



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS INTEGRADAS**

LYA CARLA DE SIQUEIRA CAMPOS

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Enterococcus faecalis* E *Candida albicans* POR PCR EM TEMPO REAL EM DENTES NÃO SINTOMÁTICOS COM LESÃO PERIAPICAL

Cuiabá, MT
2018

LYA CARLA DE SIQUEIRA CAMPOS

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Enterococcus faecalis* E
Candida albicans POR PCR EM TEMPO REAL EM DENTES NÃO
SINTOMÁTICOS COM LESÃO PERIAPICAL**

Dissertação apresentada à UNIC, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Integradas, na área de Concentração de Biociências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Alessandra Nogueira Porto
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a. Tereza Aparecida D.V. Semenov

Cuiabá, MT
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais para Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecária Elizabete Luciano /CRB1-2103

C142i Campos, Lya Carla de Siqueira.

Identificação e Quantificação de *Enterococcus Faecalis* e *Candida Albicans* por PCR em Tempo Real em Dentes não sintomáticos com Lesão Periapical / Lya Carla de Siqueira Campos. Cuiabá-MT, 2018.
56p.

Dissertação apresentada à UNIC – Universidade de Cuiabá, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Integradas – Área de Concentração Biociências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Alessandra Nogueira Porto.
Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Tereza Aparecida D.V. Semenoff

1. Microbiota. 2. Canal Radicular. 3. Reação em Cadeia da Polimerase.

CDU 616.314

LYA CARLA DE SIQUEIRA CAMPOS

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Enterococcus faecalis* E *Candida albicans*
POR PCR EM TEMPO REAL EM DENTES NÃO SINTOMÁTICOS COM LESÃO
PERIAPICAL

Dissertação apresentada à UNIC, no Mestrado em Ciências Odontológicas Integradas. Área de concentração em Biociências como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

Prof.^a Dr.^a. Alessandra Nogueira Porto
(Orientadora)
UNIC

Prof.^a Dr.^a. Andreza Maria F. Aranha
UNIC

Prof.^a Dr.^a. Bianca Borsatto Galera
UFMT

Cuiabá, 27 de março de 2018.

Dedico esta pesquisa ao meu filho, João Vítor Campos Garcia, que ao ter conhecimento do meu êxito no programa de Pós-graduação *Stricto Sensu*, não titubeou demonstrando em seu sorriso largo, a validação à minha aprovação.

AGRADECIMENTOS

A Deus que tudo sabe e tudo opera, o meu louvor e gratidão!

A minha família, esposo e filho, pela compreensão diante das minhas ausências, ansiedade e fragilidade no decorrer do curso.

Aos meus amigos e colegas de trabalho pelo apoio nos momentos em que não pude compartilhar das tarefas laborais.

Aos eternos colegas de Curso por acreditarem em mim durante da caminhada; que nos momentos de tensão, dúvidas e angústias souberam oferecer, cada um na sua singularidade, o afago necessário e vital de motivação.

À Prof.^a Dr.^a. Tereza Aparecida D. V. Semenoff pelos momentos em que juntas, vivemos o processo da presente pesquisa.

À Prof.^a Dr.^a. Alessandra Nogueira Porto, por aceitar no decorrer do curso mais um desafio e por me proporcionar direção.

Ao Professor Dr. Alex Semenoff Segundo, pelo entusiasmo diante seus ensinamentos compartilhados.

Aos Professores Doutores do programa de pós - graduação *stricto sensu* em Ciências Odontológicas Integradas da Universidade de Cuiabá – UNIC, Alexandre Meireles Borba, Andreza Maria Fábio Aranha, Cynthia Rodrigues de Araújo Estrela, Luiz Evaristo Ricci Volpato, Mateus Rodrigues Tonetto, Matheus Coelho Bandéca, Orlando Aguirre Guedes.

À Bióloga, responsável técnica do laboratório de biologia molecular da Universidade de Cuiabá-UNIC, Andressa Ricci, pela acolhida e paciência na condução do método escolhido para a pesquisa.

Ao Biólogo Doutorando Natalino Francisco da Silva pelo apoio na construção dos dados gráficos.

Ao Coordenador do programa de pós-graduação *stricto sensu* em Ciências Odontológicas Integradas da Universidade de Cuiabá – UNIC, Prof. Dr. Álvaro Henrique Borges.

Ao Diretor da Faculdade de Odontologia da Universidade de Cuiabá – UNIC, Fábio Luís Miranda Pedro.

Ao Reitor da Universidade de Cuiabá – UNIC, Fernando Ciríaco.

Ao Pró-Reitor Acadêmico da Universidade de Cuiabá – UNIC, José Cláudio Perecin.

Ao Pró-Reitor Administrativo e Diretor de Unidade da Universidade de Cuiabá – UNIC, Fernando Ciríaco Dias Neto.

Ao Diretor do programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Kroton, Prof. Dr. Hélio Suguimoto.

À Coordenadora de Pesquisa e Pós-Graduação - *Stricto Sensu* da Universidade de Cuiabá – UNIC, Lucélia de Oliveira Santos.

À secretaria do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade de Cuiabá nas pessoas de Ana Borsari e José Bohnenberger.

À Fundação de amparo e apoio à pesquisa do Estado de Mato Grosso – FAPEMAT, pelo incentivo oportunizado.

Aos graduandos do curso de Odontologia que se dispuseram diante os atendimentos endodônticos.

Aos clientes da Clínica de Odontologia da Universidade de Cuiabá – UNIC, que de modo indireto oportunizaram a realização da busca.

“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)

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Descrição dos primers e sondas de DNA dos microrganismos do estudo. (5' - 3').....	39
Tabela 2- Caracterização dos pacientes envolvidos no estudo.....	40
Tabela 3- Médias e desvios padrão da quantidade de microrganismos detectados pelo qPCR no estudo.	40
Tabela 4- Frequência e porcentagem dos microrganismos envolvidos no estudo. ...	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Amoxicilina
AZ	Azitromicina
CR	Canais Radiculares
CI	Ciprofloxacina
CL	Cloranfenicol
DC	Doxiciclina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EM	Eritromicina
FTM	Tioglicolato fluido
I	Escala intermediária
MO	Microrganismo
MX	Moxifloxacina
MTAD	Mistura do isômero de tetraciclina
OMS	Organização Mundial da saúde
PMA	Monoazida de propídio
PG	Benzilpenicilina
qPCR	Reação em cadeia quantitativa da polimerase (do inglês quantitative polymerase chain reaction)
R	Resistentes
RI	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucléico
Rpm	Rotações por minutos
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
TC	Tetraciclina
UFC/ml	Unidades formadoras de colônia por mililitro
VA	Vancomicina
XL	Amoxicilina + ácido clavulânico
µL	Microlitro

RESUMO

Campos LCS. Identificação e quantificação de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* por PCR em tempo real em dentes não sintomáticos com lesão periapical. [dissertação]. Cuiabá: Universidade de Cuiabá; 2018.

A terapêutica endodôntica tornou-se temática preocupante diante da verificação considerável da presença de microrganismos resistentes em situações de pós-tratamento. O objetivo do presente estudo foi identificar e quantificar *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* em dentes assintomáticos com lesão periapical, visível por imagem. A busca ocorreu por conveniência em uma clínica de odontologia a partir de pacientes com protocolo para atendimento. Neste contexto, foram incluídos no estudo indivíduos que apresentaram lesão periapical de 2 a 5 mm de diâmetro, assintomáticos, coroas dentárias satisfatoriamente restauradas, ausência de antibiótico terapia em 6 meses. As cavidades abertas ao meio bucal, fístulas periapicais, lesão endo-periodontal, pinos intrarradiculares foram excluídos do estudo. Foram avaliados 35 dentes, a partir de um contingente de 21 pacientes do sexo feminino (60%) e 14 do sexo masculino (40%), com média de idade de 41,37(±16,14 anos). Os dentes explorados e tratados foram: 12 incisivos, 4 caninos, 13 pré-molares e 6 molares. A coleta microbiológica foi realizada por meio de cones de papel estéril número 20 inseridos no interior do canal, e após acondicionados em *eppendorfs*, e seguindo protocolo de extração conforme fabricante, foram processados com a técnica de PCR-*real time* e sonda TAQMAN®. Foi obtido a presença de *Enterococcus faecali* em onze amostras (31,4%) com média de 349,3757±1.370,1802, a *Candida albicans* apresentou em 27 amostras (77,1%) com média de 104,6497±285,0534. Os resultados revelaram que o *Enterococcus faecalis* foi mais expressivo em relação à quantificação e a *Candida albicans* apresentou uma expressiva frequência em todas as amostras. Considerando dentes em processo de infecção primária (nunca tratados endodonticamente), fato ainda não verificado em estudos anteriores com relação a dentes sem sintomatologia.

Palavras-Chaves: Microbiota, Canal Radicular, Reação em Cadeia da Polimerase.

ABSTRACT

Campos LCS. Identification and quantification of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* by real-time PCR in asymptomatic teeth with periapical lesion. [dissertation]. Cuiabá: University of Cuiabá; 2018.

Endodontic therapy is a worrying topic with the significant presence of resistant microorganisms in post-treatment situations. The aim of this study was to identify and quantify *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in asymptomatic teeth with periapical lesion, visible through image. The search occurred for convenience in a dental clinic from patients with care protocol. In this context, individuals with periapical lesions ranging from 2 to 5 mm in diameter, asymptomatic, satisfactorily restored dental crowns, absence of antibiotic therapy in 6 months were included in the study. Cavities open to the oral environment, periapical fistulas, endo-periodontal lesion, intraradicular pins were excluded from the study. 35 teeth were evaluated from a contingent of 21 female patients (60%) and 14 male patients (40%), with a mean age of 41.37 (\pm 16.14 years). The explanted and treated teeth were: 12 incisors, 4 canines, 13 premolars and 6 molars. The microbiological collection was performed through number 20 sterile paper cones inserted in the canal, and after packed in eppendorfs, and following extraction protocol according to the manufacturer, were processed with the real-time PCR technique and TAQMAN® probe. The presence of *Enterococcus faecalis* was obtained in eleven samples (31.4%) with a mean of 349.3757 \pm 1370.1802, *Candida albicans* was present in 27 samples (77.1%) with a mean of 104.6497 \pm 285.0534. The results showed that *Enterococcus faecalis* was more expressive in relation to quantification and *Candida albicans* showed an expressive frequency in all the samples. Considering teeth in the process of primary infection (never endodontically treated), a fact not yet verified in previous studies regarding teeth without symptomatology.

Key Words: Microbiota, Root Canal, Polymerase Chain Reaction.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 BIOFILME DENTÁRIO	16
2.2 MICROBIOTA ENDODÔNTICA	17
3 PROPOSIÇÃO	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	32
4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO	32
4.2.1 Critérios de inclusão:	32
4.2.2 Critérios de Exclusão	33
4.3 EXAME CLÍNICO	33
4.4 COLETA DOS MATERIAIS	34
4.5 AMOSTRA E ANÁLISE LABORATORIAL.....	35
4.5.1 Extração e quantificação do DNA	35
4.5.2 Confeção dos primers, detecção e quantificação microbiana (rt-PCR) ..	36
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5 RESULTADOS	40
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO	46
8 REFERÊNCIAS	47
ANEXOS	52
APÊNDICE	55

1 INTRODUÇÃO

Os achados microbiológicos validados pelo projeto microbioma oral humano (HOMD – *Human Oral Microbiome Database*) conferem a cavidade oral o título de microbioma de procariota mais rico do corpo humano. Isto se deve pelo fato de ser essa região, colonizada por cerca de 700 espécies de microrganismos, os quais encontram-se tabulados na HOMD. Dessas espécies, 54% foram nomeadas oficialmente, 14% foram cultivadas, mas sem denominação, e 32% são filos conhecidos não cultivados.¹⁻³

Dentre as elencadas na base de dados HMOD, algumas são mais prevalentes com destaque para as espécies dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Prevotella* e alguns microrganismos filamentosos.¹⁻⁴

Porém, mesmo diante da considerável microbiota da cavidade oral, os elementos dentinários permanecem vitais. A barreira dos elementos dentinários constituída por tecidos mais rígidos, os mantem íntegros e livres de agentes microbianos. Mas, alguns fatores podem favorecer a invasão de microrganismos a esses espaços, e podem ser considerados como exemplos os casos de traumatismos dentários e lesões cariosas.⁵

Nessas circunstâncias, estabelecendo uma invasão de microrganismos nas cavidades dos elementos dentinários, as células de defesa do hospedeiro promoverão um processo inflamatório no local, ou seja, nos tecidos radiculares. Todavia, pelo fato de a região pulpar e radicular possuir uma insipiente circulação periférica com uma diminuição da drenagem linfática, as células hospedeiras não conseguirão lograr êxito em relação à eliminação dos microrganismos nos espaços vitais. De modo adverso, ocorrerá um aumento no processo de desvitalização no tecido pulpar bem como, do canal radicular com conseqüente comprometimento periapical.^{3-4,6-9} A partir do qual Instaura-se o início da patogênese endodôntica.

Alguns estudos^{5,10,11} classificam as infecções endodônticas em infecção primária, secundária e persistente. Deste modo, pode-se elucidar que as doenças endodônticas ocorrem de modo progressivo e paulatinamente se instalam. E, a partir da presença de uma ou mais espécies de microrganismos em região pulpar com

concomitante processo necrótico, considera-se um caso de infecção endodôntica primária. Essa classificação possui um perfil microbiano vasto em relação aos tipos de espécies encontradas na cavidade oral, e a alteração do perfil microbiológico se instaura mais facilmente a partir de uma intervenção endodôntica. De modo que, diante os procedimentos quimio-mecânicos, haverá uma seleção dos microrganismos no tocante as espécies. Este processo promove uma diminuição em relação à quantidade das espécies restringindo-as em espécies anaeróbias estritas. Trata-se a partir deste estágio das classificações seguintes de infecção endodôntica: infecção secundária e/ou persistente. ^{4,11,12}

Neste cenário, torna-se evidente que a persistência dos microrganismos em pós-terapêutica das endodontopatias e das periapicopatias são constantes, e como exemplo desses microrganismos alguns são frequentemente citados como exemplo *Candida*¹³, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*¹⁴, *Fusobacterium*, *Pseudomonas*¹⁵¹⁹ e *Enterococcus* ¹⁴. Ainda assim, desse rol a *Candida albicans* e o *Enterococcus faecalis* lideram a prevalência dos achados. ^{17,18}

Desta forma, a presença dos microrganismos em tecidos pulpaes, e principalmente dos microrganismos *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* vem sendo de modo incansável temática de pesquisas nos últimos anos. Vários são os fatores que induzem a essa preocupação, mas dentre esses fatores, encontram-se os fracassos no tratamento endodôntico, juntamente com a vulnerabilidade dos produtos utilizados nessa área, bem como, os processos de resistências bacterianas somados a relação desses microrganismos aos casos de infecções nosocomiais. ¹⁴

Diante dessas situações, identificar os microrganismos que circundam a colonização endodôntica, tanto em estágio primário, secundário e/ou persistente de infecção é tão relevante, quanto conhecer as vias que induzem a sua adesão. ^{5,11,18} Mas a determinação dessa população é complexa em relação a metodologia de coleta, processamento e identificação microbiológica. ^{5,13,16}

Nessa circunstância, as técnicas de identificação dos microrganismos orais têm sido realizadas por vários métodos, dentre estes a cultura com a verificação das células bacterianas viáveis como unidades formadoras de colônias. Este método pode ser demorado, e exige produtos com os meios para cultura dispendiosos, além de favorecer comprometimento em relação a presença de

oxigênio durante o manejo. Já a técnica da reação em cadeia da Polimerase (*Polymerase ChainReaction* – PCR), é uma opção mais específica, pois, com perspectivas inovadoras, apresenta respaldo para uma especificidade e sensibilidade na determinação da microbiota envolvida.^{16,17,19,20}

Com isso, conhecer melhor a etiopatogênese das doenças endodônticas e periapicais trará um melhor entendimento para as formas de diagnóstico, prognóstico e plano de tratamento mais assertivo diante de processos infecciosos.^{17,21,22}

De todo o exposto, o presente estudo se propôs a identificar e quantificar microrganismos em canal intrarradicular em pacientes submetidos ao tratamento endodôntico, de dentes com restauração, assintomáticos e apresentando-se clinicamente satisfatório. Assim a determinação da presença microbiana ou não, envolvidos no processo, bem como sua quantificação contribuirá com a promoção de condutas terapêuticas mais eficazes para a supressão dos mesmos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A busca para a revisão da literatura, foi realizada a partir das bases de dados indexadas *online*, nos bancos de dados *National Library of Medicine-Pubmed*; *Scientific Electronic Library Online-Scielo*, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde-*Lilacs* e *Google Scholar*.

Foram consideradas as publicações dos últimos 05 anos, sendo que as evidências de Miller (1894), Kary Mullis (1985), Russel Huguchi (1993) e Dewhirst (2015) foram consideradas para a construção desta revisão.

2.1 BIOFILME DENTÁRIO

Segundo a OMS - Organização Mundial da Saúde define-se um biofilme como um ecossistema bacteriano proliferativo e enzimaticamente ativo ^{22,23}, que evolui a partir de microcolônias e um aglomerado celular. ²³ Esta matriz constituída por componentes microbianos é composta basicamente por polissacarídeos, células epiteliais descamadas, leucócitos, enzimas, sais minerais, glicoproteínas salivares, proteínas, pigmentos e restos alimentares²³ substâncias que fazem parte da constituição celular dos microrganismos.

As microcolônias podem ser constituídas por um único microrganismo, denominadas de monomicrobianas ou, mais frequentemente, serem compostas por várias espécies bacterianas e receberem a denominação de polimicrobianas. Em conformidade com o meio e os nutrientes existentes. ²³

A presença de espaços ou canais de água entre as microcolônias de microrganismos permitem a passagem de nutrientes e outros produtos, atuando, de certa forma, como um sistema circulatório inicial o que contribui para a viabilidade dos mesmos. ²⁴

O biofilme, no entanto, proporciona a proteção necessária aos microrganismos frente aos fatores ambientais, mecanismos de defesa do hospedeiro e substâncias tóxicas. Além disso, facilita a troca de nutrientes produzidos pelos microrganismos e a remoção de produtos metabólicos tóxicos. ^{24,25}

Em relação ao biofilme dentário, este é considerado um ecossistema dinâmico, diante das contínuas mudanças em relação à composição dos agentes

microbianos nos diferentes nichos da cavidade bucal. Neste contexto, estima-se que mais de setecentas espécies microbianas sejam capazes de colonizar a cavidade bucal e que cada indivíduo possa albergar cerca de 150 a 200 espécies em sua região bucal. ²⁴ Tal dinamicidade caracteriza o biofilme dentário em uma mistura de diferentes espécies de microrganismos, sendo comum o isolamento de muitas espécies bacterianas a partir de uma única amostra. ^{23,24}

Estudos elucidam que o biofilme microbiano da cavidade bucal tem possibilidade de ser constituído por: fungos, bactérias e vírus (*Epstein barr*) e podem estar associadas às infecções locais ou sistêmicas. ^{25,26,27}

As interações entre esses microrganismos são complexas e altamente dependentes do contexto em que se encontram, ou seja, da condição tecidual, vascularização e comprometimento imune do hospedeiro. Esses agentes podem variar de uma concorrência feroz por nutrientes e nichos, manifestados por comportamentos antagônicos, mecanismos de cooperação altamente evoluídos entre diferentes espécies que apoiam seu crescimento mútuo em ambientes específicos. ^{26, 27, 28}

Devido à facilidade em resistir a condições ambientais rudimentares, tais como espaços radiculares, as bactérias vêm se apresentando como protagonistas em alta prevalência de diversos tipos de infecções crônicas graves a exemplo das endocardites, das artrites sépticas. ^{27, 28, 29}

Assim, as espécies bacterianas induzem a evasão nas respostas imune do hospedeiro se associando, portanto, aos casos de resistências antimicrobianas.

28

2.2 MICROBIOTA ENDODÔNTICA

Sabe-se, portanto, que a rigidez dos tecidos dentais pode promover barreiras dificultando o agente antimicrobiano em atingir seu alvo, porém, comprometimentos infecciosos, ainda são evidências científicas conforme estudos citados a seguir.

De acordo com Alves, 2004 ³⁰ nos estágios das infecções endodônticas e presença de comprometimento pulpar, há um rol de microrganismos que se

estabelecem nesse nicho e conhedidamente os estudiosos dão destaque. Pode-se citar que nos estágios primários são evidentes: *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Campylobacter*, *Propionibacterium*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*. Nos estágios posteriores, ou seja, quando mesmo após procedimentos endodônticos alguns microrganismos sobrevivem verificam-se situações de infecções secundárias e persistentes. Neste contexto, a ênfase para os microrganismos será: infecção secundária- *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Escherichia* e Fungos; já para a infecção persistente: *Actinomyces*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Propionibacterium* e Fungos. Nesta seara torna-se relevante a identificação microbiológica dos microrganismos nos processos endodônticos para que favoreça uma diminuição de doenças pulpares.

Rani e Chopra, 2006 ³¹ utilizando uma amostra de 30 pacientes do sexo masculino e feminino entre 15 a 45 anos de idades, isolaram e identificaram microrganismos aeróbicos e anaeróbicos da raiz de amostras de canais de dentes clinicamente sintomáticos não vitais com lesões periapicais, em primeira abertura do canal radicular. Nessa amostra os dentes deveriam apresentar dor espontânea, dor a percussão, inchaço, somado a patologia periapical após exame de raio x. O processo de coleta foi realizado a partir do acesso à polpa, onde um escareador foi inserido no canal até o forame apical e o conteúdo obtido para cultura aeróbica e anaeróbica. A cultura anaeróbica, seguiu-se com o meio de transporte pré-aquecido Stuart, o conteúdo do canal radicular foi inoculado em Agar de infusão de cérebro e sangue Agar suplementado anaerobicamente (Hi-Mídia) e manteve-se em *McIntosh* e *Fildes Anaerobic Jar* em 37°C para 48 às 72h. Para a cultura aeróbica, o conteúdo do canal radicular foi colocado em tubo de ensaio estéril, selados e transferidos para o laboratório. Os teores do canal radicular foram inoculados em Agar de sangue e Agar *MConkey* e colocados em uma incubadora em 37°C durante 18 a 24 horas. As características da colônia foram observadas em quaisquer crescimento e identificação de microrganismos realizada por coloração de Gram e reações bioquímicas padrão. O estudo revela uma natureza polimicrobiana nos processos de infecção endodôntica e a importância dos anaeróbios facultativos em dentes com sintomatologia. Dos isolados totais 49,27% eram anaeróbios obrigatórios, enquanto outros eram microrganismos facultativos e aeróbicos.

Estrela *et al.*, 2009³² elucida que o biofilme microbiano dos dentes com periodontite apical persistente apresenta espécies simples de microrganismos Gram-positivos e relata que o *Enterococcus faecalis* representa a espécie mais comum para os casos de retratamento, estando presente em cerca de 74% dos casos. Para os autores o fator primordial que determina o potencial patogênico desse agente é sua facilidade de aderência à superfície da dentina. Porém, a invasão em túbulos dentinários radiculares por bactérias do canal radicular é um evento multifatorial e um número limitado de espécies bacterianas orais tem as propriedades necessárias para participar. Por outro lado, a penetração do *Enterococcus faecalis* na dentina radicular infectada mostrou variações no modelo experimental. O desenvolvimento e modificação do biofilme de *Enterococcus faecalis* no canal radicular e sua penetração nos túbulos dentinários foram associados às condições ambientais prevalentes. A estrutura de colonização bacteriana no colágeno dentinário constitui a representação biológica natural. Os túbulos dentários contêm uma quantidade considerável de colágeno não-mineralizado e o colágeno tipo I serve como substrato de adesão aos *Streptococcus* orais. *Enterococcus faecalis* tem sido usado como marcador biológico em estudos endodônticos e sua importância para a pesquisa endodôntica está bem documentada. Os *Enterococcus faecalis* são classificados de forma variável e está entre os microrganismos mais comuns nas infecções adquiridas no hospital (85-95%). Sua virulência envolve a capacidade de adesão aos tecidos do hospedeiro, e durante o processo de invasão tecidual, demonstra grande potencial redox e nutrientes essenciais limitados. O *Enterococcus faecalis* expressa fatores que permitem a adesão às células hospedeiras e à matriz extracelular, facilitando a invasão e interferência na imunomodulação mediada.

Dumani *et al.*, 2012³³ objetivaram determinar a frequência de dois microrganismos patogênicos importantes associados a infecções endodônticas, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, em amostras de canais radiculares de pacientes com polpas necróticas ou em dentes portadores de insucesso endodôntico, por meio do método de reação em cadeia da polimerase. Para tanto, amostras microbianas foram obtidas a partir de 117 dentes com tecidos de polpa necrótica e 114 dentes com necessidade de retratamento endodôntico. Sendo possível observarem que *Enterococcus faecalis* tiveram presentes em 16% do grupo de dentes com necrose pulpar e 10% do grupo de dentes que necessitavam

de retratamento endodôntico. O genoma de *Candida albicans* foi identificado em 20% e 11% das infecções do canal radicular com necrose pulpar e com necessidade de retratamento, respectivamente. As frequências de microbiota não foram estatisticamente diferentes entre os grupos necróticos e de retratamento ($p > 0,05$, teste de Qui - quadrado). Os autores concluíram que a análise por PCR dos dentes com lesões periapicais, revelou que *Enterococcus faecalis* foi encontrado em menos pacientes do que nos estudos anteriores. A prevalência da *Candida albicans* foi consistente com os relatórios anteriores. Não foi encontrada diferença estatística entre infecções do canal primário e secundário para *Candida albicans* ou *Enterococcus faecalis*.

Rôças e Siqueira, 2012³⁴ com quarenta e dois dentes em retratamento, assintomáticos, e evidência radiográfica de periodontite apical e terapia endodôntica há mais de 2 anos, pesquisaram a presença bacteriana com abordagem reversa de hibridação DNA-DNA e contagens de *Enterococcus faecalis* e *Streptococo* sem ensaio quantitativo de PCR em tempo real (qPCR). Os níveis bacterianos foram inferidos para cada amostra com base nas curvas padrão obtidas. As curvas padrão para *Enterococcus faecalis* e *Streptococos* foram construídas usando DNA extraído de concentrações conhecidas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) cultivadas em cultura pura. A PCR quantitativa em tempo real detectou *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus* em 38% e 41% dos casos, 9,76% e 65,78% das contagens bacterianas totais, respectivamente. O resultado questiona o estado de *Enterococcus faecalis* como principal agente patogênico e sugerem que outras espécies podem ser patógenos candidatos associados à infecção endodôntica persistente / secundária.

Pontani *et al.*, 2013³⁵ corroboram que os microrganismos são os principais agentes causadores das infecções endodônticas, por outro lado, lembram que os procedimentos baseados em fenótipos para a identificação bacteriana têm algumas desvantagens especialmente, quando se investiga a microbiota endodôntica. Assim, métodos mais sensíveis como a reação em cadeia da polimerase – PCR, podem fornecer resultados mais precisos e confiáveis para a prevalência microbiana endodontopatogênica. Os autores investigaram a prevalência de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* em vinte dentes com periodontite apical sintomática em dentes submetidos ao retratamento endodôntico. Para tanto, amostras

microbiológicas foram retiradas dos canais imediatamente após a remoção da gutta percha por meio de técnicas assépticas. As amostras foram processadas por amplificação através da PCR. Como resultado, o *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais predominante, aliás, detectada em 65% dos casos e *Candida albicans* foi detectada em 35% dos casos. Desta forma, demonstram juntamente com afirmações de pesquisas anteriores, que também puderam detectar estes microorganismos em situações semelhantes.

Kovac *et al.*, 2013³⁶ investigaram estes mesmos microrganismos, *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* em dentes com lesões cariosas profundas e com necrose pulpar de 32 pacientes e analisaram a suscetibilidade das cepas de *Enterococcus faecalis* para diferentes antimicrobianos. O cultivo das amostras dentárias produziu quatro cepas de *Enterococcus faecalis* (12,5%) e três cepas de *Candida albicans* (9,4%). Todos os isolados de *Enterococcus faecalis* eram suscetíveis à ampicilina, um isolado era resistente à tetraciclina, dois à eritromicina e a azitromicina. Dois isolados apresentavam susceptibilidade intermediária a ciprofloxacina e a moxifloxacina. Frente ao exposto, os autores puderam concluir que *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* podem participar do canal radicular dental em infecções periapicais, e o uso de soluções irrigantes efetivas e medicamentos intracanaís ativos contra esses microrganismos é importante para prevenir falhas na terapia endodôntica.

Murad *et al.*, 2014³⁷ investigaram trinta e seis canais radiculares com presença de infecção persistente. No estudo detectaram a presença de setenta e nove espécies bacterianas. Dessas, as mais prevalentes foram: *Enterococcus faecium* (36%), *Streptococcus epidermidis* (36%), *Eubacterium saburreum* (28%), *Parvimonas micra* (28%), *Streptococcus sanguis* (28%), *Capnocytophaga sputigena* (28%), *Leptotrichia buccalis* (28%) *Enterococcus faecalis* (36%) e *Staphylococcus warneri* (28%). Também foram encontrados em menor prevalência: *Treponema socranskii* (3%), *Fusobacterium periodonticum* (3%), *Capnocytophaga gingivalis* (3%) e *Spiroplasma ixodes* (3%). Houve uma diferença significativa entre as espécies Gram-negativas e Gram-positivas, consideradas as Gram-negativas, as mais evidentes. A microbiota de dentes com periodontite apical persistente apresentou um perfil misto e complexo, hospedando *Enterococcus faecium* e *Streptococcus epidermidis* como as espécies mais prevalentes. Nenhuma correlação

foi encontrada entre quaisquer das espécies testadas e achados clínicos; entretanto, as lesões periapicais com as maiores áreas, apresentaram maiores contagens de espécies Gram-negativas.

Tong *et al.*, 2014³⁸ avaliaram os efeitos da concentração inibitória mínima (MIC) em irrigantes intracanal com diferentes concentrações de nisina (MTAD, MTADN, MTAN) em *Enterococcus faecalis* pela determinação da utilização de antibiótico, pós-antibiótico (PAE) e pós-antibiótico sub-mic (PASME). Relacionando os efeitos à resistência aos fármacos e à alcalinidade – pH 8, 9 e 10 respectivamente. Para o estudo foi utilizado uma única colônia de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 que permaneceu sob cultivo por 24 horas. O estudo mostrou resistência alcalina do *Enterococcus faecalis* pós-tratamento com os três irrigantes intracanaís: MTAD (3% de doxiciclina nisina e 4,25% de citrina doxiciclina, 0,5% polissorbato), MTAN (3% de nisina, 4,25% de ácido cítrico e 0,5% polissorbato) e MTADN combinado com 3% nisina apenas. Diante disso, revelou a resistência alcalina de *Enterococcus faecalis* após o tratamento com os três irrigantes intracanaís. Quanto ao desafio de pH, para o pH 8, houve diminuição lenta do *Enterococcus faecalis*. No pH 9, os quatro grupos de *Enterococcus faecalis* cresceram até um em 7 dias, e a solução alcalina não inibiu de modo eficaz tal crescimento. Em pH 10, a taxa de sobrevivência de *Enterococcus faecalis* tratados com MTAD diminuiu para um mínimo de 2 dias e aumentou após 7 dias. Similarmente, no grupo controle de *Enterococcus faecalis*, também houve diminuição para um mínimo de 2 dias e um máximo após 14 dias. Com os irrigantes MTADN e MTAN e pH 10, os *Enterococcus faecalis* foram completamente mortos entre 12 h e 4 dias. Além disso, nenhum grupo de *Enterococcus faecalis* sobreviveu a solução com pH 11 e para os irrigantes, MTAD, MTADN, MTAN houve morte do microrganismo.

Di Santi *et al.*, 2015³⁹ na tentativa de corroborar frente aos problemas endodônticos, avaliaram a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias facultativas, isoladas de canais radiculares frente ao insucesso endodôntico e os antibióticos de uso sistêmico. Foi utilizado como referência cepas de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Actinomyces viscosus* e *Staphylococcus aureus*. A amostra foi constituída por 15 dentes unirradiculares tratados endodonticamente com lesão periapical, sem uso de antimicrobiano prévio nos últimos três meses

anteriores à coleta. Com a pesquisa verificou-se uma susceptibilidade aos antibióticos: Amoxicilina (AC), Rifampicina (RI), Moxifloxacina (MX), Vancomicina (VA), Tetraciclina (TC), Ciprofloxacina (CI), Cloranfenicol (CL), Benzilpenicilina (PG), Amoxicilina associada ao ácido clavulânico (XL), Doxiciclina (DC), Eritromicina (EM) e Azitromicina (AZ). Entretanto, alguns isolados com cepas de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, foram resistentes (R) a Azitromicina (AZ) e Rifampicina (RI). Além disso, algumas cepas de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Actinomyces viscosus* dos isolados, apresentaram uma escala intermediária (I) frente aos antibióticos Rifampicina (RI), Ciprofloxacina (CI), Cloranfenicol (CL), Eritromicina (EM) e Azitromicina (AZ). Todas as cepas de *Staphylococcus aureus* mostraram-se suscetíveis frente aos 12 antibióticos testados.

Santos *et al.*, 2015⁴⁰ avaliaram em casos de primeira consulta para tratamento endodôntico, a microbiota endodôntica de dentes com e sem lesão periapical visível radiograficamente, e quantificar unidades formadoras de colônia (UFC/ml) das principais espécies bacterianas envolvidas. A amostra composta por 12 canais foi dividida em dois: Grupo (1): com necrose pulpar sem lesão visível em RX e Grupo (2): com lesão periapical visível em Rx. Das amostras, três canais se apresentaram sem lesão periapical (Grupo1) e nove com lesão periapical visível radiograficamente (Grupo 2). Os achados microbiológicos revelaram para o Grupo (1) uma menor variedade de espécie microbiológica cultivável, se, comparado com os achados para o Grupo (2). Quanto a Unidade Formadora de Colônia (UFC/ml), foi evidente uma diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos sem e com lesão periapical. No Grupo (1), embora com uma menor variedade bacteriana, houve maior número de bactérias, enquanto o Grupo (2) mesmo com uma maior variedade de microrganismos cultiváveis, a quantidade bacteriana foi menor.

Nóbrega *et al.*, 2016a⁴¹ exploraram a diversidade bacteriana em 10 canais radiculares, com abscesso apical agudo. No estudo, foi utilizada análise clonal e as amostras foram submetidas ao isolamento de DNA bacteriano, por amplificação do gene 16S rRNA, clonagem e sequenciamento. O número médio de taxa genômica por canal foi de 15, variando de 11 a 21. Um total de 689 clones foi analisado e 76 filotipos foram identificados. Desses, 47 (61,84%) apresentaram espécies diferentes e 29 (38,15%) incultiváveis ou não caracterizadas. Foi observado um total de 799 fragmentos de rRNA 16S clonados e sequenciados com

mais de quatro caracteres ambíguos ou comprimento do fragmento mais curto que foram descartados. Resultou em 689 sequências apropriadas para a análise filogenética. O número de clones analisado em cada caso variou de 55 a 86. A maioria das espécies e filotipos identificados neste estudo representaram menos de 10% a microbiota total recuperada de cada amostra. No entanto, algumas espécies representaram 30% da microbiota por amostra. *Prevotella spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Filifactor alocis* e *Peptostreptococcus stomatis*, foram as mais detectadas, seguindo-se de: *Dialister invisus*, *Phocaeicola abscessus*. O clone oral não caracterizado *Lachnospiraceae*, *Porphyromonas spp.*, *Parvimonas micra*. Oito filos foram detectados e os táxons mais frequentemente identificados pertenciam aos filos: Firmicutes (43,5%), Bacteroides (22,5%) e Proteobacteria (13,2%). Nenhuma espécie foi detectada em todas as amostras estudadas e algumas espécies foram identificadas em apenas um caso. Destes dados, considera-se que a infecção endodôntica primária aguda, é caracterizada por ampla diversidade bacteriana e alta variabilidade intersubjetiva. As bactérias Gram-negativas anaeróbicas pertencentes ao filo Firmicutes, seguidas por Bacteroides, foram os microrganismos mais prevalentes no estudo.

George *et al.*, 2016⁴² realizaram um estudo objetivando identificar os microrganismos orais mais prevalentes em abscessos endodônticos e identificar possíveis associações bacterianas e relações sinérgicas entre as espécies. Os autores ainda formulam a hipótese que os abscessos obtidos da região demográfica de Portland, Oregon, EUA possa conter microrganismos não identificados em espécimes encontrados em abscessos obtidos no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Como resultado, puderam perceber que os microrganismos mais comuns foram *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Streptococcus Cluster III*, *Solobacterium moorei* e *Streptococcus constellatus* verificaram que as identificações taxonômicas se correlacionaram bem, com exceção de *Treponema* e *Streptococcus cristae*. Levando os autores a concluir que a identificação de espécies bacterianas em abscessos endodônticos, obtidos em locais distintos na América do Norte e do Sul, pode levar à avaliação de novos microrganismos e relações sinérgicas associadas à progressão da doença endodôntica e ao desenvolvimento de abscessos apicais agudos.

Lee *et al.*, 2016⁴³ estudaram em 62 canais únicos (48 incisivos e 14

caninos) com necrose pulpar e periodontite apical com espécies de bactérias. Dessa amostra nove apresentavam traumatismo, mas com coroa intacta; sete apresentavam invaginatus tipo I e cárie, 46 dentes com coroa relativamente intacta e cárie proximal ou secundária. Além disso, oito das amostras apresentavam trajetos sinusais na região da mucosa alveolar próximo ao ápice do dente. Nenhum dos 62 canais apresentava sinais agudos. O crescimento bacteriano foi encontrado em 50 canais, (80,6%) da amostra. Foram isoladas 118 bactérias, sendo 83 (70,3%) anaeróbias e 35 (29,7%) aeróbias, no entanto, apenas 34 espécies bacterianas foram identificadas, 32 dos canais continham duas espécies e 18 continham três espécies de bactérias cultivadas da porção apical do canal radicular. Entre as 34 espécies bacterianas em 50 dentes com bactérias positivas, *Porphyromonas endodontalis* foi encontrado em 10 (20%) dentes; *Bacteroides*, mais precisamente, *Bacteroides caccae* e *Parabacteroides merdae*, além de Firmicutes como *Dialister invisus* e *Eubacterium siraeume* também *Fusobacterium nucleatum* foram encontrados em 9 (18%) dentes; *Treponema denticola* e *Enterococcus faecalis* foram encontrados em 8 (16%) dentes; *Peptostreptococcus spp.* e *Olsenella uli*, foram encontrados 6 (12%) dentes; *Veillonella spp.* Foi encontrado em 5 (10%) dentes, demais espécies em 4 dentes.

Nóbrega *et al.*, 2016b⁴⁴ investigaram a composição bacteriana presente em canais radiculares de dentes associados ao abscesso apical agudo por identificação molecular (16S rRNA) de bactérias cultiváveis. O estudo foi realizado a partir de 20 pacientes de emergência, com necrose pulpar, infecção em canais radiculares e edema em tecido mole. Destes 12 eram de unirradiculares e oito multirradiculares. O estado da polpa foi avaliado através do teste de sensibilidade térmica. Dessa amostra foram isoladas, 220 cepas por cultura e 215 foram identificados pelo sequenciamento de 16S rRNA. Cinco estirpes que não foram identificadas pelo sequenciamento foram submetidas à análise e três de cinco cepas foram clonadas. O estudo permitiu a identificação de 59 diferentes bactérias em 99% dos isolados, 27 bactérias Gram-negativas anaeróbias, 23 Gram-positivas anaeróbias; 8 Gram-positivas facultativas e uma bactéria Gram-negativa facultativa. Com maior frequência para *Prevotella buccae* (10/20), *Pseudoramibacter alactolyticus* (9/20), *Prevotella nigrescens* (8/20), *Parvimonas micra* (7/20), *Dialister invisus* (6/20), *Filifactor alocis* (4/20), *Prevotella tanneriae* (4/20), *Peptostreptococcus*

stomatis (4/20), *Fusobacterium spp.* (3/20). O Número de espécies bacterianas encontradas na raiz variou de dois a 12 com uma média de seis tipos de microrganismos em cada dente. Os autores não demonstraram associação entre achados microbianos e características clínicas.

Delboni *et al.*, 2016⁴⁵ em uma amostra composta por 42 canais num total de 20 pacientes, rastreados e programados para receber retratamento endodôntico não cirúrgico, avaliaram a diversidade e similaridade de isolados de genótipos de *Enterococcus faecalis* de múltiplos locais orais. Foi obtido um total de 126 amostras microbianas categorizadas em: 42 amostras de cada um dos três locais (saliva, câmara pulpar e canal radicular de dentes previamente tratados). A raiz com evidência radiográfica de periodontite apical foi selecionada nos casos de canais múltiplos, para os casos em que todas as raízes apresentaram lesões periapicais, foram escolhidos os canais maiores. Verificou-se isolados de *Enterococcus faecalis* em 10 casos clínicos com envolvimento de oito pacientes. Bioquimicamente foram identificadas 74 cepas: 10 foram isolados da saliva, 17 da câmara pulpar e 47 do canal radicular. Foram observados sete genótipos homogêneos de *Enterococcus faecalis* em diferentes indivíduos e particularmente em colônias múltiplas foram isoladas de cada local da amostra. Logo, dos 10 casos, seis dos sete tipos clonais estavam presentes nos canais infectados. Notadamente, em quatro de oito pacientes, o mesmo tipo clonal de *Enterococcus faecalis*, esteve presente na infecção do canal radicular, sendo também isolado na câmara pulpar, e nas amostras de saliva. Em particular, o tipo clonal foi detectado em todos os 3 locais orais.

Lacerda *et al.*, 2016⁴⁶ por meio de uma revisão sistemática, evidenciaram a relação das infecções endodônticas secundárias e persistentes com o fracasso do tratamento endodôntico. O insucesso endodôntico, caracterizou-se diante a incapacidade de eliminar microrganismos e a indução a microbiota residual com consequente presença de lesões perirradiculares pós-tratamento. Quanto às falhas nos procedimentos endodônticos, ficou evidente a inclusão da falta de habilidade técnica do profissional, condutas inadequadas, existência de lesão perirradicular prévia, limite de obturação do tratamento efetuado, resistência dos microrganismos e localização destes, o que contribui para uma dificuldade no manejo clínico. A infecção secundária ocorre após uma intervenção profissional e se caracteriza com

a presença de uma microbiota diversa, com invasão microbiana entre as consultas. Sua microbiologia apresenta um biofilme uni ou plurimicrobiano, com menor diversidade em relação à infecção primária, assim, por meio de cultura observou-se que infecção secundária pode ser composta por Gram-positivas facultativas, espécies orais e não orais, com prevalência para: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus species*, *Escherichia coli*, *Candida species* e *Enterococcus faecalis*. Mesmo diante de procedimentos de desinfecção e de alterações do microambiente, quando a presença de microrganismos persiste, tem-se a infecção persistente, com etiologia associada tanto aos microrganismos da infecção primária quanto aos da infecção secundária. A microbiologia deste agravo é composta por uma única espécie ou por um número menor de espécies, se comparada à infecção primária. Interessante ressaltar os mecanismos de resistência microbiana, onde as bactérias têm a capacidade de aderir à parede do canal radicular e com processo de multiplicação, aumentam sua densidade e se organizam em biofilme, tornando-se mais resistentes. Quanto à resistência microbiana, os estudos relatam que 90% dos casos ocorrem com prevalência da associação do *Enterococcus faecalis* em casos de infecção persistente ou secundária. O que demonstra que há uma necessidade da realização de medidas preventivas contra uma reinfecção em casos de tratamentos endodônticos.

Vallejo-Labrada *et al.*, 2017⁴⁷ através de um estudo experimental *ex vivo* com 45 pré-molares inferiores unirradiculares de dimensões semelhantes, foi identificado microrganismos comuns relacionadas à doença pulpar. Foi avaliado também, o método de esterilização/desinfecção antes do preenchimento do canal radicular. Foi realizado exame de imagens de Raio-X, mesio-distal e linguo-bucal, para determinar anatomia interna semelhante. Quinze dentes foram distribuídos aleatoriamente, com remoção das coroas e obturação pela técnica de condensação lateral, a remoção foi realizada após 24 horas. A análise microbiológica foi realizada seguindo os critérios: (1) quantificação microbiana em 15 postes moldados; (2) quantificação microbiana de 15 postes vazados previamente desinfetados com álcool 70% por 15 minutos e (3) quantificação microbiana de 15 postes vazados e autoclavados a 121°C x 249 x F x 15 libras de pressão por 15 minutos. Num total de 45 amostras cultivadas e analisadas, os microrganismos identificados foram principalmente: *Staphylococcus sp.*, *Candida sp.*, *Escherichia coli*. Houve avaliação

posterior ao efeito do método de desinfecção e esterilização na microbiota dos postes a partir do qual foi obtido um contingente entre as variáveis: tratamento e crescimento. Com a aplicação do teste de Qui-quadrado obtiveram o valor de 0,018. Esse valor é menor que 0,05 com o qual a hipótese nula é rejeitada e concluiu-se que há diferença na eficiência dos diferentes tratamentos utilizados para o controle do crescimento bacteriano. Bem como se verificou dependência entre o crescimento bacteriano e o tipo de tratamento utilizado para limpeza.

Toral *et al.*, 2017⁴⁸ estudaram a formação de biofilme polimicrobiano em canais radiculares, com intuito de padronizar condições *in vitro* para a formação de biofilme endodôntico. Com 128 pré-molares inferiores extraídos em meio ortodôntico, sem doença periodontal e sem tratamento endodôntico prévio ou restaurações, as coroas dentárias foram removidas e o comprimento da raiz foi padronizado para 16 mm. A técnica corono-apical com um mm abaixo do forame apical para a preparação do canal radicular e irrigação de 3 ml de 5,25% de NaOCl. Posteriormente, os canais radiculares secos foram embebidos em EDTA a 17% por 3 minutos para remoção de detritos da dentina. Cada pré-molar foi autoclavado a 120°C e a raiz foi cortada na extremidade distal. As cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 9212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Candida albicans* ATCC 10231; foram utilizadas em meios seletivos de *Agar Entero-cult* para a confirmação microbiológica de *Enterococcus faecalis*. As colônias foram identificadas por meio de testes bioquímicos como catalase, PYR, NaCl a 6,5%, hemólise em Agar sangue, inulina, manitol e agar de esculina biliar seguido de confirmação semi-automática do sistema Micro Scan. A confirmação da *Candida albicans* foi realizada pela primeira vez por isolamento primário de ágar Sabouraud. A coloração Gram foi utilizada para análise de conídios típicos e blastoconídios. Além do que, foi cultivado em meio *Chromagar Candida* e testes bioquímicos de identificação como urease, para assimilação de carboidratos e filamento a 42°C para *Candida spp.* A proliferação de cada microrganismo ocorreu em caldo de infusão de coração cerebral (BHI) a 37 ° C Por 24h. Os 128 experimentos foram incubados em câmara a 37°C sob duas diferentes atmosferas aerófila e microaerófilos. Destas, oito grupos com oito foram inoculadas da seguinte maneira: 1 *Enterococcus faecalis* (EF), 2 *Staphylococcus aureus* (SA), 3 *Candida albicans* (CA), 4 Controle negativo (NC), 5 (EF+SA) 6 (EF+CA), 7 (SA+CA), 8 (EF+SA+CA), em duplicatas com avaliações após 15, 30, 45

e 60 dias. Foi evidenciada a formação de biofilmes por microscopia eletrônica, nas superfícies após 15 dias: em ambos os meios. Em contraste, nas apicais houve adesão e invasão, porém, ausência da formação de biofilme. O efeito do oxigênio para o desenvolvimento do biofilme sob em atmosfera anaeróbica de superfície ocorreu após 15 dias. No entanto, no nível apical o crescimento bacteriano foi detectado para qualquer uma das amostras analisadas. As bactérias apresentaram um melhor crescimento em biofilme a 10% de CO₂. Observou-se melhor agregação bacteriana na superfície da dentina sem presença de túbulos dentinários na porção coronária. Sob CO₂, a única combinação microbiana com capacidade para crescer no terço apical durante no período de tempo foi *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. Na superfície dentinária foram observados um biofilme mais delineado e estruturalmente bem desenvolvidas ao longo de todo o canal. Contudo, em relação às culturas aerófilas, ficou evidente a presença de alguns túbulos dentinários em porções apicais. Os resultados da microscopia eletrônica de varredura evidenciaram a maturidade do Biofilme, diante os microrganismos banhados por glicocálice e aderidos a uma superfície dura. A matriz formada pela combinação de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* sob uma atmosfera aerófila e incubada por 15 dias demonstraram maior crescimento bacteriano em reação ao biofilme observado no ambiente anaeróbio. A Identificação e detecção de morfotipos microbianos foram realizadas por meio da coloração de Gram e observações microscópicas, as características macroscópicas das colônias e meios de cultura sólidos possibilitou a seleção de colônias para cada um dos microrganismos do experimento. Essas colônias foram identificadas através de Micro sistemas de varredura obtendo uma taxa de concordância de 100% em relação ao microrganismo em cada canalículo radicular. Os resultados revelaram 100% de isolamento puro, além disso, como estabelecido pela coloração de Gram controles negativos não tinham microrganismos.

De acordo com as buscas, verificou-se considerável presença de microrganismos em sistemas de canais, dentre esses os mais frequentes *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Logo, sua ilustração morfológica torna-se relevante para uma melhor compreensão da proposição e dos resultados.

Enterococcus faecalis é um microrganismo com forma arredondada, conformado por cadeias curtas ou dispostos em pares. É classificado como Gram-

positivos resistentes a condições severas inclusive na natureza, o que facilita a sua existência também no solo, na água e nas plantas. No ser humano, em mais de 15 espécies do gênero *Enterococcus*, cerca de 80-90% dos isolados clínicos são de *Enterococcus faecalis*, e geralmente estão associados a infecções comunitárias e hospitalares adquiridas. Crescem a uma temperatura entre 10 a 42°C e em ambientes com amplos valores de pH. ⁴⁹

Candida albicans, é um fungo diploide, com formato de levedura ou pseudohifa (células alongadas e agrupadas), vivem de modo comensal no organismo dos seres humanos, e podem ser encontrados na cavidade bucal, trato gastrointestinal e membranas de outros sítios, com capacidade para sobreviver em regiões densas e profundas. ⁵⁰

Ao estudarem as colônias dos microrganismos *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* De Souza *et al.* 2017 ⁵¹ destacaram uma facilidade de inter-relação entre o *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* nos biofilmes polimicrobianos, e enfatizaram um aumento da tolerância a diferentes antibióticos.

3 PROPOSIÇÃO

Identificar e quantificar *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* em dentes permanentes não sintomáticos com lesão periapical.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Estudo de caráter observacional e transversal foi desenvolvido na clínica de odontologia da Universidade de Cuiabá-MT, no período de março de 2016 a junho do ano de 2017. Sob a apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Cuiabá-MT-0125 CEP/UNIC- protocolo nº 2012-125 (Anexo 1)

A presente pesquisa obteve o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso- FAPEMAT (Edital Universal 003/2014).

4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A busca e seleção da amostra foi estabelecida por conveniência, em que uma vez verificado a necessidade de tratamento endodôntico, os pacientes eram atendidos por uma pesquisadora Doutora, que orientava e esclarecia acerca do estudo e os pacientes assinavam o Consentimento Livre esclarecido dando sua anuência.

Foram avaliados 35 dentes uni e/ou multirradiculares, sendo: 12 incisivos, quatro caninos, 12 pré-molares, sete molares, todos com lesão periapical, seguindo os critérios de elegibilidade.

4.2.1 Critérios de inclusão:

- Ter idade mínima de 18 e máxima de 65 anos de idade;
- Apresentar-se sem patologia de base (diabetes mellitus, imunodeprimidos);
- O paciente deveria apresentar pelo menos um dente permanente com lesão periapical com indicação de tratamento endodôntico;
- As lesões periapicais deveriam possuir entre dois e cinco mm de diâmetro;
- Paciente assintomático;

- As coroas dentárias deveriam apresentar-se restauradas com material permanente ou provisório de maneira satisfatória (sem fraturas e/ou infiltração).

Foram excluídos da busca, os pacientes que apresentavam os seguintes critérios.

4.2.2 Critérios de Exclusão

- Presença de perfurações na coroa, na furca ou nas raízes;
- Presença de lesões endoperiodontais;
- Presença de sintomatologia dolorosa na última semana;
- Ter sido submetido a tratamento com antimicrobianos nos últimos seis meses antes da pesquisa;
- Ter sido submetido à intervenção endodôntica de urgência, há menos de seis meses;
- Dentes com histórico ou presença de fistula no momento da coleta.
- Dentes com cavidades pulpares abertas ao meio bucal ou com pinos intra-radulares.

4.3 EXAME CLÍNICO

Para obter informações iniciais importantes acerca da condição do estado geral pacientes, foi realizado o exame físico com a verificação dos dados vitais. Foi avaliado: a temperatura axilar, a pressão arterial, a verificação do pulso radial periférico, de modo a observar amplitude, ritmo e frequência, e foi estabelecido como padrão: medidas padrões estabeleceu-se T: 37°C; PA: 120x80 mmHg; P: 60-100 ppm.⁵²

Em ato contínuo coletou-se os dados da anamnese (história médica e odontológica pregressa), realizando-se a documentação da radiografia periapical do elemento dental; o teste de vitalidade pulpar com gás refrigerante (Endo-Frost, labSIRO & Osmar Kiyon, São Paulo, SP) e manobras de percussão horizontal e vertical e palpação periapical. Essas manobras indispensáveis para auferir uma condição dolorosa do paciente.

Na percussão investiga-se a coroa dos dentes com leves toques em movimento horizontal e vertical, essa avaliação é suficiente para deflagrar um processo doloroso nessa região. Na palpação, através do tato realiza-se com movimento leve a verificação da presença de dor, da presença de perda da continuidade óssea e de um possível aumento do volume apical.⁵³

Uma vez obedecido os critérios de ausência de dor ou de processo inflamatório nesta etapa, os pacientes selecionados foram encaminhados a prosseguir o atendimento odontológico e a busca do material.

4.4 COLETA DOS MATERIAIS

A coleta do material foi realizada durante o atendimento endodôntico, por única pesquisadora capacitada e experiente. E após a avaliação clínica, os pacientes foram submetidos ao bochecho com clorexidina a 0,12% (Riohex Gard-Rioquímica Blumenau-SC), e a seguir, à anestesia local, isolamento absoluto com dique de borracha e acesso coronário.

A partir dessa etapa, foi realizada a exploração dos canais radiculares com limas tipo k números 06 e 08 (Dentsply Mailefer Ind. E Com Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil), irrigação com água destilada, preparo dos terços cervical e médio com brocas LA AXCESS (SybronEndo®, Orange, CA, EUA), odontometria com lima tipo k número 20 ou 25 (Dentsply Mailefer Ind. E Com Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil), nova irrigação dos canais radiculares com água destilada e inserção de um cone de papel esterilizado (Dentsply Mailefer Ind. E Com. Ltda., Petrópolis, Brasil), número 20 no comprimento da odontometria por um minuto. A coleta foi realizada em duplicata. Para os dentes multirradiculares, a coleta foi realizada apenas nos canais radiculares com lesão periapical.

Após a coleta, cada cone de papel, foi inserido em microtubo do tipo Eppendorf (*Microtubes, MCT-150-C 1,5 mL, Clear microrganismos-POLYMER. BOLI-PROOF, AXYGEN, INC. UNION City USA*), devidamente identificado e acondicionado em temperatura de - 80°C.

4.5 AMOSTRA E ANÁLISE LABORATORIAL

A amostra foi constituída por 35 dentes uni e/ou multirradiculares, sendo: 12 incisivos, quatro caninos, 12 pré-molares, sete molares, todos com lesão Periapical.

4.5.1 Extração e quantificação do DNA

Para a avaliação microbiológica, a extração do DNA genômico foi realizada com auxílio do kit *PureLink™ Genomic DNA Purification Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

As amostras de cada paciente obtidas por meio de cones de papel número 20, foram acondicionadas em tubos eppendorfs. Foi adicionado 1,0 ml de água ultrapura aos minitubos e o material foi homogeneizado em agitador mecânico (Vórtex, QL 901, Biomixer) por 30 segundos e 500 µL da amostra foram centrifugados (3 min x 10.000 rpm, 27°C).

Após a remoção do sobrenadante, foi adicionado 180 µL de Lisozima, sendo realizada ressuspensão no Vórtex por 30 segundos e incubação a 37°C por 30 minutos. A seguir, 20 µL de Proteinase K foram adicionados aos tubos contendo a suspensão de células bacterianas (pellet) e em seguida novamente colocados no Vórtex por 30 segundos. Foi adicionado 200 µL de *PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer* sendo realizada nova homogeneização com o agitador mecânico, por 30 segundos.

Cada minitubo foi incubado à 55°C por 120 min, sendo retirados e recolocados no agitador mecânico por 30 segundos em intervalos de 20 minutos. Após esses procedimentos, foi adicionado 200 µL de etanol (100%) ao lisado e o minitubo foi agitado por 5 segundos até a formação de uma solução homogênea.

Ao término desse processo, todo o lisado (aproximadamente 600 µL) foi transferido para uma coluna (contendo membrana de sílica - "*PureLink™ Spin Column*") acoplado a um tubo de coleção. Esse conjunto foi centrifugado por 1 min x 10.000 rpm, 27°C.

Em seguida, foram realizadas dois enxagues da membrana com 500 µL de *Wash Buffer 1* (10.000 rpm por 1 min) e *Wash Buffer 2* (10.000 rpm por 3 min), o tudo coletor foi desprezado e a coluna foi acondicionada em um novo mini tubo. Finalmente, 30 µL de *PureLink™ Genomic Elution Buffer* foi utilizado na eluição do DNA fixado na membrana de sílica, com posterior centrifugação por 1 min x 10.000 rpm, 27°C. A coluna foi removida e descartada, e o mini tubo foi incubado a -20°C.

As cepas bacterianas foram provenientes da Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, cultivadas no laboratório de microbiologia da Universidade de Cuiabá.

4.5.2 Confeção dos primers, detecção e quantificação microbiana (rt-PCR)

Os primers empregados foram desenhados de acordo com a sequência específica altamente conservada do gene 16S do DNA ribossomal bacteriano de cada microrganismo envolvido e sintetizados pela *Life Technologies* do Brasil LTDA, São Paulo-SP (*Invitrogen Tech-LineSM*). A busca das sequências alvo desejadas, foi realizada por consulta ao NCBI *Nucleotide Search* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O software Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) foi utilizado para a confecção dos primers (Tabela 2).

A identificação e quantificação absoluta das bactérias de *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* Universal *Echerichia coli* nas amostras clínicas foi realizada através da rt-PCR pelo equipamento *StepOne™* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA), utilizando pares de primers específicos por sistema de amplificação com sondas TAQMAN® (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA). Em seguida, os mesmos foram testados, em relação à especificidade, empregando o programa NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A concentração dos primers, bem como, as condições ideais para o processo de amplificação (concentrações dos reagentes/determinação das temperaturas envolvidas) foram previamente estabelecidas para cada conjunto de primers Forward e Reverse incluídos no estudo.

A rt-PCR foi realizada utilizando uma solução de 25 µL contendo 0,5 µL de 200 nmol de cada primer, 0,5 µL de 200 nmol de sonda Taqman, 12,5 µL de

Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) 9 μ L de água estéril e 2 μ L de solução de DNA.

Inicialmente, para a realização da curva padrão, foi utilizado o DNA extraído a partir da bactéria pura, onde foi feita a leitura em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-vis, NanoDrop Technologies, Wilmington, EUA) por meio da avaliação das absorvâncias a 260 nm e da relação entre as absorvâncias a 260/280 nm. Obteve-se uma concentração inicial entre 0,5-0,6 μ g/ μ L de cada DNA bacteriano, em seguida realizou-se 8 diluições seriadas (10¹-10⁸) para confecção da curva padrão. A curva padrão (a qual possuía concentração conhecida) foi utilizada para converter os scores de Ct (Cycle threshold) obtidos com as amostras de fluido em números exatos de concentração de DNA.

Uma vez determinados os limites de quantificação, as amostras clínicas foram processadas juntamente com a curva padrão (controle positivo) respectivas de cada espécie bacteriana, em triplicatas, e os valores médios foram utilizados para o cálculo dos níveis bacterianos. As reações foram realizadas respeitando-se uma eficiência de amplificação para a curva padrão entre 110% a 93% (slope = -3,10 a -3,50) e um coeficiente de correlação (R^2) \geq 0,98%. Para o ensaio da rt-PCR ter alta eficiência, a inclinação da curva padrão (slope) deve ser próxima de -3,30. (60)

O controle negativo foi realizado substituindo o DNA pela mesma quantidade de água estéril, a fim de checar possíveis contaminações.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados microbiológicos foram submetidos a tratamento estatístico específico, utilizando o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 20.

Para responder aos objetivos do estudo foram utilizadas, além de técnicas básicas de análise exploratória como média, mediana, desvio padrão, frequência absoluta e relativa, o teste Qui-quadrado para analisar a relação entre variáveis qualitativa e para comparar os grupos aos pares empregamos a comparação múltipla de Tukey.

Os testes de hipóteses desenvolvidos nesse trabalho consideraram uma significância de 5%, e a hipótese nula foi rejeitada quando p-valor foi menor ou igual a 0,05.

Tabela 1- Descrição dos primers e sondas de DNA dos microrganismos do estudo. (5' - 3')

Microrganismo	Primer/Sonda	Sequência
<i>Escherichia coli</i>		
(ATCC 25922)	F	TGG AGC ATG TGG TTT AAT TCG A
	R	TGC GGG ACT TAA CCC AAC A
	Sonda	VICCACAGACCTGACGACAAGCCATGATTAMRA
<i>Enterococcus faecalis</i>		
(ATCC 29212)	F	ACA AAT TCC AAA CGA ACT TG
	R	CAG TCG TCT ACC TCC ATC ATT
	Sonda	6FAMTGG TTC TCT CCG AAA TAG CTT TAG GGC TATAMRA
<i>Candida albicans</i>		
(ATCC 36801)	F	GGG TTT GCT TGA AAG ACG GTA
	R	TTG AAG ATA TAC GTG GTG GAC GTT A
	Sonda	6FAMACC TAA GCC ATT GCT AAA GCG ATC CCGTAMRA

5 RESULTADOS

Com relação aos pacientes atendidos, 21 deles eram do sexo feminino (60%), 14 eram do sexo masculino (40%). A média de idade foi de $41,37 \pm 16,14$ anos sendo que a maior idade apresentada foi 65 anos e a menor foi 19 anos (Tabela 2); (Quadro 1-Apêndice).

Tabela 2- Caracterização dos pacientes envolvidos no estudo.

		Frequência	Porcentagem
Sexo	Masculino	14	40
	Feminino	21	60
Dentes estudados	Incisivos	12	34,3
	Caninos	4	11,4
	Pré-molares	12	34,3
	Molares	7	20
Idade	Média	Desvio Padrão	
	41,37	16,14	
	Mínima	Máxima	
	19	67	

Com relação aos dentes analisados, 12 eram incisivos, quatro caninos, 13 pré-molares e seis molares (Tabela 2); (Quadro 1- Apêndice).

Tabela 3- Médias e desvios padrão da quantidade de microrganismos detectada pelo qPCR no estudo.

Grupos	Médias	Desvios Padrão
<i>Escherichia coli</i>	75.850,6697	207.704,5263
<i>Enterococcus faecalis</i>	349,3757	1.370,1802
<i>Candida albicans</i>	104,6497	285,0534

Conforme metodologia adotada para o estudo, na identificação dos microrganismos, em relação a cepa universal, observou-se que todas as amostras apresentavam contaminação por *Escherichia coli*, com uma média de $75.850,6697 \pm 207.704,5263$ números de microrganismos (Tabela 3) dado que confirma a viabilidade das espécimes coletados.

Tabela 4- Frequência e porcentagem dos microrganismos envolvidos no estudo.

Bactérias estudadas	Presença nas amostras	Frequência	Porcentagem	Significância (P<0,05)
<i>Escherichia coli</i>	Sim	35	100%	0,000
	Não	0	0	
<i>Enterococcus faecalis</i>	Sim	11	31,4	0,028
	Não	24	68,6	
<i>Candida albicans</i>	Sim	27	77,1	0,001
	Não	8	22,9	

Teste estatístico de Qui-quadrado ($p < 0,05$)

Referente aos microrganismos de escolha, o *Enterococcus faecalis*, em relação a quantificação, esteve presente em onze amostras (31,4%) com um número médio de $349,3757 \pm 1370,1802$ de microrganismos detectados (Tabela 3 e 4).

O microrganismo *Candida albicans*, foi evidenciado na maioria das amostras do estudo, totalizando 27 (77,1%) amostras com contaminação, e um número médio de $104,6497 \pm 285,0534$ (Tabelas 3 e 4).

6 DISCUSSÃO

O estudo ocorreu com pacientes usuários do serviço de odontologia de uma instituição de ensino no município de Cuiabá, e culminou com uma população composta por 60% de pacientes do sexo feminino e com idade média de 41,37 ($\pm 16,14$). Esses dados coincidem com a pesquisa realizada por Saliba *et al.*, 2015⁵⁴ quando em atendimento odontológico em instituição pública, conferem a prevalência para uma população do sexo feminino; e no tocante a idade para os atendimentos do estudo citado, ocorreu na faixa etária de 18 a 29 anos de idade. Sendo verificado no presente trabalho uma busca mais tardia pelo serviço odontológico.

A temática da pesquisa é preocupante, pois desde as evidências de Miller 1894⁵⁵ da presença de microrganismos em espaços dentinários, os estudos da endodontia são constantes, uma vez que mesmo diante dos avanços tecnológicos dessa área, os microrganismos conseguem lograr situações e manterem-se viáveis em pós-tratamento endodôntico.

Salientamos, contudo, que as evidências ocorreram a partir de amostras compostas por pacientes em pós-tratamento endodôntico bem como em pacientes portadores de algum sinal ou sintoma visível ao exame clínico. Esses critérios estabelecidos por grande parte das pesquisas, não conciliam com o presente estudo, tendo como desafio à verificação da presença dos microrganismos em situação de primeiro tratamento o que a diferencia das demais pesquisas.

Em relação ao presente estudo, amparada em um rol de pacientes isentos de comprometimento sistêmico ou doloroso, a amostra foi constituída por 35 dentes restaurados, e por não possuírem qualquer sinal de contato com o meio bucal, foram considerados satisfatórios.

No tocante a identificação e quantificação dos microrganismos, seguindo a proposta da classificação da infecção endodôntica, os estudos de Estrela *et al.* 2014⁵⁶ elucidam que a contaminação no SCR, ocorre devido a práticas complexas, por vezes realizadas sem uma delimitação adequada aos princípios biológicos e mecânicos, bem como medidas que propiciam processos infecciosos e por vezes com sinais clínicos insidiosos. Neste contexto, os estudos realizados por Chueh *et al.*

2003⁵⁷ detectaram que em 70% dos casos analisados por eles em Taiwan, apresentavam restaurações dos condutos radiculares deficientes.

Os autores^{56,57} são incisivos, que se traduz a uma preocupação em relação a condutas preventivas na odontologia, e que pode fortalecer o caminho dos sucessos na endodontia, tão importante quanto o conhecimento da patogênese de doenças periapicais.

Considerando Alves *et al.*, 2015⁵⁸; Siqueira Jr *et al.*, 2012⁵⁹ casos de infecção primária, condição de necrose tecidual com diversidade de espécies, em relação aos microrganismos do estudo *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* não haveriam de estar tão evidentes. Tais microrganismos são característicos de situações de pós-procedimento endodôntico, e didaticamente são característicos dos casos de infecção secundária e persistente. Esta clássica da infecção na endodontia, não condiz com a demanda analisada, pois uma amostra de primeiro tratamento endodôntico, apresentou-se consideravelmente contaminada.

Vejamos as evidências de Zhang *et al.*, 2015⁶⁰ ao elucidarem uma maior prevalência do *Enterococcus faecalis* em infecções persistentes se comparado com situações de periodontites apicais crônicas, o que não condiz com os achados da busca.

Em relação à quantidade do *Enterococcus faecalis*, pode se justificar pela capacidade e facilidade desse microrganismo em competir com outros agentes, no tocante a pesquisa, a *Candida albicans*; e para sua sobrevivência consegue se manter em túbulos dentinários, resistindo inclusive a privação nutricional.⁶¹

Essa versatilidade do *Enterococcus faecalis* também foi verificada nos achados de Kayaoglu e Orstavik, 2004⁶² e Ilke, 2017⁴⁹ quando exemplificaram a penetração em túbulos dentinários desse microrganismo, independente da extensão (profundidade) bem como a boa adaptação em ambientes mais agressivos, no que tange a precariedade de nutrição, oxigênio e pH.

Juntamente com as características morfológicas e fisiológicas desses microrganismos, os estudos de Zoletti *et al.*, 2010⁶³ referem que mesmo em casos de ausência aparente de comprometimento apical, os microrganismos podem ser encontrados. Esta tese desperta a evidência de que não apenas em situações de

insucessos endodônticos podemos inferir à presença de microrganismos, mas em quaisquer outras situações que demandam procedimentos odontológicos. Com isso, deve existir uma previsibilidade de contaminação, independente do grau da complexidade do tratamento, com erradicação de condutas humanas falhas.

As situações de traumatismos com contaminação da dentina também podem favorecer a contaminação do meio pulpar, com conseqüente processo inflamatório e formação de lesão periapical, situação ilustrada por Beltrame *et al.*, 2012⁶⁴. Apesar de uma constituição mais rígida, a dentina não dificulta a formação do biofilme principalmente para o *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, ambos uma vez que possuem fatores de virulência tais como a presença da gelatinase (gelE) para *Enterococcus faecalis* e proteases para *Candida albicans*, propiciam a adesão e a viabilidade necessária para se manterem únicos ou agrupados. Fato que induz a verificação para que os processos de restaurações possam ser um fator determinante da invasão dos agentes no espaço radicular.

No que concerne a correlação da *Candida albicans* com a doença periodontal Yoo *et al.*, 2017⁶⁵ verificaram a utilização de produtos utilizados na região radicular, e que mesmo com algumas substâncias, essa levedura não diminui suas propriedades virulentas nos espaços intracanaís. Adquirem viabilidade para penetrar até cerca de 400 µm de profundidade, e tanto quanto o *Enterococcus faecalis*, invadem espaços com maior dificuldade para sua remoção, neste cenário continuarão sucumbindo os irrigantes utilizados na endodontia. Esses microrganismos podem ser veiculados por materiais e mãos de profissionais e também se alojarem em outros nichos como a porção coronal.

É manifesto, no entanto, que o grau de comprometimento é diretamente relacionado com o estado imunitário do hospedeiro, mas em situações de inatividade, o microrganismo uma vez aderido poderá aguardar situação favorável para se prosperar.

Assim sendo, as evidências deste estudo reforça uma necessidade de tratamentos odontológicos bem planejados, com técnicas e materiais capazes de sanificar o sistema de canais radiculares, mesmo diante de infecções por microrganismos resistentes e patogênicos.

Considerando amostras em primeiro atendimento endodôntico, infere-se que em situações de procedimentos odontológicos com restaurações do elemento dental, há que se pensar em contaminação, voltando o olhar para medidas educativas e preventivas.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo verificou-se a presença dos microrganismos *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* em dentes nunca tratados endodonticamente. Nas amostras, o *Enterococcus faecalis* foi mais expressivo no que tange a quantificação, e em relação à presença o microrganismo *Candida albicans* foi mais contundente.

Diante o exposto, devido à importância dos microrganismos em relação às infecções endodônticas persistentes, estudos dessa natureza tornam-se necessários para busca de condutas preventivas e terapêuticas para supressão dos mesmos.

8 REFERÊNCIAS

1. Blaser MJ. The microbiome revolution. *J Clin Invest.* 2014 Oct; 124(10): 4162-5.
2. Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the human microbiome. *Nutr Rev.* 2012 Aug 1; 70(suppl_1):S38-44.
3. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010 Oct 1; 192(19):5002-17.
4. Siqueira JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001 Jan 1; 34(1):1-0.
5. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Lopes HP. Treatment of endodontic infections. Germany: Quintessence publishing; 2011.
6. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108(10) Suppl 1:4578-85.
7. Singh P. Endo-perio dilemma: a brief review. *Dent Res J.* 2011; 8(1):39-47.
8. Gonçalves MC, Malizia C, Rocha LE. Lesões endodôntico-periodontais: do diagnóstico ao tratamento. *Braz J Periodontol-March.* 2017;27(01):40-45.
9. Anderson AC, Hellwig E, Vespermann R, Wittmer A, Schmid M, Karygianni L, Al-Ahmad A. Comprehensive analysis of secondary dental root canal infections: a combination of culture and culture-independent approaches reveals new insights. *PLoS One.* 2012 Nov; 7(11): e49576.
10. Brito Júnior M, soares JA, LUZ RS. Lesões periapicais crônicas: revisão dos aspectos microbiológicos por diferentes métodos de investigação. *RGO - Rev Gaúcha Odonto.* 2011 Jan; 59:121-5.
11. Persoon IF, Crielaard W, Özok AR. Prevalence and nature of fungi in root canal infections: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* 2017 Nov; 50(11):1055-66.
12. Persoon IF, Buijs MJ, Özok AR, Crielaard W, Krom BP, Zaura E, Brandt BW. The mycobiome of root canal infections is correlated to the bacteriome. *Clin Oral Investig.* 2017 Jun; 21(5):1871-81.
13. Siqueira JF Jr, Antunes HS, Rôças IN, Rachid CT, Alves FR. Microbiome in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-Treatment Apical Periodontitis. *PLoSOne.* 2016 Sep; 30; 11(9):1-14.
14. Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. *J Endod.* 2015 Aug; 41(8): 1207-13.

15. Álvaro-Cárdenas G, Hernández-Solís SE, Rueda-Gordillo F, Aguilar-Orozco N. Identificación molecular de *Fusobacterium nucleatum* en conductos radiculares necróticos de dientes con periodontitis apical crónica. Rev Odontol La noam, 2011;3(1):7-10.
16. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K et al. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 2006 Apr; 27(2-3):95-125.
17. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Present status and future directions in endodontic microbiology. Endod Topics. 2014 May; 30(1): 3-22.
18. Endo MS, Signoretti FGC, Marinho ACS, Martinho FC, Gomes BPF. APCR identification of endodontic pathogens and DNA quantification in samples from teeth with post-treatment apical periodontitis. Clin Lab Res Den 2014 Dec; 20(4):197-208.
19. Al-Nazhan S, Al-Sulaiman A, Al-Rasheed F, Alnajjar F, Al-Abdulwahab B, Al-Badah A. Microorganism penetration in dentinal tubules of instrumented and retreated root canal walls. In vitro SEM study. Restor Dent Endod 2014 Nov; 39(4): 258-64.
20. Natri N, Natri M, Jewtuchowicz V, Mujica M, Lovanniti C, G Ariel et al . Prevalence of *Candida* species in necrotic pulp with chronic periapical processes. Acta odontol. Latino am. 2011 Sep; 24(2):183-7.
21. Farias CG, Vinagre NP de L, Amanajás Tde A, Laurentino R V, Machado LFA, Amoras-Alves ACB. Investigaçã o do vírus *Epstein-Barr* em pacientes com Periodontite Crônica. Rev. odontol UNESP 2013 Mar; 42(2): 124-9.
22. Zambrano de la peña S, Salcedo-Moncada D, Petkova- Gueorguieva M, Ventocilla Huasupoma M. Biofilm en Endodoncia: una revisión. Odontol.Sanmarquina, 2017; 19(2): 45-9.
23. Jhajharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: A review. J Int Soc Prev Community Dent. 2015 Jan; 5(1):1-12.
24. Wingender J, Neu TR, Flemming HC. What are bacterial extracellular polymeric substances? In: Wingender J, Neu TR, Flemming HC, editors. Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function. Springer Verlag: Springer-Verlag; 1999. P. 1-19.
25. Ten Cate JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. Odontology. 2006 Sep; 94(1):1-9.
26. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. J Clin Microbiol. 2005 Nov; 43(11): 5721-32.
27. Peterson SN, Meissner T, Su AI, Snesrud E, Ong AC, Schork NJ, Bretz WA. Functional expression of dental plaque microbiota. Front Cell Infect Microbiol. 2014 Aug; 4:1-13.

28. Gabriliska RA, Rumbaugh KP. Biofilm models of polymicrobial infection. *Future Microbiol.* 2015 Dec; 10(12): 1997-2015.
29. Chiang WC, Pamp SJ, Nilsson M, Givskov M, Tolker-Nielsen T. The metabolically active subpopulation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms survives exposure to membrane-targeting antimicrobials via distinct molecular mechanisms. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012 Jun; 65(2):245-56.
30. Alves FRF. Understanding microbial etiology of endodontic infections *Rev. bioclin. Taubaté*, 2004; 10(2):67-71.
31. Rani A, Chopra A. Isolation and Identification of Root Canal Bacteria from Symptomatic Non vital Teeth with Periapical Pathosis. *Endodontology*, 2006, 18:12-7.
32. Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JA, Estrela CR. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. *J Appl Oral Sci.* 2009 Apr; 17(2):87-91.
33. Dumani A, Yoldas O, Yilmaz S, Koksall F, Kayar B, Akcimen B, Seydaoglu G. Polymerase chain reaction of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in apical periodontitis from Turkish patients. *J Clin Exp Dent.* 2012 Feb; 4(1): 34-9.
34. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with post treatment disease. *J Clin Microbiol.* 2012 May; 50(5):1721-4.
35. Pontani B, Sharaff M, Archana G, Parekh V. Detection of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in previously root-filled teeth in a population of Gujarat with polymerase chain reaction. *Contemp Clin Dent.* 2013 Jan; 4(1):62-6.
36. Kovac J, Kovac D, Slobodnikova L, Kotulova D. *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in the dental root canal and periapical infections. *Bratisl Lek Listy.* 2013; 114(12):716-20.
37. Murad CF, Sassone LM, Faveri M, Hirata R Jr, Figueiredo L, Feres M. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Endod.* 2014 Jul; 40(7):899-906.
38. Tong Z, Huang L, Ling J, Mao X, Ning Y, Deng D. Effects of intracanal irrigant MTAD Combined with nisin at sub-minimum inhibitory concentration levels on *Enterococcus faecalis* growth and the expression of pathogenic genes. *PLoS One.* 2014 Mar; 6; 9(3):1-7.
39. Santi BT, Ribeiro MB, Endo MS, de Almeida GOMES BP. Avaliação da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias facultativas isoladas de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico frente aos antibióticos de uso sistêmico. *Rev. odontol. UNESP. Araraquara.* 2015 Jul; 44(4): 1807-2577.

40. Santos EL, Gazzoni AF, Wagner, C. Análise da microbiota aeróbica endodôntica de dentes com e sem lesão periapical. Rev. Ciênc. Saúde, 2015 Jan; 17(1): 33-9.
41. Nóbrega LM, Montagner F, Ribeiro AC, Mayer MA, Gomes BP. Bacterial diversity of symptomatic primary endodontic infection by clonal analysis. Braz Oral Res. 2016a; 30(1): 1-9.
42. George N, Flamiatos E, Kawasaki K, Kim N, Carrire C Phan B et al. Oral microbiota species in acute apical endodontic abscesses. J Oral Microbiol. 2016 Jan; 8(1):1-9.
43. Lee LW, Lee YL, Hsiao SH, Lin HP. Bacteria in the apical root canals of teeth with apical periodontitis. J Formos Med Assoc. 2016 Jun; 116(16): 448-56.
44. Nóbrega LM, Montagner F, Ribeiro AC, Mayer MA, Gomes BP. Molecular Identification of Cultivable Bacteria From Infected Root Canals Associated With Acute Apical Abscess. Braz Dent J. 2016 Jun b; 27(3):318-24.
45. Delboni MG, Gomes BP, Francisco PA, Teixeira FB, Drake D. Diversity of *Enterococcus faecalis* Genotypes from Multiple Oral Sites Associated with Endodontic Failure Using Repetitive Sequence-based Polymerase Chain Reaction and Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction. J Endod. 2017 Mar; 43(3):377-82.
46. Lacerda MFLS, Coutinho TM, Barrocas D, Rodrigues JT, Vidal F. The relationship between secondary and persistent infections and failure of endodontic treatments. Rev. bras. odontol. 2016 Sep, 73(3), 212-7.
47. Vallejo-Labrada M, Ojeda-Garces JC. Microbiological Study of Cast Posts before Cementation. Int J Dent. 2017 Feb; 2017:1-7.
48. Toral FC, Hernández LD, González CE, Varona FS, Ciodaro, AR, Ortega, HD. Ex vivo model for studying polymicrobial biofilm formation in root canals. Univ.Sci. 2017 Apr; 22(1):31-43.
49. Ike Y. Patogenicidade do Enterococcus. Nihon sakingaku zasshi. *Revista japonesa de bacteriologia*. 2016 Jan; 71 (1): 1-2.
50. Neves PL, Santana DP, Ribeiro ER, Menezes ACS. New approaches on virulence factors of *Candida albicans*. Rev. Ciênc. Méd. Biol. 2013;12(2) 229-233
51. De Sousa MN, De Macedo AT, Dos Santos JRA. Inter-relação entre *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e os tratamentos endodônticos. Rev de Investigação Biomédica, 2017 Nov: 9(1) 49-57.
52. PORTO, CC. Semiologia Médica. 6. ed. Guanabara Koogan. 2009.
53. Lopes HP, Siqueira Jr JF. Endodontia Biologia e Técnica. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.

54. Saliba NA, Lima, AMC, Garbin, CAS, Corrente, JE. User evaluation on dental care in the Unified Health System: an approach from the standpoint of humanization. *Ciênc. Saúde Coletiva*. 2016 Dec, 21(12): 3879-87.
55. Miller W.D. An introduction in the study of the bacteriopathology of the dental pulp. *Dent Cosmos* 1894; 36: 505-528.
56. Estrela C, Holland R, Estrela CRDA, Alencar AHG, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Characterization of successful root canal treatment. *Braz Dent*. 2014 Feb; 25(1):3-11.
57. Chueh IH, Chen SC, Lee CM, Hsu YY, Pai SF, Kuo MI, et al. Technical quality of root canal treatment in Taiwan. *Int Endod J*. 2003 Jun; 36(6):416-22.
58. Santos EL, Gazzoni AF, Wagner C. Análise da microbiota aeróbica endodôntica de dentes com e sem lesão periapical. *Rev. Ciênc. Saúde*. 2015 Jan; 17(1), p. 33-39.
59. Siqueira Jr JF, Rôças IN, Lopes HP, Alves FRF, Oliveira JCM, Armada L et al . Princípios biológicos do tratamento endodôntico de dentes com polpa necrosada e lesão perirradicular. *Rev. Bras. Odontol*. 2012 Jun; 69(1): 8-14.
60. Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared whit Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. *J.Endod*. 2015 Aug; 41(8):1207-13.
61. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod*. 2006 Feb; 32(2):93-8.
62. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Sep; 15(5):308-20.
63. Zoletti GO, Carmo FL, Pereira ME, Rosado AS, Siqueira Jr JF, Santos KRN. Comparison of endodontic bacterial community structures in root canal treated teeth with or without apical periodontitis. *J Medical Microbiol*. 2010 Nov; 59:1360-4.
64. Beltrame AP, Bolan M, Serratine AC, Rocha MJ. Bacterial intensity and localization in primary molars with caries disease. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2012 Jan; 30(1):32-40.
65. Yoo YJ, Kwon I, Oh SR, Perinpanayagam H, Lim SM, Ahn KB et al. Antifungal Effects of Synthetic Human Beta-defensin-3-C15 Peptide on *Candida albicans*-infected Root Dentin. *J Endod*. 2017 Nov; 43(11):1857-61.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário (a), da pesquisa intitulada “**Identificação e quantificação de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* por PCR em tempo real em dentes não sintomáticos com lesão periapical**” conduzida por Lya Carla de Siqueira Campos.

Este estudo tem por objetivo Identificar e quantificar *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* em dentes permanentes não sintomáticos com lesão periapical. Você foi selecionado (a) por critério de inclusão de seleção, levando-se em conta as condições necessárias (lesão periapical) em dente nunca tratado endodonticamente.

Sua participação não é obrigatória e a qualquer momento, você poderá desistir que seus dados sejam utilizados na busca e retirar seu consentimento. Sua recusa, desistência ou retirada do consentimento não acarretará em prejuízo no seguimento do tratamento odontológico pré - estabelecido.

Sua participação é espontânea, não remunerada e não implicará em gasto como participante da mesma.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em participar dos processos de tratamento endodôntico que tem início com os exames clínicos simples, Raio - X.

Os dados obtidos por meio desta pesquisa serão confidenciais e não serão divulgados em nível individual, visando assegurar o sigilo de sua participação.

Os pesquisadores responsáveis se comprometem a tornar públicos nos meios acadêmicos e científicos os resultados obtidos de forma consolidada sem qualquer identificação de indivíduos ou instituições participantes.

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr (a)

_____, portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa das informações constantes neste **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, **DECLARA e FIRMA**

seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** concordando em participar da pesquisa proposta. Fica claro que o participante da pesquisa, pode a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Cap. III, Art. 9º do Código de Ética Odontológica (Res. CFO-118/2012).

Por fim, como pesquisadora responsável pela pesquisa, DECLARO o cumprimento do disposto na Resolução CNS nº 466 de 2012, contidos nos itens IV.3 e IV.4, este último se pertinente, item IV.5.a e na íntegra com a resolução CNS nº 466 de dezembro de 2012.

Por estarmos de acordo com o presente termo o firmamos em duas vias igualmente válidas (uma via para o participante da pesquisa e outra para o pesquisador) que serão rubricadas em todas as suas páginas e assinadas ao seu término, conforme o disposto pela Resolução CNS nº 466 de 2012, itens IV. 3.f e IV. 5.d.

Cuiabá, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante da Pesquisa

Responsável Principal

Identificação do Pesquisador:

Lya Carla de Siqueira Campos -

Rua das Orquídeas, 371.

Cuiabá - MT

Fone: (65) 999719097 e-mails: lyac.scampos@yahoo.com.br

Universidade de Cuiabá (UNIC) - Unidade Beira Rio

Avenida Manoel José de Arruda, 3100, Bloco de Saúde I, sala 328

Jardim Europa – Cuiabá -MT

CEP: 78.065-900

Fone:(65)3363-1271

E-mail:cep.unic@kroton.com.br



UNIVERSIDADE
DE CUIABÁ

Registro: nº 0125 CEP/UNIC – protocolo nº 2012-125

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UNIC

DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa: “**Avaliação Microbiológica de Dentes Tratados ou não Endodonticamente com Presença ou não de Lesão Periapical**” do (a) pesquisador (a) **Tereza Aparecida Delle Vedove Semenoff** foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Cuiabá - UNIC.

Cuiabá-MT, 30 de agosto de 2012.

Profª. Ms. Margarete Lovato
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
UNIC



APÊNDICE

Quadro – 1: Dados dos pacientes envolvidos no estudo e resultados da análise das amostras pelo método qPCR.

Número da Amostra	Identificação do Paciente	Sexo do paciente	Idade do Paciente	Elemento Dental	Quantidade de microrganismos detectada em qPCR		
					<i>Escherichia coli</i> (Universal)	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Candida albicans</i>
1	P1	F	19	46	1.202,80	6,75	0,00
2	P5	M	25	12	4.092,96	0,00	0,00
3	P6	F	38	41	2.256,28	0,00	0,00
4	P7	F	23	36	49.751,94	0,00	43,64
5	P9	F	21	25	958.479,84	0,00	46,97
6	P13	M	22	23	2.624,91	0,00	24,60
7	P15	F	40	44	2.750,70	0,00	23,03
8	P17	F	67	22	6.702,00	0,00	35,36
9	P18	M	56	42	5.805,30	0,00	0,00
10	P19	F	39	14	30.731,06	0,00	32,94
11	P20	F	28	35	37.275,66	1.134,02	422,54
12	P21	F	34	16	6.950,94	0,00	49,47
13	P22	F	20	15	19.841,85	402,21	16,16
14	P23	M	19	24	715.345,55	1.962,43	22,74
15	P24	F	23	12	1.143,88	0,00	0,00
16	P25	M	63	21	22,50	0,00	2,95
17	P28	M	60	43	4.587,52	409,89	19,54
18	P29	M	57	11	5.329,91	0,00	13,60
19	P30	F	33	15	2.277,29	0,00	377,83
20	P31	F	65	16	692,02	0,00	45,14
21	P32	M	22	14	693,72	0,00	34,64
22	P33	F	64	35	1.188,38	0,00	35,16

23	P34	F	59	34	935,59	0,00	61,54
24	P35	M	46	11	546,96	0,00	0,00
25	P36	F	44	26	5.211,06	0,00	30,61
26	P37	M	28	47	76.242,50	7.907,41	0,00
27	P39	F	57	23	11.663,52	7,34	258,56
28	P40	F	50	11	376,40	8,94	11,62
29	P41	M	43	31	408.531,09	16,52	6,32
30	P42	M	58	16	11.788,55	45,47	1.630,33
31	P44	M	33	21	4.814,94	0,00	8,96
32	P45	F	50	44	1.481,06	0,00	0,00
33	P46	M	60	33	242.433,94	0,00	80,46
34	P48	F	52	41	20.152,09	327,17	67,18
35	P50	F	30	25	10.848,73	0,00	260,85