

**ROBERTO XAVIER ROMERO CAZARES**

**Efeito da ativação ultrassônica da pasta de hidróxido de cálcio na atividade  
metabólica de bactérias em canais radiculares:  
Estudo clínico randomizado**

São Paulo  
2018



**ROBERTO XAVIER ROMERO CAZARES**

**Efeito da ativação ultrassônica da pasta de hidróxido de cálcio na atividade  
metabólica de bactérias em canais radiculares:  
Estudo clínico randomizado**

**Versão Corregida**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Dentística) para obter o título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Endodontia  
Orientador: Profa. Dra. Ericka Tavares Pinheiro

São Paulo  
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação  
Serviço de Documentação Odontológica  
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Romero Cazares, Roberto Xavier.

Efeito da avaliação ultrassônica da pasta de hidróxido de cálcio na atividade metabólica de bactérias em canais radiculares: estudo clínico randomizado / Roberto Xavier Romero Cazares ; orientador Ericka Tavares Pinheiro. -- São Paulo, 2018.

95 p. : tab., fig. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Endodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Periodontite periapical. 2. Infecções bacterianas. 3. Tratamento endodôntico. 4. Hidróxido de cálcio. 5. Ativação ultrassônica passiva. I. Pinheiro, Ericka Tavares. II. Título.



Romero Cazares RX. Efeito da ativação ultrassônica da pasta de hidróxido de cálcio na atividade metabólica de bactérias em canais radiculares: estudo clínico randomizado. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 13 / 12 / 2018

### **Banca Examinadora**

Profa. Dra. Marcia Martins Marques

Instituição: FO-USP

Julgamento: Aprovado

Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

Instituição: FOB-USP

Julgamento: Aprovado

Profa. Dra. Elaine Faga Iglecias

Instituição: UNIP

Julgamento: Aprovado



Dedico este trabalho ao Rei tudo poderoso que me colocou  
neste caminho, graças a ele e a sua sabedoria infinita.

A minha amada Mishel, Sebastián e Luciana, muito obrigado pelo tempo,  
paciência, carinho e amor, são o melhor da minha vida. Amo vocês.

A meus pais por me ensinar que nunca o caminho na vida é fácil,  
mas tem sempre que se levantar e seguir lutando.

Aos meus irmãos que sempre me apoiaram e estiveram  
presente em cada passo.



## AGRADECIMENTOS

À **Professora Doutora Ericka Tavares Pinheiro** você é um excelente exemplo de pessoa e professora, que soube inspirar-me na realização do presente e futuros trabalhos, admiro muito sua dedicação e paciência, agradeço por compartilhar-me todos os seus conhecimentos e pelos ensinamentos para a vida, um agradecimento do fundo do coração. Muito Obrigado!

À **Professora Doutora Marcia Marques** que com esforço, trabalho e dedicação soube deixar nos corações dos equatorianos que participaram no Dinter, uma gratidão enorme deixando ânsias de conquistas maiores.

Aos professores do departamento de Dentística que participaram do Dinter **Prof. Dr. Giulio Gavini, Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira, Prof. Dr. Manoel Eduardo Lima Machado, Prof. Dr. Marcelo dos Santos, Profa. Dra. Mary Caroline Skelton Macedo, Profa. Dra. Carla Renata Sipert** obrigado pela amizade e conhecimento compartilhado.

Aos meus colegas **Alexandre Pinheiro Lima Carvalho, Carlos Nogales, Luiza Paz, Laura Nardello, Lais Prado, Fernanda Fernandes, Fernanda Bruno, Renata Bommarito e Bárbara Guedes** que foram fundamentais no desenvolvimento desta pesquisa, (grandes triagens, coleta de amostras, avaliação da dor, preservação e laboratório) sem duvida alguma cada procedimento foi realizado com sucesso por cada um de vocês.

As boas amizades que ficam no Brasil, **Lau, Lu, Alê, Carlos, Eduardo, Thais** agradeço por tê-los conhecido, esses bons momentos e risos que ficaram sempre nas lembranças de este tempo maravilhoso. Tenham presente que no Equador vocês sempre se sentiram na sua casa.

Agradeço aos colegas de Equador que foram parte do Dinter, em especial ao **Klever, Frank, Kathy, Fabricio, Marcelo e Inês** obrigado pelo convívio e apoio, e pela amizade de **Blanca, Pablo, Edu e Eduardo**.

Agradeço à **Universidad Central del Ecuador e Universidade de São Paulo** pela oportunidade e por fazer possível nosso crescimento na pesquisa e conhecimento.

Aos todos os funcionários da Clínica de pós-graduação, Departamento de Dentística e secretaria de Pós-graduação pelo apoio e colaboração.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton



## RESUMO

Romero Cazares RX. Efeito da ativação ultrassônica da pasta de hidróxido de cálcio na atividade metabólica de bactérias em canais radiculares: Estudo clínico randomizado. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corregida.

Protocolos complementares de desinfecção estão sendo investigados com o objetivo de promover uma maior redução de bactérias viáveis após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares. Este estudo clínico randomizado comparou o efeito da ativação ultrassônica da pasta de hidróxido de cálcio com o da pasta não ativada na redução da atividade metabólica de bactérias nos canais radiculares. Vinte pacientes com necrose pulpar e periodontite apical assintomática foram alocados de forma randomizada em dois grupos de acordo com o protocolo de medicação intracanal: Grupo UA - ativação ultrassônica da pasta de hidróxido de cálcio (n=10) e Grupo NA - não ativação da pasta (n=10). Amostras microbiológicas dos canais radiculares foram coletadas após os procedimentos de: cirurgia de acesso (S1), preparo químico-cirúrgico (S2), irrigação ultrassônica passiva (PUI) (S3) e medicação intracanal entre sessões com pasta de hidróxido de cálcio, com ou sem ativação ultrassônica (S4). As amostras endodônticas foram submetidas à extração de DNA e RNA. O RNA foi submetido à reação de transcrição reversa para confecção de DNA complementar (cDNA). O efeito dos procedimentos endodônticos na redução bacteriana foi determinado por qPCR baseada em rDNA, utilizando iniciadores universais para a região 16S *rRNA* do domínio *Bacteria*. A atividade metabólica das bactérias foi calculada pela razão rRNA/rDNA baseados nos dados dos ensaios de qPCR. Bactérias foram consideradas metabolicamente ativas quando a razão era maior ou igual a 1. A análise intragrupo foi realizada pelos testes de Wilcoxon e Q de Cochran; enquanto a análise entre os grupos foi realizada pelos testes de Mann-Whitney e Exato de Fisher ( $P < 0,05$ ). As amostras S1 apresentaram uma mediana de  $2,38 \times 10^6$  e  $1,60 \times 10^5$  cópias de rDNA nos grupos UA e NA, respectivamente. Após o preparo químico-cirúrgico houve uma redução significativa de rDNA bacteriano nos dois grupos (UA:  $2,14 \times 10^3$ ; NA:  $7,48 \times 10^3$ ;  $P < 0,01$  para ambos). Porém, 80% e 90% dos casos permaneceram com bactérias metabolicamente ativas após o preparo

químico-cirúrgico nos grupos UA e NA, respectivamente. A PUI contribuiu para a redução do número de canais com bactérias ativas nos dois grupos (UA: 60%; NA: 50%). No grupo UA, esse número caiu para 30% após o protocolo da medicação intracanal com ativação ultrassônica, com uma diferença significativa entre S1 e S4 ( $P < 0,05$ ). Por outro lado, no grupo NA, 60% dos canais continham bactérias metabolicamente ativas. A análise entre os grupos revelou uma diferença significativa entre os protocolos de medicação intracanal quanto ao metabolismo bacteriano em S4 ( $P < 0,05$ ). Concluiu-se que a ativação ultrassônica da pasta de hidróxido de cálcio foi mais efetiva do que a pasta não ativada em reduzir o metabolismo bacteriano.

Palavras-chave: Periodontite apical. Infecção bacteriana. Tratamento endodôntico. Ativação Ultrassônica Passiva. Hidróxido de cálcio. PCR quantitativo.

## ABSTRACT

Romero Cazares RX. Effect of the ultrasonic activation of calcium hydroxide paste on the metabolic activity of bacteria in root canals: A randomized clinical trial. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Corrected Version.

Complementary disinfection protocols have been investigated with the objective of promoting a greater reduction of viable bacteria after the chemical-surgical preparation of the root canals. This randomized clinical study compared the effect of the ultrasonic activation of the calcium hydroxide paste with an nonactivated paste in reducing the metabolic activity of bacteria in the root canals. Twenty patients with pulp necrosis and asymptomatic apical periodontitis were randomized into two groups according to the intracanal medication protocol: UA group - ultrasonic activation of calcium hydroxide paste (n = 10) and NA group - no activated paste (n = 10). Microbiological samples of the root canals were collected following the procedures of: access (S1), chemical-surgical preparation (S2), passive ultrasonic irrigation (PUI) (S3) and intracanal medication with calcium hydroxide paste, with or without activation (S4). The endodontic samples were submitted to DNA and RNA extraction. RNA was subjected to the reverse transcription reaction to make complementary DNA (cDNA). The effect of endodontic procedures on bacterial reduction was determined by rDNA-based qPCR using universal primers for the 16S *rRNA* region of the *Bacteria* domain. The metabolic activity of the bacteria was calculated by the rRNA/rDNA ratio based on qPCR assay data. Bacteria were considered to be metabolically active when the ratio was positive (greater than or equal to 1). Intragroup analysis was performed by the Wilcoxon and Cochran's Q testes; while the analysis between the groups was performed by the Mann-Whitney test and Fisher's exact test ( $P < 0.05$ ). Samples S1 presented a median of  $2.38 \times 10^6$  and  $1.60 \times 10^5$  copies of rDNA in the UA and NA groups, respectively. After the chemical-surgical preparation, there was a significant reduction of bacterial rDNA in both groups (UA:  $2.14 \times 10^3$ , NA:  $7.48 \times 10^3$ ,  $P < 0.01$  for both). However, 80% and 90% of the cases remained with metabolically active bacteria after the chemical-surgical preparation in the UA and NA groups, respectively. PUI contributed to the reduction of the number of canals with active bacteria in both groups (UA: 60%, NA: 50%). In the UA group, this number dropped to 30%, with a significant

difference between S1 and S4 ( $P < 0.05$ ). Analysis between the groups revealed a significant difference between intracanal medication protocols for bacterial metabolism in S4 ( $P < 0.05$ ). It was concluded that the ultrasonic activation of the calcium hydroxide paste was more effective than the nonactivated paste in reducing the bacterial metabolism.

Keywords: Apical Periodontitis, Bacterial infection, Root Canal Treatment, Passive Ultrasonic Activation, Calcium Hydroxide, Quantitative PCR.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Organograma dos procedimentos clínicos e de coleta do tratamento endodôntico.....45
- Figura 5.1 - Número de canais com resultados positivos das reações de qPCR baseada em rDNA nas diferentes etapas do tratamento endodôntico: antes do preparo químico-cirúrgico (S1), após o preparo químico-cirúrgico (S2), após irrigação ultrassônica passiva (S3) e medicação intracanal (S4).....54
- Figura 5.2 - Número de canais radiculares com resultados positivos das reações de qPCR baseada em rRNA nas diferentes etapas do tratamento endodôntico: antes do preparo químico-cirúrgico (S1), após o preparo químico-cirúrgico (S2), após irrigação ultrassônica passiva (S3) e medicação intracanal (S4) .....57
- Figura 5.3 - Número de canais radiculares com bactérias metabolicamente ativas (razão rRNA/rDNA positiva) nas diferentes etapas do tratamento endodôntico: antes do preparo químico-cirúrgico (S1), após o preparo químico-cirúrgico (S2), após irrigação ultrassônica passiva (S3) e medicação intracanal (S4) .....59



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1 - Características clínicas dos pacientes nos diferentes grupos: UA (ativação ultrassônica da medicação intracanal) e NA (não ativação da medicação intracanal).....53
- Tabela 5.2 - Número e porcentagem de canais radiculares com resultados positivos das reações de qPCR baseada em rDNA .....55
- Tabela 5.3 - Valores da mediana (mínimo – máximo) de cópias de rDNA bacteriano nas diferentes etapas do tratamento endodôntico: antes do preparo químico-cirúrgico (S1), após o preparo químico-cirúrgico (S2), após irrigação ultrassônica passiva (S3) e medicação intracanal (S4) .....55
- Tabela 5.4 - Número e porcentagem de canais radiculares com resultados positivos das reações de qPCR baseada em rRNA .....57
- Tabela 5.5 - Valores da mediana (mínimo – máximo) dos níveis de rRNA bacteriano nas diferentes etapas do tratamento endodôntico: antes do preparo químico-cirúrgico (S1), após o preparo químico-cirúrgico (S2), após irrigação ultrassônica passiva (S3) e medicação intracanal (S4) .....58
- Tabela 5.6 Número e porcentagem de canais radiculares com bactérias metabolicamente ativas (razão rRNA/rDNA positivas) .....60
- Tabela 5.7 - Valores da mediana (mínimo – máximo) da razão rRNA/rDNA nas diferentes etapas do tratamento endodôntico: antes do preparo químico-cirúrgico (S1), após o preparo químico-cirúrgico (S2), após irrigação ultrassônica passiva (S3) e medicação intracanal (S4) .....60
- Tabela 5.8 - Taxa de detecção de bactérias totais de ensaios baseados em RNA ribossômico (rRNA) e seus respectivos genes (rDNA) nas diferentes etapas do tratamento endodôntico de 20 dentes: antes do preparo químico-cirúrgico (S1), após o preparo químico-cirúrgico (S2), após irrigação ultrassônica passiva (S3) e medicação intracanal (S4) .....61



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca(OH) <sub>2</sub>	Hidróxido de cálcio
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico complementar)
CHP	Hidróxido de cálcio + Glicerina
CHPG	Hidróxido de cálcio + Glicerina + Paramonoclofenol canforado
CHX	Digluconato de clorexidina
CRT	Comprimento real de trabalho
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
G	Gauge
mg	Miligramas
MIC	Medicação Intracanal
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetro
NA	Pasta de hidróxido de cálcio não ativada
NaOCl	Hipoclorito de sódio
nM	nanoMol
PCR	Polymerase chain eaction (Reação de polimerase em cadeia)
PQC	Preparo químico-cirúrgico
PUI	Irrigação ultrassônica passiva
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction (Reação de polimerase em cadeia quantitativa)
rDNA	Ribosomal Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico ribossômico)
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido ribonucleico)
RPM	Rotações por minuto
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid (Ácido ribonucleico ribossômico)

RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Reação de transcriptase reversa
ssp	Espécies
TE	Tris + EDTA
UA	Ativação ultrassônica da pasta de hidróxido de cálcio



## LISTA DE SIMBOLOS

°C	Graus Celsius
=	Igual
>	Maior
<	Menor
µL	Microlitro
%	Porcentagem



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	25
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	29
2.1	Estudos clínicos que avaliaram por métodos moleculares a eficácia do preparo químico-cirúrgico na redução bacteriana dos canais radiculares.....	30
2.2	Estudos clínicos que avaliaram por métodos moleculares a eficácia dos procedimentos complementares de desinfecção na redução bacteriana após o preparo dos canais radiculares.....	33
<b>3</b>	<b>PROPOSIÇÃO</b> .....	41
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
<b>4.1</b>	<b>Aspectos éticos</b> .....	43
<b>4.2</b>	<b>Procedimentos e coletas clínicas</b> .....	43
4.2.1.	Seleção de pacientes.....	43
4.2.2.	Alocação dos pacientes.....	44
4.2.3.	Coletas microbiológicas e procedimentos clínicos.....	46
<b>4.3.</b>	<b>Análise microbiológica</b> .....	50
4.3.1	Extração de DNA/RNA e síntese do cDNA .....	50
4.3.2	Análise de qPCR baseado em rDNA e rRNA.....	51
<b>4.4</b>	<b>Análise estatística</b> .....	51
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	53
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	63
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	67
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69
	<b>APÊNDICE</b> .....	75
	<b>ANEXOS</b> .....	79



## 1 INTRODUÇÃO

Na natureza, as bactérias encontram-se normalmente organizadas em comunidades microbianas denominadas de biofilmes. Estes são compostos de microorganismos aderidos a uma superfície e envoltos numa matriz extracelular. A organização e crescimento microbiano, aliada à produção da matriz extracelular, contribui para a formação de comunidades com maior resistência às defesas do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos.

As bactérias, organizadas na forma de biofilme, são os principais agentes etiológicos das doenças periapicais. A maioria das bactérias e seus subprodutos é reduzida após o preparo químico-cirúrgico (PQC). Porém, este não é capaz de eliminar totalmente o biofilme bacteriano no interior do sistema de canais radiculares. As bactérias persistentes ao tratamento endodôntico desenvolvem estratégias de sobrevivência, entrando num estado de baixa atividade metabólica, provocada pela escassez de nutrientes. Se as condições nutritivas se restabelecerem no interior dos canais radiculares, as bactérias podem se tornar metabolicamente ativas e atingir concentrações suficientes para indução de um processo inflamatório dos tecidos periapicais, levando ao insucesso do tratamento endodôntico.

A ação sinérgica da instrumentação mecânica auxiliada pelas substâncias químicas promove uma redução dos níveis de bactérias dos canais radiculares; porém, a maioria dos casos permanece infectada após a fase do preparo químico-cirúrgico. Esse fato levou a busca de procedimentos complementares para promover uma melhor antissepsia dos canais radiculares. Uma dessas estratégias consiste na ativação das soluções irrigadoras, o que potencializa sua ação, levando a um aumento na limpeza/ desinfecção de áreas que não foram atingidas pelo preparo químico-cirúrgico (istmos, canais ovais ou ramificações). Entre os procedimentos complementares de desinfecção podemos citar a ativação ultrassônica, também denominada de PUI (do inglês *passive ultrasonic activation*). Esta consiste na transmissão da energia acústica por meio de um inserto acoplado ao ultrassom, a qual origina ondas ultrassônicas que são dissipadas na solução irrigadora no interior dos

canais radiculares. Estudos mostram que a ativação da solução irrigadora contribui para a desorganização do biofilme aderido às paredes dos canais radiculares.

Outra estratégia utilizada para complementar a redução bacteriana após o preparo químico-cirúrgico é o uso de medicação intracanal entre sessões do tratamento endodôntico. As propriedades do hidróxido de cálcio derivam de sua dissociação iônica em íons cálcio e íons hidroxila, sendo que a ação destes íons sobre os tecidos e os microrganismos explicam as propriedades biológicas e antimicrobianas desta substância. Estudos mostraram que a medicação intracanal com uma pasta de hidróxido de cálcio  $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$  pode ser necessária para favorecer a redução das bactérias persistentes e, previsivelmente, tornar a maioria dos canais radiculares livres de bactérias cultiváveis antes da obturação. Porém, outros estudos relataram que o uso de pastas de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  não foram capazes de promover uma redução maior do que aquela obtida pelo preparo químico-cirúrgico. Os estudos clínicos que avaliaram a ação antimicrobiana da pasta de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  como medicação intracanal entre sessões apresentaram uma grande variação quanto: à composição da pasta, à sua forma de inserção no canal radicular, ao tempo de atuação entre as sessões do tratamento e ao método de análise microbiológica utilizada nos estudos.

Recentemente, dois estudos sugeriram o uso do ultrassom para ativação da pasta de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  com os objetivos de favorecer um aumento do pH da pasta e promover uma maior desinfecção intracanal. Duarte et al. (2012), em um estudo *ex vivo*, analisaram a influência da ativação ultrassônica de pastas de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  sobre os níveis de pH e liberação de íons cálcio em reabsorções radiculares externas simuladas. Nos períodos 7, 15 e 30 dias, o nível de pH foi maior quando a pasta foi ativada por ultrassom do que a pasta não ativada; além disso, a liberação de cálcio também foi maior usando ativação ultrassônica após 7 e 30 dias. Por sua vez, Arias et al. (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana e a penetrabilidade nos túbulos dentinários de pastas de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , com e sem ativação ultrassônica, em dentes bovinos infectados com *Enterococcus faecalis*. Após 15 dias, a pasta de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  apresentou melhores resultados quando foi ativada por ultrassom: a viabilidade bacteriana foi de 30% após a ativação comparada à 70% quando a pasta não foi ativada. Os autores concluíram que a ativação ultrassônica incrementou o efeito

antimicrobiano da pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  e foi responsável pela maior penetração da mesma no interior dos túbulos dentinários.

Os estudos acima citados, realizados *in vitro*, mostraram que a ativação ultrassônica da pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  promoveu um maior benefício como medicação intracanal do que a pasta não ativada. Até o presente momento, não existem estudos clínicos que avaliaram o efeito antibacteriano da pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  ativada por ultrassom como medicação intracanal. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da ativação ultrassônica da pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  na redução de bactérias viáveis dos canais radiculares de dentes com periodontite apical.

A hipótese de nulidade é que ativação ultrassônica da pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  não influencia na atividade metabólica de bactérias dos canais radiculares pela análise da razão rRNA/rDNA.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Estudos clínicos e microbiológicos têm um papel importante na escolha de protocolos de tratamento que promovam a máxima redução de micro-organismos dos canais radiculares, o que pode contribuir para um aumento dos índices de sucesso do tratamento endodôntico. Os estudos microbiológicos podem ser realizados por métodos dependentes ou independentes da cultura microbiana. Os métodos dependentes da cultura proporcionam uma sensibilidade menor na detecção de micro-organismos quando comparados aos métodos independentes da cultura (Siqueira; Rôças, 2005). Por sua vez, o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular possibilitou um maior conhecimento da microbiota endodôntica, por possibilitar a detecção de uma grande proporção de bactérias ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo nos canais radiculares (Siqueira; Rôças, 2009). Portanto, os métodos moleculares se tornaram os métodos de escolha para o estudo da microbiota endodôntica. A partir de meados dos anos 2000, diversos estudos avaliaram os procedimentos endodônticos utilizando métodos baseados em rDNA (gene 16S rRNA), principalmente por estes métodos permitirem uma quantificação absoluta das bactérias pela reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR). Porém, é importante ressaltar que a principal limitação dos estudos baseados em rDNA é a não diferenciação entre células vivas ou mortas, o que pode ser uma limitação para análise das bactérias após os procedimentos de desinfecção. Para solucionar esse problema, autores têm recomendado o uso do RNA ribossômico (rRNA), o qual permite distinguir a viabilidade tanto de bactérias cultiváveis quanto das bactérias ainda não cultiváveis. Entretanto, como os níveis de rRNA variam grandemente dependendo do estado metabólico da célula, a qPCR baseada em rRNA não permite a quantificação absoluta das bactérias. Diante do exposto, recentemente, uma associação dos métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA têm sido propostos para o estudo da viabilidade e quantidade de bactérias nos canais radiculares (Pinheiro et al., 2015).

## 2.1 Estudos clínicos que avaliaram por métodos moleculares a eficácia do preparo químico-cirúrgico na redução bacteriana dos canais radiculares

Vianna et al. (2006) avaliaram a redução bacteriana após o PQC com hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% ou gel de clorexidina (CHX) 2% em 32 canais radiculares em dentes com necrose pulpar e periodontite apical assintomática. A redução bacteriana foi analisada por meio da cultura e qPCR baseada em rDNA. Apesar da redução da carga microbiana, a reação de qPCR detectou uma maior quantidade de bactérias após o PQC do que o método da cultura. A redução bacteriana foi significativamente maior no grupo NaOCl 2,5% do que no grupo CHX 2%. Os autores concluíram que NaOCl 2,5% não só tem capacidade de eliminar microorganismos, como a de remover as células bacterianas dos canais radiculares.

Rôças e Siqueira (2011a) compararam a eficácia antimicrobiana do NaOCl 2,5% e CHX 0,12% utilizados como irrigantes durante o tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar e periodontite apical. Amostras microbiológicas dos canais radiculares foram coletadas de 47 dentes unirradiculares antes e após o PQC. O método molecular de PCR (reação em cadeia da polimerase) convencional foi utilizado para avaliar a presença de bactérias, *Archaea* e fungos; enquanto a hibridação DNA-DNA de captura reversa foi utilizada para identificação bacteriana. *Archaea* e fungos não foram detectados; no entanto, a presença de bactérias foi positiva em todas as amostras iniciais. Após o PQC, bactérias estavam ausentes em 40% dos casos no grupo do NaOCl 2,5% e em 47% dos casos no grupo da CHX 0,12%. Tanto o NaOCl 2,5% quanto à CHX 0,12% promoveram uma redução significativa no número de bactérias nos canais radiculares, sem diferença entre os dois grupos.

Rôças et al. (2013) compararam a redução bacteriana promovida por duas técnicas de instrumentação em 45 dentes unirradiculares com periodontite apical. O PQC foi realizado com limas manuais de níquel titânio ou instrumentos rotatórios de níquel titânio BioRace, utilizando o NaOCl 2,5% como irrigante. Na análise das amostras dos canais radiculares por qPCR baseado em rDNA, a instrumentação rotatória resultou em menos casos positivos para bactéria (60%) quando comparada

à instrumentação manual (95%). No grupo da instrumentação manual a média de células bacterianas reduziu de  $4,56 \times 10^7$  nas coletas iniciais para  $8,56 \times 10^4$  após o PQC; enquanto no grupo da instrumentação rotatória, a média de células bacterianas foi de  $6,98 \times 10^6$  para  $7,85 \times 10^4$ . Os autores concluíram que não houve diferença na redução bacteriana após o PQC realizado com limas manuais ou rotatórias de níquel titânio, considerando que os parâmetros de alargamento e irrigação foram similares.

Neves et al. (2014) avaliaram a redução bacteriana após o PQC com o sistema SAF (*Self Adjusting File*) em comparação com limas manuais de níquel titânio. Em ambos os grupos foi utilizada a mesma quantidade de NaOCl 2,5%; porém, no grupo SAF, a irrigação foi contínua. Foram selecionados 50 dentes unirradiculares com necrose pulpar e periodontite apical. Os parâmetros foram analisados por meio de qPCR para determinar a redução dos níveis totais de bactérias e *Streptococcus* spp. Além disso, foi utilizada a hibridação DNA-DNA de captura reversa para identificação bacteriana. Após o PQC, o grupo SAF reduziu significativamente o nível total de bactérias, os quais passaram de uma média de  $1,6 \times 10^7$  de células bacterianas nas amostras iniciais para  $1,34 \times 10^4$  nas amostras após PQC. No grupo de limas manuais de níquel titânio, o nível total de bactérias foi reduzido de  $5,67 \times 10^7$  células bacterianas nas coletas iniciais para  $1,12 \times 10^5$  após o PQC. O sistema SAF também resultou em um menor número de reações qPCR-positivas (45,5%) quando comparado ao grupo da instrumentação manual (95,5%). Os níveis de *Streptococcus* spp. foram reduzidos principalmente pelo sistema SAF, mas em quatro casos essa espécie bacteriana ainda foi detectada. Os autores concluíram que o PQC com o sistema SAF foi altamente eficaz na redução da população bacteriana quando comparado à instrumentação com limas manuais de níquel titânio.

Rôças et al. (2014) avaliaram a suscetibilidade de bactérias ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo aos procedimentos endodônticos em 25 dentes unirradiculares com periodontite apical. O PQC dos canais radiculares foi realizado com instrumentos rotatórios de níquel titânio e NaOCl 2,5% como substância irrigadora. As amostras dos canais radiculares foram analisadas por meio de PCR e qPCR. Após o PQC, houve uma redução significativa das bactérias totais e das oito espécies bacterianas estudadas. Apesar da redução significativa do total de bactérias após o PQC ( $2,03 \times 10^7$  para  $9,7 \times 10^4$  células bacterianas), 64% dos casos apresentavam

reações qPCR positivas. Duas das oito espécies bacterianas foram detectadas após o PQC: *Bacteroidaceae* sp. HOT-272 e *Fretibacterium fastidiosum* HOT-363. Os achados confirmaram que bactérias ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo podem participar da microbiota associada à periodontite apical. O PQC foi altamente eficaz em eliminar completamente as bactérias estudadas ou, pelo menos, reduzir substancialmente seus níveis.

Rodrigues et al. (2015) compararam a eficácia de dois sistemas de instrumentação mecanizada, SAF (*Self Adjusting File*) e TFA (*Twisted File Adaptive*), na redução de bactérias em canais de dentes com necessidade de retratamento endodôntico. A contagem total de bactérias, *Streptococcus* spp. e *Enterococcus faecalis* foi avaliada por meio de qPCR. No grupo SAF, a média inicial de células bacterianas ( $1,78 \times 10^4$ ) foi reduzida significativamente após o PQC ( $9,43 \times 10^2$ ); enquanto no grupo TFA, a média de bactérias passou de  $8,24 \times 10^4$  para  $7,71 \times 10^1$ . Após o PQC, *Streptococcus* spp. foram detectados em 43% dos casos no grupo SAF e em 27% do grupo TFA; enquanto *E. faecalis* não foi detectado nas amostras pós-tratamento. Em conclusão, SAF e TFA foram igualmente eficientes na redução bacteriana de dentes com tratamento prévio e periodontite apical.

Pinheiro et al. (2015) utilizaram qPCR baseado em rRNA e em rDNA (gene rRNA) para detecção de *E. faecalis* em 18 dentes com necessidade de retratamento endodôntico. Esta espécie bacteriana foi detectada em 77,8% e 72,2% das amostras iniciais utilizando qPCR baseado em rRNA e rDNA, respectivamente. Em contraste, após o PQC, *E. faecalis* foi detectado em apenas 33,3% das amostras usando rDNA e em 61,1% das amostras analisadas pelo método baseado em rRNA. Nas amostras positivas para rRNA e rDNA, foi calculada a razão rRNA/rDNA para análise do metabolismo bacteriano. Essa análise revelou que o número de cópias de rRNA era mais elevado do que o número de cópias rDNA, indicando que *E. faecalis* permanecia metabolicamente ativo nas infecções persistentes após o preparo químico-cirúrgico. Esses resultados demonstraram que qPCR baseado em rRNA foi mais sensível que o método baseado em rDNA para detecção de *E. faecalis* em amostras de canais radiculares.

Neves et al. (2016) avaliaram a redução bacteriana promovida por um sistema de lima única e movimento recíproco (Reciproc) em comparação com um sistema de múltiplas limas e com rotação contínua (BioRace) durante o PQC em canais de 60 dentes com periodontite apical primária. As amostras dos canais radiculares foram coletadas antes e após o PQC, que foi realizado com o auxílio de NaOCl 2,5%. A redução dos níveis de bactérias totais e de *Streptococcus* spp. foi avaliada por qPCR. No sistema de lima única, os níveis bacterianos caíram de  $7,1 \times 10^5$  nas amostras iniciais para  $7,05 \times 10^2$  nas amostras após PQC; e no grupo da BioRace, essa redução foi de  $1,31 \times 10^5$  para  $6,03 \times 10^1$  células bacterianas. Após o PQC, 55% e 50% dos casos permaneceram positivos para bactérias nos grupos Reciproc e BioRace, respectivamente. Ambos os sistemas de instrumentação promoveram redução do nível de *Streptococcus* spp. Deste modo, foi demonstrado que tanto o sistema de lima única quanto o sistema de múltiplas limas foram efetivos na redução total de bactérias e de *Streptococcus* spp dos canais radiculares.

Rôças et al. (2016) compararam a eficácia antimicrobiana do NaOCl 2,5% e CHX 2% utilizado como substâncias auxiliares durante o PQC de 50 dentes com periodontite apical primária. Os níveis de bactérias totais e *Streptococcus* spp. foram avaliados por qPCR. Após o PQC, 44% e 40% dos canais permaneceram infectados nos grupos do NaOCl 2,5% e CHX 2%, respectivamente. Ambos os grupos tiveram redução significativa na média de bactérias quando as amostras iniciais foram comparadas às amostras após o PQC: redução de  $3,7 \times 10^5$  para  $5,49 \times 10^2$  células bacterianas no grupo do NaOCl 2,5%; e de  $8,77 \times 10^4$  para  $2,81 \times 10^3$  no grupo da CHX 2%. Ambos os protocolos de irrigação também foram efetivos em reduzir os níveis de *Streptococcus* spp dos canais radiculares. Os autores concluíram que não houve diferença na efetividade antimicrobiana do NaOCl 2,5% e da CHX 2% durante o PQC dos canais radiculares.

Rodrigues et al. (2017) avaliaram o efeito do tamanho do preparo apical na redução de bactérias dos canais radiculares de 43 dentes com indicação de retratamento endodôntico convencional. O PQC foi realizado com o sistema TFA (*Twisted File Adaptive*) e irrigação com NaOCl 2,5% ou solução salina. As amostras bacteriológicas dos canais radiculares foram coletadas antes do PQC, após o uso do primeiro/ terceiro instrumento do sistema TFA, além de uma amostra após a irrigação

final com NaOCl 1% no grupo da solução salina. Após o PQC, houve redução bacteriana significativa entre o primeiro e terceiro instrumento do sistema TFA. A média da carga bacteriana presente no grupo NaOCl 2,5% foi:  $8,24 \times 10^4$  na amostra inicial,  $1,65 \times 10^3$  após o primeiro instrumento e  $7,71 \times 10^1$  após o terceiro instrumento. No grupo da irrigação com solução salina, a média de bactérias foi:  $1,98 \times 10^4$  na amostra inicial,  $2,10 \times 10^3$  após o primeiro instrumento,  $6,48 \times 10^2$  após o terceiro instrumento, e  $5,14 \times 10^2$  após a irrigação final com NaOCl 1%. A incidência de casos positivos para bactéria após o terceiro instrumento foi de 32% e 67% no grupo NaOCl 2,5% e solução salina, respectivamente. No grupo da solução salina, esse número caiu para 38% após o a irrigação final com NaOCl 1%. Os autores concluíram que o aumento no tamanho do preparo apical melhorou a desinfecção dos canais radiculares independentemente do tipo de irrigante. Além disso, o benefício da desinfecção com NaOCl 2,5% foi maior quando os preparos apicais foram maiores.

## **2.2 Estudos clínicos que avaliaram por métodos moleculares a eficácia dos procedimentos complementares de desinfecção na redução bacteriana após o preparo dos canais radiculares**

Sakamoto et al. (2007) avaliaram a redução de bactérias nas diferentes etapas do tratamento endodôntico. Amostras de canais radiculares de 18 dentes com periodontite apical foram coletadas em 3 momentos: no início do tratamento, após PQC com NaOCl 2,5% e após 1 semana de medicação intracanal com  $\text{Ca(OH)}_2$  e PMCC (paramonoclorofenol canforado). A redução da carga bacteriana foi determinada por meio de qPCR. Após PQC e medicação intracanal, 67% das amostras permaneceram positivas. A média de bactérias nos canais radiculares foi:  $1,72 \times 10^7$  nas amostras iniciais,  $5,75 \times 10^4$  após PQC e  $2,53 \times 10^4$  após a medicação intracanal. O PQC com NaOCl 2,5% foi eficaz em reduzir o número total de bactérias nos canais radiculares. Em contraste, o uso do  $\text{Ca(OH)}_2$  como medicação intracanal não foi capaz de promover uma redução significativa de bactérias dos canais radiculares quando comparada ao PQC.

Rôças e Siqueira (2010) identificaram as taxas bacterianas persistentes após os procedimentos endodônticos por meio de RT-PCR e hibridação DNA-DNA por captura reversa. Foram incluídos canais radiculares de 15 dentes com periodontite apical e com necessidade de tratamento ou retratamento endodôntico. As amostras foram coletadas antes do tratamento, após o PQC com NaOCl 2,5% e após 7 dias de  $\text{Ca(OH)}_2$  como medicação intracanal. A presença de bactérias foi detectada em todas as amostras iniciais. Bactérias viáveis, detectadas pelo RNA ribossômico, estavam presentes em 60% e 53% dos casos após o PQC e medicação intracanal, respectivamente. Os autores concluíram que a maioria das espécies/ taxa bacterianas foi erradicada ou pelo menos reduzida após o PQC e a medicação intracanal, mas é necessário implementar novas estratégias, técnicas, instrumentos e substâncias para diminuir o nível de bactérias persistentes nos canais radiculares.

Rôças e Siqueira (2011b) avaliaram o efeito antimicrobiano do PQC utilizando NaOCl 2,5% como irrigante e o efeito complementar da medicação intracanal do  $\text{Ca(OH)}_2$  com glicerina (CHG) ou  $\text{Ca(OH)}_2$  com glicerina e PMCC (CHPG) durante o tratamento de canais radiculares de 24 dentes com periodontite apical. Os métodos moleculares usados foram: PCR para determinar a presença de bactérias, fungos e *Archaea*; e hibridação DNA-DNA de captura reversa para identificação bacteriana. Todas as amostras foram positivas para bactérias nas coletas iniciais e negativas para fungos e *Archaea*. Não houve diferença significativa na incidência de casos positivos para bactérias após PQC e após a medicação intracanal: 54% e 37,5% dos casos, respectivamente. Da mesma forma, não houve diferença na incidência de casos positivos para bactérias na comparação entre os grupos. No grupo CHG, 50% e 42% dos casos foram positivos após PQC e medicação intracanal, respectivamente; enquanto no grupo CHPG, os valores correspondentes foram de 58% e 33%. Na análise da hibridação DNA-DNA, a diversidade de espécies bacterianas foi substancialmente reduzida após PQC e medicação intracanal. As espécies bacterianas mais presentes após PQC e medicação intracanal foram *Propionibacterium acnes* e *Streptococcus* spp.

Paiva et al. (2012) analisaram o efeito antimicrobiano da irrigação ultrassônica passiva (PUI) ou irrigação final com clorexidina (CHX) 2% como procedimentos complementares de desinfecção após o PQC de dentes com necrose pulpar e

periodontite apical. Amostras microbiológicas foram coletadas no início do tratamento e depois do PQC com instrumentos rotatórios de níquel titânio BioRace e irrigação com NaOCl 2,5%. Então, as amostras foram divididas em 2 grupos: grupo PUI com ativação de NaOCl 2,5% ou irrigação convencional de CHX 2%. As amostras foram analisadas por meio de cultura e PCR. Na análise das coletas iniciais, todas foram positivas para bactérias e negativas para fungos. No grupo da PUI, a incidência de casos positivos após o PQC foi de 38,5% pelo método da cultura e 69% pelo PCR; após a desinfecção complementar, esses valores caíram para 23% e 54%, respectivamente. No grupo da CHX, 36% e 64% dos casos foram positivos após PQC pelos métodos da cultura e PCR, respectivamente; após a irrigação final, os valores correspondentes aos métodos caíram para 14% e 43%. Na análise entre os grupos, não houve diferença significativa entre os dois protocolos estudados. Ambos os procedimentos complementares de desinfecção reduziram a incidência de casos positivos quando comparados às amostras após PQC, mas a redução não foi significativa.

Paiva et al. (2013b) avaliaram o efeito da PUI como procedimento de desinfecção complementar após o PQC. As amostras foram coletadas de dez dentes com periodontite apical, antes do PQC, após preparo com instrumentos rotatórios de níquel titânio e NaOCl 2,5% como irrigante, e após à PUI com NaOCl 2,5%. A redução bacteriana foi analisada por qPCR. Todas as amostras iniciais foram positivas para bactérias, com uma média de  $2,21 \times 10^6$  células bacterianas por amostra. Após o PQC, esse número reduziu para  $2,01 \times 10^4$ . Após a PUI, a média reduziu para  $1,65 \times 10^4$  células bacterianas, sem diferença significativa em relação às amostras pós-PQC. Os autores concluíram que a PUI não foi eficaz em reduzir o nível de bactérias quando comparada ao PQC.

Paiva et al. (2013a) avaliaram os níveis bacterianos antes e após o PQC usando instrumentos rotatórios de níquel titânio com NaOCl 2,5% como substância irrigadora, seguido por uma irrigação complementar com CHX 2% e uma semana de medicação intracanal com pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  associado à CHX 2%. A redução bacteriana nos canais radiculares de 14 dentes com periodontite apical foi determinada por qPCR. De todos os casos positivos nas amostras iniciais, a porcentagem de canais infectados diminuiu para 50% após o PQC e irrigação final

com CHX 2%, e para 42% após a medicação intracanal. Na análise quantitativa, a média de bactérias passou de  $9,8 \times 10^6$  nas amostras iniciais para  $1,14 \times 10^5$  após o PQC, com diferença significativa entre as amostras. Porém, não houve diferença significativa na redução bacteriana promovida pela irrigação final com CHX 2% ( $3,14 \times 10^4$ ) quando comparada às amostras após PQC. Por outro lado, houve redução significativa do nível bacteriano após a medicação intracanal ( $9,13 \times 10^3$ ) quando comparadas às amostras após a irrigação final. Os autores concluíram que a irrigação final com CHX 2% seguida da medicação de intracanal à base de  $\text{Ca(OH)}_2$  foram capazes de promover uma redução bacteriana adicional quando comparada ao PQC.

Provenzano et al. (2015) avaliaram a presença de ácidos graxos de cadeia curta, componentes de bactérias Gram-positivas, em diferentes etapas do tratamento endodôntico. Amostras dos canais radiculares de 17 dentes com periodontite apical foram realizadas após o PQC com NaOCl 2% ou CHX 2% como irrigantes, e após uma semana de medicação intracanal com pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$ . A análise por qPCR determinou que 71% das amostras permaneceram positivas para bactérias após PQC e 47% após a medicação intracanal. No grupo do NaOCl 2%, 67% e 44% dos casos foram positivos após PQC e medicação intracanal, respectivamente; enquanto no grupo da CHX 2% os valores correspondentes foram 75% e 50% de casos positivos. Os autores não encontraram diferença no efeito antimicrobiano das duas substâncias irrigadoras. Após a medicação intracanal, houve uma redução de casos infectados; porém aproximadamente 50% dos casos permaneciam infectados.

Zandi et al. (2016) avaliaram, por qPCR, os níveis bacterianos após PQC, realizado com NaOCl 1% ou CHX 2%, e medicação intracanal com pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  em 49 dentes com necessidade de retratamento endodôntico não-cirúrgico. No grupo do NaOCl 1%, houve uma redução significativa dos níveis bacterianos na comparação entre as amostras iniciais ( $7,96 \times 10^4$ ) e as amostras após o PQC ( $2,95 \times 10^2$ ); porém, após a medicação intracanal, observou-se um aumento dos níveis bacterianos ( $3,51 \times 10^2$ ) quando comparados aos encontrados após o PQC. Resultados semelhantes foram encontrados no grupo da CHX 2%, onde os níveis médios das células bacterianas foram:  $5,37 \times 10^5$  nas amostras iniciais,  $1,10 \times 10^3$  nas amostras após PQC e  $1,95 \times 10^3$  nas amostras após medicação intracanal. Tanto o NaOCl 1% quanto a CHX 2% diminuíram a número total de bactérias, sem diferença significativa entre

os irrigantes. Embora o número de canais radiculares positivos tenha diminuído após a medicação intracanal com  $\text{Ca(OH)}_2$ , a contagem bacteriana nos casos positivos aumentou significativamente.

Nakamura et al. (2018) avaliaram o efeito da PUI, comparado à irrigação convencional não ativada (IC), na redução de bactérias e endotoxinas de canais radiculares de 50 dentes com periodontite apical assintomática. Os dentes foram randomizados em dois grupos de acordo com o protocolo de irrigação final após o PQC: grupo PUI (n=25) e grupo IC (n=25). As amostras microbiológicas foram coletadas antes e após o PQC com instrumentos reciprocantes e NaOCl 2,5%, após os protocolos de irrigação final, e após a medicação intracanal com  $\text{Ca(OH)}_2$ . A detecção e o total de bactérias foi determinado por meio de qPCR e a detecção e determinação do nível de endotoxina pelo teste turbimétrico LAL (acrônimo de *Limulus Amebocytes Lisate*). Todas as amostras iniciais foram positivas para bactérias, com uma mediana de  $1,49 \times 10^6$  no grupo PUI e  $8,55 \times 10^5$  no grupo IC. Após o PQC, a porcentagem de casos positivos foram de 76% e de 80% para os grupos da PUI e IC, respectivamente. O número total de bactérias diminuiu significativamente após o PQC em ambos os grupos:  $1,41 \times 10^4$  no grupo PUI e  $3,53 \times 10^4$  no grupo IC. Após os protocolos de irrigação final, no grupo PUI, 68% dos casos continuavam positivos, com uma mediana de  $4,29 \times 10^3$  células bacterianas; enquanto no grupo IC, 72% dos casos foram positivos, com uma mediana de  $1,08 \times 10^4$  células bacterianas. Na análise entre os grupos, houve diferença significativa nos níveis de bactérias após os procedimentos de irrigação final. Após a medicação intracanal, 64% e 60% das amostras foram positivas, com uma mediana de  $2,39 \times 10^3$  e  $4,56 \times 10^3$  nos grupos PUI e IC, respectivamente. Os autores concluíram que a ativação ultrassônica foi mais efetiva do que a irrigação não ativada na redução do número total de bactérias em canais radiculares de dentes com periodontite apical.

Nardello (2018) avaliou a atividade metabólica de bactérias persistentes utilizando métodos moleculares baseados em rDNA e rRNA. Amostras microbiológicas dos canais radiculares foram coletadas de 15 dentes com periodontite apical assintomática em diferentes fases do tratamento endodôntico: após a cirurgia de acesso; após o PQC realizado com instrumentos de lima única (Reciproc) e NaOCl 2,5% como substância irrigadora; e após medicação intracanal com  $\text{Ca(OH)}_2$  por 14

dias. O efeito dos procedimentos endodônticos na redução bacteriana foi determinado por qPCR baseada em rDNA, utilizando iniciadores universais para a região 16S *rRNA* do domínio *Bacteria* e iniciadores espécie-específicos para *Bacteroidaceae [G-1] sp oral taxon 272*. A atividade metabólica de bactérias totais e *Bacteroidaceae [G-1] sp oral taxon 272* foi calculada pela razão rRNA/rDNA baseados nos dados dos ensaios de qPCR. Bactérias foram detectadas em todas as amostras iniciais ( $1,87 \times 10^5$  cópias de rDNA). Após o PQC, houve uma redução significativa de rDNA de bactérias totais ( $7,86 \times 10^4$ ). Após a medicação intracanal, não houve redução de rDNA bacteriano ( $7,97 \times 10^4$ ) quando comparada à fase de preparo. Na análise do metabolismo bacteriano, houve uma redução significativa após a PQC (mediana 1) e um aumento após a medicação intracanal (mediana 2). Da mesma forma, o tratamento endodôntico não promoveu a redução do metabolismo bacteriano da espécie *Bacteroidaceae [G-1] sp oral taxon 272*. A autora concluiu que houve uma redução no número de bactérias totais, assim como do seu metabolismo, após o PQC; entretanto, após o uso da medicação intracanal o metabolismo bacteriano aumentou. Além disso, *Bacteroidaceae [G-1] sp. oral taxon 272* permaneceu metabolicamente ativa após o PQC e medicação intracanal, o que indica que faz parte da composição da microbiota persistente.

Na revisão da literatura, verificou-se um aumento do número de estudos clínicos que utilizaram métodos moleculares para análise microbiológica dos canais radiculares nos últimos 10 anos. Esses estudos avaliaram as novas técnicas utilizadas para a terapia endodôntica, que, apesar dos avanços, ainda não conseguem eliminar totalmente a microbiota intracanal. Os estudos clínicos concordam que o PQC é a fase mais importante para redução bacteriana dos canais radiculares. Entretanto, nesses estudos, aproximadamente metade dos casos ainda apresentavam bactérias detectáveis por métodos moleculares, independente do sistema de instrumentação e da solução irrigadora utilizada durante o PQC. Esse fato indica a necessidade de se procurar estratégias antimicrobianas mais efetivas. Desse modo, o uso de procedimentos complementares de desinfecção após a fase de preparo do canal radicular vem ganhando força na procura de se obter resultados mais previsíveis de redução bacteriana. Um dos procedimentos utilizados após a instrumentação para se obter uma maior limpeza e desinfecção dos canais radiculares é a ativação ultrassônica da solução irrigadora. Embora alguns estudos tenham mostrado

resultados promissores da PUI em termos de redução bacteriana quando comparada à irrigação convencional, outros autores não encontraram uma redução adicional de bactérias quando a ativação ultrassônica da solução irrigadora foi utilizada pós-preparo dos canais radiculares. Da mesma forma, não há uma concordância entre os autores sobre a efetividade da pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  em promover redução bacteriana quando utilizada como medicação intracanal entre as sessões do tratamento endodôntico de dentes com periodontite apical. Com o objetivo de melhorar as propriedades da pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  como medicação intracanal, a ativação ultrassônica da pasta foi sugerida recentemente por Duarte et al. (2012) e Arias et al. (2016). O presente estudo teve o objetivo de avaliar, clinicamente, a eficácia da ativação ultrassônica do hidróxido de cálcio na redução de bactérias viáveis dos canais radiculares. Para isso, foram utilizados métodos moleculares baseados em rDNA e rRNA.

### **3 PROPOSIÇÃO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Avaliar o efeito da ativação ultrassônica da pasta de hidróxido de cálcio na atividade metabólica de bactérias em canais radiculares de dentes com periodontite apical.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a presença e quantidade de bactérias totais após os procedimentos endodônticos pelos métodos moleculares baseados em rDNA.
- Avaliar a presença de bactérias metabolicamente ativas após os procedimentos endodônticos pela análise da razão rRNA/rDNA.
- Comparar as taxas de detecção de bactérias após os procedimentos endodônticos pelos ensaios de qPCR baseados em rRNA ou rDNA.



## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Esse estudo foi realizado de acordo com as normas CONSORT (*Consolidated Standards of Reporting Trials*) para estudos clínicos randomizados. A metodologia utilizada para as coletas e análises microbiológicas foi baseada em estudos clínicos prévios (Pinheiro et al., 2015; Nakamura et al., 2018).

### **4.1 Aspectos éticos**

Os procedimentos clínicos foram realizados na Clínica de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), mediante a prévia aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa nº 2.201.768 (Anexo A) desta instituição e após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por cada paciente (Apêndice A). Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Microbiologia Molecular do Departamento de Dentística da FOUSP e no Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

### **4.2 Procedimento e coletas clínicas**

#### **4.2.1 Seleção de pacientes**

Os critérios de inclusão/ exclusão de pacientes foram baseados em estudo prévio (Nakamura et al., 2018). Os critérios de inclusão foram: pacientes com diagnóstico de necrose pulpar (confirmado pela resposta negativa ao teste de sensibilidade ao frio com gás refrigerante) e periodontite apical assintomática. Os critérios de exclusão foram: pacientes que utilizaram antibióticos nos últimos 3 meses; dentes com perda de tecido dentário que impossibilite o isolamento absoluto; dentes com câmara pulpar aberta/ exposta ao meio bucal; dentes com bolsa periodontal

superior a 4 mm; dentes com evidência radiográfica de tratamento endodôntico prévio, ápice aberto, fratura, reabsorção ou calcificação. Além disso, dentes com uma curvatura maior que 20° (Schneider, 1971), e raízes mais curtas que 15 mm ou maiores que 25 mm foram excluídos. Também foram excluídos da pesquisa pacientes com alterações sistêmicas relevantes, como doenças degenerativas crônicas, processos infecciosos, doenças autoimunes ou imunodeficiências induzidas ou adquiridas, portadores de marca-passo ou próteses coronarianas.

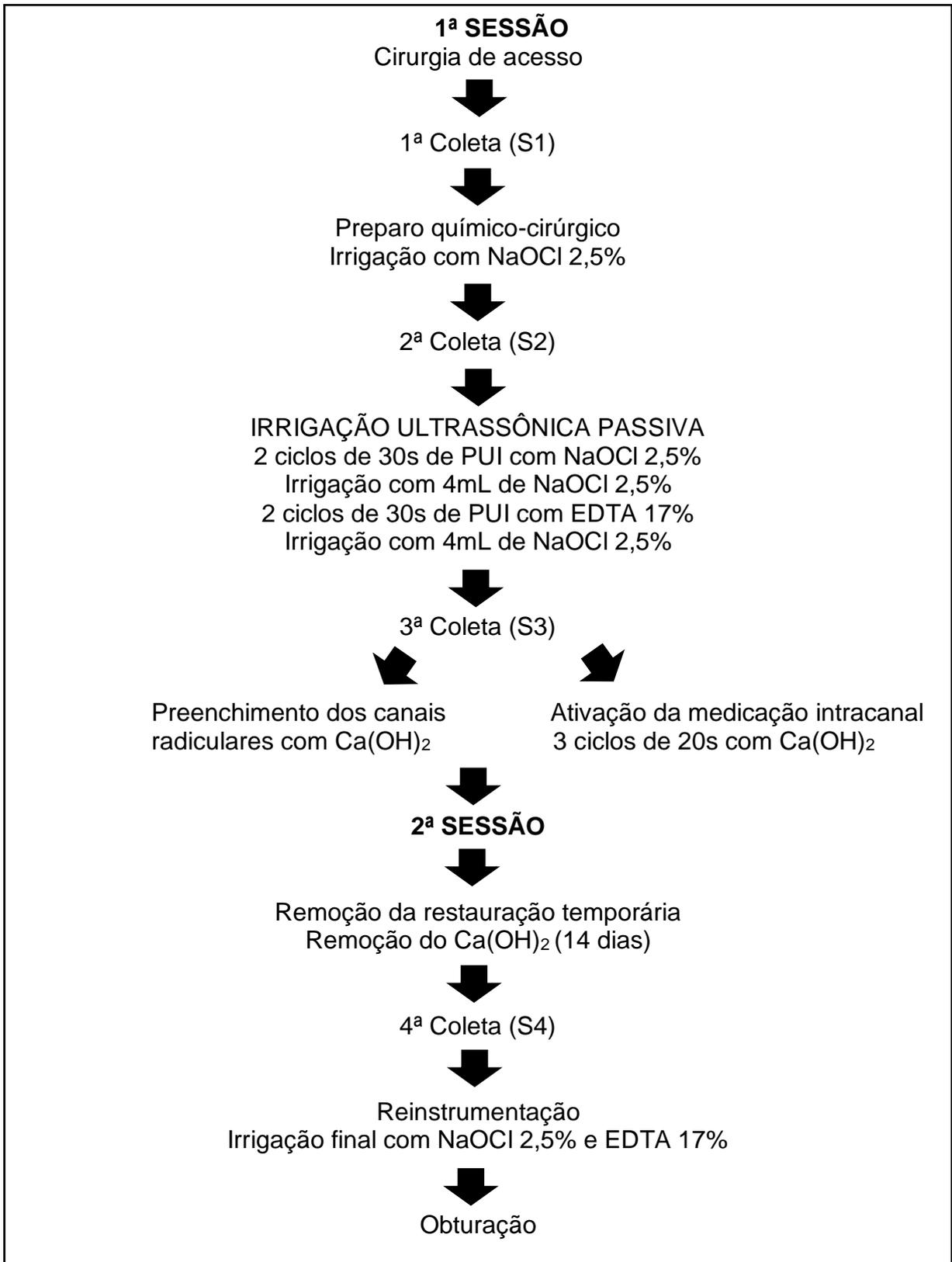
O período de recrutamento foi de março a maio de 2018, quando foram selecionados 20 pacientes que atingiram os critérios de inclusão/ exclusão. Nesse período, foram examinados 63 pacientes, dos quais 43 foram excluídos pelos seguintes motivos: dentes birradiculares ou multiradiculares (n=16), ausência de periodontite apical (n=21), tratamento endodôntico prévio (n=3), bolsa periodontal superior a 4 mm (n=2) e pacientes com problemas sistêmicos (n=1).

#### 4.2.2 Alocação dos pacientes

Após a seleção dos 20 pacientes, as radiografias foram digitalizadas e os diâmetros das lesões mensurados. Para permitir que os grupos tivessem lesões iniciais semelhantes e o número igual de pacientes, foi realizada uma randomização estratificada baseada no diâmetro inicial da lesão. Os pacientes foram divididos em 2 grupos de 10 pacientes: Grupo UA (ativação ultrassônica da medicação intracanal) e NA (não ativação ultrassônica da medicação intracanal), com lesões periapicais de diâmetro médio de 5,7 mm e 5,2 mm, respectivamente. A randomização foi realizada com um sistema de randomização eletrônica online (*Research Randomizer*, [www.randomizer.org](http://www.randomizer.org)). O processo de randomização e alocação dos pacientes foi realizado por um pesquisador independente ao estudo, de forma que os operadores eram cegos ao grupo de alocação do paciente até o momento da inserção da medicação intracanal com pasta de hidróxido de cálcio.

A organização dos procedimentos clínicos e de coletas microbiológicas podem ser visualizados no organograma representado na Figura 4.1.

Figura 4.1 – Organograma dos procedimentos clínicos e de coleta do tratamento endodôntico



Fonte: O autor

#### 4.2.3 Coletas microbiológicas e procedimentos clínicos

Os procedimentos clínicos foram realizados na Clínica de Pós-Graduação da FOU SP por 2 pós-graduandos alunos do Programa de Odontologia (área de concentração em Endodontia) com experiência de mais de 5 anos na especialidade. As coletas microbiológicas foram realizadas de acordo com estudos prévios (Nakamura et al., 2018).

Após o exame clínico e radiográfico inicial, os pacientes receberam 10mL de antisséptico bucal para bochechar por 1 minuto. Após o antisséptico bucal, os dentes foram anestesiados e realizado o isolamento absoluto com arco plástico (Maquira Indústria de produtos Odontológicos S.A, Maringá, PR, Brasil), lençol de borracha (Medeitex, São José dos Campos, SP, Brasil), grampos metálicos adequados (SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e barreira gengival (Top Dam, FGM, Brasil). A antisepsia do campo operatório e da coroa dentária foram realizadas com swabs esterilizados (Jiangsu Rongye Technology., Ltda. Yangzhou, China) embebidos em peróxido de hidrogênio 30% por 30s, seguido por hipoclorito de sódio 2,5% (Fórmula e Ação farmácia de manipulação, São Paulo, SP, Brasil), por mais 30s, sendo este neutralizado por tiosulfato de sódio 5% (Fórmula e Ação farmácia de manipulação, São Paulo, SP, Brasil) (Anexo B) (Rôças et al., 2004).

A cirurgia de acesso foi realizada em duas etapas, com auxílio de brocas diamantadas esféricas 1014HL ou 1015HL (Microdont Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil) em alta-rotação refrigeradas com auxílio de seringas de 10mL (Lifelong Meditech Pvt. Ltd., Manesar, Guagaon, India) e soro fisiológico esterilizado (Isofarma, Precabura, CE, Brasil), tomando-se o cuidado de não acessar a câmara pulpar. Após este procedimento, o protocolo de antisepsia da coroa dental e do campo operatório foi novamente realizado, como já foi descrito anteriormente; coletas das coroas do ângulo cavo superficial, foram realizadas com cones de papel estéril, para comprovar a eficácia das manobras de desinfecção. A ausência de bactérias no campo operatório foi comprovada por meio de PCR convencional, utilizando iniciadores universais para o domínio *Bacteria*. Após este procedimento a cirurgia de acesso foi finalizada com novas brocas diamantadas esterilizadas e refrigeradas com soro fisiológico

Ao término destes procedimentos, a câmara pulpar foi aspirada e o canal radicular preenchido com solução salina. A odontometria foi realizada com um instrumento tipo K número 10 (Dentsply Maillefer, Baillagues, Suíça) com auxílio de localizador foraminal (Romidan Ltd., Kiryat Ono, Israel). O comprimento real de trabalho (CRT) foi determinado em 0,5 mm aquém do limite zero observado no localizador foraminal. Um instrumento tipo H número 15 foi pressionado contra as paredes do canal para criar raspas de dentina e suspender bactérias na solução. Quatro cones de papel número 15 esterilizados foram introduzidos individualmente no canal para coletar o conteúdo inicial de bactérias (**S1**), sendo mantidos em posição por 1 minuto cada. A parte ativa das limas utilizadas e os cones de papel foram depositados em microtubos esterilizados contendo 300 µL de solução RNA later (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estado Unidos da América), para análise bacteriana (Anexo C).

No passo seguinte, a câmara pulpar foi preenchida com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5%, que foi agitada e carregada progressivamente no sentido coroa-ápice com o auxílio de instrumentos tipo K até atingir o CRT. Após o esvaziamento inicial do canal, instrumentos manuais do tipo K foram levados sem pressão até comprimento real de trabalho, em ordem crescente de diâmetro, do instrumento número 10 ao número 40 (Dentsply Maillefer, Baillagues, Suíça). O primeiro instrumento que demonstrasse travamento no CRT foi utilizado como base para a escolha do instrumento Reciproc (VDW GmbH, Munique, Alemanha) a ser utilizado no preparo químico-cirúrgico. Se o travamento fosse compatível com instrumentos 10 ou 15, o dente foi excluído da pesquisa, pela dificuldade da realização da coleta inicial. Se o travamento fosse compatível com as limas 20, 25 ou 30, o instrumento Reciproc R40 foi escolhido; e quando o instrumento inicial de referência fosse o 35 ou 40, o preparo foi realizado com o instrumento Reciproc R50.

Os instrumentos reciprocantes foram acionados num motor VDW-silver (VDW GmbH, Munique, Alemanha) ajustado à cinemática preconizada para cada instrumento, sempre na presença de NaOCl 2,5%. O instrumento Reciproc selecionado foi levado ao interior do conduto em movimento reciprocante, seguindo sequências de três ciclos de penetração/retrocesso, de maneira a avançar em direção apical a cada ciclo. Ao término de cada sequência, o instrumento foi limpo com gaze

esterilizada e o canal irrigado com NaOCl 2,5%, atingindo-se o CRT apenas no último ciclo de penetração.

Durante o preparo, foram utilizados 40 mL de solução irrigadora por canal, sendo 30 mL durante a instrumentação e mais 10 mL ao final do preparo, com as pontas irrigadoras posicionadas a aproximadamente 2 mm aquém do comprimento real de trabalho, utilizadas em movimentos de vai e vem com pequena amplitude. A irrigação durante o preparo químico-cirúrgico foi realizada com seringas plásticas esterilizadas de 10 mL e pontas endodônticas de irrigação Endo-EZE (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) com diâmetro de 30G e saída de meia cana lateral, ao passo que a aspiração da substância irrigadora foi realizada através de cânulas de aspiração SurgiTip (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) acopladas à bomba a vácuo odontológica. Ao final, o canal foi aspirado com pontas endodônticas Capillary Tips 0,014' e 0,019'' (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) e novamente irrigada com 5ml de tiosulfato de sódio 5% por 1 minuto. O canal foi novamente aspirado, e preenchido com soro fisiológico. Assim, realizando uma nova coleta microbiológica (S2), como descrito anteriormente.

Após a finalização do PQC, realizava-se irrigação ultrassônica passiva, PUI, com o inserto liso Irrisonic de 0,2 mm de diâmetro e conicidade .01 (Helse, Ribeirão Preto, SP, Brasil), acionado por aparelho de ultrassom (Gnatus, Ribeirão Preto, Brazil) ajustado em 10% de potência. A ponta do inserto era posicionada 2 mm aquém do CRT, evitando-se o contato com as paredes do canal. Os canais foram irrigados com 2mL de NaOCl 2,5% e o inserto foi acionado por 30 segundos. A solução de NaOCl 2,5% era renovada (2mL) e ativada por mais 30s, a irrigação final foi realizada com 4mL de NaOCl 2,5% sem ativação. Estes procedimentos foram repetidos com 2mL de EDTA-T 17% e, novamente, uma irrigação final com 4mL de NaOCl 2,5%, totalizando 2min de ativação.

Após os dois ciclos, o conteúdo do canal era aspirado com pontas Capillary tips 0,014'' e 0,019'' e uma nova irrigação com 5mL de tiosulfato de sódio 5% por 1 minuto era realizada. Os canais eram então aspirados, secos novamente, e preenchidos com soro fisiológico esterilizado para a realização de uma nova coleta (S3).

Após a coleta, os canais radiculares foram secos com cones de papel esterilizados, e então, preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio [Ca(OH)<sub>2</sub>] Ultracal XS (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA), com agulha Navitip de diâmetro de 29G e saída frontal (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) colocada 1mm aquém do CRT. No Grupo UA, após o preenchimento dos canais foi feita a ativação do hidróxido de cálcio com o inserto liso Irrisonic (Helse, Ribeirão Preto, SP, Brasil), acionado por aparelho de ultrassom (Gnatus, Ribeirão Preto, Brazil) ajustado em 30% de potência e posicionada 2 mm aquém do CRT, foram feitos 3 ciclos de 20 segundos no sentido mesio-distal e vestibulo-lingual, no total de 1 minuto, após de cada ativação, os canais radiculares foram preenchidos novamente com hidróxido de cálcio (Duarte et al., 2012).

Uma radiografia periapical foi realizada para verificar o completo preenchimento do canal radicular. Pra finalizar a primeira sessão, as cavidades de acesso foram seladas com uma camada de 2 mm de espessura de obturador provisório endodôntico (Dentalvile, Joinville, SC, Brasil) e uma camada de cimento de ionômero de vidro Riva Self Cure (SDI Limited, Victoria, Australia).

Os pacientes retornaram à clínica para uma segunda sessão de tratamento após um período de 14 dias, e os procedimentos de anestesia, isolamento absoluto, abertura coronária e desinfecção do campo operatório foram realizados seguindo o mesmo protocolo utilizado na primeira sessão clínica. A remoção do selamento provisório foi feita após uma nova coleta para verificação da desinfecção do campo, a medicação intracanal foi removida do interior dos canais radiculares utilizando-se 10 mL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 17% e leve agitação com limas manuais tipo K número 15. E então, uma quarta coleta (S4) foi realizada seguindo os mesmos critérios de procedimentos realizados nas coletas anteriores.

Em seguida, os canais foram irrigados com 10 mL de NaOCl 2,5% e re-instrumentados com o mesmo instrumento utilizado na primeira sessão do tratamento, procedeu-se, a executar a irrigação final com 10 mL de NaOCl (2,5%) e 10 mL de EDTA (17%). Após a secagem dos condutos por meio de aspiração e utilização de cones de papel esterilizados, os canais foram obturados por meio da técnica de condensação lateral com guta-percha e cimento AH Plus (Dentsply Maillefer), e os

acessos coronários devidamente selados com restaurações de resina composta (Z350, 3M Corporation, St. Paul, MN, EUA).

### 4.3 Análise microbiológica

#### 4.3.1 Extração de DNA/RNA e síntese do cDNA

Essa fase foi realizada no Laboratório de Microbiologia Molecular do Departamento de Dentística da FOUSP. As amostras endodônticas foram descongeladas e homogeneizadas por agitação durante 1 minuto. A extração de DNA e RNA foi realizada com o kit de purificação *MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit* (Epicentre Technologies, Madison, WI, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados (também chamados pellet) foram suspensos em solução contendo 300 µL de *Tissue and Cell Lysis Solution* e 2 µL de Proteinase K, e incubados por 15 minutos a 65 °C. As amostras foram resfriadas em gelo por 5 minutos e foram adicionados 150 µL da solução *MPC Protein Precipitation Reagent* para precipitação proteica. Após nova centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e submetidos a precipitação com isopropanol. Os ácidos nucleicos totais foram suspensos em 35 µL do tampão TE, que foram divididos em duas partes iguais. A primeira alíquota foi para análise de DNA; enquanto a segunda alíquota sofreu um processo de purificação de RNA de acordo com as recomendações do fabricante (Epicentre Technologies, Madison, WI, EUA). Após esses processos, foram realizados novo tratamento com DNase I (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e uma reação de PCR para confirmar a ausência de DNA nas amostras de RNA. Para isso, foram utilizados iniciadores universais para região do gene 16S *rRNA*. A quantificação dos ácidos nucleicos em cada amostra foi realizada no aparelho do NanoDrop e analisada pelo software ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). As alíquotas de DNA foram armazenadas em freezer -20 °C até o momento do uso. Para as amostras de RNA, foi realizada a Reação de Transcriptase Reversa (RT) para sintetizar o cDNA (DNA complementar), utilizando o

kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, São Paulo, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA foi armazenado em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  (Anexo D).

#### 4.3.2 Análise de qPCR baseado em rDNA e rRNA

Os níveis de rDNA e rRNA de todas as amostras foram quantificados por qPCR. Para análise do total de bactérias, as reações de qPCR foram realizadas com um par de iniciadores universais para a região conservada do gene 16S *rRNA* do domínio *Bacteria*, conforme descrito por (Shelburne et al., 2000): 5'- GAG AGT TTG ATY MTG GCT CAG – 3' e 5'- GAA GGA GGT GWT CCA RCC GCA- 3'. As reações foram realizadas em placas de 96 poços com um volume total de 20  $\mu\text{L}$  contendo: 10  $\mu\text{L}$  Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 100 nM de cada iniciador, água e 2  $\mu\text{L}$  do DNA ou cDNA.

Nos controles negativos foram utilizados 2  $\mu\text{L}$  de água como molde, as reações de qPCR foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, utilizando o *StepOne Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O ciclo de amplificação foi:  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 s, anelamento a  $60^{\circ}\text{C}$  por 1 min e extensão a  $95^{\circ}\text{C}$  por 15s. Os resultados foram analisados pelo software StepOne Plus Software v2.3 (Applied Biosystems).

#### 4.4 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o Software BioEstat 5.3 (Mamirauá, Amazonas, Brasil). O teste exato de Fisher e o teste Q de Cochran foram utilizados para análise dos dados qualitativos (presença/ ausência de bactérias) entre os grupos e intragrupo, respectivamente. Para os dados quantitativos, a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney e a comparação intragrupo pelo teste de Wilcoxon. A comparação da taxa de detecção dos métodos baseados em rDNA e rRNA foi realizada pelo teste de McNemar. Todos os dados foram analisados com nível de significância de 5%.

## 5 RESULTADOS

Dos 20 pacientes incluídos no estudo, 9 eram mulheres e 11 homens, com uma idade média de 44 anos, variando de 25 a 69 anos. As características clínicas dos 20 dentes e sua distribuição nos grupos de tratamento são apresentadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Características clínicas dos pacientes nos diferentes grupos: UA (ativação ultrassônica da medicação intracanal) e NA (não ativação da medicação intracanal)

	Grupos de Tratamento	
	Ativação Ultrassônica (n=10)	Não ativação (n=10)
<b>Gênero</b>		
Feminino	3	6
Masculino	7	4
<b>Grupo dental</b>		
Anterior	4	6
Premolar	6	4
<b>Preparo do canal radicular</b>		
R40 (0.40mm, conicidade0.6)	4	5
R50 (0.50mm, conicidade0.5)	6	5

Fonte: O autor

### 5.1 Análise das amostras por qPCR baseado em rDNA: presença e quantificação bacteriana

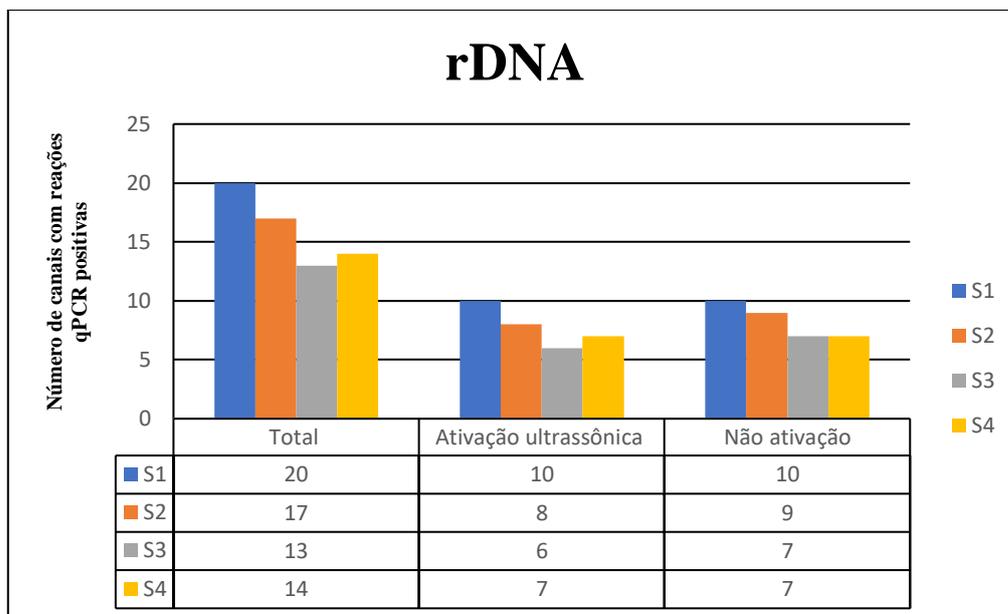
A Figura 5.1 mostra o número de canais radiculares com presença de rDNA bacteriano em cada etapa do tratamento endodôntico de todos os dentes estudados. Do total de 20 amostras iniciais (S1) positivas, rDNA bacteriano permaneceu em níveis detectáveis em 85% (17/20) das amostras S2, 65% (13/20) das amostras S3 e 70% (14/20) das amostras S4. Uma redução significativa do número de canais com rDNA bacteriano foi observada entre as amostras S1 – S3 ( $p=0,018$ ) e S1 – S4 ( $p=0,027$ ). Porém, não foi encontrada diferença significativa entre as amostras S1 e S2 ( $p=0,067$ ). Após o uso da medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio, independente do

seu modo de inserção, rDNA bacteriano foi detectado em 14 amostras S4, não havendo diferença significativa entre as amostras S2 - S4 e S3 – S4.

A Tabela 5.2 apresenta a comparação dos dados qualitativos (presença/ausência de bactérias) entre os dois grupos de tratamento. Uma análise entre as amostras dentro de cada grupo também foi realizada. Porém, nenhuma diferença significativa foi encontrada na comparação entre os grupos ou intragrupo.

A Tabela 5.3 apresenta os dados quantitativos relacionados aos níveis de rDNA nas amostras dos canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento. Na comparação entre os grupos, não houve diferença significativa entre as amostras dos canais radiculares em nenhuma etapa do tratamento. Por sua vez, na análise intragrupo, houve uma redução significativa dos níveis de rDNA bacteriano entre as amostras S1 – S2 nos grupos com e sem ativação do hidróxido de cálcio ( $p=0,007$  e  $p=0,009$ , respectivamente).

Figura 5.1 – Número de canais com resultados positivos das reações de qPCR baseada em rDNA nas diferentes etapas do tratamento endodôntico: antes do preparo químico-cirúrgico (S1), após o preparo químico-cirúrgico (S2), após irrigação ultrassônica passiva (S3) e medicação intracanal (S4)



Fonte: O autor

Tabela 5.2 – Número e porcentagem de canais radiculares com resultados positivos das reações de qPCR baseada em rDNA

<b>rDNA</b>		
<b>Amostras</b>	<b>Grupos de Tratamento</b>	
	Ativação Ultrassônica (n=10)	Não ativação (n=10)
<b>S1</b>	10 (100%) <sup>aA</sup>	10 (100%) <sup>aA</sup>
<b>S2</b>	8 (80%) <sup>aA</sup>	9 (90%) <sup>aA</sup>
<b>S3</b>	6 (60%) <sup>aA</sup>	7 (70%) <sup>aA</sup>
<b>S4</b>	7 (70%) <sup>aA</sup>	7 (70%) <sup>aA</sup>

Valores em uma mesma linha, seguidos por letras minúsculas idênticas, não diferem entre si no nível de 5 % pelo Teste Exato de Fisher; enquanto valores em uma mesma coluna, seguidos por letras maiúsculas idênticas, não diferem entre si no nível de 5 % pelo teste de Q de Cochran.

Fonte: O autor

Tabela 5.3 – Valores da mediana (mínimo – máximo) de cópias de rDNA bacteriano nas diferentes etapas do tratamento endodôntico: antes do preparo químico-cirúrgico (S1), após o preparo químico-cirúrgico (S2), após irrigação ultrassônica passiva (S3) e medicação intracanal (S4)

<b>rDNA</b>		
<b>Amostras</b>	<b>Grupos de Tratamento</b>	
	Ativação Ultrassônica (n=10)	Não ativação (n=10)
<b>S1</b>	2,38 x 10 <sup>6</sup> (3,33 x 10 <sup>4</sup> - 2,29 x 10 <sup>7</sup> ) <sup>aA</sup>	1,60 x 10 <sup>5</sup> (4,41 x 10 <sup>4</sup> - 4,46 x 10 <sup>7</sup> ) <sup>aA</sup>
<b>S2</b>	2,14 x 10 <sup>3</sup> (0,00 - 3,51 x 10 <sup>5</sup> ) <sup>aB</sup>	7,48 x 10 <sup>3</sup> (0,00 - 9,52 x 10 <sup>4</sup> ) <sup>aB</sup>
<b>S3</b>	2,23 x 10 <sup>3</sup> (0,00 - 3,67 x 10 <sup>4</sup> ) <sup>aB</sup>	7,59 x 10 <sup>3</sup> (0,00 - 1,09 x 10 <sup>5</sup> ) <sup>aB</sup>
<b>S4</b>	1,27 x 10 <sup>4</sup> (0,00 - 5,40 x 10 <sup>6</sup> ) <sup>aB</sup>	6,15 x 10 <sup>3</sup> (0,00 - 3,21 x 10 <sup>5</sup> ) <sup>aB</sup>

Valores em uma mesma linha, seguidos por letras minúsculas idênticas, não diferem entre si no nível de 5 % pelo teste de Mann–Whitney U-test; enquanto valores em uma mesma coluna, seguidos por letras maiúsculas distintas, diferem entre si no nível de 5 % pelo teste de Wilcoxon signed rank para amostras relacionadas.

Fonte: O autor

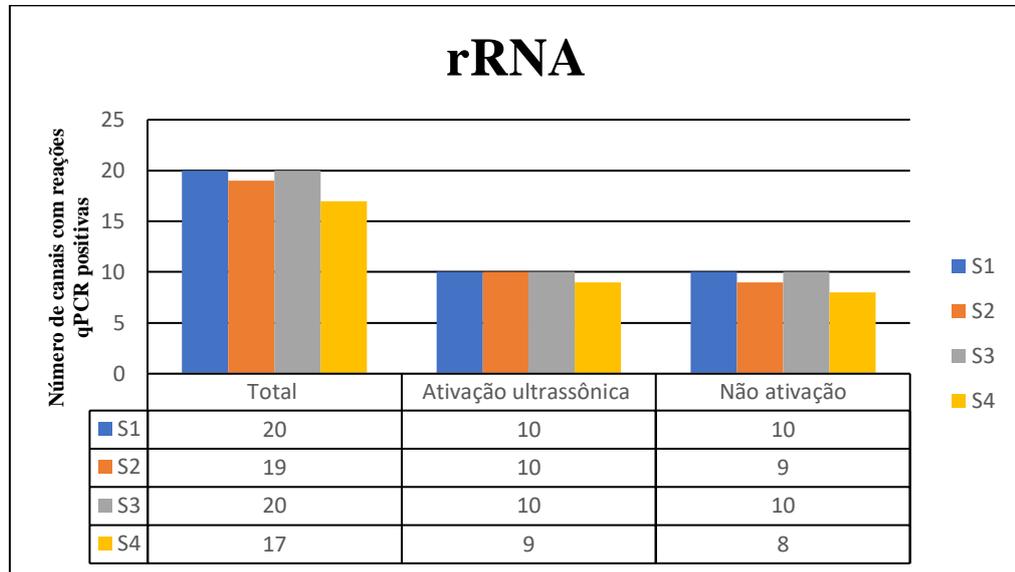
## **5.2 Análise das amostras por qPCR baseado em rRNA: presença e viabilidade bacteriana**

A Figura 5.2 apresenta o número total de canais radiculares com presença de rRNA bacteriano em cada etapa do tratamento endodôntico. Do total de 20 amostras positivas em S1, rRNA bacteriano permaneceu em níveis detectáveis em todas as amostras pós-tratamento, com exceção de 4 amostras (1 S2 e 3 S4).

A Tabela 5.4 apresenta o número e porcentagem de canais radiculares com resultados positivos das reações de qPCR baseada em rRNA nos grupos com e sem ativação do hidróxido de cálcio. Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos ou intragrupo.

A Tabela 5.5 apresenta os níveis de rRNA nas amostras dos canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento. Na comparação entre os grupos, não houve diferença significativa entre as amostras dos canais radiculares em nenhuma etapa do tratamento. Por outro lado, na análise intragrupo, houve uma redução significativa dos níveis de rRNA bacteriano entre as amostras S1 – S2 nos grupos com e sem ativação do hidróxido de cálcio ( $p=0,005$  e  $p=0,046$ , respectivamente).

Figura 5.2 – Número de canais radiculares com resultados positivos das reações de qPCR baseada em rRNA nas diferentes etapas do tratamento endodôntico: antes do preparo químico-cirúrgico (S1), após o preparo químico-cirúrgico (S2), após irrigação ultrassônica passiva (S3) e medicação intracanal (S4)



Fonte: O autor

Tabela 5.4 – Número e porcentagem de canais radiculares com resultados positivos das reações de qPCR baseada em rRNA

Amostras	rRNA	
	Grupos de Tratamento	
	Ativação Ultrassônica (n=10)	Não ativação (n=10)
<b>S1</b>	10 (100%) <sup>aA</sup>	10 (100%) <sup>aA</sup>
<b>S2</b>	10 (100%) <sup>aA</sup>	9 (90%) <sup>aA</sup>
<b>S3</b>	10 (100%) <sup>aA</sup>	10 (100%) <sup>aA</sup>
<b>S4</b>	9 (90%) <sup>aA</sup>	8 (80%) <sup>aA</sup>

Valores em uma mesma linha, seguidos por letras minúsculas idênticas, não diferem entre si no nível de 5 % pelo Teste Exato de Fisher; enquanto valores em uma mesma coluna, seguidos por letras maiúsculas idênticas, não diferem entre si no nível de 5 % pelo teste de Q de Cochran.

Fonte: O autor

Tabela 5.5 – Valores da mediana (mínimo – máximo) dos níveis de rRNA bacteriano nas diferentes etapas do tratamento endodôntico: antes do preparo químico-cirúrgico (S1), após o preparo químico-cirúrgico (S2), após irrigação ultrassônica passiva (S3) e medicação intracanal (S4)

Amostras	rRNA	
	Grupos de Tratamento	
	Ativação Ultrassônica (n=10)	Não ativação (n=10)
<b>S1</b>	1,42 x 10 <sup>6</sup> (5,91 x 10 <sup>4</sup> - 1,10 x 10 <sup>8</sup> ) <sup>aA</sup>	4,77 x 10 <sup>5</sup> (5,91 x 10 <sup>3</sup> - 5,61 x 10 <sup>7</sup> ) <sup>aA</sup>
<b>S2</b>	1,21 x 10 <sup>4</sup> (3,55 x 10 <sup>3</sup> - 4,51 x 10 <sup>5</sup> ) <sup>aB</sup>	4,64 x 10 <sup>4</sup> (0,00 - 1,09 x 10 <sup>6</sup> ) <sup>aB</sup>
<b>S3</b>	1,10 x 10 <sup>4</sup> (2,94 x 10 <sup>3</sup> - 4,72 x 10 <sup>5</sup> ) <sup>aB</sup>	3,77 x 10 <sup>4</sup> (2,02 x 10 <sup>3</sup> - 5,37 x 10 <sup>6</sup> ) <sup>aB</sup>
<b>S4</b>	7,60 x 10 <sup>3</sup> (0,00 - 1,10 x 10 <sup>5</sup> ) <sup>aB</sup>	2,48 x 10 <sup>4</sup> (0,00 - 2,95 x 10 <sup>5</sup> ) <sup>aB</sup>

Valores em uma mesma linha, seguidos por letras minúsculas idênticas, não diferem entre si no nível de 5 % pelo teste de Mann–Whitney U-test; enquanto valores em uma mesma coluna, seguidos por letras maiúsculas distintas, diferem entre si no nível de 5 % pelo teste de Wilcoxon signed rank para amostras relacionadas.

Fonte: O autor

### 5.3 Atividade metabólica de bactérias antes e após os procedimentos endodônticos

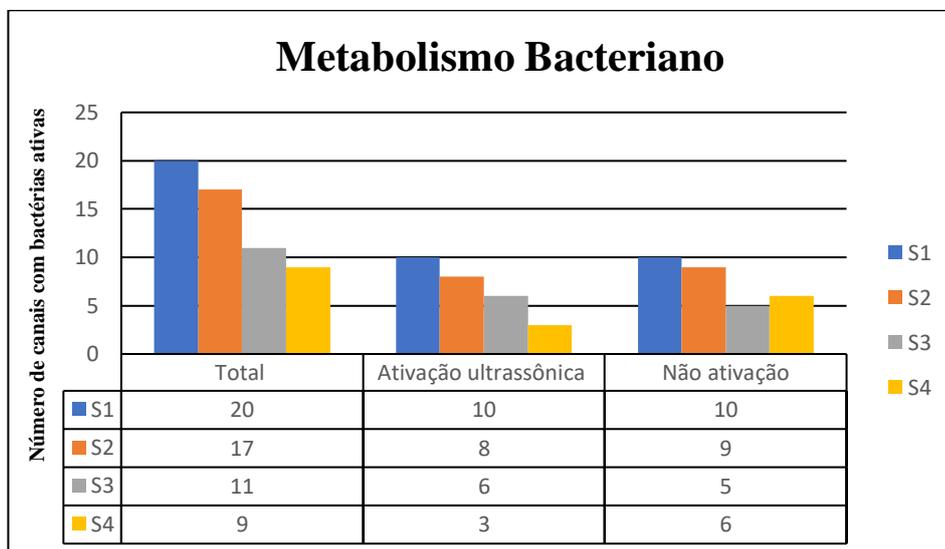
A Figura 5.3 apresenta o número de canais com presença de bactérias metabolicamente ativas (razão rRNA/rDNA maior ou igual a 1) em cada etapa do tratamento endodôntico. Do total de 20 amostras positivas em S1, bactérias permaneceram ativas em 85% (17/20) das amostras S2 e 55% (11/20) das amostras S3; sendo observada uma redução significativa do número de canais com bactérias ativas entre as amostras S1-S3 ( $p=0,0077$ ) e S2-S3 ( $p=0,0277$ ). Porém, não foi encontrada diferença significativa entre as amostras S1 e S2 ( $p=0,10$ ). Após a medicação intracanal, bactérias permaneceram ativas em 45% (9/20) das amostras S4; não havendo diferença significativa entre as amostras S3-S4 ( $p= 0,4631$ ).

Particularmente, no grupo da ativação ultrassônica da medicação intracanal (n=10), apenas 3 amostras (30%) S4 continham bactérias ativas; havendo uma

redução significativa do número de canais com bactérias ativas entre as amostras S1-S4 ( $p=0,018$ ) e S2-S4 ( $p=0,0431$ ). Porém, no grupo sem ativação ultrassônica da medicação intracanal ( $n=10$ ), a única diferença significativa encontrada foi entre as amostras S1-S3 ( $p=0,0431$ ). Nesse grupo, 6 amostras S4 permaneceram com bactérias ativas, não havendo diferença significativa entre as amostras S1-S4 ( $p=0,0679$ ). (Tabela 5.6).

A Tabela 5.7 apresenta os valores da razão rRNA/rDNA nas amostras dos canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento. A análise entre os grupos revelou uma diferença significativa entre os protocolos de medicação intracanal quanto ao metabolismo bacteriano em S4 ( $p=0,035$ ). Na análise intragrupo, houve uma redução significativa da razão rRNA/rDNA entre as amostras S1 – S4 ( $p=0,0078$ ) e S3 – S4 ( $p=0,0149$ ) no grupo da ativação ultrassônica da medicação intracanal.

Figura 5.3 – Número de canais radiculares com bactérias metabolicamente ativas (razão rRNA/rDNA positiva) nas diferentes etapas do tratamento endodôntico: antes do preparo químico-cirúrgico (S1), após o preparo químico-cirúrgico (S2), após irrigação ultrassônica passiva (S3) e medicação intracanal (S4).



Fonte: O autor

Tabela 5.6 – Número e porcentagem de canais radiculares com bactérias metabolicamente ativas (razão rRNA/rDNA positivas)

<b>Razão rRNA/rDNA</b>		
<b>Amostras</b>	<b>Grupos de Tratamento</b>	
	Ativação Ultrassônica (n=10)	Não ativação (n=10)
<b>S1</b>	10 (100%) <sup>aA</sup>	10 (100%) <sup>aA</sup>
<b>S2</b>	8 (80%) <sup>aA</sup>	9 (90%) <sup>aA</sup>
<b>S3</b>	6 (60%) <sup>aAB</sup>	5 (50%) <sup>aAB</sup>
<b>S4</b>	3 (30%) <sup>aB</sup>	6 (60%) <sup>aA</sup>

Valores em uma mesma linha, seguidos por letras minúsculas idênticas, não diferem entre si no nível de 5 % pelo Teste Exato de Fisher; enquanto valores em uma mesma coluna, seguidos por letras maiúsculas distintas, diferem entre si no nível de 5 % pelo teste de Q de Cochran e pelo teste de Wilcoxon.

Fonte: O autor

Tabela 5.7 – Valores da mediana (mínimo – máximo) da razão rRNA/rDNA nas diferentes etapas do tratamento endodôntico: antes do preparo químico-cirúrgico (S1), após o preparo químico-cirúrgico (S2), após irrigação ultrassônica passiva (S3) e medicação intracanal (S4)

<b>Razão rRNA/rDNA</b>		
<b>Amostras</b>	<b>Grupos de Tratamento</b>	
	Ativação Ultrassônica (n=10)	Não ativação (n=10)
<b>S1</b>	3,0 (1 – 30) <sup>aA</sup>	4,5 (1 – 8) <sup>aA</sup>
<b>S2</b>	2,5 (0 – 25) <sup>aA</sup>	8 (1 – 26) <sup>aA</sup>
<b>S3</b>	3,0 (1 – 20) <sup>aA</sup>	4,0 (0 -12) <sup>aA</sup>
<b>S4</b>	0,0 (0 – 2) <sup>aB</sup>	2 (0 – 11) <sup>bA</sup>

Valores em uma mesma linha, seguidos por letras minúsculas distintas, diferem entre si no nível de 5 % pelo teste de Mann–Whitney U-test; enquanto valores em uma mesma coluna, seguidos por letras maiúsculas distintas, diferem entre si no nível de 5 % pelo teste de Mann–Whitney U-test.

Fonte: O autor

#### 5.4 Taxa de detecção de bactérias após os procedimentos endodônticos pelos ensaios de qPCR baseados em rDNA e rRNA

A Tabela 5.8 mostra a taxa de detecção de bactérias pelos ensaios baseados em rDNA e rRNA. A taxa de detecção bacteriana foi de 100% (20/20) no S1 utilizando ambos os ensaios de qPCR. Pelo método baseado no rDNA, a detecção bacteriana foi de 85% (17/20) nas amostras após o PQC; enquanto, bactérias foram detectadas em 95% (19/20) das amostras S2 pelo método baseado em rRNA. Após a desinfecção complementar com PUI, o método baseado em rDNA detectou bactérias em 65% (13/20) dos casos; porém, o rRNA foi detectado em 100% (20/20) das amostras S3 ( $p=0,0156$ ). Além disso, após a medicação intracanal, rDNA permaneceu detectável em 70% (14/20) das amostras S4; enquanto bactérias foram detectadas em 85% (17/20) dessas amostras utilizando o método baseado em rRNA.

Tabela 5.8 - Taxa de detecção de bactérias totais de ensaios baseados em RNA ribossômico (rRNA) e seus respectivos genes (rDNA) nas diferentes etapas do tratamento endodôntico de 20 dentes: antes do preparo químico-cirúrgico (S1), após o preparo químico-cirúrgico (S2), após irrigação ultrassônica passiva (S3) e medicação intracanal (S4)

DETECÇÃO BACTERIANA													
		S1		S2		S3		S4					
		rDNA	<i>p</i>	rDNA	<i>p</i>	rDNA	<i>p</i>	rDNA	<i>p</i>				
		+	-	+	-	+	-	+	-				
rRNA	+	20	0	1,0	17	2	0,5	13	7	0,02	13	4	0,37
	-	0	0		0	1		0	0		1	2	

Fonte: O autor







## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito da ativação ultrassônica da pasta de hidróxido de cálcio, em comparação com uma pasta não ativada, na atividade metabólica de bactérias em canais radiculares de dentes com periodontite apical. Adicionalmente, os efeitos de cada etapa do tratamento endodôntico nas condições bacteriológicas dos canais radiculares também foram avaliados, incluindo a análise do número de canais infectados, além do nível e do metabolismo de bactérias que persistiram após os procedimentos endodônticos. O presente estudo revelou que a ativação ultrassônica da pasta de hidróxido de cálcio foi mais efetiva do que a pasta não ativada em reduzir o metabolismo bacteriano; portanto, a hipótese de nulidade foi rejeitada. Neste estudo, a atividade metabólica bacteriana após os procedimentos endodônticos de desinfecção foi avaliada utilizando métodos moleculares baseados em rRNA ribossômico (rRNA) e rDNA (genes que codificam rRNA). Estudos têm proposto uma associação dos métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA para uma avaliação simultânea da viabilidade e quantidade de bactérias em uma comunidade bacteriana (Matsuda et al., 2007; Campbell et al., 2011; Pitkänen et al., 2013). Como as bactérias possuem poucos genes que codificam o rRNA, o nível de rDNA está relacionado diretamente à quantidade de bactérias, mas não à sua viabilidade. Por outro lado, devido à abundância de ribossomos presentes nas células vivas, a relação entre os níveis de rRNA e rDNA será positiva em casos de células metabolicamente ativas. Até o presente momento, poucos estudos utilizaram a razão rRNA/rDNA para análise da microbiota que permanece metabolicamente ativa após os procedimentos endodônticos de desinfecção (Pinheiro et al., 2015; Nardello, 2018).

A primeira etapa do tratamento endodôntico, o preparo químico-cirúrgico (PQC), é considerada a etapa de maior importância para a redução de bactérias dos canais radiculares. O presente estudo evidenciou uma redução significativa do número de cópias de rDNA bacteriano após o PQC, confirmando os achados prévios (Vianna et al., 2006; Sakamoto et al., 2007; Rôças et al., 2010; Rôças et al., 2011a; Rôças et al., 2011b; Paiva et al., 2012; Paiva et al., 2013a; Paiva et al., 2013b; Rôças et al., 2013; Neves et al., 2014; Rôças et al., 2014; Rodrigues et al., 2015; Provenzano et al., 2015; Zandi et al., 2016; Neves et al., 2016; Rôças et al., 2016; Rodrigues et al., 2017; Nakamura et al., 2018; Nardello, 2018). Esse fato se deve ao contato dos

instrumentos endodônticos com as paredes dos canais radiculares, promovendo a remoção ou desorganização mecânica do biofilme bacteriano. Neste estudo, a instrumentação foi realizada com um sistema de lima única, mediante movimentos reciprocantes. Os preparos apicais foram realizados com limas de níquel titânio com um diâmetro na ponta de 0,40 mm ou 0,50 mm e conicidade de 0,05 e 0,06, respectivamente. A escolha do instrumento foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante, com um protocolo estabelecido previamente no estudo de (Nakamura et al., 2018). A renovação contínua e um grande volume da substância irrigadora utilizada neste estudo (um total 40mL de NaOCl 2,5%) mostrou que o sinergismo da ação mecânica do instrumento e a ação química da solução irrigadora tem o potencial de promover uma redução significativa dos níveis de bactérias dos canais radiculares.

Apesar da redução dos níveis bacterianos após o PQC, uma grande porcentagem de casos permaneceram positivos (reações qPCR-positivas para o rDNA) nos dois grupos: 80% e 90% dos casos nos grupos UA e NA, respectivamente. Esses dados concordam com os estudos prévios que utilizaram qPCR baseada em rDNA (Vianna et al., 2006; Sakamoto et al., 2007; Paiva et al., 2012; Provenzano et al., 2015; Nakamura et al., 2018; Nardello, 2018). Porém, outros estudos mostraram uma presença menor de reações qPCR positivas após o PQC (Rodrigues et al., 2015; Rôças et al., 2016). As diferenças entre os estudos podem estar relacionadas às técnicas de instrumentação e ao volume/ concentração do irrigante. Estudos recentes mostraram que um aumento no diâmetro apical, além de instrumentos com desenhos/ cinemáticas que promovam um maior contato com as paredes do canal radicular, podem contribuir para uma maior redução do número de bactérias após o PQC (Rodrigues et al., 2017).

A análise da razão rRNA/rDNA revelou que as bactérias detectadas pelo método baseado em rDNA permaneceram metabolicamente ativas na maioria dos casos após o PQC. Na análise dos 20 casos, 85% das amostras S2 apresentavam células bacterianas metabolicamente ativas. Após a PUI, o número de canais com bactérias ativas reduziu significativamente quando comparado às amostras S2 (55%,  $p=0,0277$ ). Esse dado ressalta a importância da PUI, quando utilizada como procedimento complementar de desinfecção, na redução da atividade metabólica das

bactérias após o PQC. Esses dados concordam com estudos clínicos prévios que mostraram o benefício dos procedimentos complementares de desinfecção em contribuir para redução dos níveis de bactérias dos canais radiculares após PQC (Paiva et al., 2012; Neves et al., 2014; Nakamura et al., 2018). Esses dados também concordam com estudos prévios *in vitro* que mostraram uma maior limpeza do sistema de canais radiculares após a ativação ultrassônica do NaOCl, promovendo a remoção de tecido orgânico, bactérias planctônicas e biofilme dos canais radiculares (Van der Sluis et al., 2007; Jiang et al., 2011; Mozo et al., 2012). Porém, outros autores não encontraram diferença na redução bacteriana promovida pelo PQC e aquela promovida pela PUI (Paiva et al., 2013b).

Após a PUI, os canais radiculares foram medicados com pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$ , com ou sem ativação ultrassônica, por 14 dias. No grupo UA, houve uma redução significativa da porcentagem de casos com bactérias metabolicamente ativas ao término do tratamento (30%), com diferença significativa entre S1-S4 e S2-S4 (ambos  $p < 0,05$ ). Por outro lado, no grupo NA, 60% dos casos permaneceram com bactérias metabolicamente ativas após o uso da medicação intracanal. Na análise entre os grupos, o nível de metabolismo bacteriano nas amostras S4 foi menor no grupo UA do que no grupo NA. Esses dados revelaram que a ativação ultrassônica da pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  promoveu uma maior redução do metabolismo bacteriano quando comparada à pasta não ativada. Esses dados estão de acordo com um estudo prévio *in vitro* que mostrou uma boa atividade da pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  ativada por ultrassom sobre infecção intra-tubular. (Arias et al., 2016). Esses autores mostraram que a ativação ultrassônica promoveu um maior contato da pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  com as paredes dos canais radiculares, possibilitando o alcance em áreas onde as bactérias podem permanecer viáveis, como no interior dos túbulos dentinários ou em áreas com variações da anatomia interna dos canais radiculares (Arias et al., 2016). Além disso, (Duarte et al., 2012) mostraram que a ativação ultrassônica da pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  poderia ter como consequência um aumento do pH no interior dos canais radiculares. Portanto, a maior redução do metabolismo bacteriano encontrada no presente estudo pode estar relacionada ao preenchimento dos túbulos dentinários e ao aumento do pH. A difusão de íons hidroxila através da dentina depende do período da medicação, diâmetro dos túbulos dentinários (cervical versus apical) e remoção da camada de smear layer (patência dos túbulos dentinários). A atividade antimicrobiana do  $\text{Ca(OH)}_2$

está relacionada com a liberação de íons hidroxilas altamente reativos em um ambiente aquoso, que afeta principalmente a membrana citoplasmática, proteínas e DNA bacteriano (Siqueira e Lopes, 1999; Estrela et al., 1999; Mohammadi et al., 2011).

O veículo para o qual o hidróxido de cálcio é adicionado afeta as propriedades físicas e químicas de o composto e, portanto, suas aplicações clínicas. Comparado com agentes solúveis em água, os veículos viscosos e oleosos prolongam a ação do hidróxido de cálcio, mas pode ter efeitos colaterais negativos associados. (Mohammadi et al., 2011)

A queda do metabolismo celular pode estar relacionada a alterações no transporte através da membrana citoplasmática, nos componentes do citoesqueleto e dificultar a proliferação celular (Siqueira et al., 1999; Evans et al., 2002; Appelbe et al., 2007; Mohammadi et al., 2011).

Por fim, na comparação entre os métodos, observou-se uma maior sensibilidade da reação de qPCR baseada em rRNA para detecção de bactérias nas amostras de canais radiculares, especialmente nas coletadas após os procedimentos complementares de desinfecção. Nas amostras pós-PUI, bactérias foram detectadas em 100% dos casos pelo método de rRNA e em 65% dos casos pelo método baseado em rDNA. Esses dados concordam com achados prévios que evidenciaram a sensibilidade do método baseado em rRNA na detecção de bactérias viáveis em uma comunidade bacteriana (Matsuda et al., 2007; Pitkänen et al., 2013; Pinheiro et al., 2015; Nardello, 2018). Esses dados confirmam os estudos que demonstraram que os métodos baseados em rRNA bacteriano, além de ser um indicador de viabilidade celular, apresenta uma alta sensibilidade para detecção de bactérias metabolicamente ativas devido à abundância de ribossomos presentes nessas células (Matsuda et al., 2007; Campbell et al., 2011; Pitkänen et al., 2013). A associação dos métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA para análise da atividade metabólica bacteriana têm sido utilizado em diversas áreas da microbiologia (Matsuda et al., 2007; Campbell et al., 2011; Pitkänen et al., 2013). O presente estudo utilizou a razão rRNA/rDNA para análise da atividade metabólica de bactérias em amostras de canais radiculares, confirmando que esta pode ser uma ferramenta promissora para o monitoramento da eficácia antimicrobiana do tratamento endodôntico.

## 7 CONCLUSÕES

Diante das metodologias utilizadas e dos resultados obtidos, concluiu-se que:

- A ativação ultrassônica da pasta de hidróxido de cálcio promoveu uma maior redução do metabolismo bacteriano do que a pasta não ativada.
- O preparo químico-cirúrgico promoveu uma redução dos níveis de rDNA e rRNA bacteriano nos canais radiculares; enquanto a irrigação ultrassônica passiva realizada após o preparo químico-cirúrgico contribuiu para redução do número de casos com bactérias metabolicamente ativas.
- A reação de qPCR baseada em rRNA foi mais sensível do que o método baseado em rDNA para detecção de bactérias após os procedimentos de desinfecção endodôntica.



## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

Appelbe OK, Sedgley CM. Effects of prolonged exposure to alkaline pH on *Enterococcus faecalis* survival and specific gene transcripts. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Jun;22(3):169-74. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00340.x

Arias MP, Maliza AG, Midená RZ, Graeff MS, Duarte MA, Andrade FB. Effect of ultrasonic streaming on intra-dentinal disinfection and penetration of calcium hydroxide paste in endodontic treatment. *J Appl Oral Sci*. 2016 Nov-Dec;24(6):575-81. doi: 10.1590/1678-775720150553

Campbell BJ, Yu L, Heidelberg JF, Kirchman DL. Activity of abundant and rare bacteria in a coastal ocean. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 2;108(31):12776-81. doi: 10.1073/pnas.1101405108. doi: 10.1073/pnas.1101405108.

Duarte MA, Balan NV, Zeferino MA, Vivan RR, Morais CA, Tanomaru-Filho M, et al. Effect of ultrasonic activation on pH and calcium released by calcium hydroxide pastes in simulated external root resorption. *J Endod*. 2012 Jun;38(6):834-7. doi: 10.1016/j.joen.2012.03.005.

Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann LL. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. *J Endod*. 1999 Jun;25(6):416-8. doi: 10.1016/S0099-2399(99)80269-6

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2002 Mar;35(3):221-8. doi:10.1046/j.1365-2591.2002.00504.x

Jiang LM, Verhaagen B, Versluis M, Langedijk J, Wesselink P, van der Sluis LW. The influence of the ultrasonic intensity on the cleaning efficacy of passive ultrasonic irrigation. *J Endod*. 2011 May;37(5):688-92. doi: 10.1016/j.joen.2011.02.004.

Matsuda K, Tsuji H, Asahara T, Kado Y, Nomoto K. Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Jan;73(1):32-9. doi: 10.1128/AEM.01224-06.

---

<sup>1</sup> De acordo com Estilo Vancouver.

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

Mozo S, Llana C, Forner L. Review of ultrasonic irrigation in endodontics: increasing action of irrigating solutions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012 May 1;17(3):e512-6. doi: 10.4317/medoral.17621.

Nardello LCL. Análise da atividade metabólica de bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção: estudo molecular baseado em RNA e DNA [dissertação] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018 [citado 29 out. 2018]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23156/tde-12062018-094527/pt-br.php>

Nakamura VC, Pinheiro ET, Prado LC, Silveira AC, Carvalho APL, Mayer MPA, et al. Effect of ultrasonic activation on the reduction of bacteria and endotoxins in root canals: a randomized clinical trial. *Int Endod J*. 2018 Jan;51 Suppl 1:e12-e22. doi: 10.1111/iej.12783.

Neves MA, Provenzano JC, Rôças IN, Siqueira JF, Jr. Clinical antibacterial effectiveness of root canal preparation with reciprocating single-instrument or continuously rotating multi-instrument systems. *J Endod*. 2016 Jan;42(1):25-9. doi: 10.1016/j.joen.2015.09.019.

Neves MA, Rôças IN, Siqueira JF, Jr. Clinical antibacterial effectiveness of the self-adjusting file system. *Int Endod J*. 2014 Apr;47(4):356-65. doi: 10.1111/iej.12151.

Paiva SS, Siqueira JF, Jr., Rôças IN, Carmo FL, Ferreira DC, Curvelo JA, et al. Supplementing the antimicrobial effects of chemomechanical debridement with either passive ultrasonic irrigation or a final rinse with chlorhexidine: a clinical study. *J Endod*. 2012 Sep;38(9):1202-6. doi: 10.1016/j.joen.2012.06.023.

Paiva SS, Siqueira JF, Jr., Rôças IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC, et al. Clinical antimicrobial efficacy of NiTi rotary instrumentation with NaOCl irrigation, final rinse with chlorhexidine and interappointment medication: a molecular study. *Int Endod J*. 2013a Mar;46(3):225-33. doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02111.x.

Paiva SS, Siqueira JF, Jr., Rôças IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC, et al. Molecular microbiological evaluation of passive ultrasonic activation as a supplementary disinfecting step: a clinical study. *J Endod*. 2013b Feb;39(2):190-4. doi: 10.1016/j.joen.2012.09.014.

Pinheiro ET, Candeiro GT, Teixeira SR, Shin RC, Prado LC, Gavini G, et al. RNA-based Assay demonstrated *Enterococcus faecalis* metabolic activity after chemomechanical procedures. *J Endod*. 2015 Sep;41(9):1441-4. doi: 10.1016/j.joen.2015.04.020.

Pitkanen T, Ryu H, Elk M, Hokajarvi AM, Siponen S, Vepsalainen A, et al. Detection of fecal bacteria and source tracking identifiers in environmental waters using rRNA-based RT-qPCR and rDNA-based qPCR assays. *Environ Sci Technol*. 2013;47(23):13611-20. doi: 10.1021/es403489b.

Provenzano JC, Rôças IN, Tavares LF, Neves BC, Siqueira JF, Jr. Short-chain fatty acids in infected root canals of teeth with apical periodontitis before and after treatment. *J Endod*. 2015 Jun;41(6):831-5. doi: 10.1016/j.joen.2015.02.006.

Rôças IN, Lima KC, Siqueira JF, Jr. Reduction in bacterial counts in infected root canals after rotary or hand nickel-titanium instrumentation--a clinical study. *Int Endod J*. 2013 Jul;46(7):681-7. doi: 10.1111/iej.12045.

Rôças IN, Provenzano JC, Neves MA, Siqueira JF, Jr. Disinfecting effects of rotary instrumentation with either 2.5% sodium hypochlorite or 2% chlorhexidine as the main irrigant: A randomized clinical study. *J Endod*. 2016 Jun;42(6):943-7. doi: 10.1016/j.joen.2016.03.019.

Roças IN, Siqueira JF, Jr. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *J Endod*. 2010 Jan;36(1):45-52. doi: 10.1016/j.joen.2009.10.022. doi: 10.1016/j.joen.2009.10.022.

Roças IN, Siqueira JF, Jr. Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. *J Endod*. 2011a Feb;37(2):143-50. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.006.

Roças IN, Siqueira JF, Jr. In vivo antimicrobial effects of endodontic treatment procedures as assessed by molecular microbiologic techniques. *J Endod*. 2011b Mar;37(3):304-10. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.003.

Roças IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod*. 2004 May;30(5):315-20. doi: 10.1097/00004770-200405000-00004.

Rodrigues RCV, Zandi H, Kristoffersen AK, Enersen M, Mdala I, Orstavik D, et al. Influence of the apical preparation size and the irrigant type on bacterial reduction in root canal-treated teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 2017 Jul;43(7):1058-63. doi: 10.1016/j.joen.2017.02.004.

Rodrigues RC, Antunes HS, Neves MA, Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Infection control in retreatment cases: in vivo antibacterial effects of 2 instrumentation systems. *J Endod*. 2015 Oct;41(10):1600-5. doi: 10.1016/j.joen.2015.06.005.

Sakamoto M, Siqueira JF, Jr., Roças IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Feb;22(1):19-23. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00315.x.

Schneider SW. A comparison of canal preparations in straight and curved root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1971 Aug;32(2):271-5. doi:10.1016/0030-4220(71)90230-1.

Shelburne CE, Prabhu A, Gleason RM, Mullally BH, Coulter WA. Quantitation of bacteroides forsythus in subgingival plaque comparison of immunoassay and quantitative polymerase chain reaction. *J Microbiol Methods*. 2000 Jan;39(2):97-107. doi:10.1016/s0167-7012(99)00106-2.

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.

Siqueira JF, Jr., Roças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res*. 2009 Nov;88(11):969-81. doi: 10.1177/0022034509346549.

Van der Sluis LW, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *Int Endod J*. 2007 Jun;40(6):415-26. doi: 10.1111/j.1365-2591.2007.01243.x.

Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J*. 2006 Jun;39(6):484-92. doi: 10.1111/j.1365-2591.2006.01121.x.

Zandi H, Rodrigues RC, Kristoffersen AK, Enersen M, Mdala I, Orstavik D, et al. Antibacterial effectiveness of 2 root canal irrigants in root-filled teeth with infection: A

randomized clinical trial. *J Endod.* 2016 Sep;42(9):1307-13. doi: 10.1016/j.joen.2016.06.006.



APÊNDICE A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**Título do estudo:** Análise da Comunidade Bacteriana Metabolicamente Ativa nas Infecções Endodônticas Persistentes após Diferentes Protocolos Clínicos de Desinfecção: Estudo Molecular baseado em RNA e DNA

**Pesquisador responsável:** Ericka Tavares Pinheiro

**Equipe de pesquisa:** Prof. Dr. Giulio Gavini, Profa. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer, Alexandre Pinheiro Lima de Carvalho, Carlos Goes Nogales, Laura Cristina Leite Nardello, Fernanda Pinheiro Bruno, Luiza Riomar Paz, Roberto Xavier Romero Cazares, Bárbara Guedes Alves.

**Instituição/Departamento:** Faculdade de Odontologia da Universidade São Paulo – Departamento de Dentística

**Telefone para contato:** (11) 3091-7839 / (11) 2648-8293

**Local da coleta de dados:** Clínica da Pós-Graduação da FOU SP

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “**Análise da Comunidade Bacteriana Metabolicamente Ativa nas Infecções Endodônticas Persistentes após Diferentes Protocolos Clínicos de Desinfecção: Estudo Molecular baseado em RNA e DNA**” que tem como objetivo avaliar o quanto a agitação da solução irrigadora por ultrassom, laser ou instrumento endodôntico consegue diminuir o número de bactérias encontradas no canal radicular.

A pesquisa será realizada na Clínica da Pós Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, e serão selecionados pacientes da Clínica de Endodontia da FOU SP já em tratamento.

O procedimento consiste em, detectada no exame clínico e radiográfico a infecção do canal, estes pacientes serão convidados a participar da pesquisa permitindo a coleta do conteúdo que está dentro do canal durante todo o tratamento para a pesquisa. Os demais serão encaminhados para outras disciplinas para que possam ser realizados os tratamentos necessários.

O tratamento consiste em duas sessões, sendo que a primeira será feita o procedimento relacionado com o tratamento de canal, com o uso ou não da agitação da solução irrigadora e as coletas. Na segunda sessão, será feito o fechamento do canal, uma nova coleta e restauração do dente, finalizando o tratamento. O tratamento será feito com anestesia para conforto do paciente, e serão realizadas apenas as radiografias necessárias para a realização do tratamento. Anualmente o participante da pesquisa retornará à Clínica de Endodontia para controle do tratamento.

Rubrica Participante da Pesquisa

Rubrica do Pesquisador Responsável

1/3

Os participantes da pesquisa serão divididos em 4 grupos: 1 – Seringa plástica descartável e pontas de irrigação; 2 – Agitação da solução irrigadora com ultrassom; 3- Agitação com instrumento endodôntico; 4- Agitação da irrigação a laser.

O risco deste tratamento é uma sensibilidade após as consultas de tratamento, que o pesquisador responsável estará à inteira disposição para solucionar. O benefício ao participante da pesquisa será o tratamento de canal garantindo melhor saúde bucal.

Aos participantes desta pesquisa são assegurados:

- Ressarcimento de todos os gastos;
- Assistência em virtude dos danos decorrentes da pesquisa;
- Indenização em casos de danos decorrentes da pesquisa;
- Acesso aos resultados dos exames radiográficos;
- Os dados fornecidos serão confidenciais;
- Liberdade de retirada do Consentimento sem penalização por parte dos pesquisadores;
- Liberdade de recusar em participar do estudo sem penalização por parte dos pesquisadores responsáveis;
- Em caso de interrupção do estudo receberá assistência adequada de forma gratuita pelo tempo que for necessário;

O pesquisador responsável, Ericka Tavares Pinheiro, poderá ser encontrado no telefone (11) 2648-8293, ou na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

CEP-FOUSP - Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – Avenida Professor Lineu Prestes nº 2227 – 05508-000 – São Paulo – SP – Telefone (11) 3091.7960 – e-mail cepfo@usp.br. O horário de atendimento ao público e pesquisadores é: de segunda a sexta-feira das 9 as 12h e de 14 as 16h (exceto em feriados e recesso universitário). O Comitê é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. (Resolução CNS nº 466 de 2012).

Rubrica Participante da Pesquisa

Rubrica do Pesquisador Responsável

2/3

Este termo está sendo elaborado em duas vias, sendo uma do participante da pesquisa e outra do pesquisador responsável.

Após ler estas informações e de ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelo pesquisador concordo em participar de forma voluntária neste estudo.

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Nome do participante da pesquisa:

\_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Telefone: ( \_\_\_\_\_ )

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

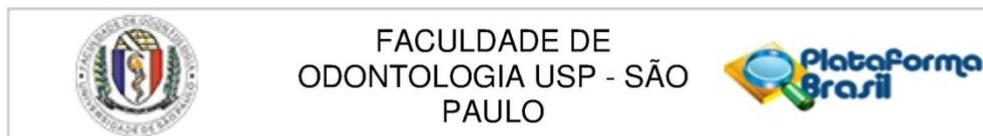
Assinatura do Participante da pesquisa

\_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador Responsável



## ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Análise da Comunidade Bacteriana Metabolicamente Ativa nas Infecções Endodônticas Persistentes após Diferentes Protocolos Clínicos de Desinfecção: Estudo Molecular baseado em RNA e DNA

**Pesquisador:** Ericka Tavares Pinheiro

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 71367517.0.0000.0075

**Instituição Proponente:** Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.201.768

**Apresentação do Projeto:**

Este projeto pretende avaliar o efeito de diferentes métodos de desinfecção em dentes com periodontite apical. Serão selecionados 100 pacientes com necrose pulpar e periodontite apical. Coletas microbiológicas dos canais radiculares serão realizadas no início do tratamento endodôntico (S1) e após o preparo químico-mecânico com Sistema Reciproc e NaOCI 2,5% (S2). A seguir, os pacientes serão igualmente divididos em grupos de acordo com procedimentos complementares de desinfecção realizados após o preparo químico-mecânico: Grupo XP (XP-endo Finisher), Grupo PIPS (irrigação ativada a laser utilizando as pontas PIPS (Photon-Induced Photoacoustic Streaming), Grupo PUI (irrigação ultrassônica passiva) e Grupo IC (irrigação convencional com seringas, sem ativação). Novas coletas microbiológicas dos canais radiculares serão feitas após os procedimentos complementares de desinfecção (S3) e após a medicação intracanal com hidróxido de cálcio por 14 dias (S4) e re-instrumentação dos canais radiculares antes da obturação (S5). As amostras dos canais radiculares serão submetidas à extração dos ácidos nucleicos totais. O efeito dos protocolos de tratamento sobre a microbiota total será determinado por qPCR baseada em rDNA, utilizando iniciadores universais para o Domínio Bacteria.

**Endereço:** Av Prof Lineu Prestes 2227

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 05.508-900

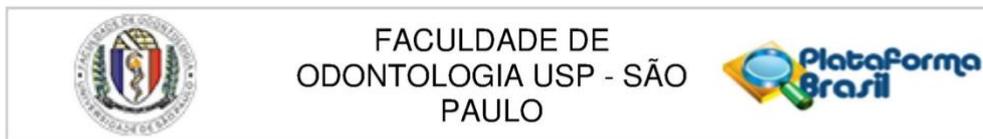
**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3091-7960

**Fax:** (11)3091-7814

**E-mail:** cepfo@usp.br



Continuação do Parecer: 2.201.768

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo deste projeto de pesquisa é avaliar a eficácia antimicrobiana de diferentes protocolos clínicos de desinfecção endodôntica e também analisar a diversidade e atividade metabólica de bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos são os inerentes ao tratamento endodôntico convencional e os benefícios diretos ao pacientes são o tratamento de canal realizado e a possível diminuição da infecção do dente, colaborando para uma melhor saúde bucal.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante, que pode indicar melhores métodos de tratamento endodôntico.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentadas as informações básicas do projeto, o projeto detalhado, o TCLE e a folha de rosto, estando todos conformes.

**Recomendações:**

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site [www.saude.gov.br/plataformabrasil](http://www.saude.gov.br/plataformabrasil)).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

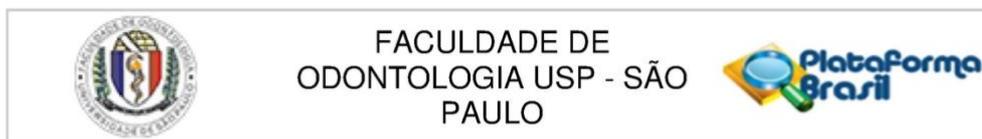
Não há pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_888126.pdf	17/07/2017 13:33:24		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	17/07/2017 13:32:33	Ericka Tavares Pinheiro	Aceito
Cronograma	cronogramadeduracaodapesquisa.docx	17/07/2017 13:32:11	Ericka Tavares Pinheiro	Aceito

**Endereço:** Av Prof Lineu Prestes 2227  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br



Continuação do Parecer: 2.201.768

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodeconsentimentolivre esclarecido.pdf	14/06/2017 14:54:21	Ericka Tavares Pinheiro	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Ericka_2017.pdf	16/05/2017 16:25:28	Laura Cristina Leite Nardello	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 04 de Agosto de 2017

---

**Assinado por:**  
**Maria Gabriela Haye Biazevic**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av Prof Lineu Prestes 2227  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br



## ANEXO B – Protocolo de desinfecção do campo operatório

1. Após a anestesia do dente, proceder com o isolamento absoluto com grampo metálico e barreira gengival
2. Com uma broca esférica diamantada, esterilizada, montada em motor de alta-rotação, remover todo o material restaurador (definitivo e temporário), tecido cariado, e esmalte sem suporte de dentina, evitando trepanar a câmara pulpar. Utilizar apenas irrigação com soro fisiológico esterilizado através de seringa descartável
3. Com um swab esterilizado, realizar a desinfecção do campo operatório com água oxigenada 30% de forma excêntrica, iniciando pela coroa dentária em direção ao arco de isolamento
4. Com outro swab esterilizado, proceder, da mesma forma, com a desinfecção com NaOCl 2,5%
5. Concluir a cirurgia de acesso com novas brocas esterilizadas e soro fisiológico
6. Realizar nova desinfecção do campo com swabs esterilizados, água oxigenada 30% e NaOCl 2,5%
7. Neutralizar o NaOCl com um swab embebido em tiosulfato de sódio 5% por um minuto
8. Com um cone de papel esterilizado, coletar uma amostra da parede interna da cirurgia de acesso, atentando para não introduzir o cone na câmara pulpar (controle de assepsia do campo operatório).



## ANEXO C – Procedimentos de coletas de bactérias do canal radicular

1. Com auxílio de seringa descartável e agulha endodôntica de 30G Endo-EZE (Ultradent Products Inc), preencher o canal radicular com soro fisiológico esterilizado.
2. Aspirar a solução da câmara pulpar, mantendo somente a solução no interior do canal radicular
3. Introduzir um instrumento tipo H número 15 até o CRT e, com movimentos suaves de limagem contra as paredes, suspender o conteúdo microbiano da dentina na solução
4. Com auxílio de uma pinça hemostática, fraturar a lima entre a parte ativa e a porção intermediária
5. Depositar a parte ativa da lima em um microtubo de 1,5mL contendo solução de transporte RNA later
6. Introduzir um cone de papel número 15 até o CRT, mantendo-o em posição por um minuto
7. Depositar este cone no mesmo microtubo no qual foi depositada a parte ativa da lima
8. Repetir o procedimento de coleta com 4 novos cones de papel, mantendo-os individualmente no CRT por 1 minuto cada
9. Depositar estes cones no mesmo microtubo no qual foi depositada a parte ativa da lima

OBSERVAÇÃO: nas coletas realizadas após o uso de alguma substância química, deve-se neutralizar a substância e secar o canal antes de se proceder com os procedimentos de coleta.

## ANEXO D – Procedimentos laboratoriais

**1) EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO**

1. Manter os microtubos contendo as amostras no gelo até o completo descongelamento do meio de transporte
2. Homogeneizar cada amostra em agitador de vortex durante 1min a fim de desprender a maior quantidade possível de bactérias na solução
3. Centrifugar as amostras em centrífuga refrigerada a 4°C e 13.000RPM por 10min
4. Em um tubo tipo Falcon de 15mL estéril, preparar uma mistura de 300µL de Tissue e Cell Lysis (MasterPure DNA purification kit - Epicentre) e 2µL de Proteinase K (Life Technologies Corp), em volume necessário para a quantidade de amostras a ser analisada, com sopro (MIX-1)
5. Remover as amostras da centrífuga e, com auxílio de pipetas de 1000µL, descartar o sobrenadante mantendo o pellet
6. Adicionar 300µL do MIX-1 a cada amostra
7. Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 10s
8. Aquecer as amostras em banho-Maria a 65°C por 15 min, misturando-as em agitador de vortex por 10s a cada 5min
9. Esfriar as amostras em gelo por 5min
10. Adicionar 150µl de MPC Protein precipitation reagent (MasterPure DNA purification kit - Epicentre) a cada amostra
11. Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 10s
12. Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 10min

13. Transferir o sobrenadante para microtubos de 1,5mL, esterilizados e devidamente identificados, e descartar o microtubo contendo o pellet
14. Adicionar mais 25µl de MPC Protein precipitation reagent a cada amostra
15. Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 10s
16. Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 10min
17. Transferir o novo sobrenadante para novos microtubos de 1,5mL, esterilizados e devidamente identificados, e descartar o microtubo contendo o pellet
18. Adicionar 500µL de isopropanol 100% a cada microtubo e invertê-los 30/40 vezes
19. Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 10min
20. Descartar o isopropanol, com pipetas e ponteiras de 1000µL, atentando para não remover o pellet
21. Acrescentar 500µL de etanol 70% ao pellet
22. Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 10s
23. Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 5min
24. Retirar parte do etanol 70%, deixando apenas cerca de 50µL no fundo do microtubo
25. Centrifugar novamente a 4°C e 13.000RPM por 5min
26. Remover totalmente o etanol 70% com ponteiras de 200µL
27. Manter os tubos abertos em temperatura ambiente para evaporar o remanescente de etanol
28. Adicionar 35µL de TEBuffer (Life Technologies Corp) em cada amostra
29. Hidratar as amostras, mantendo-as no gelo ou, preferencialmente, no termomixer (Eppendorf, Hauppauge, NY, EUA) a 4°C por 10 minutos

30. Analisar a concentração de ácidos nucleicos no espectrofotômetro (NanoDrop 1000 – Thermo Fisher Scientific).

## **2) DIVISÃO DAS AMOSTRAS DNA/RNA**

1. Hidratar as amostras no termomixer por 10 min a 10°C
2. Dividir as amostras em 2
3. 17,5uL em um microtubo denominado com o número da amostra + RNA
4. O outro microtubo com os 17,5uL restantes ficará destinado a portar o DNA
5. Guardar o microtubo DNA

## **3) PRIMEIRA PURIFICAÇÃO DO RNA COM DNase**

1. Em um microtubo limpo, misturar 2uL de DNase I, Amp Grade e 2uL de 10X DNase I Reaction Buffer para cada amostra.
2. Acrescentar 3,4uL do MIX em cada amostra de RNA
3. Aguardar 30 min em temperatura ambiente para degradar o DNA
4. Adicionar 200uL de 2x T&C Lysis Solution
5. Agitar no vortex por 5s
6. Manter no gelo 5min
7. Adicionar 200uL de MPC

8. Agitar no Vortex por 10s
9. Centrifugar (4°C 13.000RPM) por 10min
10. Transferir o sobrenadante para microtubos limpos e devidamente identificados conforme a amostra
11. Descartar o pellet
12. Adicionar 500uL de isopropanol
13. Inverter as amostras 30-40 vezes
14. Centrifugar (4°C 13.000RPM) por 10min
15. Retirar o isopropanol sem deslocar o pellet
16. Lavar o pellet com 500uL de etanol 70%
17. Vortexar por 10s
18. Centrifugar (4°C 13.000RPM) por 5min
19. Retirar o etanol 70% com uma ponteira de 1000uL, mantendo cerca de 50uL no fundo da microtubo
20. Centrifugar (4°C 13.000RPM) por 5 min
21. Secar o etanol 70% com uma ponteira de 200uL

#### **4) SEGUNDO PROCESSO DE LISE DO DNA DA AMOSTRA DE RNA**

Realiza-se este segundo processo de lise para garantir que todo o DNA seja extraído das amostras de RNA.

1. Acrescentar em cada tubo 1uL de DNase I, Amp Grade, 1 U/ $\mu$ L (Invitrogen) , 1uL10X DNase I Reaction Buffer (Invitrogen) de e 10uL de DEPC – treated water (Invitrogen)
2. Encubar as amostras por 15 minutos em temperatura ambiente;
3. Inativar a DNase com a adição de 1 $\mu$ L de EDTA 25mM (Invitrogen);
4. Levar ao banho-Maria a 65<sup>o</sup> C por 10 minutos. As amostras estão prontas para serem analisadas por PCR convencional, e para o uso em transcriptase reversa, antes da amplificação.
5. Analisar cada amostra no Nano Drop.

OBS: O PCR convencional foi realizado para conferir se as amostras são puras de RNA, verificando se ha, na amostra, DNA contendo genes 16s (universal).

## **5) QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS EM UMA AMOSTRA COM O NANODROP**

1. Ligar o aparelho do NanoDrop
2. Abrir o software ND-1000
3. Selecionar cidos Nucleicos
4. Abrir o leitor do aparelho e limpar a plataforma de leitura e o leitor com água, secar bem com um guardanapo macio
5. Gotejar 1uL de gua Milli-Q sobre o orifício de leitura
6. Clicar em OK no computador

7. Abrir o leitor, secar as superfícies de leitura e gotejar 1uL da solução utilizada como solvente (no caso deste experimento, é o DPEC water)
8. Clicar em “Blank”
9. Abrir novamente o leitor, secar as superfícies de leitura, gotejar 1uL da amostra a ser analisada e clicar em “Measure”
10. Repetir o passo anterior com todas as amostras.

## **6) PCR CONVENCIONAL**

A reação descrita a seguir foi padronizada para detecção de DNA bacteriano com uso de primers universais específicos para o domínio Bacteria. O volume total de cada reação é de 50 $\mu$ L, sendo o tamanho do produto de amplificação de 1500pb.

Para evitar contaminação das amostras de DNA, todos os procedimentos foram realizados em câmaras de fluxo laminar específicos para realização de PCR. Todos os materiais utilizados, com exceção dos tubos contendo as amostras e os reagentes, foram abertos dentro da câmara e permaneceram em seu interior durante o processo de desinfecção com luz ultravioleta.

1. Manter os tubos contendo as amostras em gelo até o completo descongelamento da solução
2. Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 15s
3. Centrifugar as amostras por 5 segundos em 1200RPM para coletá-las no fundo do microtubo

4. Em uma estante resfriada para PCR, posicionar microtubos de 200 $\mu$ L, em número suficiente para a quantidade de amostras, controle positivo e controle negativo da reação, identificando-os devidamente
5. Em um microtubo de 1,5mL realizar uma mistura (MIX-2), com volume suficiente para todas as amostras, controles positivo e negativo da reação, dos seguintes reagentes nas respectivas proporções:

Para bactérias totais:

- |  |              |
|--|--------------|
| • PCR Buffer (Life Technologies Corp)                      | 5 $\mu$ L    |
| • Mg <sup>2+</sup> para PCR (Life Technologies Corp)       | 3 $\mu$ L    |
| • dNTP de trabalho (2,5mM; Life Technologies Corp)         | 4 $\mu$ L    |
| • Taq polimerase (Life Technologies Corp)                  | 0,4 $\mu$ L  |
| • Ultrapure water  | 15,6 $\mu$ L |
| • Primer universal Forward (Exxtend, Paulínia, SP, Brasil) | 10 $\mu$ L   |
| • Primer universal Reverse (Exxtend, Paulínia, SP, Brasil) | 10 $\mu$ L   |

6. Depositar 48 $\mu$ L do MIX-2 em cada microtubo de 200 $\mu$ L
7. Adicionar 2 $\mu$ L de cada amostra no respectivo microtubo
8. Adicionar 2 $\mu$ L da amostra de DNA/RNA correspondente ao controle positivo no respectivo microtubo
9. No tubo a ser utilizado como controle negativo, adicionar 2 $\mu$ L de Ultrapure water.

## 6.1 AMPLIFICAÇÃO DO DNA EM TERMOCICLADOR

- Homogeneizar as soluções nos tubos para PCR em mini-centrífuga por 2s
- Posicionar as microtubos no termociclador (T-100 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA) e programar a corrida conforme descrito:

Para *Streptococcus species*: denaturação inicial a 95°C por 2 min, seguido por 30 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72 °C por 2,5 min e extensão final a 72°C por 10 min.

Para *Enterococcus faecalis*: denaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido por 30 ciclos a 95°C por 1 min, 68°C por 1 min, 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 7 min.

Para *Propionibacterium acnes*: denaturação inicial a 94°C por 2 min, seguido por 45 ciclos a 94°C por 30 s, 54°C por 1 min, 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 7 min.

## 6.2 ELETROFORE EM GEL DE AGAROSE

- Em um Becker contendo 80mL de tampão TAE 1X (0,8mL de TAE 50X + 39,2mL de H<sub>2</sub>O), acrescentar 0,56g de agarose
- Levar ao micro-ondas por aproximadamente 45s, misturando a cada 20s sem levantar fervura

- Aguardar esfriar um pouco e acrescentar 4 $\mu$ L de GelRed (Biotium Inc, Haiyward, CA, USA)
- Despejar o gel de agarose ainda líquido em um suporte para eletroforese grande e posicionar o pente com o tamanho de casas apropriado
- Aguardar o líquido geleificar (aproximadamente 15 minutos)
- Remover o pente, e posiciona o suporte na cuba de eletroforese (BioRad Laboratories Inc.), com as casas voltada para o pólo negativo (fio preto)
- Encher a bandeja, cobrindo totalmente a placa de gel, com a solução de corrida (TAE 1X)
- Em um papel plastificado, depositar gotas de 2 $\mu$ L de tampão de corrida (Loading buffer), em quantidade igual ao número de amostras, incluindo os controles positivo e negativo, mais um, que será utilizado como marcador da eletroforese
- Misturar 5 $\mu$ L de marcador Mass Ladder 1kb (Life Technologies) à uma gota de corante e, com a mesma ponteira, levar a solução misturada à primeira casa da placa de gel de agarose
- Repetir o passo anterior para cada amostra, substituindo o marcador por 5 $\mu$ L de amostra
- Fechar a bandeja e conectá-la ao aparelho;
- Ligar o aparelho, ajustando a voltagem em 80V e 200mA e o timer em 40 minutos. Após a corrida, proceder com a leitura e documentação fotográfica do gel em luz ultravioleta.