo.

As análises foram realizadas no *software* R, versão 3.6.2.

4.7 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

4.7.1 Extração de DNA

A extração foi realizada utilizando-se o kit Purelink Genomic DNA Kit (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos) (Figura 4A e Figura 5). Até o momento da realização do protocolo de extração do DNA genômico, as amostras ficaram estocadas em freezer à -20°C.

Para iniciar o processo de extração, os microtubos contendo as amostras foram retirados do freezer até atingirem a temperatura ambiente. Os microtubos foram agitados para remoção mecânica do material biológico dos cones de papel. Em seguida os microtubos foram alocados na centrífuga, na rotação de 10,000 RPM por 5 minutos, para sedimentação do material biológico. Após centrifugação foram adicionados a cada microtubo 180 µL de Genomic Digestion Buffer e 20 µL de Proteinase K. Em seguida todos os microtubos foram alocados no banho seco com controle de temperatura por, no mínimo, duas horas à 56° C.

Após o tempo de espera, os cones foram retirados, e ao material foram adicionados 200 µL de Genomic Lysis e 200 µL de Etanol 96%. O líquido resultante foi transferido para uma coluna do kit e posteriormente alocado na centrífuga, na rotação de 10,000 RPM por 1 minuto, para a retenção do DNA genômico.

Foi adicionado a cada microtubo 500 µL de Wash Buffer 1 (tampão de lavagem) e os microtubos foram colocados na centrífuga, na rotação de 10,000 RPM por 1 minuto. Na etapa seguinte, foi adicionado a cada microtubo 500 µL de Wash Buffer 2 (tampão de lavagem) e os microtubos foram recolocados na centrífuga, na rotação de 10,000 RPM por 1 minuto.

O conteúdo presente abaixo do filtro de cada microtubo foi descartado e os microtubos foram centrifugados na rotação de 10,000 RPM por 3 minutos, para total secagem do material. O tubo coletor foi descartado e o filtro foi encaixado em um microtubo vazio. Foi adicionado a cada microtubo 30 µL de Elution Buffer (solução tamponada de eluição) e aguardado um tempo de 3 minutos. Após isso, os microtubos foram centrifugados na rotação de 10,000 RPM por 1 minuto, para eluição do material. Os filtros foram descartados e os microtubos com as amostras extraídas foram

fechados e estocados em freezer à -20°C, até o momento da realização da PCR em tempo real.

Figura 4 – Aparato para a realização da técnica da PCR em tempo real



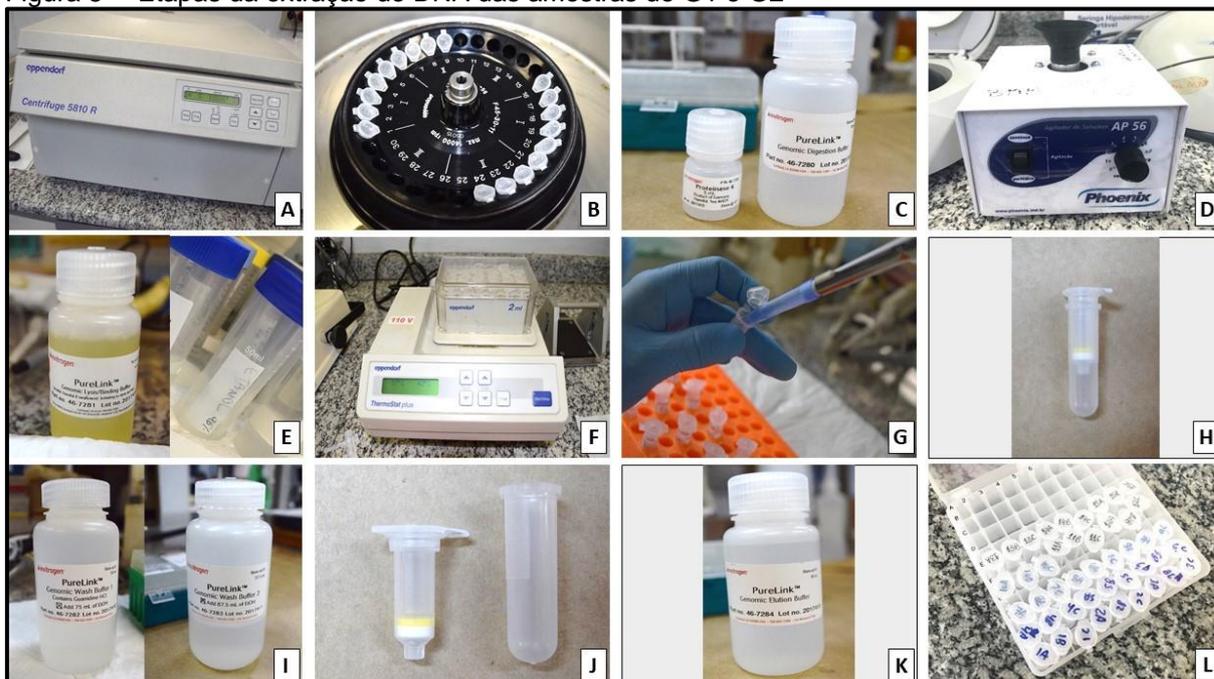
Fonte: ThermoFischer Scientific

Nota: A) PureLink™ Genomic DNA Kit.

B) PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix.

C) StepOne™ Real-Time PCR System.

Figura 5 – Etapas da extração de DNA das amostras do G1 e G2



Fonte: Autora.

Nota: A) modelo de centrífuga utilizada no laboratório.

B) amostras em posição para iniciar o processo de centrifugação.

C) soluções Proteinase K e Digestion Buffer.

D) agitador de soluções.

E) soluções tampão de lise e álcool 96%.

F) agitador com controle de temperatura.

G) transferência do sobrenadante.

H) microtubo com filtro.

I) soluções tamponadas para lavagem: Wash Buffer 1 e Wash Buffer 2.

J) microtubo com filtro e coletor separado.

K) solução tamponada de eluição: Elution Buffer.

L) amostras armazenadas após finalização do protocolo de extração de DNA.

4.7.2 PCR em tempo real

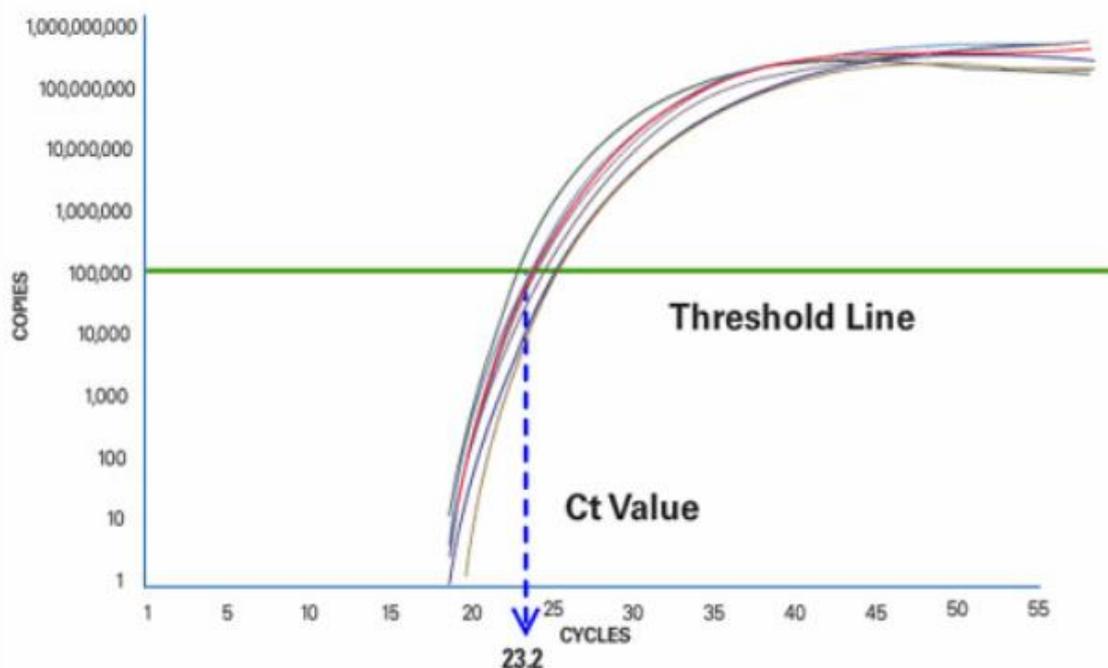
As reações da PCR em tempo real foram realizadas utilizando o Power SYBR Green PCR Master Mix como marcador fluorescente (Figura 4B). As reações da PCR em tempo real foram realizadas em um ABI StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, Estados Unidos) (Figura 4C), em um volume final de 10 μ L por reação. O volume de 1 μ L de DNA (amostras ou controles) foram adicionadas a um reagente contendo 5 μ L de 2X Power SYBR® Green Master Mix e 1 μ L de uma mistura que inclui os marcadores forward e o reverse na concentração de 10 μ M e 3 μ L de água ultra-pura. Foram adicionados às reações, dois controles negativos e um controle positivo. As amplificações ocorreram em um ciclo inicial de

95°C por 10, seguido de trinta e cinco ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por um minuto. Na próxima etapa foi realizado o estágio de Melting Curve constituído de um estágio inicial a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, seguido da elevação da temperatura, realizando a leitura após cada incremento de 0,3°C, até atingir a temperatura final de 95°C.

Para a identificação de *Enterococcus faecalis* foram utilizados os marcadores 5' GTT TAT GCC GCA TGG CAT AAG AG 3' e 5' CCG TCA GGG GAC GTT CAG 3' e para *Actinomyces israeli*, serão utilizados os marcadores 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' e 5' CCA AAA CAC CAC AAA AGT GA 3' (SPANGBERG *et al.* 2008).

4.7.3 Interpretação dos resultados

Para determinar se as amostras eram positivas para a presença de DNA de *Enterococcus faecalis* e *Actinomyces israeli* empregando-se a técnica da PCR em tempo real, os valores de quantificação foram então calculados pelo sistema de software e os valores do limiar cíclico (Ct) foram obtidos verificando-se quando a curva exponencial cruzou a linha do Threshold (Figura 6), ou seja, o nível de fluorescência no início do crescimento exponencial.

Figura 6 - *Threshold Cycle* ou *Ct*

Fonte: AB APPLIED BIOSYSTEMS, 2008

4.7.4 Análise estatística

Com o intuito de avaliar a associação entre as variáveis qualitativas foi utilizado o teste de Exato de Fisher, considerando um nível de significância de 5%. Para verificar se há diferença entre grupos e entre coletas do mesmo grupo, realizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon e Kruskal Wallis, pois verificou-se a ausência de normalidade por meio do teste de Shapiro Wilk, valor $p < 0,05$, para ambas as bactérias.

Para avaliar a diferença das coletas em cada grupo foi realizado o teste Kruskal Wallis. Para avaliar a diferença entre os grupos em cada coleta foi realizado o teste Wilcoxon.

As análises foram realizadas no *software* R, versão 3.6.2.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Os resultados do teste de associação entre as variáveis qualitativas são apresentados na Tabela 1 e 2.

Por meio da Tabela 1, nota-se que não há diferença entre os grupos com relação ao sexo ($p=0,679$). Nota-se também que houve diferença entre os grupos em relação à presença de *Enterococcus faecalis* nas coletas 1 ($p=0,003$) e 2 ($p=0,012$), no entanto não houve diferença estatística entre os grupos e coleta 3 ($p=0,099$). Com relação à associação entre arcadas, sexo e coletas 1, 2 e 3, não demonstraram significância estatística, pois o valor p é superior ao nível de significância adotado.

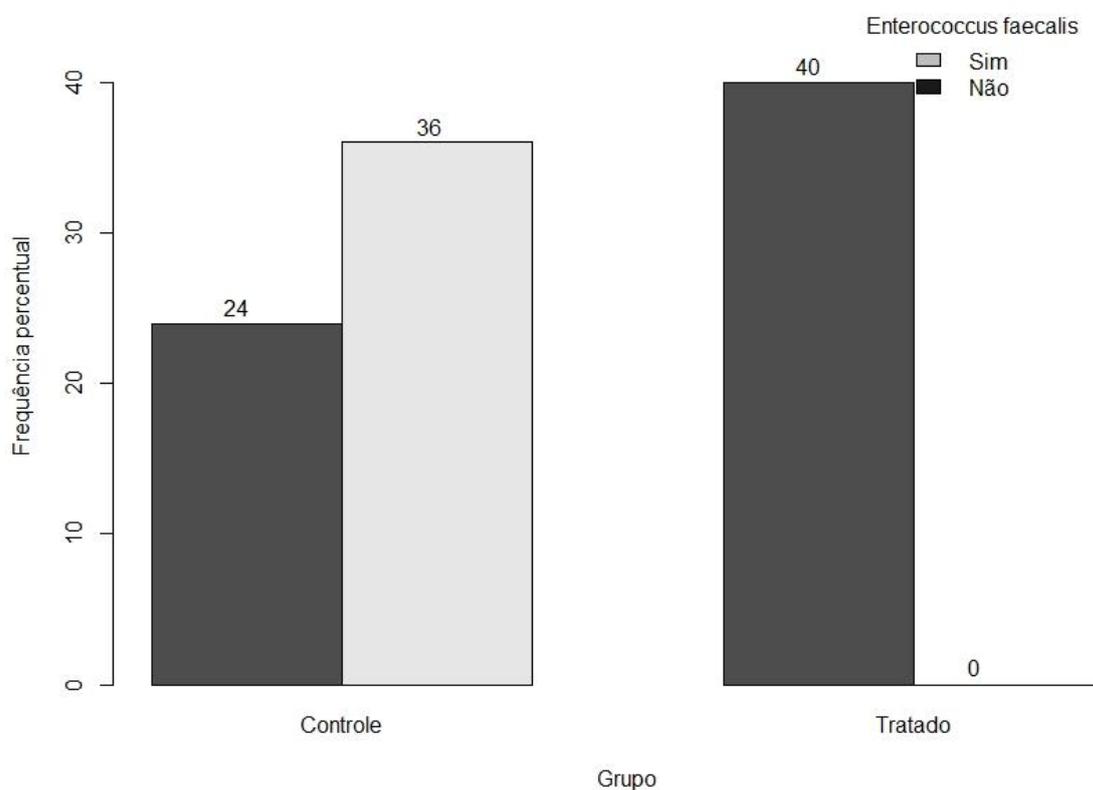
Tabela 1 - Teste Exato de Fisher para a associação das variáveis entre os grupos e arcadas na avaliação de *Enterococcus faecalis*

| VARIÁVEIS | | VALOR p |
|-----------|---------------------------------------|---------|
| Grupo | Sexo | 0,679 |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> coleta 1 | 0,003 |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> coleta 2 | 0,012 |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> coleta 3 | 0,099 |
| Arcada | Sexo | 0,688 |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> coleta 1 | 1,000 |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> coleta 2 | 0,238 |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> coleta 3 | 1,000 |

Fonte: Autora.

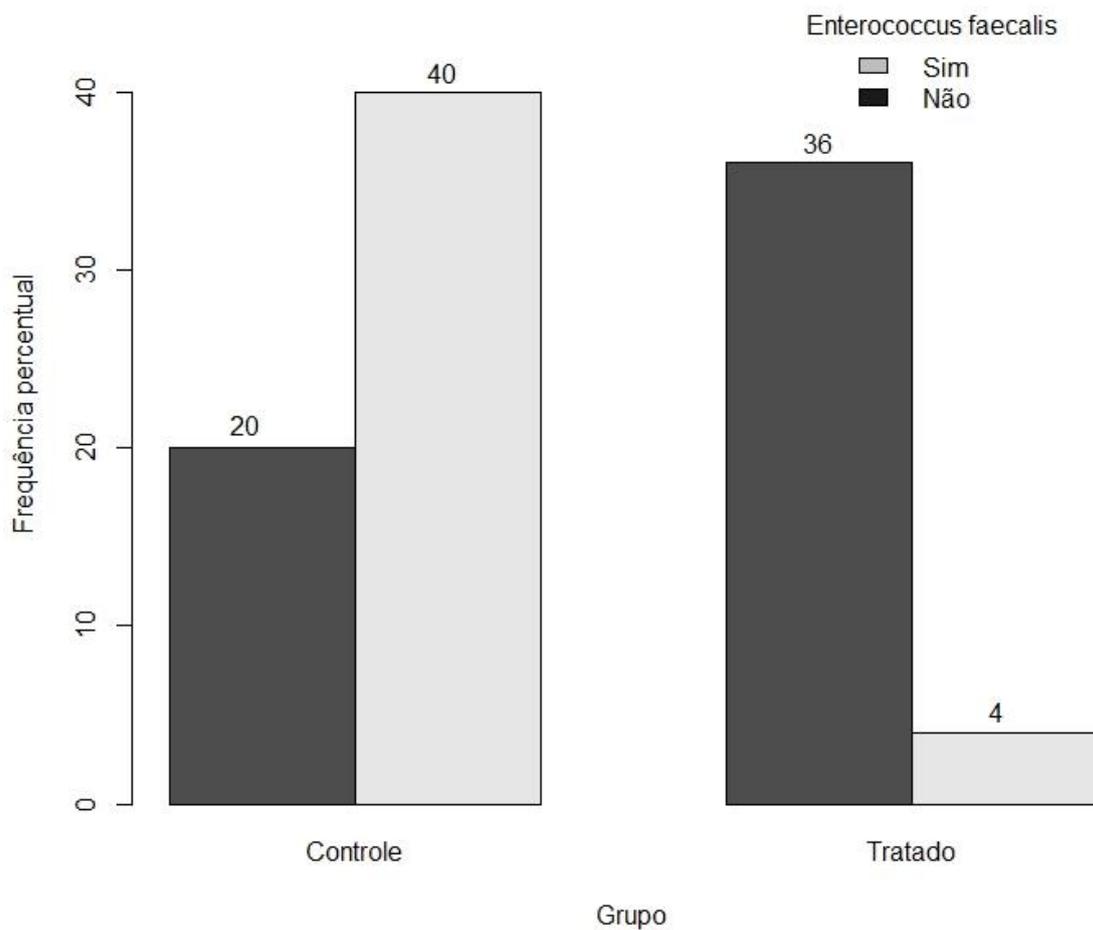
As Figuras 7 e 8 representam a frequência com que *Enterococcus faecalis* foi encontrada nos grupos controle (G1) e tratado (G2), nas coletas 1 e 2. Como pode ser observado, *Enterococcus faecalis* foi encontrada com maior frequência no G1 quando comparado ao G2, na coleta 1. De forma similar, na coleta 2, *Enterococcus faecalis* foi mais frequentemente encontrada no G1 em relação ao G2. Embora na coleta 1 do G2 *Enterococcus faecalis* não tenha sido identificada, na coleta 2 essa bactéria foi detectada.

Figura 7 - Gráfico de colunas do grupo controle (G1) e grupo tratado (G2) e a variável *Enterococcus faecalis* (presença e ausência) na coleta 1



Fonte: Autora.

Figura 8 - Gráfico de colunas do grupo controle (G1) e grupo tratado (G2) e a variável *Enterococcus faecalis* (presença e ausência) na coleta 2



Fonte: Autora.

A Tabela 2 descreve as comparações entre os grupos e as arcadas com relação ao sexo e presença de *Actinomyces israelii* nas coletas 1, 2 e 3. Nota-se que em nenhuma das variáveis analisadas houve significância estatística ao comparar os grupos e arcadas.

Tabela 2 - Teste Exato de Fisher para associação das variáveis entre grupos e arcadas na avaliação de *Actinomyces israelii*

| VARIÁVEIS | VALOR p | |
|-----------|--------------------------------------|-------|
| Sexo | 0,679 | |
| Grupo | <i>Actinomyces israelii</i> coleta 1 | 0,544 |
| | <i>Actinomyces israelii</i> coleta 2 | 1,000 |
| | <i>Actinomyces israelii</i> coleta 3 | 1,000 |
| Arcada | Sexo | 0,688 |
| | <i>Actinomyces israelii</i> coleta 1 | 0,220 |
| | <i>Actinomyces israelii</i> coleta 2 | 0,593 |
| | <i>Actinomyces israelii</i> coleta 3 | 1,000 |

Fonte: Autora.

5.1.1 Bactéria *Enterococcus faecalis*

Após a avaliação da associação entre as variáveis qualitativas, deu-se prosseguimento à verificação de igualdade entre os grupos e as coletas.

De acordo com a Tabela 3, verificou-se que há diferença estatística entre G1 e G2, sendo que G1 apresentou uma maior presença da bactéria *Enterococcus faecalis* em relação ao G2 ($p < 0,05$), que significa de uma forma geral que *Enterococcus faecalis* foi encontrada com maior frequência no G1 quando comparado ao G2.

Entretanto, ao comparar a presença de *Enterococcus faecalis* entre as coletas 1, 2 e 3, não foi identificada diferença estatística ($p > 0,05$) (Tabela 3), indicando que não houve aumento ou diminuição da quantidade da bactéria entre as coletas.

Tabela 3 - Resultado dos testes de Wilcoxon, para avaliar se há diferença entre os grupos controle (G1) e tratado (G2), e Kruskal Wallis para avaliar se há diferença entre as coletas

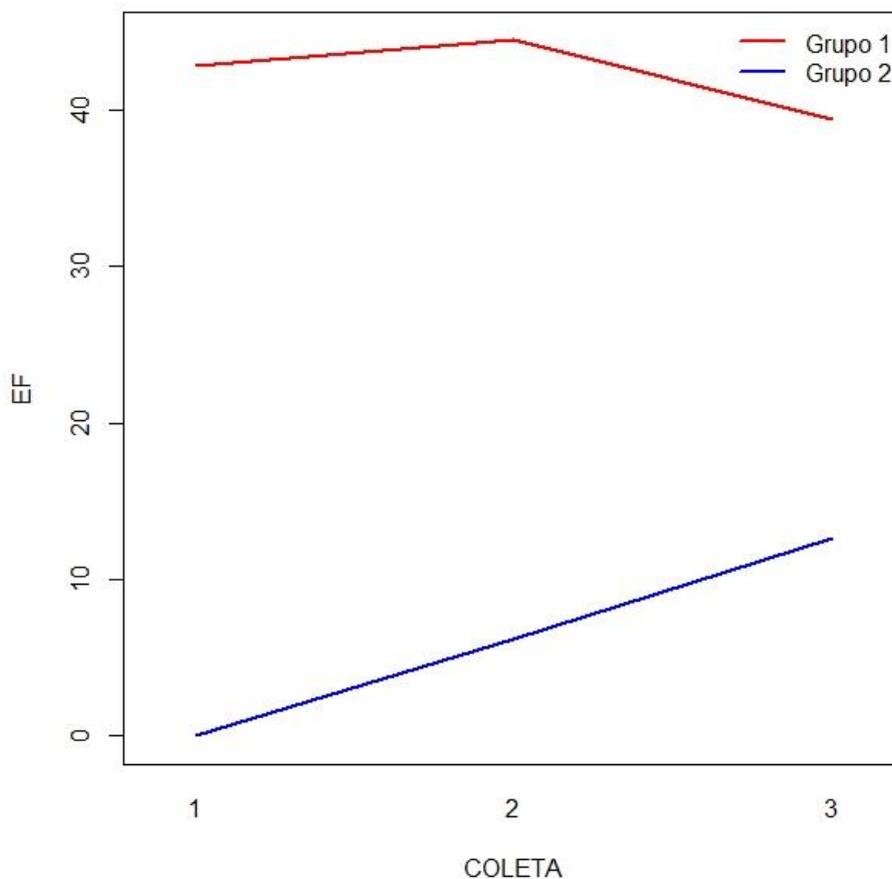
| | |
|--------|-----------------------|
| Grupo | Controle ^a |
| | Tratado ^b |
| Coleta | Coleta 1 ^a |
| | Coleta 2 ^a |
| | Coleta 3 ^a |

Fonte: Autora.

Nota: Letras distintas representam diferença estatística entre si ($p < 0,05$).

Observa-se por meio da Figura 9 que para o G1 a presença da bactéria *Enterococcus faecalis* apresentou um leve aumento na coleta 2 e depois houve uma diminuição na coleta 3. Para o G2, verificou-se um aumento para as coletas 2 e 3. No entanto, esses resultados não foram estatisticamente significativos.

Figura 9 - Gráfico de interação entre grupos e coletas, na detecção da bactéria *Enterococcus faecalis*



Fonte: Autora.

A Tabela 4 mostra a diferença na quantidade de *Enterococcus faecalis* entre as coletas 1, 2 e 3 do G1 e G2. Como pode-se observar não houve diferença entre as coletas no G1 ($p=0,656$). De forma similar, no G2, a comparação entre as coletas demonstrou que não houve diferença na quantidade de *Enterococcus faecalis* entre elas ($p=0,317$). Isso mostra que não houve variação na detecção de *Enterococcus faecalis* entre as diferentes coletas nos grupos avaliados.

Tabela 4 - Resultado dos testes de Kruskal Wallis para avaliar se há diferença das coletas dentro de cada grupo

| GRUPO | COLETA | MÉDIA ± DESVIO | VALOR p |
|-------|----------------|-----------------|---------|
| 1 | 1 ^a | 42.816 ± 32.315 | 0,656 |
| | 2 ^a | 44.438 ± 32.597 | |
| | 3 ^a | 39.385 ± 33.353 | |
| 2 | 1 ^a | 0 ± 0 | 0,317 |
| | 2 ^a | 6.166 ± 19.499 | |
| | 3 ^a | 12.605 ± 26.575 | |

Fonte: Autora.

Nota: Letras distintas representam diferença estatística entre si ($p < 0,05$).

A Tabela 5 mostra a diferença na quantidade de *Enterococcus faecalis* no G1 e G2 em relação as coletas 1, 2 e 3. Nota-se que há diferença para os grupos dentro de cada coleta ($p < 0,05$). Conclui-se que houve variação na detecção de *Enterococcus faecalis* entre os grupos nas coletas avaliadas.

Tabela 5 - Resultado dos testes de Wilcox para avaliar se há diferença para os grupos dentro de cada coleta

| COLETA | GRUPO | MÉDIA ± DESVIO | VALOR p |
|--------|----------------|-----------------|---------|
| 1 | 1 ^a | 42.816 ± 32.315 | 0,001 |
| | 2 ^b | 0 ± 0 | |
| 2 | 1 ^a | 44.438 ± 32.597 | 0,004 |
| | 2 ^b | 6.166 ± 19.499 | |
| 3 | 1 ^a | 39.385 ± 33.353 | 0,035 |
| | 2 ^b | 12.605 ± 26.575 | |

Fonte: Autora.

Nota: Letras distintas representam diferença estatística entre si ($p < 0,05$).

O Quadro 3 mostra que antes da purificação das amostras foram encontrados 13 resultados negativos para a amplificação da β -Globulina, o que sugere a existência de inibição da reação de amplificação da PCR em tempo real.

Após o processo de purificação das amostras, apenas 4 amostras se apresentaram negativas para a amplificação da β -Globulina. Isso significa que ainda há algum inibidor da reação de amplificação mesmo após processo de purificação.

Dessa forma, para as amostras amplificadas após processo de purificação foram repetidas as amostras referentes à bactéria *Enterococcus faecalis*, obtendo-se em apenas uma amostra uma amplificação da bactéria e no restante resultados negativos. Conclui-se então que nessas amostras negativas, não foi identificada a presença da bactéria.

Quadro 3 - Resultados obtidos para *Enterococcus faecalis* após realização do teste de controle positivo de amplificação com β -Globulina, nas amostras que se apresentaram negativas para as duas bactérias em alguma das coletas. Foi realizado o teste antes e após purificação das amostras

| | NÃO PURIFICADA | PURIFICADA | |
|-------------|--------------------|--------------------|------------------------------|
| GRUPO 1 | β -globulina | β -globulina | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| AMOSTRA 12B | NEGATIVO | NEGATIVO | NR |
| AMOSTRA 13A | NEGATIVO | 27.36 | 36.73 |
| AMOSTRA 13C | NEGATIVO | 34.92 | NEGATIVO |
| AMOSTRA 14B | NEGATIVO | NEGATIVO | NR |
| AMOSTRA 15A | 31 | 26.7 | NEGATIVO |
| GRUPO 2 | β -globulina | β -globulina | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| AMOSTRA 2C | NEGATIVO | 28.62 | NEGATIVO |
| AMOSTRA 3A | NEGATIVO | 23.95 | NEGATIVO |
| AMOSTRA 3C | NEGATIVO | NEGATIVO | NR |
| AMOSTRA 4B | 25.26 | NR | NEGATIVO |
| AMOSTRA 7B | NEGATIVO | 33.82 | NEGATIVO |
| AMOSTRA 7C | NEGATIVO | 35.86 | NEGATIVO |
| AMOSTRA 9C | NEGATIVO | NEGATIVO | NR |
| AMOSTRA 12A | NEGATIVO | 4,06 | NEGATIVO |
| AMOSTRA 12B | NEGATIVO | 33.37 | NEGATIVO |
| AMOSTRA 12C | NEGATIVO | 35.27 | NEGATIVO |

Fonte: Autora.

Nota: NR - Não realizado

5.1.2 Bactéria *Actinomyces israelii*

De acordo com a Tabela 6, verificou-se que não há diferença estatística entre G1 e G2 ($p>0,05$), que significa de uma forma geral que *Actinomyces israelii* foi encontrado de forma igual no G1 e no G2.

Ao comparar a presença de *Actinomyces israelii* entre as coletas 1, 2 e 3, também não foi identificada diferença estatística ($p>0,05$), indicando que não houve aumento ou diminuição da quantidade da bactéria entre as coletas.

Tabela 6 - Resultado dos testes de Wilcoxon, para avaliar se há diferença entre os grupos controle (G1) e tratado (G2), e Kruskal Wallis para avaliar se há diferença entre as coletas

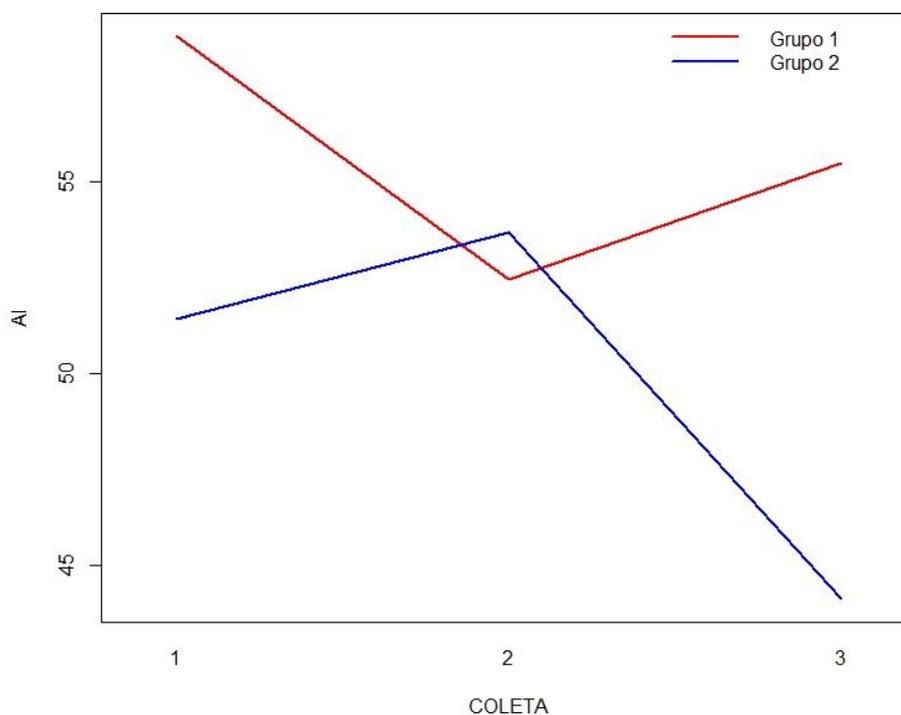
| | |
|--------|-----------------------|
| Grupo | Controle ^a |
| | Tratado ^a |
| Coleta | Coleta 1 ^a |
| | Coleta 2 ^a |
| | Coleta 3 ^a |

Fonte: Autora.

Nota: Letras distintas representam diferença estatística entre si ($p<0,05$).

Observa-se por meio da Figura 10 que para o G1 a presença da bactéria *Actinomyces israelii* apresentou uma leve diminuição na coleta 2 e depois houve um aumento na coleta 3. Para o G2, verificou-se uma diminuição para as coletas 2 e 3. No entanto, esses resultados não foram estatisticamente significativos.

Figura 10 -Gráfico de interação entre grupos e coletas, na detecção da bactéria *Actinomyces israelii*



Fonte: Autora.

A Tabela 7 mostra a diferença na quantidade de *Actinomyces israelii* entre as coletas 1, 2 e 3 do G1 e G2. Como pode-se observar não houve diferença entre as coletas no G1 ($p=0,955$). De forma similar, no G2, a comparação entre as coletas demonstrou que não houve diferença na quantidade de *Actinomyces israelii* entre elas ($p=0,772$). Isso mostra que não houve variação na detecção de *Actinomyces israelii* entre as diferentes coletas nos grupos avaliados.

Tabela 7 - Resultado dos testes de Kruskal Wallis para avaliar se há diferença das coletas dentro de cada grupo

| GRUPO | COLETA | MÉDIA ± DESVIO | VALOR p |
|-------|----------------|-----------------|---------|
| 1 | 1 ^a | 58.781 ± 18.897 | 0,955 |
| | 2 ^a | 52.444 ± 27.467 | |
| | 3 ^a | 55.469 ± 24.427 | |
| 2 | 1 ^a | 51.419 ± 29.074 | 0,772 |
| | 2 ^a | 53.651 ± 24.103 | |
| | 3 ^a | 44.103 ± 28.373 | |

Fonte: Autora.

Nota: Letras distintas representam diferença estatística entre si ($p < 0,05$).

A Tabela 8 mostra a diferença na quantidade de *Actinomyces israelii* no G1 e G2 em relação as coletas 1, 2 e 3. Nota-se que não há diferença para os grupos dentro de cada coleta ($p > 0,05$). Conclui-se que não houve variação na detecção de *Actinomyces israelii* entre os grupos nas coletas avaliadas.

Tabela 8 - Resultado dos testes de Wilcox para avaliar se há diferença para os grupos dentro de cada coleta

| COLETA | GRUPO | MÉDIA ± DESVIO | VALOR p |
|--------|----------------|-----------------|---------|
| 1 | 1 ^a | 58.781 ± 18.897 | 0,637 |
| | 2 ^a | 51.419 ± 29.074 | |
| 2 | 1 ^a | 52.444 ± 27.467 | 1 |
| | 2 ^a | 53.651 ± 24.103 | |
| 3 | 1 ^a | 55.469 ± 24.427 | 0,420 |
| | 2 ^a | 44.103 ± 28.373 | |

Fonte: Autora.

Nota: Letras distintas representam diferença estatística entre si ($p < 0,05$).

O Quadro 4 mostra que antes da purificação das amostras foram encontrados 13 resultados negativos para a amplificação da β -Globulina, o que sugere a existência de inibição da reação de amplificação da PCR em tempo real.

Após o processo de purificação das amostras, apenas 4 amostras se apresentaram negativas para a amplificação da β -Globulina. Isso significa que ainda há algum inibidor da reação de amplificação mesmo após processo de purificação.

Dessa forma, para as amostras amplificadas após processo de purificação foram repetidas as amostras referentes à bactéria *Actinomyces israelii*, obtendo-se em apenas três amostras uma amplificação negativa e no restante resultados positivos. Conclui-se então que nessas amostras negativas, não foi identificada a presença da bactéria.

Quadro 4 - Resultados para *Actinomyces israelii* obtidos após realização do controle positivo de amplificação com β -Globulina, antes e após purificação das amostras

| | NÃO PURIFICADA | PURIFICADA | |
|-------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|
| GRUPO 1 | β -globulina | β -globulina | <i>Actinomyces israelii</i> |
| AMOSTRA 12B | NEGATIVO | NEGATIVO | NR |
| AMOSTRA 13A | NEGATIVO | 27.36 | 31.84 |
| AMOSTRA 13C | NEGATIVO | 34.92 | 34.43 |
| AMOSTRA 14B | NEGATIVO | NEGATIVO | NR |
| AMOSTRA 15A | 31 | 26.7 | NEGATIVO |
| GRUPO 2 | β -globulina | β -globulina | <i>Actinomyces israelii</i> |
| AMOSTRA 2C | NEGATIVO | 28.62 | 31.85 |
| AMOSTRA 3A | NEGATIVO | 23.95 | 35.99 |
| AMOSTRA 3C | NEGATIVO | NEGATIVO | NR |
| AMOSTRA 4B | 25.26 | NR | NEGATIVO |
| AMOSTRA 7B | NEGATIVO | 33.82 | 31.99 |
| AMOSTRA 7C | NEGATIVO | 35.86 | 35.49 |
| AMOSTRA 9C | NEGATIVO | NEGATIVO | NR |
| AMOSTRA 12A | NEGATIVO | 4,06 | NEGATIVO |
| AMOSTRA 12B | NEGATIVO | 33.37 | 32.4 |
| AMOSTRA 12C | NEGATIVO | 35.27 | 32.68 |

Fonte: Autora.

Nota: NR - Não realizado

5.2 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

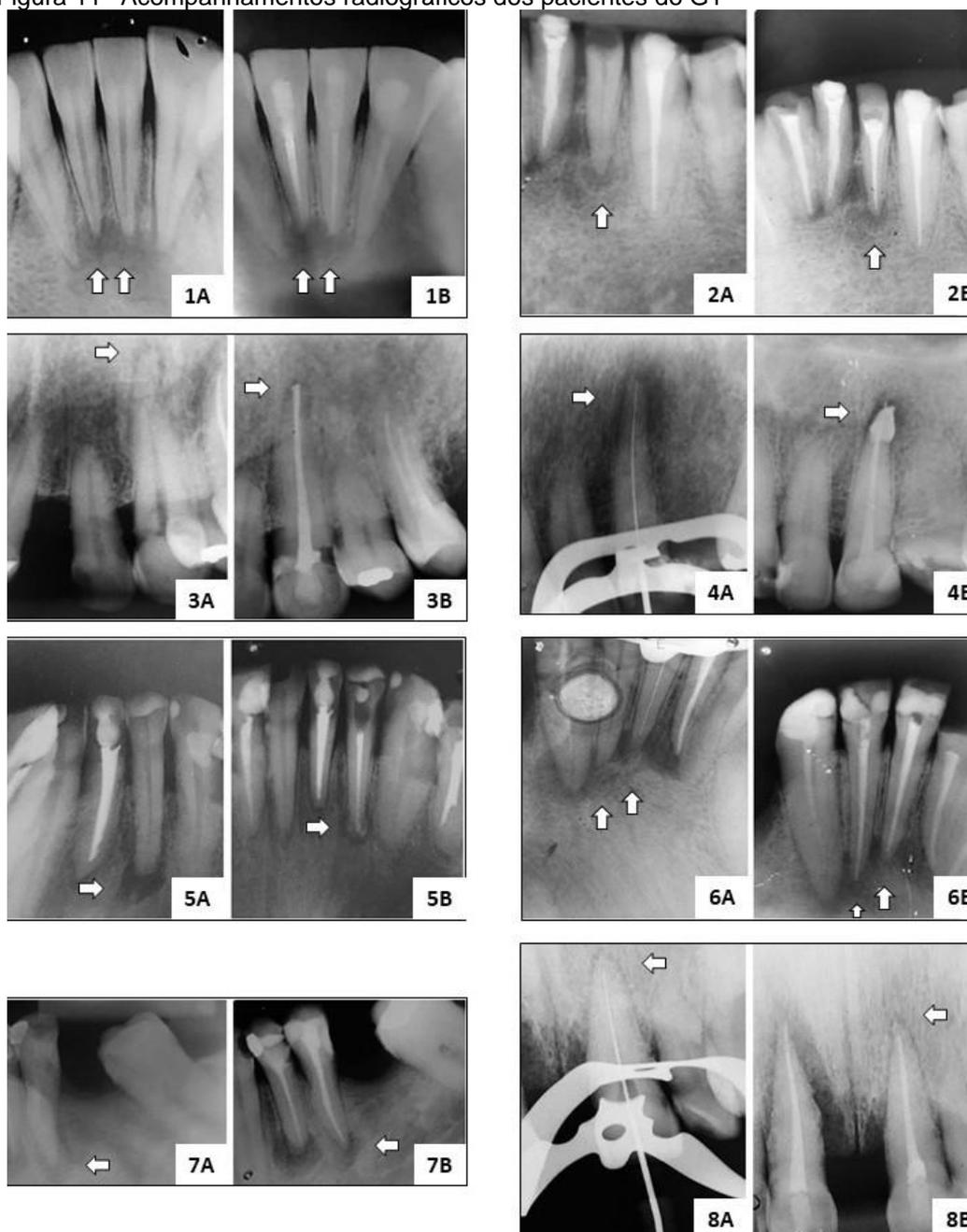
Após realização do Teste de concordância Kappa, foi obtido o valor de 0,471, que segundo os autores Landis & Koch (1977) é considerado uma concordância moderada. Foi obtido valor $p=0,000468$, sendo considerada então uma concordância significativa, pois o valor p é superior ao nível de significância adotado.

Após realização do Teste G, verificou-se por meio do resultado que não há associação entre as variáveis grupo e classificação do reparo ($p=0,2389$). Portanto, G1 e G2 respondem de forma igual ao reparo da lesão periapical, independente do tratamento aplicado.

5.2.1 G1

Abaixo, seguem os acompanhamentos radiográficos dos pacientes do G1.

Figura 11 - Acompanhamentos radiográficos dos pacientes do G1



Fonte: Autora.

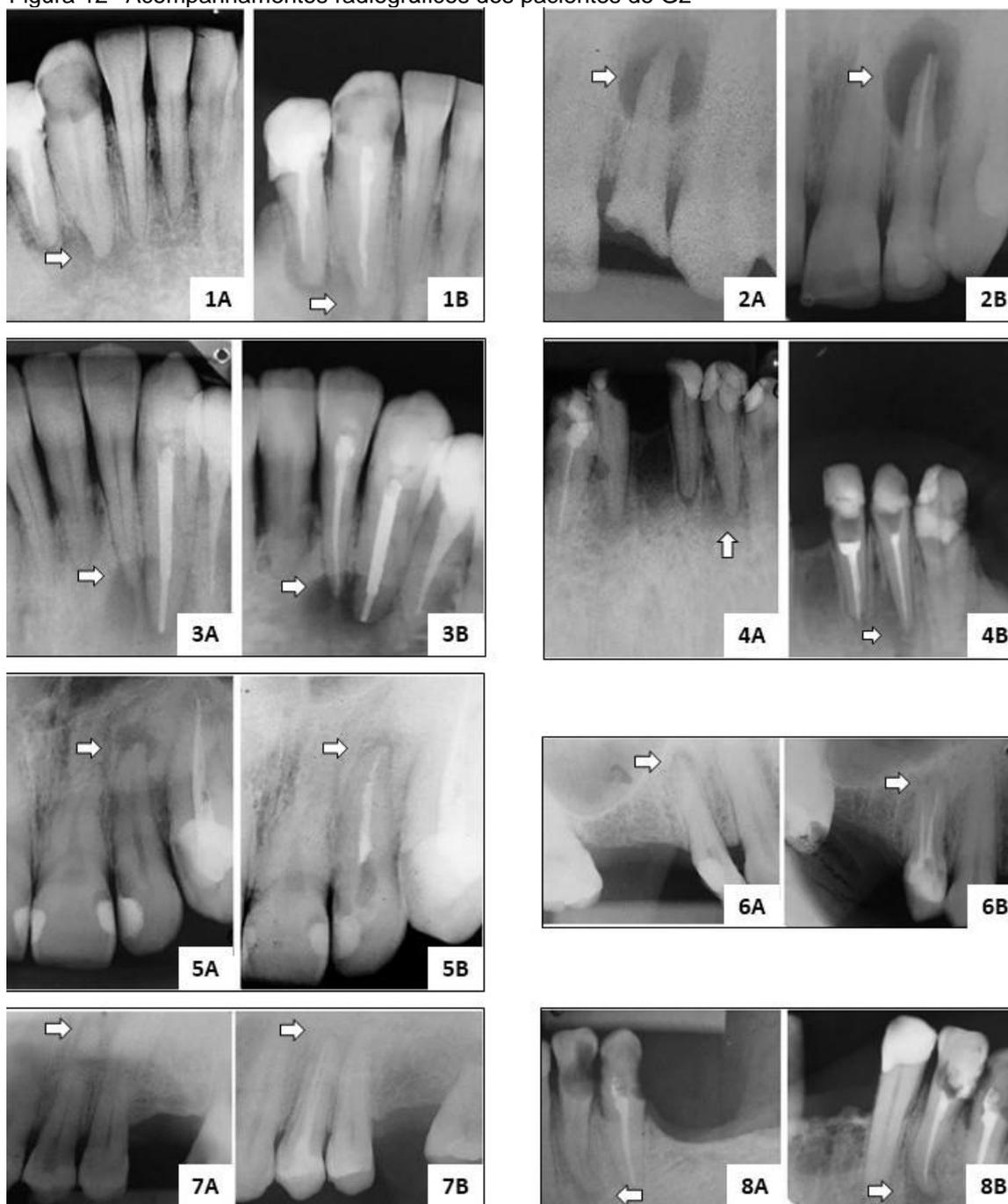
Nota: A) radiografia inicial.

B) radiografia após 60 dias da finalização do tratamento.

5.2.2 G2

Abaixo, seguem os acompanhamentos radiográficos dos pacientes do G2.

Figura 12 - Acompanhamentos radiográficos dos pacientes do G2



Fonte: Autora.

Nota: A) radiografia inicial.

B) radiografia após 60 dias da finalização do tratamento.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do teste de associação apontaram que houve diferença entre os grupos em relação à presença de *Enterococcus faecalis* nas coletas 1 e 2, no entanto não houve diferença estatística entre os grupos na coleta 3. *Enterococcus faecalis* foi encontrada com maior frequência no G1 quando comparado ao G2, na coleta 1. De forma similar, na coleta 2, *Enterococcus faecalis* foi mais frequentemente encontrada no G1 em relação ao G2. Embora na coleta 1 do G2 *Enterococcus faecalis* não tenha sido identificada, na coleta 2 essa bactéria foi detectada.

Para *Actinomyces israelii*, verificou-se que não há diferença estatística entre G1 e G2, o que, de uma forma geral, significa que *Actinomyces israelii* foi encontrada de forma igual no G1 e no G2. Dessa forma, o trabalho apresenta resultados contraditórios aos encontrados na literatura, os quais mostram que, nos estágios iniciais da infecção endodôntica, espécies do gênero *Actinomyces spp.* raramente estão presentes. Elas são encontradas com maior frequência em infecções persistentes e lesões extra-radulares (SUNDE *et al.*, 2002; SIQUEIRA *et al.*, 2002a; SIQUEIRA; ROÇAS, 2003; XIA; BAUMGARTNER, 2003; SIGNORETTI *et al.*, 2011).

Neste estudo, ao realizar o teste de associação entre os grupos, sexo e presença de *Enterococcus faecalis* e *Actinomyces israelii* nas coletas 1, 2 e 3, não houve significância estatística, indicando que o fator sexo não influencia na presença destas bactérias. Isso corrobora com o estudo de Farias (2009) que analisou a correlação entre bactérias da cavidade oral e sexo e não encontrou associação significativa entre essas variáveis. Também foi realizado no presente estudo o teste de associação entre os grupos, arcada e presença de *Enterococcus faecalis* e *Actinomyces israelii* nas coletas 1, 2 e 3, não havendo também nenhuma diferença estatística. A literatura não mostra nenhum estudo avaliando a variável arcada com a presença de bactérias, portanto mais estudos são necessários para elucidar a possível influência da arcada na presença de diferentes bactérias.

O G1 apresentou uma maior presença da bactéria *Enterococcus faecalis* em relação ao G2, significando de uma forma geral que *Enterococcus faecalis* foi encontrada com maior frequência no G1 quando comparado ao G2. O fato do G1 ter apresentado *Enterococcus faecalis*, contradiz os relatos da literatura, que afirma que ele é raramente encontrado nos casos de infecções primárias (MAIA FILHO, 2008).

No G2 ele foi encontrado em quantidades menores, pois o *Enterococcus faecalis* é um microrganismo mais comumente encontrado em infecções persistentes, quando comparado às infecções primárias (ROÇAS *et al.*, 2004; TENNERT *et al.*, 2014).

Ao comparar a presença de *Enterococcus faecalis* e *Actinomyces israelii* entre as coletas 1, 2 e 3, não foi identificada diferença estatística, indicando que não houve aumento ou diminuição da quantidade das bactérias entre as coletas. Os métodos moleculares que identificam o DNA alvo podem não ser os melhores para detectar bactérias imediatamente após os procedimentos de tratamento, porque podem detectar o DNA de bactérias que morreram recentemente em decorrência dos procedimentos realizados no PQM (JOSEPHSON; GERBA; PEPPER, 1993). Entende-se então que não seria possível avaliar imediatamente a diminuição tanto de *Enterococcus faecalis* como de *Actinomyces israelii*. Alternativamente, trabalhos da literatura utilizaram o método de UFC, que foi eficaz na identificação de bactérias viáveis, permitindo uma melhor quantificação (GARCEZ *et al.*, 2008; AHANGARI *et al.*, 2017).

Ao analisar a presença de *Enterococcus faecalis* no G1, notou-se que ela apresentou um leve aumento da coleta 1 para a coleta 2 e depois houve uma diminuição na coleta 3. Para o G2, verificou-se um aumento para nas coletas 2 e 3. O fato da *Enterococcus faecalis* ter apresentado um aumento a partir da coleta 2 pode ser justificado pelo fato de que na coleta 1 ele estava agregado dentro de um biofilme, impossibilitado o cone de papel absorvente de reter as bactérias aderidas à esse biofilme. A coleta 2 é realizada após o PQM do canal radicular, que pode ocasionar a desorganização do biofilme, mudando o estado da *Enterococcus faecalis* da agregação até para a forma planctônica (KIZHNER, *et al.* 2011), tornando a sua coleta mais fácil.

Outro motivo que pode justificar o aumento de *Enterococcus faecalis* na coleta 2, mesmo após PQM e 1ª aplicação da aPDT, é a ocorrência da entrada de microrganismos no canal durante o tratamento, devido à quebra na cadeia asséptica como nos casos de cárie remanescente, mau uso do isolamento absoluto e instrumentos contaminados (SIQUEIRA *et al.*, 2008).

No caso do aumento de *Enterococcus faecalis* na coleta 3, pode ser justificado pelo fato de que microrganismos persistentes sobrevivem, não somente pela incapacidade do PQM em removê-los das complexidades anatômicas, mas também porque alguns nutrientes capazes de favorecer o crescimento destes microrganismos

residuais podem ali permanecer e estes microrganismos se multiplicam e restabelecem a contaminação do SCR (BYSTRÖM; CLAEISSON; SUNDQVIST, 1985; GOMES; DRUCKER; LILLEY, 1996; SIQUEIRA; LOPES, 1999). Outro motivo seria por uma infecção secundária onde a causa pode ser uma infiltração coronária. Siqueira *et al.* (1999) relatam que a recontaminação de canais pode ocorrer através de infiltração pelos materiais restauradores temporários: pela dissolução do selamento pela saliva; pela infiltração da saliva na interface material selador e parede do canal e pela fratura da restauração temporária. Relataram ainda que, quando o selamento coronal é perdido, os microrganismos e seus produtos podem invadir e recolonizar o SCR, alcançando os tecidos perirradiculares através dos canais laterais ou forame apical, levando o tratamento a um prognóstico desfavorável. Vale salientar que não houve perda do material restaurador temporário nos tratamentos realizados neste trabalho, entretanto, não é descartada a possibilidade de ter ocorrido infiltração via interface dente/restauração.

A presença de *Enterococcus faecalis* na coleta 3, mesmo após PQM e utilização da MIC, também pode ser justificada pela capacidade que ele apresenta de invadir túbulos dentinários e aderir ao colágeno e também à resistência da *Enterococcus faecalis* ao Ca(OH)_2 (EVANS *et al.*, 2002). Devido ao fato da *Enterococcus faecalis* penetrar nas complexidades do SCR e se manter na maior parte do tempo nas camadas mais profundas do biofilme, isso torna ele mais resistente à ação da aPDT, devido à limitação da difusão de elementos como o FS, oxigênio e a fonte de luz, que são essenciais no efeito final da aPDT (SOUZA *et al.*, 2010).

Para *Actinomyces israelii*, observou-se que ela apresentou uma tendência à diminuição na coleta 2 e depois houve um aumento na coleta 3 no G1, embora essas variações não tenham sido estatisticamente significativas. No G2, foi verificada uma diminuição nas coletas 2 e 3. Apesar dos resultados apresentados não serem estatisticamente significativos, pode-se sugerir que, para a eliminação de *Actinomyces israelii*, o uso coadjuvante da aPDT pode ter auxiliado na redução antimicrobiana. No estudo de Fimple *et al.* (2008), a efetividade da aPDT foi avaliada. Dentes extraídos humanos, foram contaminados com *Actinomyces israelii*. Foi utilizado FS azul de metileno e laser diodo em uma potência de 1 mW e comprimento de onda de 665 nm. Concluíram que a aPDT foi um método eficaz na redução de cepas de *Actinomyces israelii* presentes no interior do canal radicular, quando associado à aplicação de azul de metileno como FS.

Quando avaliada a quantidade de *Enterococcus faecalis* e *Actinomyces israelii* entre as coletas 1, 2 e 3, observou-se que não houve diferença entre as coletas, tanto no G1 como no G2. Isso mostrou que não houve variação na detecção tanto de *Enterococcus faecalis* como *Actinomyces israelii* entre as diferentes coletas nos grupos avaliados.

Em outra análise, ao comparar a quantidade de *Enterococcus faecalis* e *Actinomyces israelii* entre G1 e G2 nas coletas 1, 2 e 3, notou-se que para *Enterococcus faecalis* houve diferença entre os grupos dentro de cada coleta, sendo o G1 o que apresentou maior quantidade dessa bactéria. Porém, essa diferença entre os grupos não foi identificada ao avaliar *Actinomyces israelii*. Conclui-se então que apenas para *Enterococcus faecalis* houve variação na detecção entre os grupos nas coletas avaliadas, o que pode ser confirmado com investigações já feitas sobre a microbiota dos canais radiculares que vem encontrando a baixa presença de *Enterococcus faecalis* nas infecções endodônticas primárias (FERRARI; CAI; BOMBANA, 2005; GOMES *et al.*, 2006).

Devido ao fato de algumas amostras terem se apresentado negativas à presença tanto de *Enterococcus faecalis* como de *Actinomyces israelii*, foi realizado um teste de controle positivo. O teste que se realiza é uma PCR em tempo real ao gene que codifica a β -globulina humana, incluída nas amostras que se apresentaram negativas para descartar a possibilidade de inibição da reação, que é causada por moléculas inibidoras presentes na amostra após o protocolo de extração e purificação do DNA (LLEO *et al.*, 2014). Após o processo de purificação das amostras, apenas 4 amostras se apresentaram negativas para a amplificação da β -Globulina, que significa a existência de algum inibidor da reação de amplificação mesmo após processo de purificação. Alguns compostos podem estar presentes dentro do dente no momento da coleta, como: íons cálcio, proteínas, gorduras, cloreto de cálcio, EDTA; e que são reconhecidos como inibidores da PCR em diferentes matrizes (ROSSEN *et al.*, 1992; TSAI; OLSON, 1992; AL-SOUD *et al.*, 2000; AL-SOUD; RÅDSTRÖM, 2001; THORNTON; PASSEN, 2004). Para as amostras amplificadas após processo de purificação foram repetidas as amostras referentes à bactéria *Enterococcus faecalis*, obtendo-se em apenas uma amostra uma amplificação da bactéria e no restante resultados negativos para a sua presença.

Alguns motivos podem explicar os altos resultados negativos para a presença de *Enterococcus faecalis*. Um motivo já foi discutido acima que se trata de que

Enterococcus faecalis é mais comumente encontrado em infecções persistentes, quando comparado às infecções primárias. Outro motivo seria de que o presente estudo utilizou cones de papel para reter o conteúdo bacteriológico de dentro do canal radicular. Alguns estudos apontam que muitas vezes os cones de papel absorvente não conseguem reter o total de bactérias que estão presentes dentro do SCR (SUN *et al.*, 2009; GARCEZ *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2010). Isso ocorre pelo fato de que a microbiota endodôntica não é restrita apenas ao canal principal, também existem bactérias no interior dos túbulos dentinários, o que pode dificultar a retenção do conteúdo bacteriológico ao cone de papel absorvente. Esse fato pode afetar a contagem total das bactérias presentes em cada amostra, recolhidas antes e durante o tratamento dos canais radiculares.

Além de uma análise clínica, o sucesso do tratamento endodôntico também depende de uma análise radiográfica (BARCELOS *et al.*, 2012). O tratamento é considerado efetivo quando toda a sintomatologia clínica desaparece e, nos casos onde havia presença de lesão periapical, há reparo e regeneração óssea (CANCIO *et al.*, 2017). A análise radiográfica do reparo periapical deste estudo mostrou que G1 e G2 respondem de forma igual ao reparo da lesão periapical, independente do tratamento aplicado. Em ambos os grupos foram verificados casos de melhora e de manutenção das lesões periapicais. É possível que um dos motivos da não regressão total seja o período curto de acompanhamento de 60 dias. No estudo de Lopes *et al.*, 2019 foi realizado o tratamento de dois dentes necróticos com presença de lesão periapical, utilizando o protocolo da aPDT, e com 60 dias de acompanhamento radiográfico foi possível observar o início do reparo ósseo. Alguns autores sugerem que para confirmar o reparo periapical e o sucesso do tratamento, sejam necessários 4 ou 5 anos de avaliação clínica e radiográfica (RICUCCI; MANNOCCI; FORD, 2006; PENESIS *et al.* 2008). O estudo de Walton & Torabinejad (1997) mostra que os períodos de reavaliação sugeridos variam de 6 meses a 4 anos; sendo 6 meses para a primeira reavaliação e 4 anos para a avaliação final. Porém, o acompanhamento radiográfico a longo prazo depende diretamente da colaboração dos pacientes, que muitas vezes não voltam, dificultando a reavaliação do tratamento realizado.

Por fim, para a realização da aPDT existem protocolos variados e que ainda não estão corretamente definidos, existindo variáveis como tipo e concentração do FS, parâmetros do *laser* como tempo e técnica de aplicação e do *laser* em si (HUANG *et al.*, 2012; DE MELO *et al.*, 2013). No presente estudo, foi testado um protocolo

baseado no trabalho de Soukos *et al.*, 2006, com FS azul de metileno a 0,005% e os parâmetros do *laser* utilizados foram no espectro de luz vermelha, energia de 9 J, comprimento de onda de 400 nm a 660 nm e 90 segundos de aplicação. Porém, estas variáveis dificultam a realização dos estudos para identificação da efetividade da aPDT no tratamento endodôntico.

7 CONCLUSÃO

A aPDT não promoveu melhores resultados no tratamento endodôntico, apresentando-se semelhante ao tratamento convencional, entretanto este trabalho apontou questões metodológicas relevantes. Sendo assim, novos trabalhos devem ser realizados para que se consiga mostrar a possível efetividade da aPDT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S. et al. Endodontic Irrigants: A Comprehensive Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 7, n. 1, p. 5-9, 2015.

ACKROYD, R. et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.

AKCAY, M. et al. Dentinal tubule penetration of AH Plus, iRoot SP, MTA fillapex, and guttaflow bioseal root canal sealers after different final irrigation procedures: A confocal microscopic study. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 48, n. 1, p. 70-76, 2016.

AHANGARI Z. et al. Comparison of the antimicrobial efficacy of calcium hydroxide and Photodynamic Therapy against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in teeth with periapical lesions; An In Vivo Study. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 8, p. 72-78, 2017.

ALFENAS, C. F. et al. Terapia fotodinâmica na redução de microrganismos no sistema de canais radiculares. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 68, n. 1, p. 68-71, 2011.

AL-SOUD, W. A., JONSSON, L. J., RADSTROM, P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 345–350, 2000.

AL-SOUD, W. A., RÅDSTRÖM, P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 485–493, 2001.

ALVES, F. R. F. Compreendendo a etiologia microbiana das infecções endodônticas. **Revista Biociências**, v. 10, n. 1-2, p. 67-71, 2001.

ASSED, S. et al. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 12, p. 66–9, 1996.

ATHAR, A. et al. Radiographic endodontic working length estimation: comparison of three digital image receptors. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology, and Endodontics**, v. 106, p. 604-608, 2008.

BAGNATO, V. S. Novas técnicas óticas para as áreas da saúde. **Física ELd**. São Paulo, 2008.

BAILÓN-SÁNCHEZ, M. E. et al. Antibacterial and anti-biofilm activity of AH plus with chlorhexidine and cetrimide. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 7, p. 977-81, 2014.

BARCELOS, R. et al. The influence of smear layer removal on primary tooth pulpectomy outcome: a 24-month, double-blind, randomized, and controlled clinical trial evaluation. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 22, p. 369–381, 2012.

BARNARD, D.; DAVIES, J.; FIGDOR, D. Susceptibility of *Actinomyces israelii* to antibiotics, sodium hypochlorite and calcium hydroxide. **International Endodontics Journal**, v. 29, p. 320-326, 1996.

BAUMGARTNER, J. C. et al. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. **Journal of Endodontics**, v. 30, p. 141-144, 2004.

BAUMGARTNER, J. C.; FALKLER, W. A. JR. Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. **Journal of Endodontics**, v. 17, p. 380-383, 1991.

BENEDICENTI, S. et al. Decontamination of root canals with the gallium-aluminum-arsenide laser: an in vitro study. **Photomedicine Laser Surgery**, v. 26, n. 4, p. 367-370, 2008.

BERBER, V. B. et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. **International Endodontic Journal**, v. 39, n. 1, p. 10-7, 2006.

BERGMANS, L. et al. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. **International Endodontic Journal**, v. 41, p. 227-239, 2008.

BERKITEN, M.; BERKITEN, R.; OKAR. Comparative evaluation of antibacterial effects of Nd: YAG laser irradiation in root canals and dentinal tubules. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 5, p. 268-70, 2000.

BERUTTI, E.; MARINI, R.; ANGERETTI, A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. **Journal of Endodontics**, v. 23, n. 12, p. 725-27, 1997.

BONSOR, S. J. et al. Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (an in vivo study). **Brazilian Dental Journal**, v. 200, p. 337-341, 2006.

BOWDEN, G. H. W. Actinomyces. In: COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. (Ed.) **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, 1998, p. 445–462, v. 2.

BUJWID, O. Ueber die reinkultur des *Actinomyces*. **Zentralbl Bakteriol Parasitenk Infektionskr**, v. 6, p. 630–633, 1889.

BYSTRÖM, A.; CLAESSION, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 1, p. 170-175, 1985.

BYSTROM, A. et al. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asejouleis. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 3, p. 58-63, 1987.

CANCIO, V. et al. Can the *Enterococcus faecalis* identified in the root canals of primary teeth be a cause of failure of endodontic treatment? **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 75, p. 423-428, 2017.

CARDOSO, M. G. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology, and Endodontics**, v. 105, p. e85-e91, 2008.

CHAN, L. S. et al. Human derival fibroblast interleukin-1 receptor antagonist (IL-1 ra) and interleukin-1 beta (IL-1 b) mRNA and protein are co-stimulated by phorbol ester: implication for a homeostatic mechanism. **Journal Investigative Dermatology**, v. 99, p. 315-322, 1992.

CHÁVEZ DE PAZ, L. E. et al. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. **International Endodontic Journal**, v. 36, p. 500-508, 2003.

CHIVATXARANUKUL, P.; DASHPER, S. G.; MESSER, H. H. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, v. 41, n. 10, p. 873-882, 2008.

COGULU, D. et al. PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 106, p. 443–449, 2008.

COSTA, L. M. et al. Tooth color change caused by photosensitizers after photodynamic therapy: An in vitro study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 160, p. 225-228, 2016.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318–1322, 1999.

DE MELO, W. C. et al. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, p. 669–693, 2013.

DE MIRANDA, R. G.; COLOMBO, A. P. V. Clinical and microbiological effectiveness of photodynamic therapy on primary endodontic infections: a 6-month randomized clinical trial. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 4, p. 1751-1761, 2018.

DE OLIVEIRA, B. P. et al. The efficacy of photodynamic therapy and sodium hypochlorite in root canal disinfection by a single-file instrumentation technique. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 3, p. 436-443, 2015.

DE ROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233–234, p. 351–371, 2002.

DOTSCH, A. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome in planktonic cultures and static biofilms using RNA sequencing. **PLoS One**, v. 7, 2012.

DU, T. et al. Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 4, p. 509-514, 2014.

DUGGAN, J. M.; SEDGLEY, C. M.; Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v. 33, p. 815-818, 2007.

DUMANI, A. et al. Polymerase chain reaction of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in apical periodontitis from Turkish patients. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 4, p. 34-39, 2012.

DUNAVANT, T.R. et al. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 32, n.6, p. 527-531, 2006.

ESTRELA, C. et al. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* - a systematic review. **Journal of Applied Oral Science**, v. 16, n 6, p. 364-368, 2008.

EVANS, M. et al. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **International Endodontic Journal**, v. 35, p. 221-228, 2002.

FABRICIUS, L. et al. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 90, n. 2, p. 134-144, 1982.

FAN, K. F. et al. Photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid for premalignant and malignant lesions of the oral cavity. **Cancer Biology & Therapy**, v. 78, n. 7, p. 1374-1383, 1996.

FARIAS, B. C. **Ocorrência de periodontopatógenos em brasileiros portadores de periodontite crônica**. 2009. 67f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

FERRARI, P. H.P., CAI, S., BOMBANA, A. C. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infection. **International Endodontics Journal**, v. 38, p. 372-380, 2005.

FIGDOR, D.; DAVIES, J. K.; SUNDQVIST, G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. **Oral Microbiology Immunology**, v. 18, n. 4, p. 234-239, 2003.

FIGDOR, D. et al. Pathogenicity of *Actinomyces israelii* and *Arachnia propionica*: experimental infection in guinea pigs and phagocytosis and intracellular killing by human polymorphonuclear leucocytes in vitro. **Oral Microbiology Immunology**, v. 7, p. 129-136, 1992.

FIMPLE, J. L. et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 6, p. 728-734, 2008.

FONSECA, M. B. et al. Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, p. 209-213, 2008.

FOSCHI, F. et al. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 39, p. 782-787, 2007.

FOUAD, A. F. et al. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 3223-3231, 2002.

FRIEDLANDER, L. T.; LOVE, R. M.; CHANDLER, N. P. A comparison of phosphor-plate digital images with conventional radiographs for the perceived clarity of fine endodontic files and periapical lesions. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology, and Endodontics**, v. 93, p. 321-327, 2002.

GAD, F. et al. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2173-2178, 2004.

GAMA, T. G. V. et al. Postoperative pain following the use of two different intracanal medications. **Clinical Oral Investigations**, v. 12, p. 325-330, 2008.

GARCEZ, A. S. et al. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 2, p. 138-142, 2008.

GARCEZ, A. S. et al. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 39, p. 59-66, 2007.

GARCEZ, A. S. et al. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology, and Endodontics**, v. 102, p. e93-e98, 2006.

GARCEZ, A. S. et al. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. **Journal of Endodontics**, v. 36, p. 1463-1466, 2010.

GARCEZ, A. S. et al. Terapia fotodinâmica em odontologia – laser de baixa potência para redução microbiana. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas**, v. 57, n. 3, p. 223-226, 2003.

GEORGE, S.; KISHEN, A. Influence of photosensitizer solvent on the mechanisms of photoactivated killing of *Enterococcus faecalis*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, p. 734-740, 2008.

GEORGE, S.; KISHEN, A.; SONG, P. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v. 31, p. 867-872, 2005.

GHODDUSI, J. et al. Flare-up incidence and severity after using calcium hydroxide as intracanal dressing. **The New York State Dental Journal**, v. 4, n. 72, p. 24-28, 2006.

GILBERT, P.; DAS, J.; FOLEY, I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. **Advances in Dental Research**, v. 11, p. 160–167, 1997.

GOMES, B. P. F. A.; DRUCKER, D. B.; LILLEY, J. D. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. **International Endodontics Journal**, v. 27, p. 291-298, 1996.

GOMES, B. P. F. A. et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology, and Endodontics**, v. 102, p. 247-253, 2006.

GUERREIRO-TANOMARU, J.M. et al. Antibacterial effectiveness of peracetic acid and conventional endodontic irrigants. **Brazilian Dental Journal**, v. 22, n. 4, p. 285-287, 2011.

GUPTA-WADHWA, A.; WADHWA, J.; DUHAN, J. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of three herbal irrigants in reducing intracanal *E. faecalis* populations: An in vitro study. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 8, p. e230-e235, 2016.

GURSOY, H. et al. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. **Clinical Oral Investigations**, v. 17, p. 1113–1125, 2013.

GUTKNECHT, N. et al. Temperature evolution on human teeth root surface after diode laser assisted endodontic treatment. **Lasers in Medical Sciences**, v. 20, p. 99–103, 2005.

HAAPASALO, M. Bacteroides spp in dental root canal infections. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 5, p. 1-10, 1989.

HAAPASALO, M.; UDNAES, T.; ENDAL, U. Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment. **Endodontic Topics**, v. 6, p. 29-56, 2003.

HAPPONEN, R. P. Periapical actinomycosis: a follow-up study of 16 surgically treated cases. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 2, p. 205-209, 1986.

HIRSHBERG, A. et al. Periapical actinomycosis: a clinicopathologic study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology, and Endodontics**, v. 95, n. 5, p. 614-620, 2003.

HUANG L. et al. Type I and type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Lasers Surgery and Medicine**, v. 44, p. 490–499, 2012.

IRALA, L. et al. Agitação sônica: um aparato alternativo para o uso endodôntico. **Revista da Faculdade de Odontologia**, v. 17, n. 2, p. 171-174, 2012.

ISRAEL J. Neue beobachtungen auf dem gebiete dermykosen des menschen. **Archives of Pathological Anatomy and Physiology and of Clinical Medicine**, v. 74, n. 17, p. 15–53, 1878.

JETT, B. D.; HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 4, p. 462-478, 1994.

JOHNSON, E. M.; FLANNAGAN, S. E.; SEDGLEY, C. M. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 10, p. 946-950, 2006.

JOSEPHSON, K. L.; GERBA, C. P.; PEPPER, I. L. Polymerase chainreaction detection of nonviable bacterial pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 3513–3515, 1993.

JURIC, I. B. et al. The antimicrobial effectiveness of photodynamic therapy used as an additionto the conventional endodonticre-treatment: A clinical study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 11, p. 549-555, 2014.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, HR.; FITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology, and Endodontics**, v. 20, p. 340-349, 1965.

KAYAOGLU, G., ØRSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 15, n. 5, p. 308-20, 2004.

KISHEN, A. Advanced therapeutic options for endodontic biofilms. **Endodontic Topics**, v. 22, p. 99–123, 2012.

KISHEN, A.; SHRESTHA, A. Photodynamic therapy for root canal disinfection. In: BETTINA, B. (Ed.). **Endodontic irrigation: chemical disinfection of the root canal system**. Switzerland: Springer International Publishing, 2015. p. 237-251.

KIZHNER, V. et al. Laser-generated shockwave for clearing medical device biofilms. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, p. 277-282, 2011.

KOMINE, C.; TSUJIMOTO. A small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v. 39, p. 411-414, 2013.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **Journal of Dental Research**, v. 86, p. 694–707, 2007.

KOSARIEH, E. et al. The comparison of penetration depth of two different photosensitizers in root canals with and without smear layer: An in vitro study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 13, p. 10-14, 2016.

KRANZ, S. et al. Photodynamic suppression of *Enterococcus faecalis* using the photosensitizer mTHPC. **Lasers in Surgery and Medicine**, 43, p. 241–248, 2011.

KRISTIANSEN, J. E.; AMARAL, L. The potential management of resistant infections with non-antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, n. 3, p. 319-327, 1997.

KUBLER, A. et al. Treatment of oral leukoplakia by topical application of 5-aminolevulinic acid. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 27, n. 6, p. 466-469, 1998.

LACERDA, M. F. L. S. et al. Infecção secundária e persistente e sua relação com o fracasso do tratamento endodôntico. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 73, n. 3, p. 212-217, 2016.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **International Biometric Society**, v. 33, p. 159-174, 1977.

LEE, M. T.; BIRD, P. S.; WALSH, L. J. Photo-activated disinfection of the root canal: a new role for lasers in endodontics. **Australian Endodontic Journal**, v. 30, n. 3, p. 93-98, 2004.

LLEO, M. M. et al. Detecting the presence of bacterial DNA by PCR can be useful in diagnosing culture-negative cases of infection, especially in patients with suspected infection and antibiotic therapy. **FEMS Microbiology Letters**, v. 354, p. 153–160, 2014.

LEONARDO, M.R. Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos. São Paulo: **Artes Médicas**, 2005. 1491 p.

LEONARDO, M. R. et al. Evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. **Journal of Endodontics**, v. 28, p. 815–818, 2002.

LEONARDO, M. R. et al. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v. 19, p. 348–352, 1993.

LEONARDO, M. R.; LEONARDO, R. T. **Tratamento de canais radiculares**. São Paulo: Artes Médicas, 2016.

LOPES, C. S. et al. Endodontical treatment of periapical tooth injury with photodynamic therapy: Case report. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 28, p. 253-255, 2019.

LOPES, H. P.; SIQUEIRA JR, J. F., ELIAS, C. N. Preparo químico-mecânico dos canais radiculares. In: LOPES, H. P.; SIQUEIRA JR, J. F. **Endodontia: biologia e técnica**, 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 419-480.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.

MAIA FILHO, E. T. et al. Efeito antimicrobiano “in vitro” de diferentes medicações endodônticas e própolis sobre *Enterococcus faecalis*. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 56, p. 21-25, 2008.

MAIDEN, M. F. J.; LAI, C. H.; TANNER, A. Characteristics of oral Gram-positive species. In: Slots J, Taubman MA, eds. **Contemporary Oral Microbiology and Immunology**, p. 342–372, 1992.

MAISCH, T. et al. Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 1542–1552, 2005.

MARINIC, K. et al. Repeated exposures to blue light-activated eosin Y enhance inactivation of *E. faecalis* biofilms, in vitro. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, p. 393-400, 2015.

MCCARTY, S.C.; ATLAS, R. M. Effect of amplicon size on PCR detection of bacteria exposed to chlorine. **PCR Methods and Applications**, v. 3, p. 181–185, 1993.

MEIRE, M. A. et al. Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. **International Endodontic Journal**, v. 42, n. 4, p. 351-359, 2009.

MENEZES, M. M. et al. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. **International Endodontic Journal**, v. 37, p. 311-319, 2004.

MOHAMMADI, Z.; ABBOTT, P. V. On the local applications of antibiotics and antibiotic-based agents in endodontics and dental traumatology. **International Endodontic Journal**, v. 42, n. 7, p. 555-567, 2009a.

MOHAMMADI, Z.; ABBOTT, P. V. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. **International Endodontic Journal**, v. 42, n. 4, p. 288-302, 2009b.

MOLANDER, A. et al. Clinical and Radiographic Evaluation of One and Two-visit Endodontic Treatment of Asymptomatic Necrotic Teeth with Apical Periodontitis: A Randomized Clinical Trial. **Consort Clinical Trial**, v. 33, n. 10, p. 1145-1148, 2007.

MOLANDER, A. et al. Microbiological status of root-filled teeth with periapical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 31, p. 1-7, 1998.

MONTEIRO, F. H. L. et al. Radiographic review of tissue repair in necrotic teeth endodontic treated in the Integrated Clinic Discipline of Universidade Paulista, Sorocaba, during 1999 to 2004. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 23, p. 121-126, 2005.

MUHAMMAD, O. H. et al. Photodynamic therapy versus ultrasonic irrigation: interaction with endodontic microbial biofilm, an ex vivo study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 11, p. 171–181, 2014.

MÜLLER, P.; GUGGENHEIM, B.; SCHMIDLIN, P. R. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. **European Journal of Oral Sciences**, v. 115, p. 77-80, 2007.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Esterilização, desinfecção e antissepsia. In: MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 85, 2006a.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Esterilização, desinfecção e antissepsia. In: MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 25, 2006b.

NG, R. et al. Endodontic photodynamic therapy ex vivo. **Journal of Endodontics**, 37, p. 217–222, 2011.

O'GRADY, J. F.; READE, P. C. Periapical actinomycosis involving *Actinomyces israelii*. **Journal of Endodontics**, v. 14, p. 147-149, 1988.

O'NEILL, J.; WILSON, M.; WAINWRIGHT, M. Comparative antistreptococcal activity of photobactericidal agents. **Journal of Chemotherapy**, v. 15, p. 329–334, 2003.

OLIVEIRA, D. P. et al. In vitro antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology, and Endodontics**, v. 103, p. 702-706, 2007.

PASSOS, S. M. **Microbiologia das infecções endodônticas**. 2014. 32f. Monografia (Especialização em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2014.

PECIULINE, V. et al. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root filled teeth with chronic apical periodontitis. **International Endodontics Journal**, v. 34, p. 429-434, 2001.

PENESIS, V. A. et al. Outcome of one-visit and two-visit endodontic treatment of necrotic teeth with apical periodontitis: a randomized controlled trial with one-year evaluation. **Journal of Endodontics**, v. 34, p. 251-257, 2008.

PETERS, L. B.; WESSELINK, P. R.; VAN WINKELHOFF, A.J. Combinations of bacterial species in endodontic infections. **International Endodontic Journal**, v. 35, n. 8, p. 698-702, 2002.

PINHEIRO, E. T. et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **International Endodontic Journal**, v. 36, p. 1-11, 2003.

POURHAJIBAGHER, M.; BAHADOR, A. An in vivo evaluation of microbial diversity before and after the photo-activated disinfection in primary endodontic infections: Traditional phenotypic and molecular approaches. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 22, p. 19-25, 2018.

PLOTINO, G.; GRANDE, N. M.; MERCADE, M. Photodynamic therapy in endodontics. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 6, p. 760-774, 2019.

RAHIMI, S. et al. A review of antibacterial agents in endodontic treatment. **Iranian Endodontic Journal**, v. 9, n. 3, p. 161-168, 2014.

RICUCCI, D. et al. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. **Journal of Endodontics**, v. 35, p. 493-502, 2009.

RICUCCI, D.; MANNOCCI, F.; FORD, T. R. A study of periapical lesions correlating the presence of a radiopaque lamina with histological finding. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology, and Endodontics**, v. 101, p. 389-394, 2006.

RICUCCI, D.; SIQUEIRA JR, J. F. Apical actinomycosis as a continuum of intraradicular and extraradicular infection: case report and critical review on its involvement with treatment failure. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 9, p. 1124-1129, 2008.

RICUCCI, D.; SIQUEIRA JR, J. F. Recurrent apical periodontitis and late endodontic treatment failure related to coronal leakage: a case report. **Journal of Endodontics**, v. 37, p. 1171-1175, 2011.

RIOS, A. et al. Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. **Journal of Endodontics**, v. 37, p. 856–859, 2011.

ROÇAS, I. N. et al. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **Journal of Endodontics**, v. 30, p. 315–320, 2004.

ROÇAS, I. N.; SIQUEIRA, J.F. JR. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. **Journal of Endodontics**, v. 36, p. 45–52, 2010,

RODRÍGUEZ-NIKLITSCHK, C. et al. Clinical implications of *Enterococcus faecalis* microbial contamination in root canals of devitalized teeth: Literature review. **Revista Odontológica Mexicana**, v. 19, n. 3, p. 177–182, 2015.

ROGERS, G. B. et al. Assessing the diagnostic importance of nonviable bacterial cells in respiratory infections. **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**, v. 62, p. 133–141, 2008.

ROLPH, H. J. et al. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3282-3289, 2001.

ROSA, F. C. S. **Eficácia da instrumentação associada à terapia fotodinâmica antimicrobiana e medicação intracanal na eliminação de biofilmes e na neutralização de endotoxinas em canais radiculares**. 2008. 178f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia da UNESP, São José dos Campos, 2008.

ROSSEN, L. et al. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. **International Journal of Food Science**, v. 17, p. 37–45, 1992.

SABINO, C. P. et al. Real-time evaluation of two light delivery systems for photodynamic disinfection of *Candida albicans* biofilm in curved root canals. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 6, p. 1657-1565, 2015.

SABRAH, A. H.; YASSEN, G. H.; GREGORY, R. L. Effectiveness of antibiotic medicaments against biofilm formation of *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 11, p. 1385-1389, 2013.

SAKAMOTO, M. et al. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 23, p. 275-281, 2008.

SAKELLARIOU, P. L. Periapical actinomycosis: report of a case and review of the literature. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 12, p. 151-154, 1966.

SALAH, R. et al. Prevalence of putative virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolates from patients with dental diseases. **BMC Oral Health**, v. 8, n. 17, p. 1-7, 2008.

SANTIN, G. C. et al. Antimicrobial photodynamic therapy and dental plaque: a systematic review of the literature. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

SCHACKLEY, D.C. et al. Photodynamic therapy. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 92, p. 562-565, 1999.

SCHOOPE, U. et al. Innovative wavelengths in endodontic treatment. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, p. 624-630, 2006

SEAL, G. J. et al. An in vitro comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. **International Endodontic Journal**, v. 35, p. 268-274, 2002.

SEDGLEY, C. et al. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. **Archives of Oral Biology**, v. 50, p. 575-583, 2005.

SEDGLEY, C. et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. **Journal of Endodontics**, v. 32, p. 173-177, 2006.

SEELAN, R.G. et al. Antimicrobial efficacy of different root canal sealers by using real-time polymerase chain reaction: An ex vivo study. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 18, p. 474-478, 2015.

SEWELL, C. M. D. et al. Avaliação do tratamento endodôntico em radiografias periapicais e panorâmicas. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 13, p. 295-302, 1999.

SHEN, Y. et al. Methods and models to study irrigation. **Endodontic Topics**, v. 27, p. 3–34, 2012.

SHETESTHA, A.; KISHEN A. Antibiofilm Efficacy of Photosensitizer-functionalized Bioactive Nanoparticles on Multispecies Biofilm. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 10, p. 604-610, 2014.

SIGNORETTI, F. G. C. et al. Persistent extraradicular infection in root-filled a symptomatic human tooth: scanning electron microscopic analysis and microbial investigation after apical microsurgery. **Journal of Endodontics**, v. 37, p. 1696–1700, 2011.

SILVA, L. A. et al. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 3, p. 168-172, 2012.

SINGH, S. et al. Photodynamic therapy: An adjunct to conventional root canal disinfection strategies. **Australian Endodontic Journal**, v. 41, n. 2, p. 54-71, 2015.

SIQUEIRA JR, J. F. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. **International Endodontic Journal**, v. 34, p. 1-10, 2001.

SIQUEIRA, J. F. et al. *Actinomyces* species, *Streptococci*, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. **Journal of Endodontics**, v. 28, p.168–172, 2002a.

SIQUEIRA, J. F. et al. Bacterial Leakage in Coronally Unsealed Root Canals Obturated with 3 Different Techniques. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 90, n. 5, p. 647-650, 2011.

SIQUEIRA, J. F. et al. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 11, p. 1291-1301, 2008.

SIQUEIRA JR, J. F. et al. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5% and 5.25% Sodium hypochlorite. **Journal of Endodontics**, v. 26, p. 331-334, 2000.

SIQUEIRA JR, J. F. et al. Coronal leakage of two root canal sealers containing calcium hydroxide after exposure in human saliva. **Journal of Endodontics**, v. 25, p. 14-16, 1999.

SIQUEIRA JR, J. F. et al. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. **Journal of Endodontics**, v. 28, p. 181-184, 2002b.

SIQUEIRA JR, J. F.; LOPES, H. P. **Endodontia: biologia e técnica**. Rio de Janeiro: Medsi, 1999, 650 p.

SIQUEIRA, J. F. JR.; ROÇAS, I. N. Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. **Journal of Oral Microbiology**, v. 10, p. 1-12, 2009.

SIQUEIRA, J. F. JR.; ROÇAS, I. N. Diversity of endodontic microbiota revisited. **Journal of Dental Research**, v. 88, p. 969-981, 2008.

SIQUEIRA JR, J. F.; ROÇAS, I. N. Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic Infections: Part 2—Redefining the Endodontic Microbiota. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 31, n. 7, p. 488-498, 2005.

SIQUEIRA JR, J. F.; ROÇAS, I.N.; LOPES, H. P. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology, and Endodontics**, v. 93, p. 174-178, 2002.

SIQUEIRA JR, J.F.; ROÇAS, I. N. **Microbiologia e Tratamento de Infecções Endodônticas**. In: COHEN, K. M. H. Caminhos da Polpa. 10. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, p. 513–535.

SIQUEIRA JR, J. F.; ROÇAS, I. N. Polymerase chain reaction based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 97, p. 85–94, 2004.

SIQUEIRA, J. F.; ROÇAS, I. N. Polymerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radicidentis* in primary and persistent endodontic infections. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 96, p. 215–222, 2003.

SIQUEIRA JR, J. F.; ROÇAS, I. N. The microbiota of acute apical abscesses. **Journal of Dental Research**, v. 88, no. 1, p. 61-65, 2009.

SIQUEIRA JR, J. F.; ROÇAS, I. N. Update on endodontic microbiology: candidate pathogens and patterns of colonisation. **Endodontic Practice Today**, v.2, n.1, p. 7-20, 2008.

SJOGREN, U. et al. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 30, p. 297-306, 1997.

SJOGREN, U. et al. Survival of *Araehnia propioniea* in periapical tissue. **International Endodontic Journal**, v. 21, p. 277-282, 1988.

SLACK, J.M.; GERENCSEK, M.A. *Actinomyces*, filamentous bacteria. Biology and pathogenicity. **Minneapolis: Burgess Publishing**, 1975.

SMAÏL-FAUGERON, V. et al. Pulp treatment for extensive decay in primary teeth. **Cochrane Database Systematic Reviews**, v. 6, p. 8, 2014.

SMEGO JR, R. A.; FOGLIA, G. Actinomycosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, n. 6, p. 1255-1261, 1998.

SOARES, J. A.; CESAR, C. A. S. Clinic and radiographic evaluation of one-appointment root canal therapy in teeth with chronic periapical lesions. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 15, p. 138-144, 2001.

SOARES, J. A. et al. Exploring different photodynamic therapy parameters to optimize elimination of *Enterococcus faecalis* in planktonic form. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 22, p. 127-131, 2018.

SOUKOS, N. et al. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 33, p. 161-168, 2003

SOUKOS, N. S. et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 10, p. 979-984, 2006.

SOUKOS, N. S. et al. Targeted antimicrobial photochemotherapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 2595-2601, 1998.

SOUKOS, N. S.; GOODSON, J. M. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. **Periodontology 2000**, v. 55, p. 143–166, 2011.

SOUZA, L. C. et al. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 2, p. 292-296, 2010.

SPANGBERG, E. L. S. W. et al. PCR - based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 106, n. 3, p. 443–449, 2008.

STUART, C. H. et al. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 2, p. 93-98, 2006.

SUN, J. et al. Occurrence, population structure, and antimicrobial resistance of enterococci in marginal and apical periodontitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 2218–2225, 2009.

SUNDE, P. T. et al. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. **Journal of Endodontics**, v. 28, p. 304–310, 2002.

SUNDQVIST, G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps [thesis]. **Umea (Suécia)**: University of Umea; 1976.

SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. **Journal of Endodontics**, v. 18, n. 9, p. 427-30, 1992.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiological analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 85, p. 86-93, 1998.

SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D. Life as an endodontic pathogen: Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. **Endodontic Topics**, v. 6, p. 3-28, 2003.

SUNDQVIST, G.; REUTERVING, C. O. Isolation of *Actinomyces israelii* from periapical lesion. **Journal of Endodontics**, v. 6, p. 602-606, 1980,

SUSILA, A. V. et al. Combined effects of photodynamic therapy and irrigants in disinfection of root canals. **Journal of Biophotonics**, v. 9, n. 6, p. 603-609, 2016.

TENDOLKAR, P. M.; BAGHDAYAN, A. S.; SHANKAR, N. Pathogenic Enterococci: new developments in the 21st century. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n. 12, p. 2622–2636, 2003.

TENNERT, C. et al. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 5, p. 670-677, 2014.

TENNERT, C. et al. Ultrasonic activation and chemical modification of photosensitizers enhance the effects of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* root-canal isolates. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, p. 244-251, 2015.

THORNTON, C. G.; PASSEN, S. Inhibition of PCR amplification by phytic acid, and treatment of bovine fecal specimens with phytase to reduce inhibition. **Journal of Microbiology Methods**, v. 59, p. 43–52, 2004.

TORABINEJAD, M. **Endodontics: Principles and practice**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. F.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

TSAI, Y. L.; OLSON, B. H. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 754–757, 1992.

TUNCER, A. et al. Comparison of sealer penetration using the EndoVac irrigation system and conventional needle root canal irrigation. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 5, p. 613-617, 2014.

VAZIRI, S. et al. Comparison of the bactericidal efficacy of photodynamic therapy, 2.5 % sodium hypochlorite, and 2 % chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in root canals; an in vitro study. **Dental Research Journal**, v. 9, p. 613–618, 2012.

VERA, J. et al. One-versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 8, p. 1040-1052, 2012.

VIANNA, M. E. et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 97, n. 1, p. 79-84, 2004.

WAINWRIGHT, M.; CROSSLEY, K. B. Methylene Blue - a therapeutic dye for all seasons? **Journal of Chemotherapy**, v. 14, p. 431–43, 2002.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 13-28, 1998.

WALSH, L. J. The current of laser applications in dentistry. **Australian Dental Journal**, v. 48, n. 3, p. 146-155, 2003.

WALTON, R. E.; TORABINEJAD, T. M. **Princípios e prática em endodontia**. São Paulo: Santos, 1997, p. 29-51, 325-327, 401-421.

WEIGER, R. et al. Microbial flora of sinus tracts and root canals of non vital teeth. **Endodontic Dental Traumatology**, v. 11, p. 15-19, 1995.

WILLIAMS, J. A.; PEARSON, G. J.; COLLES, M. J. Antibacterial action of photoactivated disinfection {PAD} used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. **Journal of Dentistry**, v. 34, n. 6, p. 363-371, 2006.

WILSON, B. D. et al. Photodynamic therapy for treatment of basal cell carcinoma. **Archives of Dermatological Research**, v. 128, p. 1597-1601, 1992.

WILSON, M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochemistry and Photobiology**, v. 3, p. 412-418, 2004.

WILSON, M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontaldisease. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, n. 4, p. 299-306, 1993.

XIA, T.; BAUMGARTNER, J. C. Occurrence of *Actinomyces* in infections of endodontic origin. **Journal of Endodontics**, v. 29, p. 549–552, 2003.

ZAND, V. et al. Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy and sodium hypochlorite on monoculture biofilms of *Enterococcus faecalis* at different stages of development. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 32, p. 245-251, 2014.

ZANIN, I. C. J. et al. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 324-330, 2005.

ZOLETTI, G. O.; SIQUEIRA, J. F.; SANTOS, K. R. N. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture dependent and independent approaches. **Journal of Endodontics**, v. 32, p. 722-726, 2006.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DA TERAPIA FOTODINÂMICA CONTRA ENTEROCOCCUS FAECALIS E ACTINOMYCES ISRAELII NO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES

Pesquisador: Naiana Viana Viola Nícoli

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 96305318.0.0000.5142

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.071.511

Apresentação do Projeto:

O estudo será realizado na Clínica de Endodontia da UNIFAL e serão realizados dois tipos de tratamento divididos em dois grupos: Grupo 1 e Grupo 2. Serão selecionados para o tratamento, pacientes que apresentem dentes anteriores com diagnóstico de Necrose Pulpar com presença de lesão periapical, todos requerendo o tratamento do canal radicular. Os pacientes serão selecionados para cada grupo de forma aleatória, podendo então ser encaixados no Grupo 1 ou no Grupo 2. O Grupo 1 receberá o tratamento endodôntico convencional e o Grupo 2 receberá o tratamento endodôntico convencional + aplicação de Terapia Fotodinâmica.

Trata-se de um projeto de mestrado.

Financiamento Próprio.

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar os efeitos da Terapia Fotodinâmica, como coadjuvante na desinfecção do sistema de canais radiculares, através da análise microbiológica de amostras coletadas do interior de dentes

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Bairro: centro

CEP: 37.130-001

UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3701-9153

Fax: (35)3701-9153

E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

Continuação do Parecer: 3.071.511

anteriores humanos.

Objetivo Secundário:

Identificar a presença de *Enterococcus faecalis* e *Actinomyces israelii* no sistema de canais radiculares durante o tratamento endodôntico e através da aplicação da Terapia Fotodinâmica, avaliar os efeitos na susceptibilidade desses dois microrganismos.

- a. claros e bem definidos;
- b. coerentes com a propositura geral do projeto;
- c. exequíveis

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- a. os riscos de execução do projeto são bem avaliados, realmente necessários;
- b. os benefícios oriundos da execução do projeto justificam os riscos corridos;

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- a. Metodologia da pesquisa - está adequada aos objetivos do projeto;
- b. Referencial teórico da pesquisa – está atualizado e é suficiente para aquilo que se propõe;
- c. Cronograma de execução da pesquisa – é coerente com os objetivos propostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- a. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – presente e adequado
- b. Termo de Assentimento (TA) – não se aplica
- c. Termo de Assentimento Esclarecido (TAE) – não se aplica
- d. Termo de Compromisso para Utilização de Dados e Prontuários (TCUD) – presente e adequado
- e. Termo de Anuência Institucional (TAI) – presente e adequado
- f. Folha de rosto - presente e adequada;
- g. Projeto de pesquisa completo e detalhado - presente e adequado.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomenda-se aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado do CEP acata o parecer do relator.

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Bairro: centro

CEP: 37.130-001

UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3701-9153

Fax: (35)3701-9153

E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



Continuação do Parecer: 3.071.511

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|---------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1182906.pdf | 07/11/2018 15:14:19 | | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | PROJETO2.pdf | 07/11/2018 15:12:02 | Naiana Viana Viola Nicoli | Aceito |
| Outros | CARTAAUTORIZACAO1.pdf | 05/10/2018 16:18:21 | Naiana Viana Viola Nicoli | Aceito |
| Outros | TCUD.pdf | 05/10/2018 16:17:49 | Naiana Viana Viola Nicoli | Aceito |
| Outros | TAI.pdf | 05/10/2018 16:16:47 | Naiana Viana Viola Nicoli | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.pdf | 05/10/2018 16:13:04 | Naiana Viana Viola Nicoli | Aceito |
| Folha de Rosto | FOLHAROSTO.pdf | 05/10/2018 16:12:47 | Naiana Viana Viola Nicoli | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ALFENAS, 11 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Angel Mauricio Castro Gamero
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700
Bairro: centro CEP: 37.130-001
UF: MG Município: ALFENAS
Telefone: (35)3701-9153 Fax: (35)3701-9153 E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário (a), da pesquisa - **AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DA TERAPIA FOTODINÂMICA CONTRA ENTEROCOCCUS FAECALIS E ACTINOMYCES ISRAELII NO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES** - no caso de você concordar em participar, favor assinar ao final do documento.

Sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador (a) ou com a instituição.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e endereço do pesquisador (a) principal, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação.

TÍTULO DA PESQUISA: Avaliação do efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica contra *Enterococcus faecalis* e *Actinomyces israelii* no sistema de canais radiculares.

PESQUISADOR (A) RESPONSÁVEL: Profa. Dra. Naiana Viana Viola Nicoli.

ENDEREÇO: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, Alfenas – MG.

TELEFONE: (35) 3701-9429.

PESQUISADORES PARTICIPANTES: Suellen de Azevedo Moreira – Prof. Dr. Fábio Antônio Colombo.

OBJETIVOS: avaliar os efeitos de um tratamento com laser chamado terapia fotodinâmica, que irá auxiliar na limpeza dos canais do dente.

JUSTIFICATIVA: utilizar o laser, que é uma nova tecnologia, na tentativa de eliminar ou reduzir bactérias que podem sobreviver após ser realizado o tratamento de canal.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO: o estudo será realizado na Clínica de Endodontia da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG. Serão selecionados para o tratamento, pacientes com idade entre 18 a 50 anos, que apresentem os dentes da frente com necessidade de tratamento do canal e que apresentem lesão na ponta da raiz, que somente é observada pela realização de

uma radiografia. Serão realizados dois tipos de tratamento, divididos em dois grupos, podendo então ser encaixados no Grupo 1 ou no Grupo 2.

Grupo 1 – Tratamento de canal: será realizado o tratamento de canal, uso de um remédio dentro do canal e após 15 dias o canal será fechado.

Grupo 2 – Tratamento de canal + laser: será realizado o tratamento de canal, uso de um remédio dentro do canal entre a primeira e a segunda consulta (por 15 dias) e 2 aplicações de laser, uma na primeira consulta e outra na segunda consulta.

Os cones de papel usados para coletar as bactérias de dentro do canal durante as etapas do tratamento, serão levados para analisar a presença de dois tipos de bactéria que normalmente estão presentes nas infecções de canal.

Os canais serão fechados e o dente tampado com um material temporário. Uma radiografia será feita para avaliar o tratamento do canal depois de 60 e 90 dias do término do tratamento.

RISCOS E DESCONFORTOS E MEDIDAS: a infecção do dente pode continuar, sendo necessário nova colocação de medicação dentro do canal ou até mesmo ser necessário fazer uma cirurgia de remoção da parte final da raiz; quebra do dente devido ao seu enfraquecimento e ao não cumprimento pelo paciente das orientações passadas pelo cirurgião-dentista; dor após consultas, causada pela limpeza do canal, podendo ser necessário o uso de antibiótico; danos ao dente em tratamento se o paciente não terminar o tratamento no prazo indicado.

BENEFÍCIOS: fazer um tratamento com laser no canal do dente para diminuir a quantidade de bactérias e com isso evitar que as infecções continuem.

CUSTO/REEMBOLSO PARA O PARTICIPANTE: Não haverá nenhum gasto com sua participação. As consultas, exames, tratamentos serão totalmente gratuitos, não recebendo nenhuma cobrança com o que será realizado. Você também não receberá nenhum pagamento com a sua participação.

CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA: garantimos o sigilo e asseguramos a sua privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa, os dados não serão divulgados.

Assinatura do Pesquisador Responsável:

Eu, _____,
declaro que li as informações contidas nesse documento, fui devidamente informado (a) pelo pesquisador (a) – SUELLEN DE AZEVEDO MOREIRA – dos procedimentos que serão utilizados, riscos e desconfortos, benefícios, custo/reembolso dos participantes, confidencialidade da pesquisa, concordando ainda em participar da pesquisa.

Foi-me garantido que posso retirar o consentimento a qualquer momento, sem qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento. Declaro ainda que recebi uma cópia desse Termo de Consentimento.

Poderei consultar o pesquisador responsável (acima identificado) ou o CEP - UNIFAL - MG, com endereço na Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, Cep - 37130-000, Fone: (35) 3299-1318, no e-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br sempre que entender necessário obter informações ou esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa e minha participação no mesmo.

Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados.

LOCAL E DATA: Alfenas, 03 de Outubro de 2018.

(Nome por extenso)

(Assinatura)