

RESSALVA

Atendendo a solicitação do(a) autor(a), o texto completo desse trabalho será disponibilizado no repositório a partir de 06/03/2025.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

MARIANA MUNIZ TOLEDO ORLANDO

**ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DO PERFIL
MICROBIOLÓGICO DO RETRATAMENTO ENDODÔNTICO EM UMA
SESSÃO VERSUS DUAS SESSÕES**

MARIANA MUNIZ TOLEDO ORLANDO

**ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DO PERFIL MICROBIOLÓGICO DO
RETRATAMENTO ENDODÔNTICO EM UMA SESSÃO VERSUS DUAS SESSÕES**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Endodontia. Linha de pesquisa: Patogenia, imaginologia e terapias em odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2024

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2024]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Orlando, Mariana Muniz Toledo

Análise quantitativa e qualitativa do perfil microbiológico do retratamento endodôntico em uma sessão versus duas sessões / Mariana Muniz Toledo Orlando. - São José dos Campos : [s.n.], 2024.
50 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2024.

Orientador: Márcia Carneiro Valera.

1. Endodontia. 2. Hidróxido de cálcio. 3. Doenças Periapicais . 4. Terapia endodôntica. 5. Microrganismos. I. Valera, Márcia Carneiro, orient. II. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - UNESP. IV. Universidade Estadual Paulista (UNESP). V. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

O presente estudo foi realizado a fim de elucidar o direcionamento quanto à escolha do retratamento em sessão única ou duas sessões, tendo em vista que a literatura apresenta escassos estudos clínicos sobre este tema. Por meio da análise *Checkerboard DNA-DNA hybridization* foi possível traçar os micro-organismos gram-negativos e gram-positivos mais frequentemente encontrados em diferentes etapas do retratamento endodôntico em sessão única e duas sessões.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The present study was carried out in order to clarify the direction regarding the choice of retreatment in a one-visit or two-visit, considering that the literature presents few clinical studies on this topic. Furthermore, through *Checkerboard DNA-DNA hybridization* analysis, it was possible to trace the gram-negative and gram-positive microorganisms most frequently found in different stages of endodontic retreatment in a one-visit and two-visit.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Carneiro Valera(Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Amjad Abu Hasna

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Elaine Faga Iglecias

Universidade Paulista (UNIP)

Campus de Campinas

São José dos Campos, 06 de março de 2024.

DEDICATÓRIA

À **Deus** por sempre me guiar e iluminar meu caminho, me trazendo forças e esperança mesmo nos momentos de maiores incertezas.

Aos meus pais, **Simone** e **Zilmar**, por toda dedicação, carinho e motivação que sempre me deram em meus estudos e na minha carreira profissional. Sem o empenho de vocês, nenhuma conquista haveria sido alcançada.

Ao meu irmão, **Matheus**, que sempre foi minha maior inspiração de coragem, perseverança, determinação e moral. Aquele que sempre me motivou a seguir em frente e buscar os meus sonhos, mesmo quando não acreditava serem possíveis.

.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, **Profa. Dra. Márcia Carneiro Valera**, pela oportunidade e por me orientar no programa de pós-graduação, bem como pelos ensinamentos ao longo do processo, que foram além da Odontologia. Agradeço também a paciência nesta jornada, principalmente frente às dificuldades.

Ao **Prof. Cláudio Antônio Talge Carvalho** pelos conhecimentos compartilhados nas disciplinas do programa de pós-graduação e nas clínicas de Endodontia.

Aos meus amigos de pós-graduação, **Beatriz Kowalski, Gustavo Guerrero, Carolina Gagliardi, Aline de Castro, Camila Gobbi e Giovanna Minhoto**, que me acolheram e me ajudaram nessa jornada. Obrigada pelo auxílio e por sempre me motivarem e acreditarem nos meus sonhos.

À **Maryane Rezende, Livia Iazzetto, Rafael Ward e Vinicius de Carvalho** pela oportunidade de participar um pouco de suas trajetórias na graduação e aprender com vocês durante esse processo.

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

"Se você quer mudar o mundo, comece o dia com uma tarefa completada, ache alguém para ajuda-lo através da vida, respeite todos, saiba que a vida não é justa e você vai fracassar muito. Se você tomar alguns riscos, se levantar quando os tempos estão os mais difíceis, encarar os valentões, levantar os oprimidos, e nunca, jamais desistir, se você fizer essas coisas, a próxima geração e as gerações a seguir viverão em um mundo muito melhor do que o que temos hoje". William H McRaven

RESUMO

Orlando MMT. Análise quantitativa e qualitativa do perfil microbiológico do retratamento endodôntico em uma sessão versus duas sessões [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2024.

O estudo monitorou perfil (Checkerboard DNA-DNA hybridization) microbiano em pacientes com infecção endodôntica secundária (IES) submetidos ao retratamento endodôntico em sessão única e duas sessões. 40 pacientes com necessidade de retratamento endodôntico foram selecionados. Coletas do conteúdo do canal radicular foram realizadas após remoção do material obturador (S1), após preparo biomecânico (PBM) com sistema reciprocante Reciproc® e irrigação com solução de NaOCl 2,5% (S2) e após medicação intracanal (MIC) à base de hidróxido de cálcio e solução salina fisiológica (S3). O conteúdo dos canais radiculares foi avaliado quanto à atividade antimicrobiana por cultura microbiológica (UFC/mL) e perfil microbiano pelo teste de *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. Dados foram analisados estatisticamente através de teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Lilliefors. Micro-organismos anaeróbicos foram encontrados em 100% em sessão única e 95% em duas sessões. Os níveis de UFC/mL diminuíram após o PBM, havendo a manutenção do mesmo após uso de MIC. Os micro-organismos gram-negativos mais frequentemente encontrados foram *Fusobacterium nucleatum ssp* *vicentii*, *Campylobacter rectus*, *Capnocytophaga. gingivalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Leptotrichia buccalis*, sendo os Gram-positivos, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus constellatus* e *Streptococcus mitis*. Em S2, número de espécies variou de 1 a 39 por canal. Em S3, variou de 1 a 27. PBM possibilitou redução significativa na carga microbiana nos grupos sessão única e em duas sessões. MIC não influenciou a carga bacteriana. O perfil microbiano difere em relação à frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano encontrados após a desobturação, preparo biomecânico e medicação com hidróxido de cálcio. Através deste estudo foi possível avaliar micro-organismos gram-negativos e gram-positivos mais frequentemente encontrados em diferentes etapas do retratamento endodôntico em uma ou duas sessões.

Palavras-chave: endodontia; hidróxido de cálcio; doenças periapicais; terapia endodôntica; insucesso endodôntico; microrganismos.

ABSTRACT

Orlando MMT. Quantitative and qualitative analysis of the microbiological profile of endodontic retreatment in One-visit versus Two-visit [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2024.

The study monitored microbial profile (Checkerboard DNA-DNA hybridization) in patients with secondary endodontic infection (IES) submitted to endodontic retreatment in a One-visit and Two-visit. A total of 40 patients in need of endodontic retreatment were selected. Root canal contents were collected after removal of the filling material (S1), after biomechanical preparation (PBM) with the Reciproc® reciprocating system (S2) and after intracanal medication (MIC) based on calcium hydroxide and physiological saline solution (S3). The contents of the root canals were evaluated for antimicrobial activity by microbiological culture (CFU/mL) and microbial profile by the Checkerboard DNA-DNA hybridization test. Data were statistically analyzed by Kolmogorov-Smirnov and Lilliefors normality tests. Anaerobic microorganisms were found in 100% in One-visit and 95% in Two-visit. CFU/mL levels decreased after PBM, maintaining them after the use of MIC. The most frequently found gram-negative microorganisms were Fusobacterium nucleatum ssp. vicentii, Campylobacter rectus, Capnocytophaga. gingivalis, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia and Leptotrichia buccalis, the Gram-positive ones Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Streptococcus constellatus and Streptococcus mitis. In S2, number of species varied from 1 to 39 per channel. In S3, it ranged from 1 to 27. PBM enabled a significant reduction in the One-visit and Two-visit groups. MIC does not influence bacterial load and bacterial composition. The microbial profile differs in relation to the frequency of detection and concentration of bacterial DNA found after coronary opening, PBM and MIC. Through this study it was possible to track the gram-negative and gram-positive microorganisms most frequently found in the different stages of endodontic treatment in the One-visit and Two-visit groups.

Keywords: endodontics; calcium hydroxide; periapical diseases; root canal therapy; endodontic failure; microorganisms.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio
IES	Infecção Endodôntica Secundária
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeos
LTA	Ácido lipoteicóico
S1	Coleta 1
S2	Coleta 2
S3	Coleta 3
TLR	<i>Toll-Like</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TCFC	Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 ARTIGO(S).....	17
2.1 Artigo – Orlando, MMT; Toia, CC; Corazza, BJM; Valera, MC. Análise quantitativa e qualitativa do perfil microbiológico do retratamento endodôntico em uma sessão versus duas sessões/ <i>Quantitative and qualitative analysis of the microbiological profile of endodontic retreatment in One-visit versus Two-visit..</i>	17
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	39
REFERÊNCIAS.....	41
ANEXO.....	47

1 INTRODUÇÃO

As infecções endodônticas são associadas à presença da microbiota comensal oral e se proliferam no sistema de canais radiculares devido a fatores como necrose pulpar, traumatismo dentário, presença de lesões cariosas ou restaurações defeituosas (Kirkevang et al., 2007).

Em relação às infecções endodônticas primárias, estas são polimicrobianas, com presença de micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, havendo predomínio de bactérias anaeróbias (Sundqvist 1992; Gomes et al., 2004; Siqueira Jr., Rocas, 2005; Sakamoto et al., 2007; Machado et al, 2020; Martinho et al, 2023), sendo as mesmas envolvidas com os sintomas clínicos e com a patogênese das infecções periapicais relacionadas à presença de lesão periapical visível radiograficamente (Sundqvist, 1992; Assed et al., 1996). Ao se organizarem em biofilme, estes micro-organismos dificultam a limpeza do sistema de canais radiculares, impactando o sucesso do tratamento endodôntico (Chu et al., 2006; Al-Ahmad et al., 2014).

As bactérias Gram-negativas apresentam na composição de sua parede celular, os lipopolissacarídeos (LPS), endotoxinas que, frente à morte ou multiplicação celular, promovem resposta inflamatória exacerbada (Pitts et al., 1982). Já as bactérias Gram-positivas apresentam, como componente da parede celular, o ácido lipoteicóico (LTA). LTA é responsável pela regularização de enzimas autolíticas da parede bacteriana, sendo liberado principalmente na bacteriólise (Ginsburg, 2002) e apresentando características físico-químicas que favorecem e estimulam a resposta imunológica, apresentando importância para o desenvolvimento da patologia periapical (Costa Junior, Souza-Filho, Barbosa, 2003).

O LPS e o LTA são reconhecidos pelo sistema imunológico do hospedeiro por meio dos receptores de reconhecimento padrão denominados *Toll-like (TLR)* (Akira et al., 2001), promovendo a liberação de mediadores inflamatórios (citocinas) (Aderem and Ulevitch, 2000; Hong et al., 2004; Tang et al., 2011).

A microbiota endodôntica em infecção endodôntica persistente difere da encontrada em infecção endodôntica primária. As espécies mais prevalentes em infecção endodôntica primária são *Enterococcus faecalis*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Dialister invisus*, *Propionibacterium acnes*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. Além disso, presença de sintomatologia ou obturação inadequada do canal radicular apresentam aumento de espécies bacterianas específicas (Pinto et al., 2023).

O tratamento endodôntico tem como objetivo eliminar a maior quantidade de micro-organismos e seus produtos presentes no sistema de canais radiculares, bem como atenuar os efeitos biológicos ocasionados por estes (Sjogren, 1990; Gutmann, 1992; Unal 2011), uma vez que os micro-organismos e seus produtos representam importante papel no estabelecimento da lesão periapical (Kakehashi et al., 1965). Além disso, fatores como a condição do elemento dental, condições de saúde do paciente, sinais e sintomas, presença da lesão periapical, técnicas de instrumentação e obturação empregadas são importantes para determinar o sucesso do tratamento endodôntico (Sjogren et al., 1990).

O resultado favorável do tratamento endodôntico depende da redução da maior quantidade de micro-organismos do sistema de canais radiculares e prevenção de reinfecção (Haapasalo M et al., 2010). Quando o tratamento é realizado adequadamente, o reparo da lesão periapical geralmente ocorre com regeneração do tecido duro, caracterizada pela redução da radiolucidez nas radiografias de acompanhamento (Strindberg, 1956; Grahnén & Hansson, 1961; Seltzer et al., 1963; Storms, 1969; Molven, 1976; Kerekes & Tronstad, 1979; Molven & Halse, 1988; Sjogren et al., 1990; Sjogren et al., 1997; Sundqvist et al., 1998).

Durante o tratamento endodôntico é de suma importância a utilização de substâncias irrigadoras com o intuito de auxiliar na desinfecção do sistema de canais radiculares ao atingir as áreas que não são alcançadas pelos instrumentos endodônticos. Assim, o hipoclorito de sódio (NaOCL) representa o irrigante mais utilizado na prática endodôntica devido as suas propriedades antimicrobianas e

capacidade de dissolução de matéria orgânica (Haapasalo M et al, 2014; Ruksakiet K et al, 2020).

Entretanto, a eliminação destes micro-organismos e seus produtos pode não ocorrer em sua totalidade durante o tratamento endodôntico, podendo permanecer no sistema de canais radiculares, resultando, portanto, em insucesso da terapia endodôntica e necessidade de reintervenção. A causa da persistência desses micro-organismos pode ser devido às falhas nos procedimentos de desinfecção no tratamento prévio (Siqueira, 2002; Gomes et al., 2008) ou devido a recontaminação do sistema de canais radiculares através de restaurações coronárias insatisfatórias ou ausentes após o término do tratamento (Peciulienė et al., 2006).

A falha endodôntica relacionada à presença de micro-organismos só ocorre quando estes são patogênicos, atingem certas contagens e tem acesso aos tecidos perirradiculares para causar ou manter doença periradicular (Molander A et al., 1998; Sundqvist G et al., 1998). Soma-se a estes fatores, a persistência de infecção intrarradicular em canais radiculares não instrumentados e túbulos dentinários, bem como outras áreas que não podem ser alcançadas com instrumentos e técnicas existentes devido à complexidade anatômica do sistema de canais radiculares (Hess, 1921; Sjögren et al., 1990; Lin et al., 1992; Sjögren et al., 1997; Nair et al., 2005).

Estudos apontam que a microbiota presente nos canais com fracasso do tratamento endodôntico difere da encontrada em infecção endodôntica primária, havendo a predominância de espécies anaeróbias facultativas Gram-positivas (Siqueira, 2001; Adib et al., 2004; Gomes et al., 2004; Ferrera et al., 2015; Machado et al., 2020), como *Enterococcus faecalis*, podendo inclusive ocorrer casos de monoinfecção (Hancock et al., 2001; Rôças et al., 2004).

Tal microbiota encontrada em canais com insucesso do tratamento endodôntico deve-se a um processo de seleção que depende da resistência específica de determinados micro-organismos ao preparo biomecânico, da medicação intracanal utilizada durante o tratamento endodôntico e da capacidade de sobrevivência destes micro-organismos em um meio nutricional restrito, no qual as relações entre bactérias são mínimas (Sundqvist et al., 1998).

Considerando o fato que a maioria dos casos de insucesso do tratamento endodôntico resulta da proliferação bacteriana no sistema de canais radiculares, o retratamento endodôntico consiste na remoção do material obturador, reinstrumentação e desinfecção do sistema de canais radiculares, obedecendo aos princípios biológicos e técnicos da terapia endodôntica (Hepworth, Friedman, 1997); seguido de uma nova obturação dos canais radiculares, com o objetivo de superar as falhas do tratamento anterior, permitindo, assim, a ocorrência da reparação tecidual (Lopes et al., 1999).

Durante o tratamento endodôntico em múltiplas sessões, a utilização de medicação intracanal (MIC) entre as consultas objetiva a redução bacteriana e modulação da inflamação periapical (Barbosa et al., 2018), sendo o hidróxido de cálcio $[Ca(OH)_2]$ amplamente utilizado como medicação intracanal devido a ação antibacteriana e capacidade de inibir citocinas do tipo Th1, atuando, portanto, ativamente no processo inflamatório (Mohammadi and Dummer, 2011; Martinho et al., 2015).

Com o objetivo de facilitar os procedimentos clínicos, houve uma crescente busca por materiais e técnicas que impliquem em menor custo ao profissional e menor tempo clínico. Assim, o uso de localizadores apicais (Parekh, Taluja, 2011), sistemas rotatórios e reciprocantes de níquel titânio (Cheung, Liu, 2009), bem como a irrigação com ultrassom e o uso de tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) são instrumentos utilizados na terapia endodôntica que, além de auxiliarem no sucesso do tratamento, tornam-o mais rápido (Wong et al., 2014). Com isso, a realização do tratamento endodôntico em sessão única, na qual consiste na neutralização do conteúdo tóxico, preparo biomecânico e obturação em uma mesma sessão (Peters et al., 2002) foi bastante difundido nos casos de infecção endodôntica primária (Ferrera et al, 2015). Entretanto, o tratamento endodôntico em sessão única não representa consenso atualmente entre os profissionais, sendo questionado também para os casos de retratamento endodôntico.

Para aprimorar estratégias utilizadas no retratamento e comparar efetividade de retratamento endodôntico em sessão única e duas sessões, torna-se necessário compreender o perfil microbiológico presente nas infecções endodônticas

secundárias. Até o presente momento há escassos trabalhos na literatura com análise do perfil microbiano no retratamento endodôntico, sendo que, destes estudos publicados, nenhum autor realiza comparação entre o perfil microbiano encontrado em sessão única e duas sessões.

Desta forma, este estudo clínico teve como objetivo monitorar perfil (Checkerboard DNA-DNA hybridization) microbiano em dentes com infecção endodôntica secundária (IES) submetidos ao retratamento endodôntico em sessão única e duas sessões.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Considerando que até o presente momento há escassos trabalhos na literatura relacionados à análise do perfil microbiano no retratamento endodôntico e que, destes estudos publicados, nenhum autor realiza comparação entre o perfil microbiano encontrado em sessão única e duas sessões, o presente estudo objetivou monitorar o perfil microbiano através do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* em pacientes com infecção endodôntica secundária e necessidade de retratamento endodôntico.

Os participantes da pesquisa foram submetidos ao retratamento endodôntico em sessão única ou duas sessões e coletas do conteúdo do canal radicular após remoção do material obturador (S1), após instrumentação com sistema recíprocante Reciproc® (S2) e irrigação com solução de NaOCl 2,5% e, após medicação intracanal (MIC) à base de hidróxido de cálcio e solução salina fisiológica (S3). A partir destas coletas, foram realizadas análises quanto à atividade antimicrobiana por cultura microbiológica (UFC/mL) e perfil microbiano pelo teste de *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

Micro-organismos foram encontrados em 100% no grupo retratamento em sessão única e em 95% dos casos no grupo retratamento em duas sessões. Após preparo biomecânico foi possível observar redução de micro-organismos em ambos os grupos. Porém, no grupo retratamento em duas sessões, houve aumento dos níveis de UFC/mL após medicação intracanal.

O aumento dos níveis de UFC/ mL após medicação intracanal pode ocorrer devido a presença de micro-organismos após preparo biomecânico, tendo em vista que os instrumentos endodônticos e substâncias irrigadoras auxiliares empregados na terapia endodôntica não conseguem erradicar os micro-organismos e seus subprodutos presentes no sistema de canais radiculares. Assim, bactérias remanescentes após preparo biomecânico podem se proliferar nos túbulos dentinários e migrarem para lúmen do canal radicular.

Além disso, embora o hidróxido de cálcio apresente propriedade antimicrobiana e alto pH, na qual impede sobrevivência de grande quantidade de micro-organismos, bactérias resistentes ao pH do hidróxido de cálcio podem apresentar crescimento favorecido neste meio, havendo, portanto, aumento dos níveis de UFC/mL.

Ao realizar a coleta do conteúdo do canal radicular foi possível observar que os micro-organismos gram-negativos mais frequentemente encontrados foram o *F. nucleatum ssp. vicentii*, *C. rectus*, *C. gingivalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *L. buccalis*. Os micro-organismos gram-positivos mais encontrados foram *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. constellatus* e *S. mitis*.

Através da análise do Checkerboard, nota-se que número de espécies bacterianas após desobturação dos canais radiculares e após preparo biomecânico variou entre 1 a 39 espécies por canal. Entretanto, após medicação intracanal, houve uma diminuição do número de espécies bacterianas, variando de 1 a 27 espécies.

Nota-se que o preparo biomecânico possibilitou redução significativa na carga microbiana em ambos os grupos analisados e que a medicação intracanal não impactou significativamente a carga microbiana, porém foi possível observar redução na quantidade de espécies bacterianas presentes no sistema de canais radiculares.

Assim, através deste estudo clínico foi possível traçar os micro-organismos gram-negativos e gram-positivos mais frequentemente encontrados em diferentes etapas do tratamento endodôntico quando realizado em sessão única e duas sessões.

REFERÊNCIAS

- Aderem A, Ulevitch R. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000;406(6797):782–7. doi: 10.1038/35021228. PMID: 10963608.
- Adib V, Spratt D, Ng YL, Gulabivala K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *Int Endod J*. 2004 Aug;37(8):542-51.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001. doi: 10.1038/90609.
- Al-Ahmad A, Ameen H, Pelz K, Karygianni L, Wittmer A, Anderson AC, et al. Antibiotic resistance and capacity for biofilm formation of different bacteria isolated from endodontic infections associated with root-filled teeth. *J Endod* 2014;40:223-230.
- Arias A, Perez-Higueras JJ, de la Macorra JC. Differences in cyclic fatigue resistance at apical and coronal levels of Reciproc and WaveOne new files. *J Endod*. 2012 Sep;38(9):1244-8. doi: 10.1016/j.joen.2012.05.022. Epub 2012 Jul 20. PMID: 22892743.
- Assed S, Ito IY, Leonardo MR, Silva LA, Lopatin DE. Anaerobic Microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. *Endod Dent Traumatol*. 1996 Apr;12(2):66-9.
- Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of Lipoteichoic Acid Contents and Cultivable Bacteria at the Different Phases of the Endodontic Retreatment. *J Endod*. 2016 Apr;42(4):552-6. doi: 10.1016/j.joen.2016.01.002. PMID: 27000273.
- Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, de-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medication on infectious/inflammatory contents in teeth with post-treatment apical periodontitis. *Clin Oral Investig*. 2019 Jun;23(6):2759-2766. doi: 10.1007/s00784-018-2719-0. Epub 2018 Oct 26. PMID: 30367257.
- Cheung GS, Liu CS. A retrospective study of endodontic treatment outcome between nickel-titanium rotary and stainless steel hand filing techniques. *J Endod*. 2009 Jul;35(7):938-43.
- Chu F, Kearns DB, Branda SS, Kolter R, Losick R. Targets of the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. 2006 Feb;59(4):1216-28.

Costa ED, de Souza-Filho FJ, Barbosa SV. Tissue reactions to a component of root canal system bacteria: lipoteichoic acid. *Braz Dent J*. 2003;14(2):95-8. PubMed PMID: 12964651.

Endo MS, Ferraz CCR, Zaia AA, Almeida JFA, Gomes BPFA. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. *Eur J Dent*. 2013 Jul;7(3):302-309. doi: 10.4103/1305-7456.115414. PMID: 24926210; PMCID: PMC4053619.

de Figueiredo FED, Lima LF, Oliveira LS, Ribeiro MA, Correa MB, Brito-Junior M, Faria-E-Silva AL. Effectiveness of a reciprocating single file, single cone endodontic treatment approach: a randomized controlled pragmatic clinical trial. *Clin Oral Investig*. 2020 Jul;24(7):2247-2257. doi: 10.1007/s00784-019-03077-7. Epub 2019 Oct 24. PMID: 31650315.

Ferreira NS, Martinho FC, Cardoso FG, Nascimento GG, Carvalho CA, Valera MC. Microbiological profile resistant to different intracanal medications in primary endodontic infections. *J Endod*. 2015 Jun;41(6):824-30. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.031. Epub 2015 Apr 17. PMID: 25892513.

Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infect Dis* 2002;2:171–9.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004;19(2):71–6. doi: 10.1046/j.0902-0055.2003.00116.x. PMID: 12205886.

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

Grahnén H, Hansson L. The prognosis of pulp and root canal therapy: a clinical and radiographic follow-up examination. *Odontologisk Revy*. 1961

Gutmann JL. Clinical, radiographic, and histologic perspectives on success and failure in endodontics. *Dent ClinNorthAm*.1992;36(2):379–92.

Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in Endodontics. *Dent Clin North Am*. 2010;54(2):291–312. doi: 10.1016/j.cden.2009.12.001. PMID: 20433979.

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

Heling I, Steinberg D, Kenig S, Gavrilovich I, Sela MN, Friedman M. Efficacy of a sustained-release device containing chlorhexidine and Ca(OH)₂ in preventing secondary infection of dentinal tubules. *Int Endod J*. 1992 Jan;25(1):20-4. doi: 10.1111/j.1365-2591.1992.tb00944.x. PMID: 1399050.

Hepworth MJ, Friedman S. Treatment outcome of surgical and nonsurgical management of endodontic failures. *J Can Dent Assoc.* 1997 May;63(5):364-71.

Hess W. Formation of root canal in human teeth. *The Journal of the National Dental Association.* 1921. doi: <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1921.0179>

Hong C-Y, Lin S-K, Kok S-H, Cheng S-J, Lee M-S, Wang T-M, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med.* 2004;33(3):162–9. doi: 10.1111/j.0904-2512.2004.00045.x. PMID: 15128058.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulps in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965 Sep;20:340-9.

Kerekes K, Tronstad L. Long-term results of endodontic treatment performed with a standardized technique. *J Endod.* 1979 Mar;5(3):83-90. doi: 10.1016/S0099-2399(79)80154-5. PMID: 296248.

Kirkevang LL, Vaeth M, Hörsted-Bindslev P, Bahrami G, Wenzel A. Risk factors for developing apical periodontitis in a general population. *Int Endod J.* 2007 Apr;40(4):290-9.

Kvist T, Reit C. Results of endodontic retreatment: a randomized clinical study comparing surgical and nonsurgical procedures. *J Endod.* 1999 Dec;25(12):814-7. doi: 10.1016/S0099-2399(99)80304-5. PMID: 10726528.

Lin LM, Skribner JE, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. *J Endod.* 1992 Dec;18(12):625-7. doi: 10.1016/S0099-2399(06)81335-X. PMID: 1298804.

Lopes HP, Siqueira Jr JF, Elias CN. Retratamento Endodôntico. In: Siqueira Jr JF, Lopes HP, editors. *Endodontia Biologia e Técnica.* Rio de Janeiro: Medsi; 1999. p. 497-538.

Machado ME, Nabeshima CK, Leonardo MF, Reis FA, Britto ML, Cai S. Influence of reciprocating single-file and rotary instrumentation on bacterial reduction on infected root canals. *Int Endod J.* 2013 Nov;46(11):1083-7. doi: 10.1111/iej.12108. Epub 2013 Apr 8. PMID: 23566213.

Machado FP, Khoury RD, Toia CC, Flores Orozco EI, de Oliveira FE, de Oliveira LD, da Rosa Cardoso FG, Valera MC. Primary versus post-treatment apical periodontitis: microbial composition, lipopolysaccharides and lipoteichoic acid levels, signs and symptoms. *Clin Oral Investig.* 2020 Sep;24(9):3169-3179. doi: 10.1007/s00784-019-03191-6. Epub 2020 Jan 13. PMID: 31933111.

Martinho FC, Nascimento GG, Leite FRM, Gomes APM, Freitas LF, Camões ICG. Clinical influence of different intracanal medications on th1-type and th2-type cytokine

responses in apical periodontitis. *J Endod*. 2015;41(2):169–75. doi: 10.1016/j.joen.2014.09.028. PMID: 25453567.

Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*. 2011;44(8):697–730. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01886.x. PMID: 21535021.

Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1998 Jan;31(1):1-7. PMID: 9823122.

Molven O. The frequency, technical standard and results of endodontic therapy. *Nor Tannlaegeforen Tid*. 1976 Apr;86(4-1):142-7. PMID: 1063373.

Molven O, Halse A. Success rates for gutta-percha and Kloroperka N-0 root fillings made by undergraduate students: radiographic findings after 10-17 years. *Int Endod J*. 1988 Jul;21(4):243-50. doi: 10.1111/j.1365-2591.1988.tb01006.x. PMID: 3251848.

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. doi: 10.1016/j.joen.2014.02.010. Epub 2014 Apr 8. PMID: 24935532.

Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 Feb;99(2):231-52. doi: 10.1016/j.tripleo.2004.10.005. PMID: 15660098.

Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol*. 1990 Aug;6(4):142-9. doi: 10.1111/j.1600-9657.1990.tb00409.x. PMID: 2133305.

Parekh V, Taluja C. Comparative study of periapical radiographic techniques with apex locator for endodontic working length estimation: an ex vivo study. *J Contemp Dent Pract*. 2011 Mar 1;12(2):131-4.

Peciuliene V, Rimkuvienė J, Maneliene R, Ivanauskaite D. Apical periodontitis in root filled teeth associated with the quality of root fillings. *Stomatologija*. 2006;8(4):122-6.

Peters LB, Wesselink PR. Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms. *Int Endod J*. 2002 Aug;35(8):660-7.

Pinto KP, Barbosa AFA, Silva EJNL, Santos APP, Sassone LM. What Is the Microbial Profile in Persistent Endodontic Infections? A Scoping Review. *J Endod*. 2023 Jul;49(7):786-798.e7. doi: 10.1016/j.joen.2023.05.010. Epub 2023 May 19. PMID: 37211309.

Pitts D, Williams B, Morton T. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. *J Endod*. 1982;8(1):10–8. doi: 10.1016/S0099-2399(82)80310-5. PMID: 6948902.

Ruksakiet K, Hanák L, Farkas N, Hegyi P, Sadaeng W, Czumbel LM, Sang-Ngoen T, Garami A, Mikó A, Varga G, Lohinai Z. Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite in Root Canal Disinfection: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *J Endod*. 2020 Aug;46(8):1032-1041.e7. doi: 10.1016/j.joen.2020.05.002. Epub 2020 May 12. PMID: 32413440.

Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod*. 2004 May;30(5):315-20. PubMed PMID: 15107642.

Sakamoto M, Siqueira JF Jr., Rocas IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Feb;22(1):19-23.

Seltzer S, Bender IB, Turkenkopf S. Factors affecting successful repair after root canal therapy. *Journal of the American Dental Association*. 1963. Nov;67:651-62. doi: 10.14219/jada.archive.1963.0349. PMID: 14054365.

Shuping GB, Ørstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod* 2000;26:751-5.

Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*. 1999 Sep;32(5):361-9. doi: 10.1046/j.1365-2591.1999.00275.x. PMID: 10551109.

Siqueira JF, Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J*. 2001 Jan;34(1):1-10.

Siqueira JF, Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002 Sep;94(3):281-93.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota. *J Endod*. 2005b Jul;31(7):488-98.

Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod*. 1990 Oct;16(10):498-504.

Sjögren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991;24:119-25.

Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1997 Sep;30(5):297-306. doi: 10.1046/j.1365-2591.1997.00092.x. Erratum

in: *Int Endod J* 1998 Mar;31(2):148. PMID: 9477818.

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C et al (2004) Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol* 19:352–362. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.2004.00168.x>

Storms JL. Factors that influence the success of endodontic treatment. *J Can Dent Assoc (Tor)*. 1969 Feb;35(2):83-97. PMID: 5250490.

Strindberg LZ. The dependence of the results of pulp therapy on certain factors. An analytic study based on radiographic and clinical follow-up examinations. *Acta Odontologica Scandinavica*. 1956.

Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod*. 1992 Sep;18(9):427-30.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998 Jan;85(1):86-93. PubMedPMID: 9474621.

Tang Y, Sun F, Li X, Zhou Y, Yin S, Zhou X. Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharides induce RANKL by mouse osteoblast in a way different from that of Escherichia coli lipopolysaccharide *J Endod*. 2011 Dec;37(12):1653-8. doi: 10.1016/j.joen.2011.08.015.

Unal CG, Kececi AD, Kaya BU, Tac AG. Quality of Root Canal Fillings Performed by Undergraduate Dental Students. *Eur J Dent*. 2011 Jul; 5(3): 324–30.

Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Orstavik D. Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *J Endod* 2005;31:863- 6.

Wong AW, Tsang CS, Zhang S, Li KY, Zhang C, Chu CH. Treatment outcomes of single-visit versus multiple-visit non-surgical endodontic therapy: a randomised clinical trial. *BMC Oral Health*. 2015 Dec 19;15:162. doi: 10.1186/s12903-015-0148-x.