

FERNANDA PINHEIRO BRUNO

**Prevalência, quantificação e viabilidade de *Propionibacterium acnes*
nos canais radiculares de dentes com periodontite apical
antes e após os procedimentos endodônticos de desinfecção:
estudo molecular baseado em RNA e DNA**

São Paulo

2018

FERNANDA PINHEIRO BRUNO

**Prevalência, quantificação e viabilidade de *Propionibacterium acnes*
nos canais radiculares de dentes com periodontite apical
antes e após os procedimentos endodônticos de desinfecção:
estudo molecular baseado em RNA e DNA**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Mestre em Odontologia.

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

Bruno, Fernanda Pinheiro.

Prevalência, quantificação e viabilidade de *Propionibacterium acnes* nos canais radiculares de dentes com periodontite apical antes e após os procedimentos endodônticos de desinfecção: estudo molecular baseado em RNA e DNA / Fernanda Pinheiro Bruno ; orientador Ericka Tavares Pinheiro. -- São Paulo, 2018.

79p. : fig., graf. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Endodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Periodontite periapical. 2. Canal radicular. 3. Teste de Wilcoxon. 4. Medicação endodôntica intracanal. I. Pinheiro, Ericka Tavares. II. Título.

Bruno FP. Prevalência, quantificação e viabilidade de *Propionibacterium acnes* nos canais radiculares de dentes com periodontite apical antes e após os procedimentos endodônticos de desinfecção: estudo molecular baseado em RNA e DNA.
Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 06 / 07 /2018

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Angela Toshie Araki Yamamoto

Instituição: Universidade Cruzeiro do Sul Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Ellen Sayuri Ando Suguimoto

Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas – USP

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a).Flaviana Bombarda de Andrade

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo- Campus Bauru – USP

Julgamento: Aprovada

Dedico esse trabalho primeiramente à Deus, porque sem ele nada disso seria possível. Ele confiou a mim a missão de cumprir mais essa tarefa e graças ao teu amor e misericórdia e a concluí.

Dedico também aos meus pais Suely Bruno e Romeu Bruno e aos meus irmãos Charles Bruno e Thiago Bruno por acreditarem no meu sonho e por sonharem ele comigo, amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Sou eternamente grata a Deus, não apenas por permitir que concluísse mais essa etapa da minha vida Profissional, mas agradeço por todas as bênçãos que recebi e recebo todos os dias, começando com a graça de estar viva permitindo que eu possa adorá-lo todos os dias da minha vida. Obrigada Senhor por conceder a mim saúde e vigor para lutar por esse sonho que hoje se transforma em realidade.

Muito obrigada aos meus pais Suely Bruno e Romeu Bruno por serem quem são para mim. Sem sombra de dúvidas se hoje cheguei aqui devo com certeza isso também a vocês. Obrigada pelos olhares e palavras de conforto e incentivo quando a força física parecia se esvaír, vocês me mantiveram em pé e motivaram para que eu alcançasse este momento. Obrigada por cuidarem de mim e da nossa família. Que o amor de Deus seja sempre o elo entre nós, amo vocês com o melhor que há em mim.

Agradeço ao meu querido João Paulo Ribeiro por ter sido tão paciente comigo e com minhas escolhas durante o período do mestrado. Seu tom manso, sua voz de calma em meio ao meu choro fez com que eu retornasse ao eixo em todos os momentos de tensão. Mostrando que as ferramentas que eu precisava estavam dentro de mim, e ninguém, a não ser eu seria capaz de usá-las para solucionar os meus problemas. Obrigada Love.

Agradeço aos meus irmãos Charles Bruno e Thiago Pinheiro Bruno por torcerem, orarem e se orgulharem de mim e da mulher que me tornei. Essa vitória também é de vocês.

Agradeço minha orientadora, Profa. Dra. Ericka Tavares Pinheiro, por me dar a oportunidade de ser sua aluna e parceira de trabalho. Agradeço seu empenho, dedicação seu olhar zeloso e criterioso para mim e nosso trabalho. Hoje sou capaz de dizer que sou uma profissional melhor e mais cautelosa graças aos anos de convivência no ambiente acadêmico desde a época da Iniciação Científica como uma jovem sonhadora até aqui como Mulher e Mestre. Saiba que tenho orgulho em dizer que fui sua aluna desde sempre. Me atrevo a dizer que a melhor forma de demonstrar minha gratidão é desejar as bênçãos de Deus para sua vida e a vida dos seus.

Agradeço aos meus amigos Ezequias Rodrigues e Mariana Reis por todo incentivo nessa caminhada que vocês tomaram para si junto comigo, amo vocês.

Agradeço aos amigos de equipe Alexandre Pinheiro, Carlos Nogales, Fernanda Fernandes, Lais C. Prado, Laura Nardello, Luiza Paz e Roberto Romero pela amizade e companheirismo começando na rotina clínica, passando pelo laboratório e transpondo os muros da universidade. Obrigada por tudo meus queridos.

Agradeço a Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer por ceder os equipamentos do Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para que parte deste trabalho fosse realizada. E a todos os funcionários e alunos por sempre estarem disponíveis para me ajudar sempre que eu precisava.

Agradeço ao Prof. Dr. Vitor Arana Chavez por permitir que parte dos meus experimentos fossem realizados no Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Agradeço aos técnicos que sempre se mostraram solícitos a me ajudar.

Agradeço também aos professores da disciplina de Endodontia da FOU SP, Prof. Dr. Giulio Gavini, Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira, Prof. Dr. José Luiz da Silva Lage Marques, Prof. Dr. Manoel Eduardo Lima Machado, Prof. Dr. Marcelo dos Santos, Prof. Dr. Igor Prokopowitsch, Profa. Dra. Mary Caroline Skelton Macedo, Profa. Dra. Carla Renata Sipert, por todo o conhecimento compartilhado e seus conselhos quanto à vivência clínica, bem como acadêmica.

Agradeço aos meus amigos de pós-graduação, Alexandre Pinheiro Lima Carvalho, Carlos Nogales, Caroline Santos, Claudia Caroline Bosio Meneses, Ellen Binoto, Hector Caballero Flores, Hermano Paiva, J. Edgar Valdivia, Juliana Marques, Lais C. Prado, Laís Pizzatto, Laura Nardello, Luiza Paz, Marco André Craveiro, Roberto Romero, Sandra Kuhne por todos os momentos compartilhados e por todo apoio, seja no âmbito acadêmico ou fora dele.

Agradeço pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de auxílio regular, processo FAPESP 2016/15473-0, fundamental para o desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço com muito carinho a todos os alunos de graduação por me respeitarem e por trocarem experiências comigo. Foram mais do que simplesmente alunos, tornaram-se amigos que respeito e que tenho prazer em conversar e ainda partilhar momentos e situações.

"Porque onde está o teu tesouro, aí estará também o teu coração"

Mateus 6.21

RESUMO

Bruno FP. Prevalência, quantificação e viabilidade de *Propionibacterium acnes* nos canais radiculares de dentes com periodontite apical antes e após os procedimentos endodônticos de desinfecção: estudo molecular baseado em RNA e DNA [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

O objetivo deste estudo foi avaliar a taxa de detecção, quantidade e atividade metabólica de *Propionibacterium acnes*, antes e após os procedimentos endodônticos de desinfecção, utilizando métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA. Foram selecionados 22 pacientes com necrose pulpar e periodontite apical assintomática. Amostras microbiológicas foram coletadas dos canais radiculares após a cirurgia de acesso (S1), após o preparo químico-cirúrgico realizado com Sistema Reciproc e NaClO₂ 2,5% (S2) e após medicação intracanal com Ca(OH)₂ por 14 dias (S3). As amostras dos canais radiculares foram submetidas à extração de DNA e RNA. O RNA foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) para confecção de DNA complementar (cDNA). DNA e cDNA foram submetidos a reações de qPCR utilizando iniciadores complementares à sequência de 16S rRNA de *P. acnes*. O efeito dos procedimentos endodônticos na redução bacteriana foi determinado por qPCR baseada em rDNA. A atividade metabólica bacteriana foi calculada pela razão rRNA/rDNA baseados nos dados dos ensaios de qPCR. Os dados foram analisados pelo teste de Wilcoxon para análise entre as amostras e teste de McNemar para comparação da taxa de detecção dos métodos baseados em rDNA e rRNA, com nível de significância de 5%. A taxa de detecção de *P. acnes* nas amostras endodônticas foi maior pelo método baseado em rRNA do que pelo método baseado em rDNA ($P < 0,0001$). *P. acnes* foi detectado em 36,4% (8/22) e 90,9% (20/22) das amostras S1 utilizando qPCR baseado em rDNA e rRNA, respectivamente. Nas amostras S2, *P. acnes* foi detectado em 36,4% (8/22) das amostras utilizando o método baseado em rDNA e em 86,4% (19/22) pelo método baseado em rRNA. Nas amostras S3, *P. acnes* persistiu em níveis detectáveis em todas as amostras positivas em S2. Na análise quantitativa, o nível médio de *P. acnes* foi $1,28 \times 10^3$ cópias de rDNA nas amostras S1. Não houve uma alteração

significante dos níveis bacterianos nas amostras S2 e S3 quando comparadas às amostras S1 ($P > 0,05$). O número de cópias de rRNA foi maior do que o de rDNA em todas as amostras ($P < 0,0001$). Em S1, o valor mediano da razão rRNA/rDNA foi 7,93 (intervalo de 2,03 a $2,04 \times 10^2$). Essa razão permaneceu positiva em S2 (mediana 16,40, intervalo de 2,21 a $4,87 \times 10^2$) e S3 (mediana 25,34, intervalo de 0,58 a $1,05 \times 10^3$), sem diferença estatística na comparação entre as amostras S1-S2 e S2-S3 (ambos $P > 0,05$). Baseados nesses achados, concluiu-se que o ensaio de qPCR baseado em rRNA revelou uma alta prevalência de *P. acnes* nas infecções endodônticas primárias e que este permaneceu metabolicamente ativo nos canais radiculares após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal.

Palavras-chave: Periodontite Apical. *Propionibacterium acnes*. Tratamento endodôntico. PCR quantitativo. RT-PCR quantitativo.

ABSTRACT

Bruno FP. Prevalence, quantification and viability of *Propionibacterium acnes* in root canals of teeth with apical periodontitis before and after endodontic disinfection procedures: RNA- and DNA-based molecular study [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Corrected Version

This study aimed to evaluate the detection rate, quantity and metabolic activity of *Propionibacterium acnes* before and after endodontic disinfection procedures using RNA- and DNA-based molecular methods. Twenty-two patients with pulp necrosis and asymptomatic apical periodontitis were selected. The microbiological samples were collected from the root canals after access cavity (S1), after the chemo-mechanical preparation performed with the Reciproc System and NaClO₂ 2.5% (S2) and after intracanal medication with Ca(OH)₂ for 14 days (S3). The root canal samples were submitted to DNA and RNA extraction. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using the reverse transcription reaction. cDNA and genomic DNA were subjected to qPCR with primers complementary for *P. acnes* 16S rRNA sequence. The effect of endodontic procedures on bacterial reduction was determined by rDNA-based qPCR. The bacterial metabolic activity was calculated by the rRNA / rDNA ratio based on qPCR assays. Data were analysed by the Wilcoxon test for analysis between samples and McNemar test for detection rate of RNA- and DNA-based molecular methods, with a significance level of 5%. The detection rate of *P. acnes* in endodontic samples was higher by the rRNA-based method than by the rDNA-based method ($P < 0.0001$). *P. acnes* was detected in 36.4% (8/22) e 90.9% (20/22) of the S1 samples using on rDNA- and rRNA- based qPCR, respectively. In S2 samples, *P. acnes* was detected in 36.4% (8/22) of the samples using the rDNA based method and 86.4% (19/22) by the rRNA based method. In S3 samples, detectable levels of *P. acnes* persisted in all S2-positive samples. Quantitative analysis of S1 samples revealed that the mean level of *P. acnes* was 1.28×10^3 rDNA copies per sample. There was no significant change in bacterial levels in S2 and S3 samples when compared to S1 samples ($P > 0.05$). The number of rRNA copies was greater than the rDNA ones in all samples ($P < 0.0001$). In S1, the median value of the rRNA / rDNA ratio was 7.93 (range: 2.03 - 2.04×10^2). This ratio remained

positive in S2 samples (median 16.40, range: 2.21 - 4.87 x 10²) and in S3 (median 25.34, range: 0.58 - 1.05 x 10³), with no statistical difference in the comparisons between S1-S2 and S2-S3 samples (both P > 0.05). Based on these findings, it was concluded that the rRNA-based qPCR assay revealed a high prevalence of *P. acnes* in primary endodontic infections and that it remained metabolically active in the root canals after chemical-surgical preparation and intracanal medication.

Keywords: Apical Periodontitis. *Propionibacterium acnes*. Endodontic treatment. Quantitative PCR. Quantitative RT-PCR.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

=	Igual
>	Maior
<	Menor
μL	Microlitro
μm	Micrometro
Ca(OH)_2	Hidróxido de cálcio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
H	Hora
MgCl_2	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NaClO^-	Hipoclorito de sódio
NiTi	Níquel-Titânio
nM	nanoMol
Pb	pares de base
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PUI	Irrigação ultrassônica passiva
qPCR	Reação de polimerase em cadeia quantitativa
rDNA	Gene 16S rRNA
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
TE	Tris + EDTA

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	Bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção: estudos clínicos analisados por métodos moleculares baseados em rDNA (gene 16S <i>rRNA</i>)	25
2.2	Métodos moleculares baseados em <i>rRNA</i> (RNA ribossômico)	34
3	PROPOSIÇÃO	37
3.1	Objetivo Geral	37
3.2	Objetivos específicos	37
3.3	Hipótese de nulidade	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	Aspectos éticos	39
4.2	Procedimentos e coletas clínicas	39
4.2.1.	Seleção de pacientes	39
4.2.2.	Coletas microbiológicas e procedimentos clínicos	40
4.3	Análise microbiológica	44
4.3.1	Extração de DNA/RNA e síntese do cDNA	44
4.3.2	Análise quantitativa e da atividade metabólica de <i>P. acnes</i>	45
4.4	Análise estatística	45
5	RESULTADOS	47
5.1	Taxa de detecção de <i>P. acnes</i> antes e após os procedimentos endodônticos utilizando ensaios de qPCR baseados em rDNA e rRNA	47
5.2	Níveis de em rDNA e rRNA de <i>P. acnes</i> antes e após os procedimentos endodônticos utilizando ensaios de qPCR	48
5.3	Atividade metabólica de <i>P. acnes</i> antes e após os procedimentos endodônticos	50

6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS.....	57
	APÊNDICES	63
	ANEXO	73

1 INTRODUÇÃO

O objetivo do tratamento endodôntico de dentes com polpa necrosada é reduzir o máximo possível os micro-organismos do sistema de canais radiculares, tendo em vista que estes são os agentes etiológicos da periodontite apical (Kakehashi et al., 1965). As bactérias estão presentes na forma de biofilme aderido às paredes dos canais radiculares e no interior dos túbulos dentinários (Ricucci; Siqueira, 2010). Portanto, para promover a redução bacteriana é necessário desorganizar essa estrutura por meios mecânicos, deixando as bactérias mais vulneráveis à ação química dos agentes antimicrobianos utilizados durante os procedimentos endodônticos. Estudos clínicos mostram que embora o preparo químico-cirúrgico e a medicação intracanal reduza os níveis microbianos dos canais radiculares, muitos casos permanecem infectados. A infecção persistente após os procedimentos endodônticos pode culminar no insucesso do tratamento se essas bactérias alcançarem os tecidos periapicais em concentrações suficientes para induzir o processo inflamatório desses tecidos (Siqueira; Rôças, 2008).

Estudos utilizando métodos dependentes de cultura demonstraram que as bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas são as mais prevalentes após os procedimentos de modelagem, limpeza e desinfecção dos canais radiculares. *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria* são os filos bacterianos mais comumente encontrados nesses casos, demonstrando que estes são mais resistentes a mudanças de ambiente ocasionadas pelo tratamento endodôntico do que os outros membros da comunidade microbiana. Especificamente, uma das espécies bacterianas mais encontradas após instrumentação e medicação de canais radiculares é *Propionibacterium acnes* (Siqueira; Rôças, 2008).

Embora o método de identificação bacteriana por cultura tenha como vantagem a possibilidade de identificar espécies viáveis, essa técnica possui limitações importantes, como a baixa sensibilidade e a impossibilidade de cultivar grande número de espécies bacterianas. Conhecendo as limitações do método de cultura, métodos moleculares independentes de cultura foram propostos para determinação da diversidade microbiana em infecções endodônticas. Esses métodos possibilitaram um aumento no número de filos bacterianos reconhecidos nas

infecções endodônticas devido a sua maior especificidade, sensibilidade e acurácia na identificação microbiana. Além disso, esses métodos permitem a detecção de espécies microbianas não cultiváveis, que correspondem a mais de 50% da microbiota dos canais radiculares (Siqueira; Rôças, 2009).

Para identificação bacteriana por métodos moleculares, o gene alvo deve conter regiões únicas para cada espécie bacteriana. O alvo mais utilizado para esse fim é o gene 16S *rRNA* (rDNA). Esses genes codificam moléculas de RNA ribossômico (rRNA). Considerando que cada bactéria possui poucas cópias do gene 16S *rRNA*, os dados da sequência desse gene podem ser usados tanto para identificação quanto para quantificação bacteriana (Siqueira; Rôças, 2005). Entretanto, vale ressaltar, que os estudos moleculares baseados em rDNA também apresentam uma limitação, que é a não distinção entre as células vivas e mortas. Esse fato pode comprometer a avaliação dos procedimentos de desinfecção, levando a uma superestimação da quantidade de bactérias persistentes após o tratamento (Siqueira; Rôças, 2005).

Para solucionar esse problema, métodos moleculares baseados na detecção do próprio RNA ribossômico (rRNA) têm sido indicados para o estudo das infecções endodônticas, por ser este um indicador de atividade metabólica dos microorganismos. Porém, esses métodos não possibilitam a quantificação absoluta das bactérias, pois os níveis de rRNA variam fortemente dependendo do estado fisiológico da célula. Devido às limitações de cada método, estudos recentes têm proposto uma associação dos métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA (genes rRNA) para uma avaliação simultânea da viabilidade e abundância das bactérias em uma comunidade bacteriana (Campbell et al., 2011; Pitkänen et al., 2013; Pinheiro et al., 2015). Além disso, a razão rRNA/rDNA poderá fornecer dados sobre atividade metabólica de diferentes bactérias, que pode variar de dormente a altamente metabólica. Até o presente momento, estudos moleculares investigando a atividade metabólica da microbiota persistente são escassos na literatura endodôntica (Pinheiro et al., 2015). Portanto, o presente estudo visou aprofundar o conhecimento da microbiota que persiste após os procedimentos de desinfecção utilizando métodos moleculares baseados em rDNA e rRNA.

Baseado na revisão da literatura, observou-se que maioria dos estudos moleculares avaliando a microbiota endodôntica foram baseados no gene 16SrRNA (rDNA). Nos estudos prévios, *P. acnes* foi uma das espécies bacterianas mais

prevalentes nas infecções endodônticas que persistem após os procedimentos endodônticos, além de *Streptococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, e *Fusobacterium nucleatum*. O presente estudo investigou a participação de *P. acnes* nas infecções endodônticas primárias e sua suscetibilidade aos procedimentos endodônticos de desinfecção utilizando métodos baseados em rRNA e rDNA. Esses métodos permitiram o estudo de três aspectos importantes na análise das bactérias persistentes nos canais radiculares: prevalência, quantidade e atividade metabólica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nas últimas duas décadas, métodos moleculares independentes de cultura baseados em DNA e RNA bacteriano foram usados para estudo da microbiota que persiste aos procedimentos endodônticos de desinfecção. Neste tópico, serão revisados estudos clínicos com análise molecular independentes de cultura que avaliaram a microbiota dos canais radiculares antes e após os procedimentos endodônticos de desinfecção. Nos estudos utilizando métodos independentes de cultura, a análise da microbiota foi realizada por métodos moleculares qualitativos (PCR - *reação de polimerase em cadeia*), semi-quantitativos (hibridização DNA-DNA) ou quantitativos (qPCR - *reação de polimerase em cadeia quantitativa*). A análise da diversidade microbiana também foi realizada por sequenciamento genético em alguns estudos moleculares.

2.1 Bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção: estudos clínicos analisados por métodos moleculares baseados em rDNA (gene 16S *rRNA*)

Rôças e Siqueira (2011a) compararam a eficácia antimicrobiana do NaClO₂ 2,5% e clorexidina 0,12% quando utilizados como irrigantes durante o preparo químico-cirúrgico de 47 dentes com necrose pulpar e periodontite apical. Para detecção bacteriana foram utilizados PCR de amplo espectro e hibridização DNA-DNA de captura reversa para identificação bacteriana. Bactérias foram detectadas em todas as amostras iniciais dos canais radiculares. Os 2 protocolos de preparo químico-cirúrgico estudados promoveram redução significativa de bactérias dos canais radiculares. Entretanto, após o preparo químico-cirúrgico, bactérias foram detectadas em 60% dos casos no grupo do NaClO₂ 2,5% e 53% dos casos no grupo da clorexidina 0,12%. As espécies mais prevalentes após o preparo químico-cirúrgico foram: *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus* spp., *Porphyromonas endodontalis*, *Dialister invisus*, *Prevotella baroniae* e *Selenomonas sputigena*.

Rôças e Siqueira (2011b) avaliaram o efeito antimicrobiano do preparo químico-cirúrgico utilizando NaClO^- 2,5% como irrigante e da medicação intracanal com diferentes pastas de Ca(OH)_2 . Foram selecionados 24 dentes com necrose pulpar e periodontite apical, que foram divididos igualmente em 2 grupos de acordo com os medicamentos: Ca(OH)_2 / glicerina e Ca(OH)_2 / paramonoclorofenol canforado/ glicerina. Os medicamentos permaneceram no interior dos canais radiculares por 7 dias. Para detecção bacteriana foram utilizados PCR de amplo espectro e para identificação bacteriana foi utilizada a hibridização DNA-DNA de captura reversa. Do total de dentes avaliados, em 54% dos casos houve a permanência de infecção nos canais após o preparo químico-cirúrgico e 37,5% após o uso da medicação intracanal. Na análise intragrupo, houve redução significativa de reações PCR-positivas entre a coleta inicial e as realizadas após os procedimentos de desinfecção. Entretanto, não houve diferença entre as coletas realizadas após preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal. Da mesma forma, na análise entre os grupos, não houve diferença entre as medicações utilizadas. As bactérias mais presentes após os procedimentos endodônticos foram *P. acnes* e *Streptococcus* spp. Os autores concluíram que o número de espécies bacterianas foi substancialmente reduzido após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal. No entanto, a presença de níveis detectáveis de bactérias persistentes em muitos casos indica que deve-se buscar estratégias antimicrobianas mais efetivas durante o tratamento endodôntico.

Paiva et al. (2012) avaliaram os efeitos antimicrobianos do preparo químico-cirúrgico utilizando instrumentos rotatórios de níquel-titânio e desinfecção complementar com irrigação ultrassônica passiva (PUI; n= 13) ou uma irrigação final com clorexidina 2% (n= 14) em dentes com periodontite apical. Amostras foram coletadas antes e após preparo químico-cirúrgico com NaClO^- 2,5%, e então foram divididos em 2 grupos: grupo da PUI com ativação de NaClO^- 2,5% e irrigação com solução de clorexidina 2%. Nas coletas iniciais, todas foram positivas nas reações de PCR. No grupo da PUI, 9 (69%) casos foram positivos após o preparo químico-cirúrgico e 7 (54%) após a irrigação complementar. De modo similar, no grupo da irrigação com clorexidina, 9 (64%) dos casos foram positivos após o preparo químico-cirúrgico apresentaram positivos e 6 (43%) após a irrigação complementar. Deste modo, os procedimentos complementares de desinfecção utilizando PUI ou

irrigação final com clorexidina reduz o número de casos positivos nas análises moleculares.

Paiva et al. (2013a) avaliaram a redução microbiana após o preparo químico-cirúrgico, seguido por uma irrigação complementar e uma semana de medicação intracanal. Foram selecionados 14 dentes com periodontite apical. Coletas microbiológicas dos canais radiculares foram realizadas antes (S1) e após o preparo químico-cirúrgico com NaClO₂ 2,5% e irrigação adicional com EDTA 17% (S2), uma irrigação final com clorexidina (S3) e uma semana de medicação intracanal com pasta de CaOH₂ e clorexidina (S4). O rDNA foi extraído e foram realizadas análises de qPCR para redução microbiana e, em 3 casos, foi realizado sequenciamento genético para identificação de bactérias persistentes em S2 e S3. Todas amostras iniciais foram positivas, 50% dos casos continuaram positivos em S2 e S3 e 42% manteve-se positivo após S4. A mediana do número de células bacterianas foi de $8,16 \times 10^5$. Esse número diminuiu em S2 para uma mediana de $2,11 \times 10^3$. Em porcentagem de redução entre S1 e S2 houve uma redução de 98,8%. A irrigação complementar com clorexidina (S3) reduziu para uma mediana de $1,61 \times 10^3$, sendo essa redução de 70,1%. A medicação intracanal reduziu ainda mais sendo uma mediana de 0. Mais de 56% (14/25) das espécies/ filotipos detectados eram bactérias ainda não cultiváveis. *Streptococcus salivarius* foi detectado nas amostras. S2 de 2 dentes e *Eubacterium minutum* nas amostras S2 e S3 de um dente. Todas as outras espécies/ taxa foram encontradas em apenas em 1 caso e uma amostra. Deste modo, os passos complementares de desinfecção com irrigação final de clorexidina seguido de medicação de intracanal de CaOH₂ promoveu uma redução maior de bactérias do que os alcançados apenas pelos procedimentos químico-cirúrgico.

Paiva et al. (2013b) analisaram os efeitos antimicrobianos da PUI após o preparo químico-cirúrgico utilizando instrumentação rotatória de NiTi e irrigação de NaClO₂ 2,5%. Amostras foram coletadas de 10 dentes com periodontite apical antes do preparo químico-cirúrgico (S1), após o preparo químico-cirúrgico (S2) e após o PUI com NaClO₂ 2,5%. (S3). Então foram realizadas reações de: PCR de amplo espectro para detectar a presença de bactérias; qPCR para quantificar a redução microbiana; e sequenciamento para identificar a bactérias persistentes em 3 casos. Nas amostras iniciais todos os casos apresentaram-se positivos. Entretanto, após preparo químico-cirúrgico e PUI, 60% dos casos continuavam positivos. Em relação

a redução microbiana a média em S1 era de $2,21 \times 10^6$ e esse número diminuiu significativamente neste estudo em S2 para $2,01 \times 10^4$. Após o passo complementar da PUI essa média reduziu para $1,65 \times 10^4$ células bacterianas. Nas amostras S2 e S3, 4 taxa foram detectadas em 2 dentes: *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter gracilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *uncultured actinobacterium clone*. Todas as outras espécies/ taxa foram encontradas em apenas em 1 caso e um 1 amostra, com exceção de *Mogibacterium timidum*, que foi identificado em S2 e S3 de 1 dente. Deste modo, este estudo mostrou que o preparo químico-cirúrgico foi capaz de reduzir o número de casos positivos, o número de células bacterianas e a diversidade bacteriana. Em relação a PUI não foi possível observar redução microbiana significativa em relação ao preparo químico-cirúrgico.

Rôças et al. (2013) compararam a redução microbiana promovida por duas técnicas de instrumentação em 45 dentes com periodontite apical. O preparo químico-cirúrgico foi realizado com limas manuais ou rotatórias de NiTi utilizando NaClO 2,5% ou clorexidina 2% como solução irrigadora. As amostras dos canais radiculares, antes e após o preparo químico-cirúrgico incluindo a fase de irrigação final de acordo com a substância química auxiliar utilizada, foram analisadas por reações de qPCR. A instrumentação rotatória de NiTi resultou em menos casos com reações positivas (60%) quando comparada à instrumentação manual (95%). Entretanto, a análise quantitativa da redução bacteriana não revelou diferença entre as duas técnicas de instrumentação. Houve redução de $6,01 \times 10^6$ células bacterianas iniciais para $3,01 \times 10^4$ após a instrumentação manual dos canais radiculares. Da mesma forma, no grupo da instrumentação mecanizada, o número de bactérias reduziu de $9,89 \times 10^5$ para $5,65 \times 10^3$ células bacterianas. O preparo químico-cirúrgico realizado com limas manuais ou rotatórias de NiTi promoveram uma redução significativa de bactérias dos canais radiculares, considerando que os parâmetros de alargamento e irrigação foram similares entre os grupos.

Neves et al. (2014) avaliaram a redução bacteriana após o preparo dos canais radiculares utilizando o sistema SAF (*Self Adjusting File*) e limas manuais. Foram selecionados 50 dentes unirradiculares com necrose pulpar e periodontite apical. A análise quantitativa de bactérias foi realizada por qPCR e a identificação bacteriana por meio da hibridização DNA-DNA de captura reversa. Todas as amostras iniciais mostraram-se positivas para a presença de bactérias. Após o preparo químico-cirúrgico, 45,5% e 95,5% dos casos foram positivos no grupo SAF e no grupo de

limas manuais, respectivamente. O sistema SAF promoveu redução microbiana média de $1,6 \times 10^7$ células bacterianas nas coletas iniciais para $1,34 \times 10^4$ células bacterianas nas coletas após o preparo químico-cirúrgico incluindo a fase da irrigação convencional. As limas manuais de NiTi promoveram redução média de $5,67 \times 10^7$ células bacterianas nas coletas iniciais para $1,12 \times 10^5$ células bacterianas nas coletas após o preparo químico-cirúrgico incluindo a fase da irrigação convencional. As bactérias mais prevalentes após o preparo químico-cirúrgico foram *Bacteroidaceae [G-1] sp. oral taxon 272*, *D. invisus* e *Tanerella forsythia*. Deste modo, a instrumentação com o sistema SAF foi mais efetiva em reduzir o número de bactérias quando comparada à instrumentação com limas manuais. No entanto, como metade das amostras ainda tinham bactérias detectáveis após a instrumentação com SAF, a desinfecção complementar ainda se torna necessária para potencializar a redução de carga bacteriana.

Rôças et al. (2014) avaliaram a susceptibilidade de algumas bactérias ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo ao preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares em 25 dentes com periodontite apical. O preparo químico-cirúrgico com instrumentos rotatórios de NiTi, NaClO₂ 2,5% e complementados com irrigação final (EDTA 17% e NaClO₂ 2,5%) promoveu uma redução significativa de bactérias totais: $9,98 \times 10^5$ células bacterianas iniciais para $4,07 \times 10^3$ células bacterianas finais. O número de amostras qPCR- positivas após o preparo diminuiu de 25 para 16 (64%). As bactérias mais prevalentes nas coletas iniciais foram *Bacteroidaceae [G-1] sp oral taxon 272* (24%; $6,31 \times 10^3$) e *Fretibacterium fastidiosum* (20%; $1,7 \times 10^3$ cópias de DNA). Essas espécies/ taxa bacterianas também foram detectados após o preparo químico-cirúrgico, em menor prevalência e quantidade: *Bacteroidaceae [G-1] sp oral taxon 272* (4%; 4×10^2 cópias de DNA) e *F. fastidiosum* (4%; 1×10^2 cópias de DNA). Os achados confirmaram que bactérias ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo podem participar da microbiota associada à periodontite apical. *Bacteroidaceae [G-1] sp oral taxon 272* e *F. fastidiosum* foram os mais prevalentes, mas raramente como espécies/taxa dominantes da comunidade bacteriana. O preparo químico-cirúrgico foi altamente eficaz em eliminar completamente ou, pelo menos, reduzir substancialmente os níveis das bactérias estudadas.

Teles et al. (2014) avaliaram a redução bacteriana após o preparo químico-cirúrgico com NaClO₂ 3% incluindo a fase de irrigação final com ácido cítrico 10% e NaClO₂ 3% e após 14 dias de medicação intracanal utilizando CaOH₂ ou gel de

clorexidina 2% em 69 dentes com necrose pulpar. Após o preparo químico-cirúrgico, houve uma redução de 99,1% do número de bactérias na análise por qPCR. Entretanto, uma elevada quantidade de bactérias permaneceu nos canais radiculares após medicação intracanal nos 2 grupos. Na análise entre os grupos, o grupo do CaOH₂ apresentou menor número de bactérias ($2,2 \times 10^5$ cópias de DNA) quando comparado ao grupo da clorexidina ($9,1 \times 10^6$ cópias de DNA). Deste modo, os autores concluíram que a medicação intracanal não foi eficaz na redução bacteriana, mas a pasta de CaOH₂ apresentou uma melhor ação antibacteriana do que o gel de clorexidina 2%.

Ferreira et al. (2015) determinaram, por hibridização DNA-DNA, o perfil microbiológico de bactérias persistentes após o uso de CaOH₂ ou CaOH₂ associado à clorexidina como medicação intracanal em 20 dentes com infecções endodônticas primárias. As bactérias mais prevalentes foram: *C. ochracea* (70%) e *F. nucleatum ssp. vincentii* (70%) nas coletas iniciais; *Enterococcus faecium* (60%) nas coletas após preparo químico-cirúrgico; *F. nucleatum ssp. vincentii* (90%) e *E. faecium* (40%) nas coletas após a medicação intracanal. Os dois medicamentos testados reduziram o número de espécies bacterianas quando comparados às coletas iniciais dos canais radiculares. Porém, o número de espécies bacterianas persistentes foi menor no grupo do CaOH₂ associado à clorexidina. Os autores concluíram que CaOH₂ associado à clorexidina mostrou maior espectro de ação antibacteriano, porém não teve eficácia sobre *Enterococcus*, indicando que novas estratégias contra *Enterococcus* devem ser investigadas.

Gomes et al. (2015) compararam o perfil microbiano antes e após o preparo químico-cirúrgico com clorexidina gel 2% e solução salina em 15 dentes com lesões endo-periodontais. Na análise da microbiota por sequenciamento de nova geração, as espécies bacterianas mais detectadas após o preparo químico-cirúrgico foram: *E. faecalis*, *S. salivarius/vestibularis*, *Parvimonas micra*, *Prevotella nigrescens*, *Eubacterium brachy*, *Filifactor alocis* e *F. fastidiosum*. Os filos mais frequentemente encontrados foram: *Desulfobulbus* sp. oral taxon 041, *Stomatobaculum* sp oral taxon 373, *Peptostreptococcaceae* sp oral taxon 383 e *Erysipelothrichaceae* sp. oral taxon 905. Esses resultados revelaram a complexidade da comunidade bacteriana persistente após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares.

Provenzano et al. (2015) avaliaram a presença de ácidos graxos de cadeia curta e de bactérias específicas com potencial de produzir esses ácidos em canais

radiculares de 19 dentes com periodontite apical. As bactérias foram identificadas por qPCR em amostras coletadas antes e após preparo químico-cirúrgico e após 1 semana de medicação intracanal a base de CaOH_2 com paramonoclorofenol canforado e glicerina. Bactérias estavam presentes em 100% das amostras iniciais, em 71% dos casos após preparo químico-cirúrgico e em 47% das amostras após a medicação intracanal. *Streptococcus* spp. foram as espécies mais prevalentes após preparo químico-cirúrgico (65%) e após medicação intracanal (35%). O filo *Actinobacteria* também estava presente nas infecções endodônticas persistentes após o preparo (47%) e medicação intracanal (35%). Bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta, assim como seus produtos, foram detectadas nas amostras após os procedimentos endodônticos de desinfecção.

Rodrigues et al. (2015) compararam a redução bacteriana após o preparo químico-cirúrgico realizado com NaClO^- 2,5% e 2 sistemas de instrumentação, SAF (*Self Adjusting File*) ou TFA (*Twisted File Adaptive*), em 48 dentes com necessidade de retratamento endodôntico convencional. As amostras foram analisadas por qPCR para bactérias totais, *Streptococcus* spp. e *E. faecalis*. No grupo SAF, bactérias foram detectadas em 48% dos casos após o preparo químico-cirúrgico, numa média de $9,43 \times 10^2$ cópias de DNA; enquanto no grupo TFA, bactérias estavam presentes em 32% dos casos, em média $7,71 \times 10^1$ cópias de DNA. *Streptococcus* spp. foram detectadas em 43% dos casos do grupo SAF e em 27% do grupo TFA; enquanto *E. faecalis* não foi detectado nas amostras pós-tratamento. Portanto, ambos os sistemas de instrumentação foram eficientes na redução bacteriana, sem diferença significativa entre os 2 sistemas estudados em relação à desinfecção de dentes com periodontite apical e necessidade de retratamento endodôntico.

Neves et al. (2016) avaliaram a redução bacteriana promovida por 2 sistemas de preparo dos canais radiculares: um sistema de lima única com movimento reciprocante (Reciproc) e um sistema rotatório de múltiplas limas (BioRace) utilizando NaClO^- 2,5% como substância química auxiliar. Foram selecionados 60 dentes com periodontite apical assintomática. O DNA das amostras foi extraído e a redução dos níveis de bactérias totais e *Streptococcus* spp. foram avaliados por qPCR. Bactérias estavam presentes em níveis elevados em todas as coletas iniciais: $7,1 \times 10^5$ cópias de DNA para o grupo Reciproc e $1,31 \times 10^5$ para o grupo BioRace. Após o preparo químico-cirúrgico incluindo a etapa de irrigação final com EDTA 17% e NaClO^- 2,5%, permaneceram infectados 55% e 50% dos casos, com valores de

$7,05 \times 10^2$ e $6,03 \times 10^1$ cópias de DNA para os grupos Reciproc e BioRace, respectivamente. Ambos protocolos mostraram-se efetivos na redução dos níveis de *Streptococcus* spp. O estudo demonstrou após o preparo dos canais radiculares que o sistema recíprocante de lima única e o sistema rotatório de múltiplas limas foram efetivos na redução de bactérias em dentes com periodontite apical. Independente do sistema utilizado, aproximadamente metade dos dentes ainda apresentavam bactérias detectáveis por qPCR.

Rôças et al. (2016) compararam a atividade antimicrobiana do NaClO^- 2,5% e clorexidina 2% como substâncias químicas auxiliares durante o preparo químico-cirúrgico em 50 dentes com periodontite apical. A redução dos níveis de bactérias totais e *Streptococcus* spp. foi avaliada por qPCR. Bactérias foram detectadas em todas as amostras iniciais. Após o preparo químico-cirúrgico com NaClO^- 2,5% e clorexidina 2%, bactérias foram detectadas em 44% e 40% das amostras, respectivamente. Na análise quantitativa de bactéria totais, foi detectada uma média de $3,7 \times 10^5$ células bacterianas nas amostras iniciais e $1,49 \times 10^2$ células após o preparo químico-cirúrgico com NaClO^- 2,5%. No grupo da clorexidina 2%, foi detectada uma média de $8,77 \times 10^4$ e $2,81 \times 10^3$ células bacterianas nas amostras iniciais e após o preparo químico-cirúrgico, respectivamente. Na análise quantitativa de *Streptococcus* spp., ambos os protocolos foram efetivos em reduzir os níveis dessa espécie bacteriana. Os autores concluíram que não há diferença na efetividade antimicrobiana entre o NaClO^- 2,5% e clorexidina 2% como substâncias auxiliares no preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares.

Zandi et al. (2016) compararam a eficácia antimicrobiana do NaClO^- 1% e do Digluconato de clorexidina 2% nos casos de retratamento. Foram selecionados 67 dentes com necessidade de retratamento. Os dentes foram distribuídos em dois grupos randomizados. As amostras foram coletadas antes (S1) e após (S2) o preparo químico-cirúrgico fazendo a irrigação com NaClO^- ou clorexidina e após o uso da medicação intracanal de CaOH_2 com solução salina estéril por 25 dias (S3); para avaliar a redução microbiana foi realizado o teste qPCR. No grupo do NaClO^- nas amostras iniciais uma média de $7,96 \times 10^4$ células bacterianas apresentavam-se nas amostras. Após o preparo químico-cirúrgico houve redução média de $2,95 \times 10^2$ e após a medicação intracanal observaram um aumento na média de $3,52 \times 10^2$ células bacterianas quando comparados ao preparo químico-cirúrgico. No grupo clorexidina antes do preparo químico-cirúrgico foram detectadas

uma média de $5,37 \times 10^5$ células bacterianas, após o preparo químico-cirúrgico houve redução média de $1,10 \times 10^3$ e após o uso da medicação intracanal, os autores observaram um aumento médio de $1,95 \times 10^3$ bactérias quando comparados ao preparo químico-cirúrgico. O NaClO^- e a clorexidina reduziram a quantidade de bactérias na infecção intracanal. A medicação intracanal com CaOH_2 reduziu o número de casos com infecção persistente, porém resultou em carga bacteriana maiores nos casos positivos.

Rodrigues et al. (2017) avaliaram por qPCR a redução bacteriana após o preparo químico-cirúrgico com instrumentos rotatórios de NiTi de diferentes diâmetros para o preparo apical. Foram selecionados 43 dentes com periodontite apical pós-tratamento e com indicação de retratamento endodôntico convencional. Os dentes foram divididos em dois grupos de acordo com a solução irrigadora: NaClO^- 2,5% (n=22) e solução salina (n=21). As amostras bacteriológicas foram coletadas após a remoção da obturação endodôntica inicial, após o uso do primeiro instrumento do sistema TFA (*Twisted File Adaptive*) e após o terceiro instrumento do sistema TFA. No grupo solução salina, foi realizada irrigação final de NaClO^- 1%. Todas as amostras iniciais foram positivas em ambos os grupos, 67% e 32% dos casos continuavam positivos para os grupos da solução salina e do NaClO^- (2,5%), respectivamente. No grupo solução salina após a irrigação final 38% das amostras permaneceram positivas, e a média do número de cópias de DNA nas amostras foi: $1,98 \times 10^4$ nas amostras iniciais, $2,10 \times 10^3$ após o primeiro instrumento, $6,4 \times 10^2$ após o terceiro instrumento e $5,4 \times 10^2$ após a irrigação final. No grupo do NaClO^- 2,5%, a média do número de cópias de DNA foi: $8,24 \times 10^4$ nas amostras iniciais, $1,65 \times 10^3$ após o primeiro instrumento, $7,71 \times 10^1$ após o terceiro instrumento. Nos dois grupos o alargamento apical até o terceiro instrumento promoveu maior redução bacteriana do que o primeiro instrumento. Na análise entre os grupos, o grupo NaClO^- 2,5% promoveu uma maior redução bacteriana do que a solução salina nos preparos apicais maiores. Este estudo demonstrou que o aumento do diâmetro apical durante o preparo químico-cirúrgico proporcionou melhor desinfecção dos canais radiculares. A eficácia do NaClO^- 2,5% foi maior em preparos apicais maiores.

Nakamura et al. (2018) avaliaram por qPCR o efeito da ativação ultrassônica na redução da carga bacteriana quando comparada à irrigação convencional. As amostras foram coletadas de 50 dentes com periodontite apical assintomática após a

cirurgia de acesso, após o preparo químico-cirúrgico com instrumentos reciprocantes e NaClO₂ 2,5%, após os protocolos de irrigação final e após a medicação intracanal com Ca(OH)₂ com polietileno glicol por 14 dias. Os micro-organismos estavam presentes em todas as amostras iniciais: $1,49 \times 10^6$ e $8,55 \times 10^5$ células bacterianas nos grupos da ativação ultrassônica e irrigação convencional, respectivamente. O número de bactérias reduziu após o preparo químico-cirúrgico para o grupo da irrigação ultrassônica passiva com 76% de amostras positivas com uma mediana de $1,41 \times 10^4$ cópias de rDNA, após irrigação ultrassônica 68% dos casos continuavam positivos com mediana de $4,29 \times 10^3$ cópias de rDNA e após a medicação intracanal 64% das amostras estavam positivas com mediana de $2,39 \times 10^3$ cópias de rDNA. Redução bacteriana também foi observada no grupo da irrigação convencional: 80% dos casos positivos e mediana de $3,53 \times 10^4$ cópias de rDNA após o preparo químico-cirúrgico, 72% dos casos positivos com mediana de $1,08 \times 10^4$ cópias de rDNA após a irrigação convencional e 60% dos casos permaneciam positivos com mediana de $4,56 \times 10^3$ células bacterianas após a medicação intracanal. Na comparação dos grupos, a ativação ultrassônica promoveu maior redução de bactérias nos canais radiculares. Deste modo a ativação ultrassônica apresentou-se mais efetiva que a irrigação convencional quanto a redução de contagem bacteriana dos canais radiculares após o preparo químico-cirúrgico.

2.2 Métodos moleculares baseados em rRNA (RNA ribossômico)

Rôças e Siqueira (2010) identificaram bactérias persistentes após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal com CaOH₂ com paramonoclorofenol canforado por 7 dias utilizando rRNA. As amostras microbiológicas foram coletadas dos canais radiculares de 15 dentes. Após a extração de RNA, foi realizada a reação de transcrição reversa (RT) para confecção de cDNA, que foi utilizado na reação de hibridização DNA-DNA de captura reversa para identificação bacteriana. 60% dos casos apresentaram bactérias viáveis após o preparo químico-cirúrgico e 53% permaneciam viáveis após a medicação intracanal. As espécies bacterianas mais prevalentes nas amostras iniciais de dentes com periodontite apical foram *Olsenella uli* (10/15, 67%), *Pyramidobacter piscolens* (9/15, 60%), *Streptococcus species*

(8/15, 53%), *Bacteroidetes oral clone X083* (8/15, 53%), *T. forsythia* (7/15, 47%), *A. israelii* (7/15, 47%) e *Eubacterium sulci* (7/15, 47%). Após o preparo químico-cirúrgico foram *Streptococcus spp.* (7/15, 47%), *F. nucleatum* (6/15, 40%), *O. uli* (5/15, 33%), *P. acnes* (4/15, 27%), *P. endodontalis* (4/15, 27%), e *Peptostreptococcus stomatis* (4/15, 27%) e após medicação intracanal *Streptococcus spp.* (7/15, 47%), *P. acnes* (4/15, 27%), *O. uli* (4/15, 27%), e *F. nucleatum* (3/15, 20%). A diversidade bacteriana foi drasticamente reduzida após os procedimentos endodônticos de desinfecção. As espécies/táxons bacterianos mais frequentemente encontrados nas amostras após tratamento podem ser um fator de risco para persistência da doença, no entanto, esse fato ainda precisa ser determinado por estudos longitudinais.

Pinheiro et al. (2015) investigaram a sensibilidade da reação de qPCR baseado em rRNA (RT-qPCR), comparado ao método baseado em rDNA (gene *rRNA*), para identificação de *E. faecalis* de amostras clínicas de 18 dentes com necessidade de retratamento endodôntico. *E. faecalis* foi detectado em 77,8% e 72,2% das amostras iniciais utilizando qPCR baseado em *rRNA* e *rDNA*, respectivamente. Em contraste, após o preparo químico-cirúrgico, *E. faecalis* foi detectado em apenas 33,3% das amostras usando rDNA e em 61,1% das amostras analisadas pelo método baseado em rRNA. O número de cópias de rRNA de *E. faecalis* foi maior que o número de cópias de rDNA nas amostras antes e após o preparo químico-cirúrgico, indicando uma grande sensibilidade no 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. Este estudo também mostrou que o *E. faecalis* pode permanecer metabolicamente ativo após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares.

Baseado na revisão da literatura, observou-se que a maioria dos estudos moleculares avaliando a microbiota endodôntica são baseados no gene 16SrRNA (rDNA). Nesses estudos, *P. acnes* foi uma das espécies bacterianas mais prevalentes nas infecções endodônticas que persistem após os procedimentos

endodônticos, além de *Streptococcus* spp. *E. faecalis*, e *F. nucleatum*. Por outro lado, estudos da microbiota endodôntica persistente utilizando métodos moleculares baseados em rRNA são escassos. Considerando que o método baseado em rDNA tem a vantagem de possibilitar a quantificação absoluta das bactérias e que o método baseado em rRNA tem a vantagem de analisar sua viabilidade, este estudo irá utilizar esses 2 métodos para investigar a participação de *P. acnes* nas infecções endodônticas primárias e sua suscetibilidade aos procedimentos endodônticos de desinfecção.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a taxa de detecção, quantidade e atividade metabólica de *P. acnes*, antes e após os procedimentos endodônticos de desinfecção, utilizando métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar as taxas de detecção de *P. acnes* em amostras endodônticas pelos ensaios de qPCR baseados em rRNA e rDNA.
- Avaliar a quantidade de *P. acnes* antes e após preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal pela reação de qPCR baseada em rDNA.
- Avaliar a atividade metabólica de *P. acnes* antes e após preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal pela razão rRNA/ rDNA.

3.3 Hipótese de nulidade

- Hipótese nula: a taxa de detecção, quantidade e atividade metabólica de *P. acnes* não sofrem redução após os procedimentos endodônticos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada neste trabalho baseou-se em estudos clínicos e microbiológicos prévios (Pinheiro et al., 2015; Nakamura et al., 2018). Todos os procedimentos foram realizados de modo cauteloso, seguindo protocolos a fim de garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados.

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.

Após a aplicação dos critérios acima relatados, foram selecionados 22 pacientes com dentes com infecções endodônticas primárias para tratamento endodôntico e coletas microbiológicas.

4.2.2 Coletas microbiológicas e procedimentos clínicos

Os procedimentos clínicos foram realizados na Clínica de Pós-Graduação da FOUSP por 2 pós-graduandos 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) e estão descritos detalhadamente no APÊNDICE B.

Após o exame clínico e radiográfico inicial, os pacientes receberam 10mL de antisséptico bucal para bochechar por 1 minuto. Então, os dentes foram anestesiados e realizado o isolamento absoluto com arco plástico (SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), lençol de borracha (SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), grampos metálicos adequados (SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e barreira gengival (Top Dam, FGM, Brasil). A antissepsia do campo operatório e da coroa dentária foram realizadas com swabs esterilizados (Berkshire Corporation, North Carolina, EUA) embebidos em peróxido de hidrogênio 30% por 30s, seguido por hipoclorito de sódio 2,5% (NaClO₂, 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) (Rôças et al., 2004).

A cirurgia de acesso foi realizada em duas etapas, com auxílio de pontas diamantadas esféricas 1014, 1015, 1014HL ou 1015HL (Microdont Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil) em alta-rotação refrigerados com auxílio de seringas de 20mL (BD Company, São Paulo, SP, Brasil) e soro fisiológico esterilizados (Laboratórios B. Braun, São Gonçalo, RJ, Brasil), tomando-se o cuidado de não acessar a câmara pulpar. Após este procedimento, o protocolo de antissepsia da coroa dental e o campo operatório foi novamente realizado, como já foi descrito anteriormente; e a cirurgia de acesso finalizada com novas pontas esterilizadas, refrigeradas com soro fisiológico. Coleta da coroa (ângulo cavo-superficial da cavidade de acesso) foi realizada com papel absorvente para comprovar a eficácia das manobras de desinfecção. A ausência de bactérias na coleta da coroa dentária foi comprovada por meio de PCR convencional, utilizando iniciadores universais para o domínio *Bacteria* (APÊNDICE C).

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 (DentsplyMaillefer, Baillagues, Suíça) com auxílio de localizador foraminal (J. Morita Brasil, São Paulo, SP, Brasil). 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. Cinco 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 da lima utilizada e os demais cones foram depositados em microtubos de 1,5 mL esterilizados contendo 300 µl de solução RNA later (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estado Unidos da América).

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 (DentsplyMaillefer, 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 por motor VDW-silver (VDW GmbH, Munique, Alemanha) ajustado à cinemática preconizada para cada instrumento, sempre na presença de NaClO₂ 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 NaClO₂ 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 e apirogênicas de 10 mL e pontas endodônticas de irrigação Endo-EZE (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) com diâmetro de 30G e saída lateral meia canal, 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, seco com cones de papel absorvente, e preenchido com soro fisiológico apirogênico. Assim, realizando uma nova coleta microbiológica (**S2**), como descrito anteriormente.

Após a coleta, foi realizada uma irrigação final com NaClO₂ 2,5% e EDTA-T 17% com um protocolo semelhante ao descrito por Nakamura et al. (2018). Os canais radiculares foram secos com pontas de papel absorvente, e então, preenchidos com a pasta de hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) Ultracal XS (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA). Esta pasta apresenta um veículo aquoso à base de metil-celulose e vem acondicionada em uma seringa plástica acoplada a uma agulha NaviTip (0,33 mm de diâmetro). A agulha foi inserida no comprimento

real de trabalho para proporcionar o preenchimento do canal radicular em toda sua extensão. Após o preenchimento, essa pasta foi compactada com bolinhas de algodão esterilizadas com auxílio de pinças clínicas e calcadores de Paiva. O completo preenchimento do canal radicular foi verificado através de radiografia periapical. Por fim, 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, Austrália).

Os pacientes retornaram à clínica da faculdade 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. Após a remoção do selamento provisório e 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% por canal e leve agitação com limas manuais tipo K número 15. E então, uma terceira coleta (**S3**) foi realizada em ambos os grupos seguindo os mesmos critérios de procedimentos realizados nas coletas anteriores.

Em seguida, os canais foram irrigados com 10 mL de NaClO₂ 2,5% e re-instrumentados com o mesmo instrumento utilizado na primeira sessão de tratamento. Então, um novo procedimento de irrigação final com 10 ml de NaClO₂ (2,5%), 10 ml de EDTA (17%), com seringa e pontas de irrigação.

Após a secagem dos condutos por meio de aspiração e utilização de cones de papel absorvente, os canais foram obturados por meio da técnica de condensação lateral de 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).

Todas as amostras foram armazenadas em freezer -20 °C até o momento da análise microbiológica.

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 FOU SP. 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, e está descrita detalhadamente no APÊNDICE C. 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°C .

4.3.2 Análise quantitativa e da atividade metabólica de *P. acnes*

Os níveis de DNA e cDNA de *P. acnes* nas amostras foram avaliados por qPCR, utilizando iniciadores específicos para o gene 16S *rRNA*: 5'- GGG TTG TAA ACC GCT TTC- GCTG-3' e 3'- GGC ACA CCC ATC TCT GAG- CAC -5' (Rôças et al., 2010). As reações foram realizadas em placas de 96 poços com um volume total de 20 μL contendo: 10 μL Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 100 nM de cada primer, 2 μL da amostra (DNA ou cDNA) e H_2O . Nos controles negativos foram utilizados 2 μL de H_2O como molde. As reações de qPCR foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, utilizando o *StepOne Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). O ciclo de amplificação foi: 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento a 50°C por 1 min e extensão a 95°C por 15s. A curva padrão foi construída utilizando plasmídeos recombinantes contendo fragmentos de 1.500 pb do gene 16S *rRNA* de *P. acnes*. Todas as amostras foram corridas em triplicata, utilizando o valor médio para análise do número de cópias de rRNA e rDNA por amostra de canal radicular.

O coeficiente de correlação (r^2), eficiência de amplificação (E) e valores de y da curva padrão para qPCR utilizando iniciadores específicos para *P. acnes* foram 0,995; 104,387% e 35,415, respectivamente.

4.4 Análise estatística

Os dados foram analisados por testes estatísticos e o nível de significância de todos os testes foi 5%. A análise quantitativa dos níveis de rDNA e rRNA bacteriano entre as amostras S1, S2 e S3 foi realizada utilizando o teste de Wilcoxon para amostras relacionadas. A comparação da taxa de detecção dos métodos baseados

em rDNA e rRNA foi realizada utilizando teste de McNemar. As bactérias foram consideradas metabolicamente ativas se a razão rRNA/rDNA se apresentasse maior ou igual 1 (Campbell et al., 2011). O teste de Wilcoxon foi utilizado para avaliar as diferenças nas razões rRNA/rDNA das bactérias entre as amostras.

O número de casos verdadeiros positivos, falsos positivos, verdadeiros negativos e falsos negativos pelo método baseado em rDNA foi calculado em comparação ao método baseado em rRNA, o qual foi considerado um indicador de viabilidade bacteriana (padrão ouro). Baseado nesses dados, foram calculadas as taxas de sensibilidade, especificidade e acurácia do método baseado em rDNA para detectar células viáveis de *P. acnes*.

5 RESULTADOS

Para melhor compreensão e visualização dos resultados obtidos, os dados foram organizados em tópicos.

5.1 Taxa de detecção de *P. acnes* antes e após os procedimentos endodônticos utilizando ensaios de qPCR baseados em rDNA e rRNA

P. acnes foi detectado em 36,4% (8/22) e 90,9% (20/22) das amostras S1 utilizando qPCR baseado em rDNA e rRNA, respectivamente. Nas amostras S2, *P. acnes* foi detectado em 36,4% (8/22) das amostras utilizando o método baseado em rDNA e em 86,4% (19/22) pelo método baseado em rRNA. Nas amostras S3, *P. acnes* persistiu em níveis detectáveis em todas as amostras positivas em S2. A taxa de detecção de *P. acnes* foi maior pelo método baseado em rRNA do que pelo método baseado em rDNA em todas as amostras ($P < 0,05$) (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Taxa de detecção de *P. acnes* por ensaios baseados em RNA ribossômico (rRNA) e DNA ribossômico (rDNA)

<i>P. acnes</i>	S1			S2			S3			Total			
	rDNA		<i>P</i>	rDNA		<i>P</i>	rDNA		<i>P</i>	rDNA	<i>P</i>		
	+	-		+	-		+	-		+	-		
rRNA	+	8	12	0,0005	8	11	0,001	9	10	0,002	25	33	< 0,0001
	-	0	2		0	3		0	3		0	8	

+, amostras com resultados positivos em qPCR; -, amostras com resultados negativos em qPCR; S1, amostras coletadas antes do preparo químico cirúrgico; S2, amostras coletadas após do preparo químico cirúrgico; S3 amostras coletadas após a medicação intracanal. O teste de McNemar foi utilizado para comparar a diferença da taxa de detecção entre os métodos ($P < 0,05$ indica diferença estatística significativa)

No presente estudo, um total de 66 amostras de canais radiculares (amostras S1, S2 e S3 de 22 pacientes) foram usadas para avaliar a acurácia do ensaio de qPCR baseado em rDNA comparado ao ensaio baseado em rRNA (padrão ouro) para detecção de *P. acnes*. A acurácia do teste foi descrita em termos de sensibilidade e especificidade. A sensibilidade do teste de qPCR baseado em rDNA foi de 43%, indicando uma baixa habilidade do método em detectar amostras verdadeiramente positivas (amostras rRNA-positivas). Especificidade, por sua vez, indica a habilidade do teste em indicar corretamente a ausência de *P. acnes* (amostras verdadeiramente negativas). A especificidade dos dois métodos mostrou-se de igual valor em todas as etapas do tratamento (Tabela 5.2). Na análise do total das amostras, a acurácia do método baseado em DNA foi de 50%, ou seja, essa é chance do teste em classificar corretamente amostras com presença ou ausência de *P. acnes* viável.

Tabela 5.2 - Valores de sensibilidade, especificidade e acurácia do método baseado em rDNA para detectar células viáveis de *P. acnes* quando comparado ao rRNA nos canais radiculares antes (S1), após o preparo químico cirúrgico (S2) e após medicação intracanal (S3)

	DNA S1	RNA S1	DNA S2	RNA S2	DNA S3	RNA S3	DNA TOTAL	RNA TOTAL
SENSIBILIDADE	0,40	1	0,42	1	0,47	1	0,43	1
ESPECIFICIDADE	1	1	1	1	1	1	1	1
ACURÁCIA	0,45	1	0,5	1	0,54	1	0,5	1

Fonte: a autora

5.2 Níveis de em rDNA e rRNA de *P. acnes* antes e após os procedimentos endodônticos utilizando ensaios de qPCR

Os dados quantitativos relacionados ao rDNA e rRNA de *P. acnes* nas amostras dos canais radiculares estão representados na tabela 5.3. Na comparação entre as amostras, não houve redução significativa do número de cópias de rDNA entre S1 e S2 ($P = 0,92$), nem entre S2 e S3 ($P = 0,58$). Da mesma forma, os níveis

de rRNA não sofreram mudanças significativas em S2 ($P = 0,07$) quando comparados às amostras S1, nem em S3 ($P = 0,41$) quando comparados às amostras S2. Na comparação entre os métodos, o número de cópias de cDNA foi maior que o número de cópias de rDNA em todas as amostras (Tabela 5.3).

Tabela 5.3- Valores médios e da mediana (mínima - máxima) do número de cópias de 16S rDNA e rRNA de *P. acnes* em 22 canais radiculares antes (S1) e após (S2) o preparo químico cirúrgico e após a medicação intracanal (S3)

Amostras	Grupos		Valor de <i>P</i>	
	rDNA	rRNA		
S1	Mediana	0,00	$9,03 \times 10^3$	<0.0001
	(Mín - Máx)	$(0,00 - 1,76 \times 10^4)$	$(0,00 - 4,61 \times 10^4)$	
	Média	$1,28 \times 10^3$	$1,56 \times 10^4$	
	(Desvio Padrão)	$(3,79 \times 10^3)$	$(1,49 \times 10^4)$	
S2	Mediana	0,00	$1,52 \times 10^4$	<0.0001
	(Mín - Máx)	$(0,00 - 4,14 \times 10^4)$	$(0,00 - 2,84 \times 10^5)$	
	Média	$2,36 \times 10^3$	$4,14 \times 10^4$	
	(Desvio Padrão)	$(8,76 \times 10^3)$	$(6,68 \times 10^4)$	
S3	Mediana	0,00	$7,75 \times 10^3$	<0.0001
	(Mín - Máx)	$(0,00 - 6,41 \times 10^4)$	$(0,00 - 3,29 \times 10^5)$	
	Média	$4,01 \times 10^3$	$4,56 \times 10^4$	
	(Desvio Padrão)	$(1,38 \times 10^3)$	$(7,92 \times 10^4)$	

Fonte: a autora.

5.3 Atividade metabólica de *P. acnes* antes e após os procedimentos endodônticos

Nas amostras positivas para os dois métodos, foi calculada a razão rRNA/rDNA. Em S1, o valor mediano da razão rRNA/rDNA foi 7,93 (intervalo de 2,03 a $2,04 \times 10^2$). Essa razão permaneceu positiva em S2 (mediana 16,40, intervalo de 2,21 a $4,87 \times 10^2$) e S3 (mediana 25,34, intervalo de 0,58 a $1,05 \times 10^3$), sem diferença estatística na comparação entre as amostras S1-S2 e S2-S3 (ambos $P > 0,05$). Os resultados revelaram que *P. acnes* permaneceu metabolicamente ativo nos canais radiculares após os procedimentos endodônticos de desinfecção.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a prevalência, a quantidade e a atividade metabólica de *P. acnes*, utilizando métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA, antes e após os procedimentos endodônticos de desinfecção. A mesma amostra do canal foi utilizada para extração de DNA e RNA, permitindo uma comparação direta entre os métodos. Esse estudo mostra-se inovador por utilizar a razão rRNA/rDNA para avaliar a atividade metabólica de *P. acnes*, uma espécie bacteriana comum em infecções persistentes após às terapias utilizadas durante o tratamento endodôntico. Na análise de qPCR baseada em rRNA e rDNA, os procedimentos endodônticos não promoveram redução do número de células bacterianas nem de seu metabolismo; portanto, a hipótese de nulidade foi aceita.

O presente estudo revelou que a reação de qPCR baseada em rRNA (RT-qPCR) promoveu uma maior taxa de detecção de *P. acnes* que o ensaio baseado em rDNA. Esses achados estão de acordo com estudos prévios que demonstraram uma alta sensibilidade dos métodos baseados em rRNA, tendo em vista que o número de rRNA em células metabolicamente ativas é maior que o número dos seus respectivos genes (rDNA) (Matsuda et al., 2007; Pitkänen et al., 2013; Pinheiro et al., 2015). Em comparação ao ensaio de RT-qPCR, a qPCR baseada em rDNA apresentou uma especificidade equivalente ao método de rRNA, demonstrando que o rDNA detectado nos canais radiculares após os procedimentos endodônticos eram de células viáveis de *P. acnes*. Esse dado foi semelhante ao encontrado na análise de *E. faecalis* após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares (Pinheiro et al., 2015), confirmando que essas espécies bacterianas podem persistir viáveis nos canais radiculares após os procedimentos de desinfecção. Por outro lado, em estudo prévio da análise da viabilidade de *Streptococcus* spp. (Prado, 2014), a especificidade do método baseado em rDNA foi baixa, uma vez que promoveu a detecção de rDNA em casos negativos para o rRNA; demonstrando que rDNA de *Streptococcus* spp. mortos havia sido detectado após o tratamento. Esses dados sugerem que o método baseado em rRNA se torna uma ferramenta importante para monitorar a eficácia dos procedimentos endodônticos sobre as bactérias persistentes. Considerando que a condição das espécies bacterianas após o tratamento pode variar de células inativas a células com alta atividade metabólica, o

uso de métodos moleculares baseados em rRNA podem ser vantajosos para elucidar potenciais agentes etiológicos das infecções endodônticas persistentes.

Apesar das suas vantagens, até o presente momento, apenas 3 estudos utilizaram métodos baseados em rRNA para revelar a microbiota persistente após os procedimentos endodônticos (Rôças; Siqueira 2010; Pinheiro et al. 2015, Prado, 2014). Rôças e Siqueira (2010) identificaram bactérias utilizando a reação de transcrição reversa (RT) e reação de hibridização DNA-DNA de captura reversa. Esses autores identificaram *P. acnes* como uma das espécies mais prevalentes após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal, presente em 27% (4/15) das amostras dos canais radiculares em ambos os momentos da coleta. Prado (2014), utilizando RT e PCR convencional, detectou *P. acnes* em 10% (2/20) das amostras coletadas após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal. Os resultados do presente estudo corroboram com os achados prévios que revelaram que *P. acnes* é uma espécie bacteriana que persiste após os procedimentos endodônticos. Entretanto, os métodos de RT e qPCR utilizados no presente estudo revelaram uma prevalência ainda maior dessa espécie bacteriana nos canais radiculares antes e após os procedimentos de desinfecção (91%). A diferença entre os estudos deve estar relacionada à sensibilidade dos métodos moleculares utilizados. No presente estudo, o limite de detecção da reação de qPCR foi de 10 cópias de cDNA ou DNA por microlitro, enquanto o limite de detecção do método de hibridização DNA-DNA reportado por Rôças e Siqueira (2010) foi de aproximadamente 10^5 bactérias.

Nos ensaios de qPCR baseado em rDNA, a prevalência de *P. acnes* foi de 36,4% das amostras S1 e S2. Na análise quantitativa, o nível médio de *P. acnes* foi $1,28 \times 10^3$ cópias de rDNA nas amostras S1, não havendo uma alteração significativa dos níveis bacterianos nas amostras S2 e S3. Os dados de prevalência e quantificação do presente estudo estão de acordo com os achados de Rôças e Siqueira (2011a, b), que detectaram *P. acnes* em 37% e 38% das amostras após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares. De acordo com esses autores, o rDNA de *P. acnes* persistiu em níveis detectáveis após o uso da medicação intracanal com Ca(OH)_2 em todos os casos positivos em S2. A análise semi-quantitativa pelo método de hibridização DNA-DNA utilizada nos estudos prévios revelou que essas bactérias estavam presente em baixos níveis ($< 10^5$) nos canais radiculares.

Considerando que o número de rRNA transcritos por células é dependente do estado metabólico das bactérias (Campbell et al., 2011), a razão entre o número de cópias de rRNA sobre o número de cópias de rDNA foi utilizada para analisar o metabolismo de *P. acnes* no presente estudo. Essa análise revelou que o número de cópias de rRNA foi mais elevado do que o número de cópias rDNA, indicando que *P. acnes* permaneceu metabolicamente ativo nas infecções persistentes após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal. Os dados da razão rRNA/rDNA de *P. acnes* no presente estudo estão de acordo com os resultados prévios da atividade metabólica de *E. faecalis* após os procedimentos endodônticos (Pinheiro et al., 2015). Esses dados corroboram com estudos prévios que utilizaram métodos moleculares baseados em rDNA e métodos dependentes da cultura, confirmando a participação de bactérias Gram-positivas nas infecções endodônticas persistentes (Siqueira e Rôças 2008). Entretanto, é importante ressaltar que o método RT-qPCR apresenta uma maior sensibilidade para a detecção de bactérias que o ensaio de qPCR baseado em DNA; que, por sua vez, é mais sensível que método de cultura (Fidgor; Sundqvist., 2007; Pinheiro et al., 2015). A grande sensibilidade dos métodos moleculares baseados em rRNA pode se tornar importante na análise de amostras dos canais radiculares após os procedimentos de desinfecção, pois estes possuem um número limitado de bactérias. Além disso, essas bactérias persistentes podem estar presentes nos canais radiculares em um estado viável mas não cultivável. Esse método pode se tornar ainda mais valioso para análise da suscetibilidade de bactérias ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo aos procedimentos antibacterianos utilizados durante o tratamento endodôntico.

P. acnes é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, frequentemente detectada em canais radiculares após os procedimentos endodônticos (Siqueira; Rôças, 2008). Essa espécie bacteriana também tem sido detectada em biofilmes extra-radulares na superfície da raiz de dentes com periodontite apical pós-tratamento (Fujii et al; 2009). Estudos na área médica revelaram que essa espécie comensal presente na pele pode se comportar como um patógeno oportunista e causar infecções invasivas (Achermann et al., 2014). Niazi et al. (2016) relataram que *P. acnes* foi isolado dos canais radiculares somente em dentes que tinham contaminação com a cavidade oral e não em dentes com selamento coronário adequado. Esses autores sugeriram que *P. acnes*, embora não seja o agente principal da infecção endodôntica primária, pode agir como patógeno oportunista e

se estabelecer nos canais radiculares por possuir vários fatores de virulência que estão relacionados a infecção crônica ou persistente.

Os fatores de virulência de *P. acnes* estão relacionados à atividade de degradação tecidual do hospedeiro, adesão celular, inflamação e biossíntese de cápsula polissacarídea. Dentre esses fatores, o biofilme originado dessa bactéria é um fator de virulência importante (Achermann et al., 2014) e pode auxiliar essa espécie bacteriana a persistir metabolicamente ativa nos canais radiculares após procedimentos endodônticos de desinfecção (Niazi et al., 2016). *P. acnes* é considerado um colonizador secundário do biofilme, que se agrega aos colonizadores iniciais, como por exemplo *Streptococcus* spp., frequentemente detectados nas infecções endodônticas persistentes (Provenzano et al., 2015; Neves et al., 2016).

Considerando que a infecção pós-tratamento é de natureza polimicrobiana, a composição da microbiota que permanece metabolicamente ativa após os procedimentos endodônticos de desinfecção necessita ser desvendada. Bactérias apresentam diferenças na suscetibilidade aos métodos de desinfecção; e, somente após a identificação dos sobreviventes, seria possível a proposição de estratégias destinadas à sua eliminação. Esse estudo revelou que *P. acnes* é uma dessas bactérias persistentes, porém tem a limitação de ter estudado somente uma espécie bacteriana, sem associação com outros membros da comunidade. Futuros estudos necessitam ser realizados para um maior conhecimento dessa microbiota persistente. As espécies bacterianas mais frequentemente encontradas nas amostras após tratamento podem ser um fator de risco para persistência da doença; no entanto, esse fato ainda precisa ser determinado por estudos longitudinais para avaliar seu impacto na taxa de sucesso clínico do tratamento.

Os achados do presente estudo mostraram que o método baseado em rRNA é mais sensível que o método baseado em rDNA para a detecção de *P. acnes* em amostras dos canais radiculares. O uso de rRNA e rDNA neste estudo permitiu avaliar a atividade metabólica calculando a razão rRNA/rDNA, que revelou que *P. acnes* se manteve metabolicamente ativo nas amostras de canais radiculares após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal.

7 CONCLUSÃO

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

- A taxa de detecção do ensaio de qPCR baseado em rRNA foi maior que a do qPCR baseado em rDNA para análise de *P. acnes* em amostras de canais radiculares coletadas antes e após os procedimentos endodônticos.
- O preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal não promoveram a redução dos níveis de *P. acnes* dos canais radiculares.
- *P. acnes* permaneceu metabolicamente ativo após os procedimentos endodônticos de desinfecção.

REFERÊNCIAS¹

Achermann Y, Goldstein EJ, Coenye T, Shirtliff ME. *Propionibacterium acnes*: from commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Jul;27(3):419-40. doi: 10.1128/CMR.00092-13. Review.

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.

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

Figdor D, Sundqvist G. A big role for the very small--understanding the endodontic microbial flora. *Aust Dent J.* 2007 Mar;52(1 Suppl):S38-51.

Fujii R, Saito Y, Tokura Y, Nakagawa KI, Okuda K, Ishihara K. Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2009 Dec;24(6):502-5.

Gomes BP, Berber VB, Kokaras AS, Chen T, Paster BJ. Microbiomes of endodontic-periodontal lesions before and after chemomechanical preparation. *J Endod.* 2015 Dec;41(12):1975-84. doi: 10.1016/j.joen.2015.08.022.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965 Sep;20:340-9.

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. Epub 2006 Oct 27. Erratum in: *Appl Environ Microbiol.* 2007 Oct;73(20):6695. doi: 10.1128/AEM.01224-06

Nakamura VC, Pinheiro ET, Prado LC, Silveira AC, Carvalho APL, Mayer MPA, Gavini G. Effect of ultrasonic activation on the reduction of bacteria and endotoxins in

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

root canals: a randomized clinical trial. *Int Endod J.* 2018 Jan; 51 Suppl1:e12-e22. doi: 10.1111/iej.12783.

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.

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.

Niazi SA, Al Kharusi HS, Patel S, Bruce K, Beighton D, Foschi F, Mannocci F. Isolation of *Propionibacterium acnes* among the microbiota of primary endodontic infections with and without intraoral communication. *Clin Oral Investig.* 2016 Nov;20(8):2149-2160.

Paiva SS, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Carmo FL, Ferreira DC, Curvelo JA, Soares RM, Rosado AS. 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. Epub 2012 Jul 25.

Paiva SS, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC, Rachid CT, Rosado AS. 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.

Paiva SS, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC, Rachid CT, Rosado AS. 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, Mayer MP. 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.

Pitkänen T, Ryu H, Elk M, Hokajärvi AM, Siponen S, Vepsäläinen A, Räsänen P, Santo Domingo JW. 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.

Prado LC. Estudo *in vivo* da susceptibilidade de bactérias Gram-positivas após procedimentos químico-cirúrgico e medicação intracanal pelo método de reação de cadeia de polimerase baseado em DNA e RNA. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2014.

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. Epub 2015 Mar 19.

Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 2010 Aug;36(8):1277-88. doi: 10.1016/j.joen.2010.04.007. Epub 2010 Jun 14.

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

Rôças 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.

Rôças 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.

Rôças 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.

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, Neves MA, Provenzano JC, Siqueira JF Jr. Susceptibility of as-yet-uncultivated and difficult-to-culture bacteria to chemomechanical procedures. *J Endod.* 2014 Jan;40(1):33-7. doi: 10.1016/j.joen.2013.07.022.

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.

Rodrigues RC, Antunes HS, Neves MA, Siqueira JF Jr, Rôças 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. Epub 2015 Jul 30.

Rodrigues RCV, Zandi H, Kristoffersen AK, Enersen M, Mdala I, Ørstavik D, Rôças IN, Siqueira JF Jr. 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):1058-1063. doi: 10.1016/j.joen.2017.02.004. Epub 2017 May 5.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod.* 2005 Jun;31(6):411-23.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* 2008 Nov;34(11):1291-1301.e3. doi: 10.1016/j.joen.2008.07.028.

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

Teles AM, Manso MC, Loureiro S, Silva R, Madeira IG, Pina C, Cabeda JM. Effectiveness of two intracanal dressings in adult Portuguese patients: a qPCR and anaerobic culture assessment. *Int Endod J.* 2014 Jan;47(1):32-40. doi: 10.1111/iej.12122.

Zandi H, Rodrigues RC, Kristoffersen AK, Enersen M, Mdala I, Ørstavik D, Rôças IN, Siqueira JF Jr. 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

APÊNDICE B – Coletas Microbiológicas dos Canais Radiculares

Para realização das coletas microbiológicas dos canais radiculares, é necessário realizar inicialmente um protocolo de desinfecção do campo operatório, seguindo os passos descritos abaixo:

1. Após a anestesia do dente, realizar o isolamento absoluto com lençol de borracha, grampo metálico e barreira gengival.
2. Com uma broca esférica diamantada, 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 estéril através de seringa descartável.
3. Com um swab estéril, 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 estéril, proceder da mesma forma com a solução de NaOCl 2,5%.
5. Concluir a cirurgia de acesso com novas brocas esterilizadas e soro fisiológico.
6. Realizar nova desinfecção do campo com água oxigenada 30% e NaOCl 2,5%.
7. Neutralizar o NaOCl 2,5% com um swab embebido em tiosulfato de sódio 5% por 1 minuto.
8. Com um cone de papel estéril, coletar uma amostra do ângulo cavo-superficial da cavidade de acesso (controle de assepsia do campo operatório).

Após o protocolo de desinfecção do campo operatório, realiza-se a coleta microbiológica dos canais radiculares com os procedimentos descritos a seguir:

1. Com auxílio de seringa descartável e agulha endodôntica de 30G Endo-EZE (Ultradent Products Inc), preencher o canal radicular com soro fisiológico estéril.
2. Aspirar a solução da câmara pulpar, mantendo somente a solução no interior do canal radicular.
3. Introduzir uma lima 10 tipo K e realizar a odontometria com o localizador foraminal eletrônico. Introduzir uma lima 15 tipo H até o comprimento real de trabalho (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 as limas K e H (entre a parte ativa e a porção intermediária) e depositar a parte ativa da lima em um microtubo de 1,5mL contendo solução de transporte RNA later.
5. Introduzir um cone de papel número 15 até o CRT, mantendo-o em posição por 1 minuto. Repetir o procedimento de coleta com 4 novos cones de papel, mantendo-os individualmente no CRT por 1 minuto cada.
6. Depositar estes cones no mesmo microtubo no qual foi depositada a parte ativa da lima.
7. Congelar as amostras em freezer -20°C até o término do tratamento endodôntico do dente, quando será realizada a extração de DNA/RNA de todas as amostras do dente em estudo.

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.

APÊNDICE C – Procedimentos Laboratoriais

1) EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

A extração dos ácidos nucleicos das amostras dos canais radiculares foi realizada com o kit comercial *MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit* (Epicentre Technologies, Madison, WI, EUA), de acordo com os passos descritos a seguir:

1. Manter os microtubos contendo as amostras dos canais radiculares no gelo até o completo descongelamento do meio de transporte.
2. Homogeneizar cada amostra em agitador de tubos (vortex) durante 1min.
3. Centrifugar as amostras em centrífuga refrigerada a 4°C e 13.000 RPM por 10min.
4. Em um tubo tipo Falcon de 15mL estéril, preparar uma mistura de 300µL de *Tissue and Cell Lysis Solution* e 2µL de Proteinase K (*MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit*), em volume necessário para a quantidade de amostras a serem analisadas (MIX-1).
5. Remover as amostras da centrífuga e descartar o sobrenadante mantendo o pellet.
6. Adicionar 300µL do MIX-1 aos tubos contendo as amostras.
7. Homogeneizar as amostras em agitador de tubos por 10s.
8. Aquecer as amostras em banho-maria a 65°C por 15 min, misturando-as em agitador de tubos (10s) a cada 5min.
9. Esfriar as amostras em gelo por 5min.
10. Adicionar 150µl de *MPC Protein precipitation reagent* (*MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit*) aos tubos contendo as amostras.
11. Homogeneizar as amostras em agitador de tubos 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 tubos 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, com o cuidado de 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 *TE Buffer (MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit)* em cada amostra.
29. Hidratar as amostras por 10 minutos, mantendo-as no gelo ou no Thermomixer (Eppendorf, Hauppauge, NY, EUA) a 4°C.
30. Analisar a concentração de ácidos nucleicos no espectrofotômetro (NanoDrop 1000 – Thermo Fisher Scientific).

2) DIVISÃO DAS AMOSTRAS DE DNA E RNA

1. Dividir as amostras em 2 microtubos:
 - a. 17,5µL em um microtubo denominado com o número da amostra + RNA
 - b. 17,5µL em um microtubo que ficará destinado a portar o DNA.
2. Guardar o microtubo do DNA no freezer -20°C e prosseguir com a purificação do RNA.

3) PURIFICAÇÃO DO RNA

1. Em um microtubo limpo, misturar 2µL de DNase I e 2µL de 10X *DNase I Reaction Buffer (MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit)* para cada amostra de RNA.
2. Aguardar 30 min em temperatura ambiente para degradar o DNA.
3. Adicionar 200µL de 2x *T&C Lysis Solution (MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit)* e colocar no agitador de tubos por 5s.
4. Manter no gelo 5min.

5. Adicionar 200 μ L de *MPC Protein precipitation reagent (MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit)* aos tubos contendo as amostras.
6. Homogeneizar as amostras em agitador de tubos por 10s.
7. Centrifugar (4°C, 13.000RPM) por 10min.
8. Transferir o sobrenadante para microtubos limpos e devidamente identificados conforme a amostra e descartar o pellet.
9. Adicionar 500 μ L de isopropanol e inverter as amostras 30-40 vezes.
10. Centrifugar (4°C, 13.000RPM) por 10min.
11. Retirar o isopropanol sem deslocar o pellet.
12. Lavar o pellet com 500 μ L de etanol 70%.
13. Centrifugar (4°C 13.000RPM) por 5min.
14. Retirar o etanol 70% mantendo cerca de 50 μ L no fundo da microtubo.
15. Centrifugar (4°C 13.000RPM) por 5 min.
16. Secar o etanol 70% com uma ponteira de 200 μ L.

4) SEGUNDO PROCESSO DE LISE DO DNA

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

1. Acrescentar em cada tubo 1 μ L de DNase I, Amp Grade, 1 U/ μ L (Invitrogen) , 1 μ L10X DNase I Reaction Buffer (Invitrogen) e 10 μ L de DEPC – treated water (Invitrogen) .
2. Encubar as amostras por 15 min em temperatura ambiente.
3. Inativar a DNase com a adição de 1 μ L de EDTA 25mM (Invitrogen).
4. Levar ao banho-maria a 65° C por 10 minutos. As amostras estão prontas para serem utilizadas na reação de transcrição reversa. Antes da confecção do cDNA, foi realizado a reação de PCR convencional utilizando iniciadores universais para o domínio *Bacteria* para conferir se todo o DNA das amostras foi removido após o tratamento das amostras com DNase I.
5. Analisar a concentração de ácidos nucleicos no espectrofotômetro (NanoDrop 1000 – Thermo Fisher Scientific).

5) PCR CONVENCIONAL

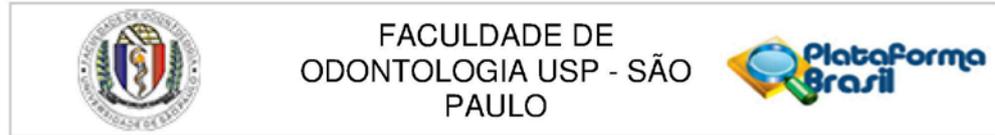
A reação descrita a seguir foi padronizada para detecção de DNA bacteriano com uso de iniciadores universais específicos para o domínio *Bacteria*: *forward*, 5'-GAG AGT TTG ATY MTG GCT CAG-3'; *reverse*: 5'- GAA GGA GGT GWT CCA RCC GCA-3' (Paster et al. 2001). O volume total de cada reação foi de 50µL, contendo: 1 µL de cada primer, 5µL de tampão para PCR (PCR Buffer, Life Technologies Corp), 1,5 µL de Mg₂ (Life Technologies Corp), 4µL de 2,5mM dNTP (Life Technologies Corp), 0,5µL de Taq DNA polimerase (Life Technologies Corp), 36 µL de água ultrapura (Ultrapure water, Life Technologies Corp) e 1 µL de DNA/RNA. A reação de PCR foi realizada no termociclador GeneAmp 2720 (Thermofisher), com o aquecimento inicial a 94°C por 4 min; seguidos de 30 ciclos de 94°C por 45 s, 60°C por 45 s e 72°C por 1,5 min; finalizados com 72°C por 15 min.

6) PCR DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR)

A reação de RT-PCR foi realizada com o kit comercial *Superscript III First-Strand* para confeccionar a fita dupla de cDNA a partir do RNA purificado da amostra. As reações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante, que serão descritas a seguir:

1. Misturar os seguintes reagentes, para cada amostra: 7 µL de RNA, 1µL de *Random Hexamer*, 1µL de dNTP e 1µL de água DPEC.
2. Incubar no banho-maria a 65°C por 5 min.
3. Incluir no gelo por 1 min.
4. Misturar os seguintes reagentes para preparar um MIX: 2µL de *Buffer*, 4µL de MgCl, 2µL de DTT, 1µL de RNase OUT e 1µL de *SuperScript III*.
5. Distribuir 10 µL do MIX nos microtubos contendo as amostras e agitar levemente.
6. Colocar as amostras no termociclador GeneAmp 2720 (Thermofisher), utilizando o ciclo: 25° por 10 min, 50° por 50 min e 85° por 5 min.
7. Adicionar 1µL de RNaseH e incubar por 20 minutos na estufa a 37°C

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA USP - SÃO
PAULO



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 NaOCl 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



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA USP - SÃO
PAULO



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 aos 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).

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	Erica Tavares Pinheiro	Aceito
Cronograma	cronogramadeduracaodapesquisa.docx	17/07/2017 13:32:11	Erica 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



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA USP - SÃO
PAULO



Continuação do Parecer: 2.201.768

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodeconsentimentolivreeseclarecido.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:** cepto@usp.br