

CARLOS GOES NOGALES

Efeito da irrigação ultrassônica e da medicação intracanal com hidróxido de cálcio na quantidade e no metabolismo de bactérias que persistiram após o preparo dos canais radiculares de dentes com periodontite apical

São Paulo

2019

CARLOS GOES NOGALES

Efeito da irrigação ultrassônica e da medicação intracanal com hidróxido de cálcio na quantidade e no metabolismo de bactérias que persistiram após o preparo dos canais radiculares de dentes com periodontite apical

Versão Original

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

Área de concentração: Endodontia

Orientador: Profa. Dra. Ericka Tavares Pinheiro

São Paulo

2019

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

Nogales, Carlos Goes.

Efeito da irrigação ultrassônica e da medicação intracanal com hidróxido de cálcio na quantidade e no metabolismo de bactérias que persistiram após o preparo dos canais radiculares de dentes com periodontite apical / Carlos Goes Nogales ; orientador Ericka Tavares Pinheiro -- São Paulo, 2019.

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

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

Versão original

1. Endodontia. 2. Irrigação ultrassônica passiva. 3. Hidróxido de cálcio. 4. Periodontite periapical. 5. RT-PCR quantitativo. I. Pinheiro, Ericka Tavares. II. Título.

Nogales CG. Efeito da irrigação ultrassônica e da medicação intracanal com hidróxido de cálcio na quantidade e no metabolismo de bactérias que persistiram após o preparo dos canais radiculares de dentes com periodontite apical. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Original.

Aprovado em: / /2019

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho

À DEUS,

À minha família – Marina, Isabela, Augusto e Gabriela

Aos meus pais Nancy e Carlos,

À família da Pós Graduação

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Ericka Tavares Pinheiro pela orientação do trabalho e por me proporcionar um crescimento e amadurecimento pessoal muito além que eu poderia imaginar quando entrei na pós-graduação.

Ao Prof. Dr. José Luiz Lage-Marques, meu Guru na Endodontia. Participou de toda minha formação como endodontista. Com certeza meu maior exemplo de profissionalismo e competência e um grande amigo, que posso recorrer em todas as horas. Gratidão eterna, grande mestre!!

À Profª Drª Angela Araki pela amizade, parceria e exemplo de vida, foco e como fazer um milhão de coisas ao mesmo tempo!!!

Ao Prof. Dr. Eduardo Akisue, amigo que acompanhou parte do meu caminho no doutorado. Amigo é aquele que ouve e fala na hora necessária, empurra para a frente e dá ânimo e fôlego no caminho.

Aos queridos pacientes que se submeteram conscientemente a um trabalho experimental, contribuindo para a execução deste estudo.

À família da pós-graduação, por compartilhar os sorrisos e angústias em todo momento, durante as madrugadas, durante as refeições, nos momentos tensos, leves, nas triagens, nos atendimentos. Alexandre Carvalho, Luiza Paz, Bruna Gontijo, Laura Nardello, Fernanda Fernandes, Renata Bommarito, Bárbara Guedes, Roberto Romero, esse trabalho não sairia se não fosse por vocês.

Aos Professores do Departamento de Endodontia, pelo convívio, atenção e conhecimentos compartilhados de forma franca e aberta.

À Secretaria do Departamento de Dentística, David, Selma, Aldo e Leandro, por salvarem nossas vidas e evitar que nossos pescoços se perdessem pelos corredores.

Ao pessoal da Clínica de Graduação e Pós Graduação – Evelyn, Selma, Flavio, esse trabalho não seria possível se não fosse pela paciência e ajuda inestimável de vocês. Gratidão eterna!!!

Agradeço à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de Doutorado.

À **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.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - FOU SP**, pelo acolhimento nesses anos e pela excelência de seus professores e funcionários.

À equipe Ozone Dental Group, Francisco, Sérgio e Magda pela compreensão e apoio neste momento.

Ao meu querido AMIGO Dr. Fernando Cerbara, pelo apoio, entendimento e suporte para concluir mais esta etapa.

Aos meus Pais – uma montanha se transforma em um montinho de areia quando se tem a base forte e apoio incondicional. Definitivamente essa conquista não seria possível sem vocês. AMO VOCÊS

Aos meus filhos Isabela, Augusto e Gabriela, meus tesouros, que na inocência da criança me deram força e me ajudaram a escalar esse Everest.

À minha esposa Marina Beloti Ferreira. O que dizer? Você segurou minha mão tão forte, me abraçou tão apertado, olhou tão fundo nos meus olhos e no ouvido da

minha alma, disse “Eu estou com você. Não desista, estamos juntos!” e aqui estou eu... escrevendo essas palavras. TE AMO MAIS QUE TUDO.

DEUS – força que me rege, orienta e guia. Você colocou os obstáculos necessários, me deu as lições pertinentes, abriu meus olhos para poder enxergar tudo isso, me deu a oportunidade de transformação e finalmente, permitiu meu triunfo.

RESUMO

Nogales CG. Efeito da irrigação ultrassônica e da medicação intracanal com hidróxido de cálcio na quantidade e no metabolismo de bactérias que persistiram após o preparo dos canais radiculares de dentes com periodontite apical [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Original.

Estudos moleculares ressaltam as limitações do protocolo endodôntico tradicional em eliminar bactérias dos canais radiculares. Apesar do preparo químico-cirúrgico (PQC) promover uma drástica redução bacteriana, muitos canais continuam infectados após essa etapa do tratamento. Dessa forma, estudos apontam para a necessidade de complementação técnica para potencializar a desinfecção dos canais radiculares após o PQC. Assim, o objetivo deste estudo clínico foi avaliar, por métodos moleculares baseados em DNA e RNA, o efeito dos métodos complementares ao preparo na desinfecção dos canais radiculares. Coletas microbiológicas dos canais de 20 dentes unirradiculares com periodontite apical foram feitas em diferentes etapas do tratamento endodôntico: previamente ao preparo (S1); após o PQC realizado com sistema Reciproc associado à irrigação com NaOCl 2,5% (S2); após a irrigação ultrassônica passiva, denominada PUI (S3); e após a medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio (S4). As amostras foram submetidas à extração de DNA e RNA. O RNA foi submetido à reação de transcrição reversa (RT-PCR) para confecção da fita dupla de DNA complementar (cDNA). DNA e cDNA foram submetidos a reações de qPCR, com iniciadores universais para a região 16S *rRNA* do domínio *Bacteria*. A atividade metabólica das bactérias foi verificada através da relação entre os níveis de rRNA e rDNA determinados pelos ensaios de qPCR. Os dados foram analisados pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas ($p < 0,05$). As amostras S1 dos 20 casos apresentaram altos níveis de rDNA (mediana: $1,25 \times 10^5$, intervalo $1,83 \times 10^4 - 9,2 \times 10^6$) e rRNA bacteriano (mediana: $5,47 \times 10^5$, intervalo $7,8 \times 10^4 - 5,95 \times 10^7$). Dezesete canais (85%) apresentaram reações qPCR positivas para rDNA nas amostras pós-preparo (S2). A redução de rDNA após o preparo foi estatisticamente significativa ($p = 0,0003$), com mediana de $2,5 \times 10^4$ (intervalo $2,26 \times 10^3 - 9,52 \times$

10^4) cópias de rDNA em S2. Por sua vez, os níveis de rRNA (mediana: $7,84 \times 10^4$, intervalo $2,91 \times 10^3 - 1,09 \times 10^6$) foram maiores que os níveis de rDNA ($p = 0,01$), sugerindo que essas bactérias estavam metabolicamente ativas em S2. Após a PUI, o número de amostras S3 com resultados positivos para rDNA caiu para 12, representando uma redução significativa em relação às amostras S2 ($p = 0,008$). Além disso, a PUI promoveu uma redução significativa dos níveis de rDNA (mediana $2,94 \times 10^3$, intervalo $2,70 \times 10^3 - 1,09 \times 10^5$) em relação às amostras S2 ($p = 0,01$). Na análise baseada em rRNA, os níveis em S3 (mediana: 03×10^4 , intervalo $1,82 \times 10^3 - 1,39 \times 10^5$) não apresentaram diferença significativa em comparação aos níveis de rDNA ($p = 0,07$), sugerindo que houve uma redução do metabolismo bacteriano após a PUI. Em S4, o número de casos positivos para rDNA bacteriano ($n = 13$) e os níveis de rDNA (mediana: $3,73 \times 10^4$, intervalo $1,98 \times 10^3 - 3,21 \times 10^5$) foram ligeiramente maiores quando comparados aos valores das amostras S3, porém sem diferenças significativas. Entretanto, os níveis de rRNA (mediana: $1,08 \times 10^5$, intervalo $3,41 \times 10^3 - 1,60 \times 10^6$) foram maiores que os de rDNA ($p = 0,02$) nas amostras S4, sugerindo que as bactérias retomaram sua atividade metabólica apesar do uso da medicação intracanal. Portanto, foi possível concluir que a irrigação ultrassônica passiva contribuiu para a desinfecção dos canais radiculares, promovendo uma redução do número e do metabolismo de bactérias. Por outro lado, as bactérias persistiram ativas nos canais radiculares após o uso do hidróxido de cálcio como medicação intracanal em dentes com periodontite apical.

Palavras-chave: Endodontia. Irrigação ultrassônica passiva. Hidróxido de cálcio. Periodontite apical. RT-PCR quantitativo.

ABSTRACT

Nogales CG. Effect of ultrasonic irrigation and calcium hydroxide intracanal medication on the levels and metabolism of bacteria that persisted after root canal preparation of teeth with apical periodontitis [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Original.

Molecular studies highlight the limitations of the traditional endodontic protocol in eliminating bacteria from the root canal. Although chemo-mechanical procedures (CMP) provide a drastic bacterial reduction, many canals remain infected after this treatment step. Thus, studies point out to the need for technical complementation to enhance root canal disinfection after CMP. Thus, the aim of this clinical study was to evaluate, by molecular methods based on DNA and RNA, the effect of supplementary preparation methods on root canal disinfection. Microbiological samples from the root canals of 20 single rooted teeth with apical periodontitis were performed at different steps of endodontic treatment: prior to preparation (S1); after chemo-mechanical procedures with Reciproc system associated with 2.5% NaOCl (S2) irrigation; after passive ultrasonic irrigation, or PUI (S3); and after calcium hydroxide intracanal medication (S4). The samples were submitted to DNA and RNA extraction. The RNA was submitted to reverse transcription reaction (RT-PCR) to make the complementary DNA double strand (cDNA). DNA and cDNA were submitted to qPCR reactions with universal primers for the 16S rRNA region of the *Bacteria* domain. The metabolic activity of bacteria was verified by the relation of rRNA and rDNA levels as determined by qPCR assays. Data were analyzed by Wilcoxon test for paired samples ($p < 0.05$). S1 samples from the 20 cases had high levels of bacterial rDNA (median: 1.25×10^5 , range $1.83 \times 10^4 - 9.2 \times 10^6$) and rRNA (median: 5.47×10^5 , range $7.8 \times 10^4 - 5.95 \times 10^7$). Seventeen canals (85%) showed rDNA positive qPCR reactions in post-preparation samples (S2). The reduction in rDNA after preparation was statistically significant ($p = 0.0003$), with a median of 2.5×10^4 (range $2.26 \times 10^3 - 9.52 \times 10^4$) copies of rDNA in S2. In turn, rRNA levels (median: 7.84×10^4 , range $2.91 \times 10^3 - 1.09 \times 10^6$) were higher than rDNA levels ($p = 0.01$), suggesting that bacteria were metabolically active in S2. After PUI, the number of rDNA-positive samples dropped to 12, representing a significant reduction

compared to S2 samples ($p = 0.008$). In addition, PUI significantly reduced rDNA levels (median 2.94×10^3 , range $2.70 \times 10^3 - 1.09 \times 10^5$) compared to S2 samples ($p = 0.01$). In rRNA-based analysis, S3 levels (median: 03×10^4 , $1.82 \times 10^3 - 1.39 \times 10^5$ range) showed no significant difference compared to rDNA levels ($p = 0.07$), suggesting that there was a reduction in bacterial metabolism after PUI. In S4, the number of rDNA positive cases ($n = 13$) and rDNA levels (median: 3.73×10^4 , range $1.98 \times 10^3 - 3.21 \times 10^5$) were slightly higher when compared to S3 samples, but without significant differences. However, rRNA levels (median: 1.08×10^5 , range $3.41 \times 10^3 - 1.60 \times 10^6$) were higher than rDNA levels ($p = 0.02$) in S4 samples, suggesting that bacteria restored their metabolic activity despite the intracanal medicament use. Therefore, it was concluded that passive ultrasonic irrigation contributed to root canal disinfection, promoting a reduction in bacterial number and metabolism. On the other hand, bacteria remained active in the root canals after calcium hydroxide use as intracanal medication in teeth with apical periodontitis.

Keywords: Endodontics. Passive ultrasonic irrigation. Calcium hydroxide. Apical periodontitis. Quantitative RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Fluxograma das etapas clínicas e coletas microbiológicas.....57
- Figura 5.1 - Número de casos com reações qPCR positivas para rDNA após os seguintes procedimentos endodônticos: cirurgia de acesso (S1), preparo químico-cirúrgico (S2), PUI (S3) e medicação intracanal entre sessões (S4).....66
- Figura 5.2 - Níveis médios de rDNA e rRNA em amostras qPCR positivas para ambos os métodos antes e após os procedimentos clínicos69

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1 - Distribuição de 20 casos segundo idade, gênero, grupo dental e diâmetro final do preparo do canal.....65
- Tabela 5.2 - Valores da mediana (mínimo - máximo) dos níveis de rDNA bacteriano em 20 canais radiculares após os seguintes procedimentos endodônticos: cirurgia de acesso (S1), preparo químico-cirúrgico (S2), PUI (S3) e medicação intracanal entre sessões (S4).....67
- Tabela 5.3 - Taxa de detecção dos métodos baseados em rDNA e rRNA em 20 canais radiculares após os seguintes procedimentos: cirurgia de acesso (S1), preparo químico-cirúrgico (S2), PUI (S3), e medicação intracanal entre sessões (S4).....68
- Tabela 5.4 - Valores da mediana (mínimo - máximo) dos níveis de rDNA e rRNA das amostras com reações de qPCR positivas para os 2 métodos nas diferentes etapas do tratamento.....68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

=	Igual
>	Maior
<	Menor
μL	Microlitro
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CHX	Digluconato de clorexidina
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio
CRT	Comprimento real de trabalho
CUI	Irrigação Ultrassônica Contínua
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
G	Gauge
h	Hora
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MIC	Medicação intracanal
mL	Mililitro
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NiTi	Níquel-Titânio

nM	nanoMol
Pb	pares de base
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PQC	Preparo químico-cirúrgico
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
RT-PCR	Reação de transcriptase reversa
Ssp	Espécies
TE	Tris + EDTA

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	Microbiologia endodôntica: da cultura aos métodos moleculares.....	27
2.2	Controle da infecção endodôntica: preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares.....	31
2.3	Procedimentos de desinfecção complementar ao preparo químico-cirúrgico: irrigação ultrassônica passiva – estudos <i>in vitro</i>	37
2.4	Procedimento de desinfecção complementar ao preparo químico-cirúrgico: irrigação ultrassônica passiva – estudos clínicos randomizados.....	44
2.5	Procedimentos de desinfecção complementares ao preparo químico-cirúrgico: medicação intracanal entre sessões.....	46
3	PROPOSIÇÃO	53
3.1	Objetivo geral.....	53
3.2	Objetivos específicos.....	53
3.3	Hipótese nula.....	53
4	MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1	Aspectos éticos.....	55
4.2	Recrutamento de pacientes elegíveis.....	55
4.3	Preparo dos canais radiculares e coletas microbiológicas.....	56
4.3.1	Procedimentos clínicos iniciais e desinfecção do campo (C1) ..	56
4.3.2	Odontometria eletrônica e primeira coleta (S1)	58
4.3.3	Preparo dos canais radiculares e segunda coleta (S2)	59
4.3.4	PUI e terceira coleta (S3)	60
4.3.5	Análise quantitativa de bactérias	62
4.3.5.1	<i>Extração de DNA/RNA e síntese do cDNA</i>	62
4.3.5.2	<i>Reação em cadeia de polimerase em tempo real</i>	63
4.4	Análise estatística	64

5	RESULTADOS.....	65
5.1	Análise por qPCR baseada em rDNA: quantificação bacteriana.....	65
5.2	Análise por qPCR baseada em rRNA e rDNA: metabolismo bacteriano.....	67
6	DISCUSSÃO.....	71
6.1	Da metodologia	71
6.2	Dos resultados.....	73
6.3	Perspectivas futuras.....	79
6.3.1	Avaliação da irrigação ultrassônica contínua	80
7	CONCLUSÃO.....	81
	REFERÊNCIAS.....	83
	APÊNDICES.....	90
	ANEXOS.....	99

1 INTRODUÇÃO

A periodontite apical é um processo inflamatório dos tecidos periapicais decorrente de um quadro infeccioso localizado no sistema de canais radiculares devido à necrose pulpar. Dessa forma, o principal agente etiológico da periodontite apical é a comunidade bacteriana organizada em biofilme, aderida às paredes dentinárias dos canais radiculares. O objetivo principal do tratamento endodôntico é tratar e prevenir esta doença, reduzindo a carga bacteriana o máximo possível e, assim, dar condições ao organismo para que repare o processo patológico.

Durante o tratamento, são utilizados instrumentos endodônticos para excisão da dentina contaminada, associados a substâncias químicas com amplo espectro de ação antimicrobiana. Entretanto, essa fase de preparo químico-cirúrgico (PQC) apresenta limitações devido à inacessibilidade dos instrumentos à complexa anatomia do sistema de canais radiculares e à ação antimicrobiana reduzida das soluções químicas sobre biofilmes bacterianos alojados nessas áreas. Assim sendo, estudos sugerem a realização de técnicas complementares após o preparo, visando potencializar a fase de sanificação do sistema de canais radiculares.

A irrigação ultrassônica passiva (PUI, acrônimo do termo em inglês *passive ultrasonic irrigation*) tem sido um dos métodos mais estudados na literatura como terapia imediata para complementar a desinfecção após o preparo dos canais radiculares ainda na primeira sessão do tratamento. Tal fato se justifica pela potencialização da ação antimicrobiana das soluções irrigadoras e de limpeza das paredes dos canais radiculares, além de facilitar a permeabilidade nas áreas de difícil acesso. O ultrassom irá transmitir, por meio dos insertos, uma onda acústica que se dissipará na solução química na forma de cavitação e micro-correnteza acústica. Embora diversos estudos laboratoriais apontem para a potencialização da capacidade de limpeza e desinfecção da solução ativada por ultrassom, existe uma escassez de estudos clínicos que comprovem a efetividade desse procedimento.

Buscando ainda maximizar a redução bacteriana no sistema de canais radiculares, alguns autores propõem o uso da medicação intracanal entre as sessões do tratamento endodôntico. Devido à dificuldade de eliminação da infecção

bacteriana na primeira consulta do tratamento endodôntico, o hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) tem sido o medicamento mais frequentemente utilizado. A falta de estudos clínicos de alta qualidade torna a evidência clínica fraca para a indicação do tratamento endodôntico em 1 ou 2 sessões; sendo este um dos assuntos mais controversos na endodontia.

A construção do conhecimento acerca do controle da infecção endodôntica se deu principalmente por estudos cuja metodologia era baseada em cultura microbiológica. Embora este método consiga revelar a viabilidade bacteriana, a cultura microbiológica apresenta algumas limitações. Entre elas pode-se citar a baixa sensibilidade e a incapacidade de detectar bactérias ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo, que representam uma grande proporção da microbiota endodôntica.

Por sua vez, a alta sensibilidade dos métodos moleculares tem feito desta metodologia a mais fiel em trabalhos que investigam o perfil microbiano das infecções endodônticas antes e após o tratamento. Os métodos baseados na molécula de DNA apresentam como vantagem a maior sensibilidade na detecção e quantificação da população bacteriana quando comparados aos métodos dependentes de cultura, além de possibilitar o estudo de bactérias ainda não cultiváveis. A quantificação absoluta de bactérias se baseia na quantidade de genes (geralmente o gene 16S rRNA) determinada pela reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR). Entretanto, esse método quantifica inclusive DNA de bactérias mortas, podendo, assim, apresentar uma supervalorização do processo infeccioso, especialmente em amostras após os procedimentos endodônticos.

Por outro lado, o método baseado na molécula de RNA é capaz de detectar a viabilidade bacteriana, pelo fato do RNA ser uma molécula mais instável do que o DNA após a morte bacteriana. Além disso, o RNA ribossômico (rRNA) é abundante em células metabolicamente ativas. Entretanto, como a quantidade de rRNA varia de acordo com as condições fisiológicas da célula, esta molécula não permite a quantificação absoluta das bactérias por qPCR. Para suprir essas desvantagens, tem-se sugerido a associação de métodos moleculares baseados em rRNA e seus respectivos genes (denominado rDNA) para o estudo de comunidades bacterianas. Desta forma, pelo rDNA é possível quantificar as bactérias e pela relação entre os níveis de rRNA e rDNA determinar se essas bactérias estão metabolicamente ativas.

Até o presente momento, poucos estudos clínicos utilizaram métodos moleculares baseados em rDNA e rRNA bacteriano para monitorar o nível de bactérias viáveis após os procedimentos endodônticos. A busca de protocolos que alcancem a máxima redução bacteriana pode contribuir para um melhor prognóstico do tratamento. Portanto, objetivo desse estudo clínico foi investigar, por métodos moleculares baseados em rDNA e rRNA, o efeito da irrigação ultrassônica e da medicação intracanal com hidróxido de cálcio nos níveis e no metabolismo das bactérias que persistiram após o preparo dos canais radiculares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiologia endodôntica: da cultura aos métodos moleculares

Sabe-se que as bactérias são os principais agentes etiológicos da periodontite apical desde 1894, com estudo clássico de Miller. Por meio de esfregaço do material coletado de canais radiculares infectados observou os três tipos morfológicos básicos de células bacterianas: cocos, espirilos e bacilos. O autor concluiu também que havia outras espécies não passíveis de cultivo por conta da limitação de técnica da época, abrindo precedente para um campo de pesquisa intenso que se desenhou desde então.

Com o avanço das pesquisas e desenvolvimento de técnicas de cultura de bactérias anaeróbias, o conhecimento do perfil microbiológico das infecções endodônticas teve um aprimoramento (Sundqvist, 1976). Este método foi bastante difundido e utilizado durante mais de um século. Atualmente são conhecidas algumas limitações desta metodologia, incluindo: uma baixa sensibilidade de detecção dos micro-organismos envolvidos no processo, identificação equivocada de cepas com fenótipo ambíguo e a inabilidade de cultivar muitas espécies orais em condições laboratoriais. Esses fatos podem contribuir para a subestimação da diversidade da população microbiana que coloniza o sistema de canais radiculares (Siqueira; Rôças, 2005a,b; Rôças; Siqueira, 2011a,b; Paiva et al., 2013a).

Com o advento das técnicas moleculares de mapeamento das infecções endodônticas um novo cenário se desenhou frente aos procedimentos endodônticos (Siqueira; Rôças, 2005b). Em um trabalho de revisão, Siqueira e Rôças (2009) apontaram para espécies bacterianas que até então eram desconhecidas no processo de patogênese da periodontite apical. Espécies ainda não cultiváveis foram frequentemente identificadas pelos métodos moleculares, sugerindo um papel de destaque no percurso da infecção. Diversos filos foram apontados com alta prevalência na doença, tais como *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes* e *Synergistes*. A análise das bactérias nas infecções endodônticas por biologia molecular revelou 210 táxons diferentes de

bactérias, correspondendo a 45% dos táxons encontrados nas infecções endodônticas, em contraste aos 151 táxons detectados nos estudos baseados em cultura microbiológica.

Diversos autores apontaram a maior sensibilidade dos métodos moleculares quando comparados aos métodos de cultura para identificação do perfil microbiológico das infecções endodônticas (Vianna et al., 2006; Siqueira; Rôças, 2009; Alves et al., 2012; Rôças et al., 2013, Rôças et al., 2014). Esse fato se torna ainda mais relevante na análise da microbiota após os procedimentos endodônticos, onde um pequeno número de bactérias é esperado. Paiva et al. (2012) avaliaram em um estudo clínico, o efeito antimicrobiano do preparo químico-cirúrgico seguido pelo procedimento suplementar de desinfecção. A análise foi feita pelo método de cultura e reação de PCR. Quando a cultura foi utilizada, 37% dos canais ainda apresentavam contaminação após o debridamento químico mecânico. Por outro lado, quando o método molecular foi empregado, a porcentagem subiu para 67%, mostrando uma diferença significativa quanto à sensibilidade dos métodos. Já Rôças et al. (2014) avaliaram por método molecular a prevalência de espécies de bactérias selecionadas, porém ainda não cultivadas e de difícil cultura em canais infectados e a susceptibilidade destas aos procedimentos do preparo químico mecânico. Dentes unirradiculares foram preparados e então as coletas microbiológicas foram feitas previamente (S1) ao preparo e após (S2). As amostras foram submetidas a análise quantitativa por qPCR e os resultados revelaram que diversas espécies ainda não cultivadas e difícil de cultivar podem participar no microbioma da periodontite apical. Porém os procedimentos químico-mecânicos foram efetivos na eliminação destas taxas ou pelo menos reduzir substancialmente.

No estudo de Teles et al. (2014) duas metodologias foram empregadas para avaliar a ação antimicrobiana da medicação intracanal com hidróxido de cálcio e clorexidina, método molecular por qPCR e a cultura. Os resultados apresentaram redução microbiana em ambas análises, porém uma análise entre as metodologias não foi feita e segundo os autores deve ser desencorajada, pois indicam realidades completamente distintas. Assim a análise direta, amostra a amostra, das duas técnicas não reflete acordo ou desacordo, apenas duas entidades diferentes sendo mensuradas. Importante ressaltar que a aplicação por 14 dias da medicação intracanal com hidróxido de cálcio aumentou o número de culturas negativas quando

comparado com a clorexidina, porém quando comparada com S2, não houve aumento significativo. Mesmo não havendo análise estatística entre os métodos, numericamente o qPCR quantificou uma redução microbiana de 99,1% e a cultura de anaeróbios 98,5%.

Dessa forma, como apontado por Siqueira; Rôças (2005a,b) e Rôças; Siqueira (2011a), para o estudo e determinação do perfil da infecção endodôntica, as avaliações utilizando os métodos moleculares independentes de cultura são importantes devido à fidelidade e riqueza de informação. Diversos estudos realizaram a detecção e/ou quantificação do DNA bacteriano, especificamente do gene 16S rRNA, que codifica a porção 16S do RNA ribossômico (rRNA) (Siqueira; Rôças, 2011; Rôças; Siqueira, 2011b; Paiva et al., 2012; Rôças et al., 2013; Paiva et al., 2013b; Nakamura et al., 2018). Como as bactérias possuem um gene único ou poucas cópias desse gene, a quantificação absoluta pela reação de PCR quantitativa (qPCR) se torna possível através do DNA. Entretanto, um viés desta metodologia pode ser a supervalorização da infecção endodôntica, pela detecção do DNA de bactérias mortas. Sendo assim, não há uma distinção entre células vivas e mortas, principalmente nas coletas microbiológicas feitas a partir dos canais radiculares imediatamente após os procedimentos endodônticos. Esta questão é discutida por diversos autores (Rôças; Siqueira, 2010; Rôças; Siqueira, 2011a; Alves et al., 2012).

Siqueira Jr e Rôças (2005b) pontuam que para superar ou pelo menos minimizar este problema em potencial, podem ser feitos ajustes na metodologia de detecção do DNA ou utilizar uma tecnologia derivada deste método que detecta RNA bacteriano, pelo PCR de transcriptase reversa (RT-PCR). Como o RNA apresenta meia vida menor que o DNA, eles são rapidamente degradados após a morte celular. O RNA-mensageiro (mRNA) conta com uma meia vida muito curta e sua detecção reflete de maneira fiel a viabilidade. Assim como o RNA-ribossomal (rRNA) também apresenta sua viabilidade comprometida após a morte bacteriana.

Portanto, o RT-PCR do rRNA pode oferecer uma sensibilidade aumentada em muitas vezes quando comparada com o PCR baseado no DNA. Isto ocorre porque a bactéria apresenta múltiplas cópias do rRNA quando comparada com o gene rRNA (DNA). Portanto o RNA é mais difícil de preservar do que o DNA. Esta dificuldade é

graças primeiramente à rápida degradação das moléculas de RNA pelas RNases, enzimas que são altamente estáveis e onipresentes em ambientes vivos (Siqueira; Rôças, 2005a; Rôças; Siqueira, 2011a; e Alves et al., 2012).

Para tal, como apontado por Siqueira Jr e Rôças (2005b) e Alves et al., (2012), a utilização do *propidium monoazide* previamente a extração do DNA é uma alternativa viável para que se tenha o RNA bacteriano como foco. Outra possibilidade é a utilização combinada dos métodos de detecção de rRNA/rDNA pois assim, é possível determinar a atividade metabólica bacteriana. Como descrito por Rôças e Siqueira (2010) onde o objetivo do estudo foi identificar a taxa bacteriana persistente aos procedimentos endodônticos utilizando o método RT-PCR combinado com método de hibridização DNA-DNA *checkerboard* por captura reversa. O estudo foi composto por 15 pacientes diagnosticados com periodontite apical. Dentre os critérios de inclusão constavam dentes a serem tratados e retratados. Os resultados mostraram que apenas 3 coletas das 45 realizadas apresentaram resultados discrepantes quando da comparação dos métodos de análise por DNA e rRNA. Estas 3 análises foram positivas para o DNA e negativas para o rRNA. Como a análise do DNA apresenta uma leitura da população bacteriana mais genérica, ainda precisa ser melhor explorada se a razão DNA/rRNA são equivalentes na determinação da prevalência de espécies específicas/filotipos após os procedimentos endodônticos. Dessa forma, maiores estudos comparando diretamente as duas metodologias na detecção de bactérias persistentes são necessários para se formar uma conclusão confiável.

Em outro estudo, Pinheiro et al. (2015) utilizaram o método qPCR com alvo no rRNA para identificação do *E. faecalis* nos canais radiculares após os procedimentos endodônticos. Paralelamente, as mesmas coletas foram analisadas pelo método qPCR utilizando o rDNA como padrão. As coletas foram extraídas de 18 dentes com periodontite apical persistente/secundária antes (S1) e após o preparo químico mecânico (S2). O RNA e DNA foram extraídos e para complementar o estudo, uma análise por qPCR com *primers* da sequência 16S rRNA para o *E. faecalis* foi realizada. Na primeira análise, pré procedimentos endodônticos (S1), a comparação dos ensaios com rRNA e rDNA, o *E. faecalis* foi detectado 77,8% e 72,2%, respectivamente. Já em S2, houve redução na atividade metabólica porém o *E. faecalis* ainda foi detectado em 33,3% das amostras do rDNA e 61,1% para o rRNA,

indicando ainda alta atividade metabólica. Dessa forma, os autores concluíram que o *E. faecalis* permanece ativo após os procedimentos endodônticos e que esta metodologia de análise, avaliando rDNA e rRNA pode ser uma ferramenta útil para o monitoramento das leituras microbianas durante o tratamento endodôntico.

Zandi et al. (2018) avaliaram a microbiota presente em casos de periodontite apical pós tratamento endodôntico, por meio de coletas microbiológicas e analisadas por pirosequenciamento. Amostras de 10 canais já tratados foram coletadas antes (S1) e após (S2) o preparo químico mecânico com NaOCl 1% ou CHX 2%. O DNA foi extraído e o gene 16S rRNA foi amplificado e avaliado por pirosequenciamento para determinar a composição bacteriana. Os resultados revelaram uma diversidade muito grande nas coletas S1 e S2, sem diferença significativa.

2.2 Controle da infecção endodôntica: preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares

Segundo Ng et al. (2011), os postulados do tratamento endodôntico foram apresentados no início do século passado (Hall, 1928) e permanecem consistentes até os dias atuais, sendo o controle microbiológico considerado o principal alvo do tratamento endodôntico. O preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares constitui uma fase importante para o controle da infecção endodôntica devido ao debridamento mecânico dos instrumentos, à ação hidrodinâmica do processo de irrigação-aspiração e à ação antibacteriana dos irrigantes. Todo esse arsenal visa à desorganização e desestruturação do biofilme bacteriano localizado no interior do sistema de canais, promovendo, assim, uma redução drástica no nível de contaminação bacteriana.

A busca pela otimização da descontaminação do sistema de canais radiculares incentivou o desenvolvimento de novos sistemas de preparo mecânico do canal radicular. Como descrito por Rôças et al. (2013), ainda não há uma evidência clara se a instrumentação mecanizada é superior à instrumentação manual em termos de desinfecção. Como a proposta central do instrumento endodôntico é debridar e modelar o canal, um possível benefício do mecanizado

sobre o manual seria com relação ao efeito de limpeza e desinfecção, pois este aquece e promove uma turbulência da solução irrigante. Entretanto as comparações entre as formas de instrumentação, manual ou mecanizada em termos de otimização da fase de sanificação ainda possui baixa evidencia científica.

A instrumentação mecanizada otimizou e acelerou a fase de modelagem do canal radicular. O movimento reciprocante aumentou o contato do instrumento com as paredes do canal, resultando em um preparo mais homogêneo e com interação mais íntima com o canal principal (Alves et al., 2012). Outra alternativa foi avaliada por Neves et al. (2014) com o instrumento auto ajustável (SAF), do inglês *Self Adjusting File*. Os autores avaliaram clinicamente a efetividade antimicrobiana destes instrumentos utilizando os métodos moleculares e comparando com a instrumentação manual. Foram feitas coletas microbiológicas antes (S1) e após o preparo químico mecânico (S2) e as informações foram analisadas pela metodologia do qPCR. Da análise quantitativa, foi possível detectar uma redução significativa promovida pela SAF quando comparada com a instrumentação manual, de 99,9% e 95,1%, respectivamente. Da análise qualitativa, a SAF resultou em significativamente mais casos com PCR negativo do que a instrumentação manual, 54,4% e 4,5%, respectivamente.

Rôças et al. (2013) avaliaram clinicamente a efetividade antimicrobiana de duas técnicas de instrumentação dos canais radiculares, técnica manual e rotatória e foi feita análise qualitativa por qPCR pela extração de DNA. Foram comparadas as técnicas manual e rotatória, utilizando os instrumentos BioRaCe e irrigação com NaOCl 2,5%. Os resultados revelaram que as amostras de S1 detectaram bactérias em todos os casos. A análise por cultura mostrou que 45% dos casos da instrumentação manual ainda apresentavam presença de bactérias. A instrumentação rotatória mostrou 35% de contaminação remanescente, porém essa diferença não foi significativa. Dessa forma, in termos de incidência de resultados positivos para bactérias, a cultura não apresentou significância entre os grupos. Em uma análise mais sensível, a instrumentação rotatória resultou em mais casos negativos.

Os sistemas reciprocantes foram propostos para cumprir a tarefa de preparo do canal radicular apenas com uma única lima. Esses instrumentos são feitos de

uma liga padrão de níquel-titânio com tratamento *M-wire*. O sistema Reciproc (VDW, Munich, Alemanha) é o mais difundido e está disponível com 3 tamanhos distintos (R25, R40 e R50), onde a seleção do instrumento ideal é feita de acordo com o diâmetro do canal radicular. Apresenta taper variado ao longo da parte ativa do instrumento, sendo 0,08, 0,06 e 0,05 mm, respectivamente. Esses sistemas são operados com movimentos reciprocantes, de tal forma que a cada 3 ciclos, é completada uma volta de 360°. Estruturalmente, os sistemas reciprocantes apresentam maior resistência à fadiga e maior tempo de vida útil quando comparados com os instrumentos de rotação contínua (Neves et al., 2016). Neste estudo, os autores compararam a efetividade antimicrobiana dos instrumentos reciprocantes com instrumentos de rotação contínua, durante a fase de preparo de canais radiculares com periodontite apical. Foram comparados os instrumentos Reciproc (n=29) e BioRaCe (n=30) sob irrigação com hipoclorito de sódio 2,5%. Foram feitas extrações de DNA das coletas antes e após o preparo para análise quantitativa do total de bactérias e de streptococci utilizando o qPCR. Após o preparo com BioRaCe e Reciproc, 50% e 55% dos canais ainda apresentavam bactérias detectáveis. Os dois sistemas foram efetivos na redução microbiana, com diferença significativa entre as análises pré e pós preparo, porém da análise intra-sistemas, ambos foram semelhantes.

Ao longo do tempo, diversas soluções químicas foram propostas como eficientes irrigantes para o tratamento endodôntico. Dentre elas, a substância química mais explorada cientificamente é o hipoclorito de sódio, graças a sua ação antimicrobiana de amplo espectro e a capacidade de dissolução tecidual (Siqueira; Rôças, 2011; Ng et al., 2011; Rôças; Siqueira, 2011a; 2011b; Alves et al., 2012; Paiva et al., 2012; Paiva et al., 2013a,b; Nardello, 2018; Nakamura et al., 2018; Carvalho, 2019). As excelentes propriedades de solvente orgânico do NaOCl conferem a ele efetividade antimicrobiana como agente irrigante.

Embora a fase de preparo químico-cirúrgico seja considerada a principal fase para o controle da infecção endodôntica, ela não é suficiente e eficiente para cumprir esta função com excelência (Alves et al., 2012). Estudos revelam que 40 a 60% dos casos de dentes com periodontite apical permanecem com bactérias detectáveis, após a fase de preparo químico-cirúrgico (Rôças; Siqueira, 2011a; Siqueira; Rôças,

2011b; Paiva et al., 2012; Beus et al., 2012; Paiva et al., 2013a,b; Nakamura et al., 2018).

Fatores como diversidade anatômica, falta de adaptação do instrumento à anatomia do canal, limitação da ação antimicrobiana da solução química, resistência bacteriana e organização bacteriana em biofilme podem levar a um considerável número de casos com bactérias detectáveis após a fase preparo químico-cirúrgico (Siqueira; Rôças, 2005a; 2005b; 2009; 2011; Ng et al., 2011; Rôças; Siqueira, 2011a; 2011b; Alves et al., 2012; Paiva et al., 2012; Beus et al., 2012; Cachovan et al., 2013; Paiva et al., 2013a; Nardello, 2018; Nakamura et al., 2018; Moreira et al., 2018; Carvalho, 2019). Outro fator determinante para a efetividade do protocolo endodôntico em termos de otimização de efeito antimicrobiano é o alargamento apical, como descrito por Rodrigues et al. (2017).

Rôças e Siqueira (2011a), comparando a eficácia antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio 2,5% e a clorexidina 0,12% quando usadas como irrigantes durante o preparo químico mecânico de dentes com periodontite apical. A presença dos filos bacteria, arquea e fungo foram avaliados pelo método molecular PCR *broad-range*, enquanto que a identificação bacteriana foi feita pela abordagem híbrida DNA-DNA *checkerboard* de captura reversa, investigando 28 possíveis patógenos. Quarenta e sete dentes que obedeceram aos critérios de inclusão foram selecionados. Foram feitas coletas microbiológicas antes (S1) e após (S2) os procedimentos de preparo químico mecânico. Nos grupos experimentais foram avaliados o hipoclorito de sódio 2,5% (n=30) e clorexidina 0,12% (n=17). Obtiveram como resultado que no grupo do hipoclorito de sódio, 60% dos dentes ainda permaneceram com bactérias detectáveis e no grupo da clorexidina, 53% dos casos ainda foi detectado. Assim, os autores concluíram que os regimes empregados reduziram significativamente os níveis de canais infectados, porém esta redução não foi significativa entre as substâncias.

Rôças e Siqueira (2011b) trabalhando com a mesma metodologia de análise, PCR por hibridização DNA-DNA, avaliaram o efeito antimicrobiano do preparo químico cirúrgico com hipoclorito de sódio 2,5% e a técnica mecânica de movimento de rotação alternada, suplementado pela medicação intracanal. Os autores

conseguiram como resultado da análise, uma incidência de PCR positivo entre 42 e 50%, quando comparadas as amostras pré e pós preparo químico cirúrgico.

No estudo de Rôças et al. (2016), os autores compararam a efetividade antimicrobiana da solução de hipoclorito de sódio 2,5% e clorexidina 2% empregadas como irrigantes durante a fase de preparo de canais infectados associados com periodontite apical. Foram estudados 50 pacientes que obedeceram aos critérios de inclusão. A análise microbiológica foi feita pelo método qPCR. Os resultados revelaram que o preparo químico mecânico com instrumentos rotatórios e as substâncias testadas promoveram uma redução no número total de bactérias, NaOCl 2,5% redução de 95,5% e a clorexidina redução de 95,4%; e na quantidade de detectáveis e em ambos os grupos, NaOCl apresentou ainda 44% de casos positivos e clorexidina, 40% de casos positivos. Entretanto estas diferenças em ambas as análises, não foram estatisticamente significantes.

Gonçalves et al. (2016) em um trabalho de revisão sistemática, compararam a efetividade do NaOCl e da clorexidina na desinfecção do canal radicular no tratamento endodôntico. Dois estudos relataram efetividade e redução similar nos níveis bacterianos para ambos irrigantes. O NaOCl foi mais efetivo que a clorexidina em 1 estudo e a clorexidina mais efetiva no outro estudo. Ambos irrigantes não foram efetivos na remoção da endotoxina em 1 estudo. O *design* do estudo e informação sobre a randomização não foram claramente descritos nos ensaios clínicos. Nenhum estudo comparou os resultados laboratoriais com os clínicos. Os autores concluíram que a evidência disponível sobre a efetividade dos irrigantes endodônticos é escassa e os achados não foram consistentes.

Rodrigues et al. (2017) avaliaram os efeitos do alargamento apical e o tipo de irrigante na redução bacteriana em dentes já tratados endodonticamente em com periodontite apical. Foram selecionados 43 dentes com tratamento endodôntico prévio e periodontite apical associada. Dois grupos foram formados, NaOCl 2,5% com n=22 e salina com n=21. As coletas microbiológicas foram realizadas previamente ao preparo (S1) e imediatamente após (S2) e uma terceira coleta (S3) após o terceiro instrumento do sistema *Twisted File Adaptive* (SybronEndo, Orange, CA). Importante ressaltar que no grupo da salina, uma irrigação adicional com hipoclorito de sódio 1% foi feita (S4). O DNA foi extraído das coletas e submetido à

análise por qPCR para avaliar os níveis totais de bactérias e streptococci. Os resultados revelaram que todas as amostras iniciais foram positivas para bactérias. O nível de descontaminação foi significativamente maior no grupo do NaOCl com os instrumentos mais calibrosos, no caso para unirradiculares, o instrumento 50/.04 e multi radiculares 35/.04. Portanto, os autores concluíram que independente do tipo do irrigante, o aumento no alargamento apical melhorou significativamente a desinfecção do canal radicular.

Nakamura et al. (2018) obtiveram uma redução de dentes com qPCR positivo entre 20 e 24% quando se comparou as duas primeiras coletas (S1 e S2), pré e pós preparo químico cirúrgico, utilizando-se como irrigante a solução de hipoclorito de sódio 2,5% e instrumentação recíprocante. Já Carvalho (2019), com o mesmo protocolo de preparo químico cirúrgico, obteve uma redução de 50% na mesma fase. Ambos evidenciando as limitações de sanificação do sistema de canais.

Siqueira e Rôças (2008) em um trabalho de revisão, esclareceram que as bactérias que resistem aos procedimentos endodônticos e estão presentes no momento da obturação podem influenciar diretamente o resultado do tratamento endodôntico. Isso pode ocorrer devido a alguns fatores, a saber: as bactérias tem a capacidade de resistir a longos períodos de falta de nutrientes, ou buscam por áreas que permaneceram contaminadas pós procedimentos intracanal e/ou assumem uma forma latente e diminuem drasticamente a atividade metabólica, até o momento que uma fonte de nutriente seja reestabelecida. Outro ponto, as bactérias resistem às mudanças ecológicas induzidas pelo tratamento, nas alterações de nutrição e trocas genéticas, incluindo a quebra do sistema *quórum-sensing* e até a desorganização da estrutura protetora do biofilme. Neste contexto, é importante ressaltar que a resistência do hospedeiro à infecção é também fundamental neste processo.

Siqueira e Rôças (2009) esclarecem que a infecção secundária é causada por microrganismos que não estavam presentes na infecção primária, mas foram introduzidos no sistema de canais radiculares após a intervenção profissional. A infecção persistente é causada por microrganismos presentes na infecção primária ou secundária e que de alguma forma resistiram aos procedimentos antimicrobianos intracanal e suportam períodos de privação nos canais tratados. A infecção intraradicular persistente ou secundária é a principal causa de diversos problemas

clínicos, incluindo a falha no tratamento endodôntico que é caracterizada pela persistência ou aparição da periodontite apical após o tratamento.

Diversos autores esclarecem que a contaminação residual pode ser responsável por colocar em risco o sucesso endodôntico (Ricucci; Siqueira, 2010; Rôças; Siqueira, 2011a,b; Beus et al., 2012; Paiva et al., 2013b; Nakamura et al., 2018). Diante das limitações do preparo químico-cirúrgico, a literatura aponta a necessidade da realização de técnicas complementares ao preparo químico-cirúrgico para potencializar os efeitos de descontaminação (Siqueira; Rôças, 2011). Assim sendo, esses procedimentos visam atuar de forma mais efetiva sobre a organização do biofilme bacteriano, além de permitir e aprimorar a penetração das substâncias químicas em áreas não atingidas pelos instrumentos endodônticos, reduzindo a carga bacteriana.

2.3 Procedimento de desinfecção complementar ao preparo químico-cirúrgico: irrigação ultrassônica passiva – estudos *in vitro*

A literatura científica tem dedicado atenção às terapias complementares ao preparo químico mecânico do sistema de canais radiculares, graças a sua limitação na fase de sanificação. A PUI é uma das técnicas que vem sendo bastante estudada, porém não há um consenso na literatura sobre sua efetividade. Diferentes resultados tem sido apresentados e esse é o foco deste capítulo, trazer uma revisão sobre os trabalhos *in vitro* que pautaram os estudos clínicos randomizados que serão apresentados na sequência.

A dinâmica da irrigação ou dinâmica de fluidos é um grande aliado no processo de sanificação do sistema de canais radiculares. Apesar do uso de diferentes técnicas durante a instrumentação e preparo mecânico, muito da anatomia intracanal permanece intocada e pode perfeitamente abrigar bactérias. Nesse sentido, a limpeza das superfícies tocadas e não tocadas do canal pode ser aprimorada com técnicas de preparo químico usando a irrigação e principalmente a

ativação do irrigante. A agitação mecânica da solução irrigante pode acontecer com a ativação sônica ou ultrassônica, como descrito por Beus et al (2012).

Ahmad et al. (1987) esclarecem que a irrigação sônica é diferente da irrigação ultrassônica, pois a primeira atua com baixa frequência e produz baixa tensão de cisalhamento. A energia sônica também gera movimentos de maior amplitude da ponta do instrumento quando comparada com o inserto ultrassônico. Uma relação positiva entre a velocidade da onda acústica e a frequência pode explicar a eficiência superior dos sistemas ultrassônicos.

Gu et al. (2009) pontuam que os instrumentos para utilização da agitação ultrassônica são fabricados para oscilar em uma frequência ultrassônica de 25 a 30 kHz, que está além do limite da percepção auditiva humana. Eles operam em uma vibração transversa formando os nodos e antinodos ao longo de todo comprimento do instrumento. Dessa forma, 2 tipos de irrigação ultrassônica são descritas pela literatura: a combinação da instrumentação ultrassônica simultaneamente com a irrigação. A segunda forma descrita é a irrigação ultrassônica passiva. Esta última, como proposta de não-corte à dentina, atua diretamente na solução química promovendo dois efeitos primordiais para a potencialização do efeito químico: cavitação, onda acústica. A cavitação é descrita por diversos trabalhos (Townsend; Maki, 2009; Castelo-Baz et al., 2012; Beus et al., 2012; Mozo et al 2012; Paiva et al., 2012; Paiva et al., 2013b; Cachovan et al., 2013; Mancini et al., 2013; Macedo et al., 2014a,b; Chen et al., 2014; Layton et al., 2015; Castelo-Baz et al., 2016; Moreira et al., 2018; Nakamura et al., 2018)

Além dos efeitos de potencialização das substâncias químicas, van der Sluis et al. (2007) relataram a efetividade da PUI na maior remoção de debris nas adjacências do canal principal e bactérias na forma planctônica. Assim sendo, favoreceu a adesão do cimento, atuando positivamente na adesividade, consequentemente aprimorando a obturação do sistema de canais.

Estudos apontam para o aprimoramento do preparo químico-cirúrgico após a PUI, além de sua atuação mais efetiva em canais ovais e em áreas de reentrâncias anatômicas dos canais radiculares. Entretanto, não há um consenso entre os autores sobre a superioridade da PUI em relação à irrigação convencional quanto à

capacidade de limpeza e desinfecção dos canais radiculares. Em um estudo *in vitro*, Townsend e Maki (2009) utilizaram canais simulados, contaminados com *Enterococcus faecalis* para comparar diferentes sistemas de irrigação e ativação: irrigação tradicional com agulhas, PUI, irrigação com EndoVac por pressão negativa, lima-F (Plastic Endo, Lincolnshire, IL) e ativação sônica. Os autores concluíram que a ativação ultrassônica teve o mesmo comportamento do grupo controle e nenhum sistema utilizado foi capaz de eliminar completamente as bactérias dos canais radiculares.

Harrison et al. (2010) investigaram a habilidade de um sistema de irrigação ativado ultrassonicamente para eliminar bactérias do sistema de canais radiculares de dentes humanos extraídos. Cento e trinta dentes foram inoculados com *E. faecalis* por 4 semanas e então distribuídos aleatoriamente. Dois sub-grupos dos canais preparados foram então expostos a irrigação ultrassônica com NaOCl 1% por 1 minuto ou a 1 semana de medicação intracanal com hidróxido de cálcio. Os espécimes foram então preparados para microscopia eletrônica de varredura e as imagens avaliadas de acordo com critérios pré definidos. A imagem inicial mostrou uma penetração das bactérias de 151 μm . Tanto a irrigação ultrassônica como a medicação intracanal por 1 semana foram efetivos na redução bacteriana, entretanto, nenhum dos grupos foi capaz de eliminar completamente os micro organismos.

Mozo et al. (2012) esclareceram que durante a PUI, energia é transmitida do instrumento ou inserto para o irrigante por meio de ondas ultrassônicas para induzir a onda acústica e a cavitação. Já van der Sluis (2007) definiu a onda acústica como um movimento rápido do fluido na forma circular ou em redemoinho ao redor do instrumento oscilante e a cavitação é definida como a criação de bolhas de vapor ou expansão, contração e/ou distorção das bolhas pré-existentes em um líquido.

Como apontado por Chen et al. (2014), em um modelo experimental de dinâmica de fluidos computadorizado, a agitação ultrassônica é capaz de promover uma maior velocidade do irrigante e maior força de cisalhamento contra as paredes dos canais radiculares quando comparada à irrigação convencional sem ativação. Devido a essas características a PUI tem o potencial de contribuir para a melhoria dos procedimentos de limpeza e desinfecção dos canais radiculares. Por outro lado,

Cachovan et al. (2013) em um estudo dividido em dois momentos distintos, compararam, inicialmente, o efeito da PUI, irrigação a partir de um sistema hidrodinâmico e irrigação manual com solução fisiológica 0,9% na redução bacteriana em 250 dentes contaminados com *Enterococcus faecalis*. O segundo momento, os dois sistemas foram usados com a solução de hipoclorito de sódio 1,5% sozinha e associada à clorexidina 0,2%, sendo ativados por 1 minuto e 30 segundos respectivamente. O sistema hidrodinâmico empregado era um equipamento aplicado à turbina da cadeira odontológica e conectado a uma seringa contendo a solução irrigante. Assim, a agulha era posicionada no terço cervical do canal radicular e a solução irrigante era aplicada sob pressão contínua e sugada concomitantemente. No grupo da PUI, foi utilizado o equipamento de ultrassom com a potência de 29.5 kHz e acoplado nele uma lima de NiTi #15 (Mectron, Cologne, Alemanha). A irrigação manual foi realizada com seringa e agulha por um período de 1 minuto. Os autores concluíram que ambos sistemas de irrigação, quando combinado com hipoclorito de sódio e clorexidina foram os mais efetivos na remoção de bactérias dos canais radiculares.

Ao contrário de Townsend e Maki (2009), que compararam 3 equipamentos de agitação e 2 de irrigação na remoção de bactérias de canais simulados, instrumentados até 35/.06. Os canais foram inoculados com *E. faecalis* e as técnicas de irrigação e agitação empregadas foram com ultrassom, agulhas de irrigação, EndoVac, EndoActivator, F-File (PlasticEndo, Lincolnshire, IL) e ativação sônica. Água estéril foi empregada como irrigante. Os resultados revelaram que a ativação ultrassônica foi mais efetiva que a irrigação manual e o EndoVac, porém semelhante aos demais grupos testados.

Em uma sequência de trabalhos *in vitro*, 3 sistemas de irrigação ultrassônica foram avaliados com relação à penetração do hipoclorito de sódio em canais laterais e acesso ao terço apical de dentes extraídos (Castelo-Baz et al., 2012) e em canais curvos (Castelo-Baz et al., 2016). Para aproximar o máximo possível da realidade, foi criado um sistema fechado em cada dente. Os dentes foram aleatoriamente distribuídos em 3 grupos experimentais de irrigação: Grupo 1 – irrigação com pressão positiva; Grupo 2 – PUI; grupo 3 – CUI. Os resultados de ambos os trabalhos foram semelhantes, mostraram uma penetração significativamente maior do irrigante no canal lateral no grupo da CUI. PUI e CUI não diferiram

estatisticamente na penetração do irrigante no terço apical. Dessa forma, foi concluído que a CUI como irrigação final melhorou a penetração da solução irrigante nos canais laterais simulados, assim como foi superior no acesso ao terço apical para ambas situações dos canais simulados (Castelo-Baz et al., 2012) e nos canais curvos (Castelo-Baz et al., 2016).

Chen et al. (2014) descrevem que a natureza do sistema de irrigação e o tipo de agitação influenciam diretamente o movimento do irrigante na porção apical do canal radicular e a interação do irrigante com as paredes dentinária. Nesse sentido, os autores conduziram estudo para avaliar qualitativamente a dinâmica de irrigação com seringas e diferentes tipos de agulhas, irrigação com pressão negativa com o sistema EndoVac e a PUI, utilizando o modelo experimental de dinâmica de fluidos computadorizado. Os resultados revelaram que a PUI mostrou a maior força de cisalhamento nas paredes junto com a maior magnitude de velocidade.

Outra propriedade positiva da ativação ultrassônica é a remoção de *smear layer* das paredes do canal, favorecendo a limpeza. Tal propriedade foi estudada por Mancini et al. (2013). Os autores avaliaram justamente a efetividade de diferentes métodos de irrigação na remoção do *smear layer* a 1, 3, 5 e 8 mm da região apical de canais radiculares. Sessenta e cinco pré molares foram padronizados e preparados química e mecanicamente e divididos em 5 grupos de acordo com a técnica de ativação do irrigante: irrigação sônica, PUI, irrigação apical por pressão negativa e 2 grupos controle. Os dentes foram clivados e analisados em microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo. Os resultados revelaram que a PUI e o EndoVac não apresentaram diferenças significantes, mas foram superiores aos grupos controles na limpeza em 5 e 8 mm da região apical. Dessa forma, os autores concluíram que nenhum dos sistemas empregados removeu completamente o *smear layer* das paredes dos canais radiculares.

Ainda no tema da remoção do *smear layer*, uma questão bastante relevante é a limpeza da região de istmo que é capaz de abrigar restos necróticos e contaminação residual. Neste ponto, Thomas et al. (2014) avaliaram a eficácia do debridamento desta região por diferentes protocolos de irrigação. Para o estudo foram utilizadas 64 raízes mesiais de molares inferiores. Foram empregados nos grupos experimentais uma modificação do EndoVac, EndoVac, PUI e a Maxi-I-

Probe, que é uma agulha de irrigação. Um protocolo padrão de irrigação foi empregado com os 4 grupos inseridos como irrigação final. Foram feitas imagens antes e após a limpeza e modelagem dos canais e a porcentagem de redução de debris na região de istmo foi calculada por um software de imagem. A análise intragrupo revelou diferença estatística em todos os grupos na redução dos debris após a limpeza e modelagem dos canais e após a irrigação final de acordo com os grupos. A análise intergrupos revelou que a PUI e o EndoVac modificado apresentaram resultados superiores ao controle, mas sem diferença entre si. Dessa forma, foi concluído que o EndoVac modificado foi mais efetivo na limpeza dos istmos quando comparado com outros sistemas.

Macedo et al. (2014a) buscaram quantificar e visualizar a possível ocorrência da cavitação transiente durante a irrigação ativada ultrassônica e sonicamente. A quantidade de cavitação gerada ao redor de vários instrumentos endodônticos foi medida por dosimetria sonoquimioluminescência no interior de 4 modelos de canal radicular nas simulando as dimensões e complexidade dos dentes humanos. Ainda mais, a distribuição espacial da sonoquimioluminescência na raiz foi visualizada com uma fotografia de longa exposição. Os resultados demonstraram que a frequência da oscilação do instrumento, o poder ultrassônico e o taper do instrumento influenciaram a ocorrência e quantidade de cavitação. Na PUI, a cavitação foi distribuída entre o instrumento e a parede do canal adjacente a todo o instrumento e no interior dos canais laterais e istmos. Na ativação sônica, a cavitação não foi detectada. Assim, os autores concluíram que a cavitação se mostrou presente na PUI e aconteceu em ambos canais retos e curvos.

Macedo et al. (2014b) buscaram quantificar e visualizar a ocorrência da cavitação ao redor do instrumento endodôntico. Para tal, foram utilizados métodos sensíveis para detecção sonoquímica da cavitação em diferentes potências assim como a ocorrência em um espaço confinado, como o canal radicular simulado. O instrumento endodôntico foi posicionado intracanal para avaliação da cavitação no confinamento e na cuveta, para as aferições pelos métodos sonoluminescência e sonoquimioluminescência. A densidade do poder acústico também foi avaliada por calorimetria. Os resultados da dosimetria sonoquímica revelaram que a cavitação aconteceu ao longo de todo instrumento endodôntico, mesmo no modelo de confinamento. A quantidade de cavitação variou entre o tipo de instrumento, mas

sempre aumentou quando foi ampliada a potência do ultrassom. As mensurações da temperatura revelaram aumento de 1 a 15°C quando a solução foi ativada por 1 minuto. Dessa forma, os autores concluíram que a produção de cavitação em canais simulados aconteceu mesmo em pequenas potências dos equipamentos. A quantidade de cavitação variou de acordo com o instrumento empregado na relação de quanto maior o diâmetro do instrumento, maior a quantidade de cavitação produzida.

Layton et al. (2015) desenvolveram um modelo experimental padronizado para avaliação em tempo real da dinâmica de fluidos/irrigação e sua correlação com a eliminação de biofilme. Um incisivo superior com canal preparado foi escaneado e reconstruído em impressora 3D. Os canais foram irrigados usando seringas, irrigação ultrassônica intermitente (PUI) e contínua (CUI). Em modelo similar, os canais foram inoculados com *E. faecalis* maduro, cultivado por 3 semanas. Dessa forma, a redução do biofilme com os sistemas de irrigação foram comparados com o controle, onde não foi feito tratamento algum. Os resultados mostraram que a PUI gerou a menor força de cisalhamento. O biofilme foi significativamente reduzido apenas pela CUI.

Avaliando *in vitro* o efeito da onda acústica ultrassônica na desinfecção de canais achatados, associando instrumentos rotatórios e recíprocante, Vasconcelos et al. (2017) valeram-se do método de cultura microbiológica para a realização do estudo. Foram utilizados incisivos inferiores inoculados com *E. faecalis* por 5 dias. Em seguida os dentes foram aleatoriamente divididos em 6 grupos: G1 – ProTapes Universal; G2 – ProTaper Universal com ultrassom; G3 – BioRaCe; G4 – BioRaCe com ultrassom; G5 – Reciproc; e, G6 – Reciproc com ultrassom. A irrigação foi feita com solução salina. Após o preparo foram feitas coletas e analisadas as UFC. Os resultados mostraram que a associação da agitação ultrassônica potencializou a descontaminação em todos os grupos testados, inclusive no controle com solução salina.

2.4. Procedimento de desinfecção complementar ao preparo químico-cirúrgico: irrigação ultrassônica passiva – estudos clínicos randomizados

Em uma sequência de estudos clínicos randomizados, a falta de consenso também fica clara. Beus et al. (2012), em um estudo clínico randomizado prospectivo, compararam os resultados microbiológicos de um protocolo de tratamento endodôntico utilizando irrigação com hipoclorito de sódio 1% sem ativação com um protocolo incluindo irrigação com hipoclorito de sódio 1%, EDTA 17% e clorexidina 2% ativados com PUI. Os dois protocolos proporcionaram um alto percentual de culturas microbiológica negativas: 84% no grupo da PUI e 80% para a irrigação não ativada, sem diferença significativa entre os grupos.

Com resultados semelhantes, Paiva et al. (2012), em estudo clínico, avaliaram o efeito antimicrobiano do preparo do canal radicular utilizando instrumentos rotatórios de NiTi e irrigação com hipoclorito de sódio 2,5%, seguido por um passo suplementar de desinfecção com a ativação ultrassônica passiva ou a irrigação final com clorexidina 2%. Coletas microbiológicas foram feitas entre os passos do tratamento endodôntico e a análise foi feita por meio de cultura e PCR utilizando iniciadores universais para bactérias totais. Foram selecionados para o estudo 30 pacientes. Os canais radiculares foram preparados de forma uniforme, com instrumentos rotatórios BioRaCe variando entre 35/.04 e 50/.04 dependendo do diâmetro do canal. O regime de irrigação foi feito com hipoclorito de sódio 2,5% e a remoção do *smear layer* foi feita com 2 mL de EDTA 17%, por 3 minutos. A irrigação final foram utilizados 5 mL de hipoclorito de sódio 2,5%. Na sequência, os pacientes foram divididos nos dois grupos experimentais. Treze pacientes foram suplementados com PUI, sendo o canal irrigado com 2 mL de hipoclorito de sódio 2,5% e ativados por 1 minuto, em seguida nova irrigação com mais 3 mL de NaOCl e 1 mL de tiosulfato de sódio 5%. O grupo da clorexidina foi composto por 14 pacientes. Após o protocolo padrão de preparo, o canal radicular foi irrigado com 5 mL de clorexidina 2% e em seguida foi neutralizada. As coletas microbiológicas foram feitas pré e pós fase de preparo e suplementação. Dessa forma, os resultados apresentaram que todas as coletas S1 foram positivas para bactéria em todos os métodos. Os procedimentos de preparo do canal radicular reduziram

significativamente a incidência de culturas positivas e resultado do PCR. Embora as abordagens suplementares apresentaram redução bacteriológica quando comparadas com as amostras pós instrumentação, essa redução não foi significativa. Assim, os autores concluíram que embora os procedimentos suplementares reduziram o número de casos com cultura e PCR positivos, muitos casos permaneceram com bactérias detectáveis.

Em outro ensaio clínico, Paiva et al. (2013a) utilizando o método molecular qPCR, avaliaram os efeitos da PUI como técnica complementar ao preparo químico-cirúrgico. Amostras de 10 pacientes foram usadas para o estudo. Três coletas microbiológicas foram feitas, antes e depois da instrumentação rotatória associando hipoclorito de sódio 2,5% e após a ativação do hipoclorito de sódio com PUI. Os autores concluíram que, apesar de uma pequena amostra avaliada, a PUI não foi efetiva em promover uma redução adicional de bactérias quando comparada ao preparo químico-cirúrgico. Diferentemente de Nakamura et al. (2018) que, em estudo clínico randomizado, usando técnica molecular de qPCR para avaliar a remoção de bactérias e endotoxinas do canal. Cinquenta pacientes com quadro de periodontite apical foram aleatoriamente distribuídos em 2 grupos variando o protocolo de irrigação final – Grupo UI: irrigação ultrassônica e Grupo NI: irrigação com agulhas. Os canais foram medicados com hidróxido de cálcio por 14 dias. Foram feitas coletas microbiológicas em todos os passos do tratamento endodôntico. A contagem total de bactérias foi feita com o método de qPCR e os níveis de endotoxina foram medidos com o lisado de limulus. Inicialmente, todas as coletas S1 foram positivas para bactéria. Os valores decaíram significativamente em S2 e após os protocolos de irrigação final (S3) houve também uma queda significativa. A análise intergrupo revelou diferença significativa entre os métodos de irrigação nas amostras S3, entretanto, essa diferença não foi significativa para os níveis de endotoxinas. Dessa forma, os autores mostraram que a PUI foi mais efetiva na redução do número de bactérias quando comparada à irrigação convencional, mas não alterou significativamente os níveis de endotoxina nos canais radiculares com periodontite apical.

Liang et al. (2013) compararam os resultados do tratamento endodôntico com e sem a ativação ultrassônica do irrigante. Foram analisados 84 casos de periodontite apical em dentes uniradiculares. Dois grupos foram designados, sendo

a irrigação convencional empregada em ambos, porém a ativação ultrassônica aconteceu em apenas 1. Após 10 a 19 meses os pacientes foram chamados para a avaliação que se deu por radiografia periapical e tomografia cone-beam. A área e volume das lesões foram mensuradas e os resultados apresentados em 4 categorias distintas: ausência, redução ou aumento da radiolusência, ou incerto. A taxa de presença foi de 82% dos 84 casos. A tomografia detectou mais lesões do que a radiografia periapical, com diferença significativa, mas a porcentagem de ausência entre as duas análises foi semelhante. Assim os autores concluíram que os tratamentos endodônticos com e sem a ativação ultrassônica contribuíram de forma semelhante para o reparo apical.

Um estudo recente de revisão sistemática da literatura e meta análise, concluiu que o nível de evidência clínica comparando a técnica de irrigação ultrassônica passiva com irrigação convencional ainda é fraca (Moreira et al., 2018). Portanto, mais trabalhos clínicos randomizados devem ser realizados a fim de fortalecer cientificamente a técnica e ainda aprimorar o conhecimento sobre a real ação da PUI sobre o irrigante.

2.5 Procedimentos de desinfecção complementares ao preparo químico-cirúrgico: medicação intracanal entre sessões

Nesse sentido, a medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio tem sido indicada para combater a microbiota persistente ao protocolo endodôntico, embora não haja consenso com relação à sua utilização, como tempo de permanência intracanal. Diversos estudos comprovam a redução bacteriana interconsultas promovida pela medicação de hidróxido de cálcio (Molander et al., 2007, Paiva et al., 2013b, Nakamura et al., 2018) a níveis inferiores ao obtido na fase de preparo químico cirúrgico, porém ainda é possível detectar bactérias e endotoxinas.

Weiger et al. (2000) em um estudo clínico prospectivo, exploraram a influência do hidróxido de cálcio como medicação entre consultas no reparo da periodontite apical de dentes com infecção primária. Setenta e três pacientes foram recrutados apresentando 1 dente com lesão periapical. Trinta e um dentes foram preparados e

medicados com o hidróxido de cálcio por pelo menos 1 semana e 36 dentes foram tratados em sessão única. Os critérios avaliados para enquadrar no sucesso terapêutico foram ausência de sinais e sintomas e ligamento periodontal normal. Em ambos os grupos analisados a probabilidade de sucesso terapêutico excedeu 90%, embora não foi detectada diferença estatística entre eles. Os autores concluíram então que sob a perspectiva microbiológica, o tratamento realizado em uma única consulta não apresentou diferença em termos de reparo periapical quando o hidróxido de cálcio foi empregado em duas consultas de tratamento.

Em um estudo clínico randomizado, Molander et al. (2007) concluíram que o tratamento endodôntico em uma única sessão ou duas sessões não apresentou diferença significativa em termos de reparo. Entretanto não é possível afirmar que mesmo os casos que apresentaram reparo estavam livres de bactérias. Em acordo com Nakamura et al. (2018), que comprovaram a redução nos níveis bacterianos e endotoxinas intracanal após a medicação intracanal, porém ainda foi possível detectar em muitos casos a presença de DNA bacteriano e endotoxina. Já Ricucci et al. (2011) encontraram superioridade significativa no reparo em longo prazo nos tratamentos endodônticos realizados em múltiplas consultas, utilizando o hidróxido de cálcio, como medicação intracanal. Comparando a taxa de sucesso dos dentes tratados endodonticamente e que utilizaram o hidróxido de cálcio como medicação intracanal com os que não usaram nenhum tipo de medicação, a porcentagem foi de 89.9% e 76.6%, respectivamente.

Molander et al. (2007) registraram o resultado clínico e radiográfico de 2 anos de controle do tratamento endodôntico em 1 ou 2 consultas e estudou relacionou a significância das coletas microbiológicas no resultado prospectivo. Foram avaliados 53 dentes tratados em sessão única e 48 dentes tratados em 2 consultas. No final do período estudado, 65% dos dentes tratados em sessão única e 75% dos dentes tratados em 2 consultas estavam curados. Esta diferença não foi significativa. Oitenta por cento dos dentes obturados com coleta negativa apresentaram cura e apenas 44% dos dentes obturados com cultura positiva estavam curados. Desta forma, este estudo concluiu que os tratamentos endodônticos realizados em 1 ou 2 consultas apresentam resultados semelhantes na relação da cura da periodontite apical.

Em análise microbiológica por qPCR, Sakamoto et al. (2007) avaliaram amostras pré tratamento endodôntico, pós preparo químico mecânico e pós medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio, coletadas de 18 dentes com periodontite apical. Nove amostras foram selecionadas aleatoriamente para análise do gene 16S rRNA. Após os procedimentos de preparo endodôntico, a medicação intracanal foi aplicada e permaneceu por 1 semana. Os autores encontraram que o protocolo instituído reduziu drasticamente a carga bacteriana, porém quando da comparação da coleta pós preparo químico mecânico (S2) e a pós a medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio (S3), esta não foi capaz em promover uma redução adicional significativa à população microbiana. Tais resultados estão de acordo com outros estudos (Teles et al., 2014; Sharma et al., 2018).

Em estudo tipo cohort prospectivo de 5 anos do tratamento endodôntico de 1369 canais radiculares foi conduzido por Ricucci et al. (2011). Assim a proposta foi analisar o maior número de casos de tratamento endodôntico conduzido por um único operador, acompanhado periodicamente por 5 anos e correlacionar os resultados com o número de variáveis clínicas. No final do período analisado, 470 pacientes com 816 dentes e 1369 canais radiculares tratados foram disponibilizados para análise. Os resultados mostraram que a taxa de sucesso foi entre 88,6% e 99,3%. Os dentes/canais radiculares com necrose pulpar, mas sem lesão óssea apresentaram taxa de sucesso de 89,5% a 92,3%. Com a periodontite apical associada, a taxa de sucesso caiu para 82,7%. Dentes com lesão periapical menores que 5 mm, a taxa de sucesso foi de 86,6% e com lesões periapicais maiores do que 5 mm, a taxa de sucesso foi de 78,2%. As condições mais severas de doença periapical afetaram negativamente os resultados. Um ótimo comprimento de trabalho foi identificado. O excesso de material obturador diminuiu o sucesso. Casos de necrose pulpar deveriam ser tratados com medicação intracanal e finalmente a qualidade do selamento coronário não afetou o resultado do tratamento.

Rôças e Siqueira (2011b) avaliaram o efeito antimicrobiano do preparo químico mecânico suplementado pela medicação intracanal durante o tratamento de dentes com periodontite apical. Foram feitas coletas de 24 dentes portadores de necrose pulpar antes (S1) e após (S2) o preparo com NaOCl 2,5% como irrigante e após 7 dias de medicação intracanal com hidróxido de cálcio (S3). A presença de bactéria, archaeal e fungo foi avaliada por método molecular PCR e a identificação

bacteriana foi feita pelo PCR checkerboard de captura reversa almejando 28 possíveis candidatos a patógenos endodônticos. Os resultados revelaram que todas as amostras S1 foram positivas para bactéria, mas negativa para archaea e fungo. Os procedimentos terapêuticos foram altamente efetivos na redução dos níveis bacterianos e no número de taxa. No geral, 46% das amostras S2 e 62,5% das amostras S3 foram negativadas. Concluindo, os níveis bacterianos e número de taxa reduziram substancialmente após o preparo químico mecânico e medicação intracanal. Entretanto, a presença de níveis detectáveis indica que estratégias complementares devem ser empregadas.

No estudo de Teles et al. (2014) foi avaliada a ação antimicrobiana da medicação intracanal com hidróxido de cálcio e clorexidina. Um estudo clínico prospectivo em 69 dentes adultos unirradiculares que foram tratados endodonticamente e as coletas microbianas foram feitas antes (S1) e depois do preparo químico mecânico (S2) e após 14 dias de medicação intracanal (S3). As coletas foram analisadas por método molecular por qPCR e cultura convencional de anaeróbios. Os resultados apontaram a redução drástica de S1 para S2 em ambas análises. No grupo do hidróxido de cálcio não houve variação entre S2 e S3 em ambas metodologias e no grupo da clorexidina houve aumento do nível bacteriano.

Teles et al. (2014) quantificaram os níveis bacterianos antes (S1) e depois (S2) do preparo usando NaOCl 3% e após (S3) a medicação intracanal com hidróxido de cálcio ou clorexidina em gel 2% em casos de necrose pulpar associado ou não à periodontite apical. Foi realizada uma análise prospectiva de 69 casos, sendo 34 no grupo da clorexidina e 35 no grupo do hidróxido de cálcio. As coletas foram feitas antes e após o preparo químico mecânico e após 14 dias da medicação intracanal. Os equivalentes bacterianos foram avaliados por qPCR de amplo espectro e as bactérias vivas e viáveis foram medidas pelo método de cultura. Ambos os grupos apresentaram queda significativa de S1 para S2, tanto na análise em qPCR como cultura. No grupo do hidróxido de cálcio nenhuma variação foi observada entre S2 e S3 nos dois métodos de análise. Já o grupo da clorexidina, apresentou aumento significativo de S2 para S3 em ambas as técnicas. A conclusão do estudo relata que canais radiculares infectados contando altos níveis de leitura bacteriana quando submetidos ao preparo químico mecânico, reduziram a contagem em 99,1% e a contagem de anaeróbios diminuiu 98,5%. As medicações empregadas

não foram capazes de reduzir ainda mais essa porcentagem, entretanto o hidróxido de cálcio apresentou melhor desempenho quando comparado com a clorexidina.

Provenzano et al. (2015) avaliaram a ocorrência dos ácidos graxos de cadeia curta, que são subprodutos do metabolismo bacteriano, antes e após os procedimentos endodônticos. Amostras microbiológicas foram feitas de canais radiculares com periodontite apical antes (S1) e depois (S2) do preparo químico mecânico utilizando a solução de NaOCl ou a clorexidina como irrigante e então após a medicação intracanal com hidróxido de cálcio por 1 semana (S3). Os resultados revelaram que os subprodutos analisados foram encontrados em todas as coletas. Os autores concluíram que este primeiro relato das toxinas compostas por ácidos graxos de cadeia curta em canais infectados sugerem que estas moléculas devem ter participação na patogênese da periodontite apical. A significância da persistência após o tratamento e seus efeitos a longo prazo ainda merece maiores elucidações.

Donyavi et al. (2016) compararam em um estudo clínico randomizado a contagem bacteriana por UFC de canais radiculares com necrose pulpar. Foram tratados 30 dentes uniradiculares divididos em 2 grupos: Grupo 1 – irrigação com 10 ml NaOCl 6% e em seguida os dentes foram obturados com guta percha. No grupo 2, o protocolo de irrigação foi semelhante ao empregado no grupo 1, porém a associação do hidróxido de cálcio com a clorexidina preencheu o canal como medicação intracanal por 14 dias. No retorno, os dentes foram obturados. Os resultados revelaram que a redução do *E. faecalis* não foi significativa entre os grupos, mas a contagem dos aeróbios e anaeróbios foi significativamente superior no grupo do hidróxido de cálcio. Dessa forma, os autores concluíram que a aplicação da medicação intracanal em dentes com necrose pulpar é indicada.

O tempo ideal de permanência do hidróxido de cálcio intracanal, ainda não é um consenso. Como apontado por Sharma et al. (2018), em um trabalho de revisão sistemática apontou que os estudos comparando a efetividade do hidróxido de cálcio por um período de 7 dias ou mais ainda são escassos.

Com uma proposta semelhante ao presente estudo, Nardello (2018) avaliou a quantidade e atividade metabólica de bactérias persistentes ao preparo químico

cirúrgico e medicação intracanal, utilizando métodos moleculares baseados em rDNA e rRNA. Foram selecionados 15 pacientes com infecções endodônticas primárias assintomáticas. Foram feitas coletas microbiológicas dos canais radiculares previamente e após o PQC, S1 e S2, respectivamente e após a medicação intracanal com Ca(OH)_2 por 14 dias (S3). A autora encontrou resultados semelhantes ao presente estudo, o PQC promoveu uma queda drástica na quantidade bacteriana e nas metabolicamente ativas. Já a medicação intracanal aumentou o metabolismo bacteriano.

Romero Cazares (2018), em estudo clínico randomizado, comparou o efeito da ativação ultrassônica da pasta de hidróxido de cálcio com a pasta não ativada na redução metabólica de bactérias dos canais radiculares. Foram avaliados 20 pacientes com diagnóstico de periodontite apical assintomática e necrose pulpar que foram alocados em dois grupos distintos: Grupo UA – ativação ultrassônica da pasta de hidróxido de cálcio e grupo NA – não ativação da pasta. Foram feitas coletas microbiológicas dos canais radiculares previamente (S1) ao PQC e posteriormente (S2), após a PUI (S3) e também após a medicação intracanal com Ca(OH)_2 por 14 dias. Os resultados revelaram que a ativação ultrassônica da pasta de hidróxido de cálcio foi mais efetiva do que a pasta não ativada em reduzir o metabolismo bacteriano.

Recentemente, Carvalho (2019) avaliou, por métodos moleculares baseados em rDNA e rRNA, a eficácia dos procedimentos complementares imediatos e mediatos ao preparo químico cirúrgico em dentes com periodontite apical. Foram selecionados 20 pacientes que obedeceram aos critérios de inclusão. Amostras microbiológicas foram feitas previamente (S1) e após o preparo químico cirúrgico (S2), após o emprego do instrumento Xp-endo Finisher (S3a), após a ativação ultrassônica (S3b), após a medicação intracanal (S4) que permaneceu por 14 dias e após o reparo dos canais na segunda consulta (S5). A atividade metabólica das bactérias foi analisada através da relação entre rRNA e rDNA das amostras por qPCR. Os resultados apresentaram todas as amostras S1 positivas para bactérias. Foi detectada uma redução significativa em S2, redução novamente nas amostras S3a e S3b e aumento no metabolismo bacteriano em S4, entretanto esse aumento não foi significativo. A amostra de S5 apresentou nova queda com diferença significativa. O autor concluiu que o reparo dos canais radiculares após a

medicação intracanal promoveu a maior desinfecção do que os procedimentos empregados na primeira sessão do tratamento de dentes com periodontite apical.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o número e a viabilidade de bactérias persistentes após os procedimentos de desinfecção complementares ao preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da irrigação ultrassônica, como procedimento de desinfecção complementar ao preparo químico-cirúrgico, no nível e no metabolismo bacteriano.
- Avaliar o efeito da medicação intracanal com hidróxido de cálcio no nível e no metabolismo bacteriano durante o tratamento endodôntico em 2 sessões de dentes com periodontite apical.

3.3 Hipótese nula

- Os procedimentos complementares de desinfecção não promovem redução dos níveis de rDNA e rRNA bacteriano além dos níveis observados após o preparo químico-cirúrgico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia empregada nesta pesquisa teve como base em estudos prévios (Pinheiro et al., 2015; Nakamura et al., 2018).

4.1 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEP-FOUSP), e aprovada sob o nº 2.201.768 (ANEXO A).

A seleção de pacientes foi iniciada em agosto de 2017 e os procedimentos clínicos realizados entre setembro de 2017 e novembro de 2018 na Clínica de Pós Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). Todos os pacientes participantes a pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A). Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Microbiologia Molecular do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

4.2 Pacientes

Os pacientes que participaram da pesquisa foram selecionados sob rígidos critérios de inclusão e exclusão. Foram incluídos pacientes portadores de dentes permanentes unirradiculares com necrose pulpar e periodontite apical assintomática, constatada através de exame radiográfico que evidenciasse rarefação óssea periapical e que não possuíssem tratamento endodôntico prévio. As radiografias foram realizadas com auxílio de posicionador radiográfico, a fim de padronizar as tomadas radiográficas permitindo o controle pós-tratamento endodôntico.

Na fase de recrutamento dos pacientes, não puderam participar desta pesquisa pacientes que apresentavam alterações sistêmicas relevantes (doenças degenerativas crônicas, processos infecciosos, doenças autoimunes ou imunodeficiências induzidas/ adquiridas), além de pacientes que tivessem feito uso de antibióticos nos 90 dias anteriores ao início da pesquisa. Também foram excluídos dentes que apresentavam perda de tecido dentário impossibilitando o isolamento absoluto, bolsa periodontal superior a 4 mm, raízes com comprimento inferior a 15 mm ou superior a 25 mm, curvaturas radiculares superiores a 25°, apicigênese incompleta, ou alterações na luz do canal radicular visíveis radiograficamente, como calcificações ou reabsorções. Durante o tratamento, pacientes com canais radiculares de diâmetro inferiores a uma lima K #15, com amostras do campo operatório positivas nas reações de qPCR ou amostras iniciais dos canais radiculares negativas para rDNA/ rRNA também foram excluídos da análise microbiológica. Após os critérios descritos acima, 20 pacientes foram avaliados nesse estudo clínico.

4.3 Preparo dos canais radiculares e coletas microbiológicas

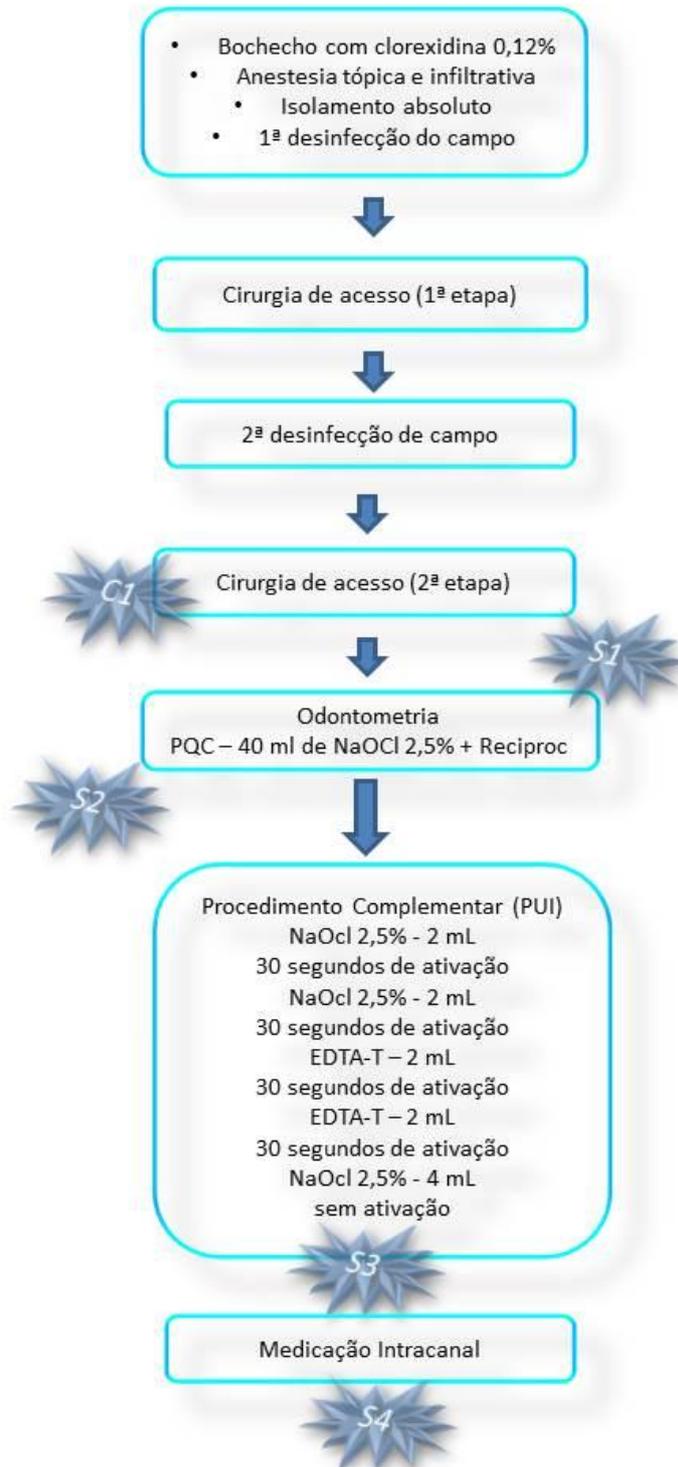
A síntese das etapas realizadas durante a pesquisa está disposta na Figura 1.

4.3.1 Procedimentos clínicos iniciais e desinfecção do campo (C1)

Iniciando a primeira sessão de atendimento clínico, os pacientes receberam 10 mL de antisséptico bucal (Clorexidina 0,12%) para bochechar durante um minuto. Após o procedimento de anestesia, foi realizado o isolamento absoluto do dente a ser tratado com auxílio de arco plástico (SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), lençol de borracha (Madeitex, São José dos Campos, SP, Brasil), grampos metálicos apropriados (SSwhite) e barreira gengival (Top Dam, FGM, São Paulo, SP, Brasil). Foi então realizada a primeira desinfecção da coroa do dente e do campo operatório com swabs esterilizados (Berkshire Corporation, North Carolina, EUA) embebidos

em peróxido de hidrogênio 30% por 30s, seguido por hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl, Fórmula e Ação farmácia de manipulação, São Paulo, SP, Brasil) por mais 30s, e tiosulfato de sódio 5% por 30s para a neutralização do hipoclorito .

Figura 4.1 - Fluxograma das etapas clínicas e coletas microbiológicas



Com o auxílio de pontas diamantadas esféricas de pescoço longo de diâmetro compatível com a coroa do dente e a câmara pulpar (Microdont Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil) utilizadas em alta-rotação e refrigeradas com auxílio de seringas plásticas de 10 mL (BD Company, São Paulo, SP, Brasil) contendo soro fisiológico esterilizado e apirogênico (Laboratórios B. Braun, São Gonçalo, RJ, Brasil), realizou-se a cirurgia de acesso em duas etapas, tomando-se o cuidado de não acessar a câmara pulpar em um primeiro momento.

Após a remoção de tecido cariado e restaurações prévias, a coroa dental e o campo operatório foram novamente desinfetados como descrito anteriormente. A cirurgia de acesso foi então finalizada com novas brocas esterilizadas e apirogênicas, igualmente refrigeradas com seringas contendo soro fisiológico.

Neste momento foram realizadas coletas da coroa dental e das imediações da câmara pulpar para comprovar a eficácia das manobras de desinfecção (C1). A ausência de bactérias no campo operatório foi comprovada por meio de PCR convencional utilizando-se iniciadores universais para o domínio *Bacteria*. Se o resultado da reação de PCR fosse positiva, indicando a presença de bactérias em C1, o dente e as amostras coletadas subsequentemente seriam excluídas da pesquisa.

4.3.2 Odontometria eletrônica e primeira coleta (S1)

Dando prosseguimento aos procedimentos clínicos, os canais radiculares foram preenchidos com solução salina esterilizada e apirogênica. Com auxílio do localizador foraminal NovApex (Forum Technologies, Israel) e um instrumento endodôntico tipo K #10 (Dentsply Maillefer, Baillagues, Suíça) de 25 mm a odontometria foi realizada e o comprimento real de trabalho (CRT) estabelecido a 1,0 mm aquém do forame apical. A parte ativa deste instrumento foi separada do cabo e depositada no interior de um tubo tipo Eppendorf com 300 µL de RNA *later* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

Em seguida, um instrumento tipo H #15 foi calibrado no CRT e pressionado contra as paredes do canal para produzir raspas de dentina e suspender bactérias na solução. Na sequência, o mesmo procedimento de separar a parte ativa do instrumento foi repetido.

Para completar a coleta microbiológica, quatro cones de papel #15 esterilizados foram utilizados para coletar o conteúdo inicial de bactérias de cada canal (S1). Cada cone foi introduzido até o CRT e mantido em posição por 1 minuto, centralizados e sem tocar nas paredes do canal radicular e então depositados no mesmo tubo que os instrumentos.

4.3.3 Preparo dos canais radiculares e segunda coleta (S2)

No passo seguinte, a câmara pulpar foi preenchida com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5%, e com o auxílio de um instrumento tipo K #10 foi agitada e carregada progressivamente no sentido coroa-ápice de maneira a permitir maior contato da substância com o conteúdo tóxico do canal até que se atingisse o comprimento real de trabalho (CRT) estabelecido durante a odontometria.

A fim de determinar o diâmetro apical inicial e a consequente seleção do instrumento que seria utilizado no preparo, instrumentos manuais tipo K de primeira série foram levados até o CRT em ordem crescente de calibre, do #20 ao #40 (Dentsply Maillefer, Suíça), até que o instrumento se ajustasse a essa medida demonstrando ligeiro travamento. A escolha do instrumento Reciproc (VDW GmbH, Munique, Alemanha) a ser utilizado no preparo químico-cirúrgico ocorreu da seguinte maneira: se o primeiro instrumento a se ajustar ao diâmetro do canal fosse o #20 ou #25, seria utilizado no preparo, o instrumento Reciproc R40; se o travamento ocorresse com os instrumentos #30, #35 ou #40, o instrumento Reciproc R50 seria selecionado.

Com o auxílio de um motor WDW-Silver (VDW GmbH, Munique, Alemanha), o instrumento Reciproc selecionado foi levado ao interior do conduto em movimento reciprocante seguindo a sequência 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 para remoção das sujidades de dentina e o canal irrigado com 10 mL de NaOCl 2,5%, atingindo-se o CRT apenas no último ciclo de penetração.

Durante o preparo foram utilizados 40 mL de solução irrigadora por canal, sendo 10 mL antes de cada ciclo de instrumentação e mais 10 mL ao final do preparo. Foram utilizadas pontas irrigadoras de pequeno calibre posicionadas aproximadamente 1 mm aquém do CRT, em movimentos de avanço/retrocesso de pequena amplitude. A irrigação durante o PQC 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 27G e saída em meia cana lateral. A aspiração da substância extravasada foi realizada através de cânulas de aspiração SurgiTip (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) acopladas à bomba a vácuo odontológica.

Ao término do preparo, o conteúdo do canal foi aspirado com pontas endodônticas Capillary Tips 0,014' e 0,019'' (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA), e foi realizada nova irrigação com 5 mL de tiosulfato de sódio 5% por um minuto para neutralizar o NaOCl. Nova aspiração, secagem com cones de papel absorvente, e preenchimento do conduto com soro fisiológico esterilizado para realização de nova coleta microbiológica (S2).

4.3.4 PUI e terceira coleta (S3)

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

repetidos com 2mL de EDTA-T 17% e, novamente, uma irrigação final com 4mL de NaOCl 2,5%, totalizando 2min de ativação. Após os dois ciclos, o conteúdo do canal era aspirado com pontas Capillary tips 0,014" e 0,019" e uma nova irrigação com 5mL de tiosulfato de sódio 5% por 1 minuto era realizada. Os canais eram então aspirados, secos novamente, e preenchidos com soro fisiológico esterilizado para a realização de uma nova coleta (S3).

Após a coleta, os canais radiculares foram secos com cones de papel esterilizados, e então, preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂] Ultracal XS (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA), com agulha Navitip de diâmetro de 29G e saída frontal (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) colocada 1mm aquém do CRT. Uma radiografia periapical foi realizada para verificar o completo preenchimento do canal radicular. Pra finalizar a primeira sessão, as cavidades de acesso foram seladas com uma camada de 2 mm de espessura de obturador provisório endodôntico (Dentalvile, Joinville, SC, Brasil) e uma camada de cimento de ionômero de vidro Riva Self Cure (SDI Limited, Victoria, Australia).

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

Em seguida, os canais foram irrigados com 10 mL de NaOCl 2,5% e re-instrumentados com o mesmo instrumento utilizado na primeira sessão do tratamento, procedeu-se, a executar a irrigação final com 10 mL de NaOCl (2,5%) e 10 mL de EDTA (17%). Após a secagem dos condutos por meio de aspiração e utilização de cones de papel esterilizados, os canais foram obturados por meio da técnica de condensação lateral com guta-percha e cimento AH Plus (Dentsply Maillefer), e os acessos coronários devidamente selados com restaurações de resina composta (Z350, 3M Corporation, St. Paul, MN, EUA).

4.3.5 Análise quantitativa de bactérias

Os microtubos contendo as amostras microbiológicas foram armazenados em freezer a -80°C até o momento das análises.

4.3.5.1 Extração de DNA/RNA e síntese do cDNA

As extrações de DNA e RNA foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Molecular do Departamento de Dentística da FOU SP, por intermédio do kit de purificação *MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit* (Epicentre Technologies, Madison, WI, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante, e estão descritas detalhadamente no APÊNDICE B.

As amostras endodônticas mantidas em RNA later foram completamente descongeladas a 37°C durante 10 min, homogeneizadas através de um agitador de vórtex durante 1 min a fim de desprender a maior quantidade possível de bactérias na solução, e então centrifugadas a 4°C e 13000 RPM durante 10 min. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados (pellets) foram suspensos em solução contendo 2 µL de Proteinase K e 300 µL de *Tissue and Cell Lysis Solution*, e incubados por 15 minutos a 65 °C. Após resfriamento das amostras em gelo por 5 minutos, foram adicionados 150 µL de *MPC Protein Precipitation Reagent* para precipitação proteica. Realizou-se nova homogeneização e centrifugação, e os sobrenadantes foram coletados e tratados com isopropanol 100%, e em seguida com etanol 70%. Foram adicionados 35µL de *TE Buffer* em cada uma das amostras e a concentração de ácidos nucleicos foi analisada no espectrofotômetro (NanoDrop 1000 - Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA).

As amostras contendo os ácidos nucleicos totais foram então divididas em duas partes iguais. A primeira alíquota foi separada e armazenada em freezer -20 °C para posterior análise de DNA. A segunda alíquota passou por um processo de purificação de RNA em duas etapas de tratamento com DNase I (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Para garantir que todo o DNA fosse extraído das amostras de RNA,

foi realizada uma reação de PCR convencional utilizando iniciadores universais específicos para o domínio *Bacteria*. Em seguida, para confeccionar a fita dupla de cDNA a partir do RNA purificado da amostra, foi realizada a reação de Transcriptase Reversa (RT-PCR) utilizando-se o kit comercial *Superscript III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen, São Paulo, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA foi armazenado em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises.

4.3.5.2 Reação em cadeia de polimerase em tempo real

A análise quantitativa dos níveis de rDNA e rRNA foi realizada por qPCR Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, utilizando o termociclador *StepOne Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As reações de PCR em tempo real foram realizadas com iniciadores universais para a região conservada do gene 16S rRNA específicos do domínio *Bacteria*. As sequências utilizadas para os *primers* foram: *Forward*: 5' - GAG AGT TTG ATY MTG GCT CAG - 3' e *Reverse*: 5' - GAA GGA GGT GWT CCA RCC GCA - 3'. 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 iniciador, 2 μL do DNA ou cDNA extraído das amostras e H_2O .

O ciclo de amplificação foi realizado da seguinte maneira: 95°C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento a 60°C por 1 min e extensão a 95°C por 15 s. Os resultados foram analisados pelo software ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Todas as amostras foram corridas em triplicata, utilizando-se para análise do número de cópias de rRNA e rDNA o valor médio entre elas.

Para a realização da curva padrão, conforme descrito por Pinheiro et al. (2015), foram utilizadas diluições de concentrações conhecidas de plasmídeos recombinantes (10^8 a 10 cópias de DNA) contendo fragmentos de 1.500 pb do gene 16S *rRNA* de *Enterococcus faecalis*, clonados após reação de PCR convencional. Cada concentração foi testada em triplicata para obtenção da curva com a maior eficiência e coerência possível, e o limite de detecção foi 10^2 cópias de DNA.

4.4 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram tabulados e submetidos à análise estatística com o auxílio do software BioEstat 5.3. A análise de aderência foi realizada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov com intervalo de significância de 5% ($\alpha=0,05$). Observaram-se distribuições não-normais, desta forma, optou-se pela realização de testes não-paramétricos numéricos para analisar as hipóteses experimentais. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5%.

As análises entre as amostras S1, S2, S3 e S4 foram realizadas através do teste de Wilcoxon (*signed-rank test*) para amostras relacionadas, por se tratarem dos mesmos dentes em diferentes momentos do tratamento endodôntico. As comparações entre a taxa de detecção nas diferentes etapas do tratamento utilizou-se o teste Q de Cochran.

A comparação entre as reações de qPCR baseadas em rRNA e rDNA foi realizada através do teste de McNemar para análise da taxa de detecção bacteriana dos diferentes métodos. O teste de Wilcoxon (*signed-rank test*) foi utilizado para comparar os níveis medianos de rRNA e rDNA das bactérias nas amostras com reações de qPCR positivas para os dois métodos.

5 RESULTADOS

Após os critérios de inclusão e exclusão, os resultados da análise microbiológica de 20 pacientes foram avaliados nesse estudo clínico. As características clínicas dos casos estudados estão descritas na tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Distribuição de 20 casos segundo idade, gênero, grupo dental e diâmetro final do preparo do canal

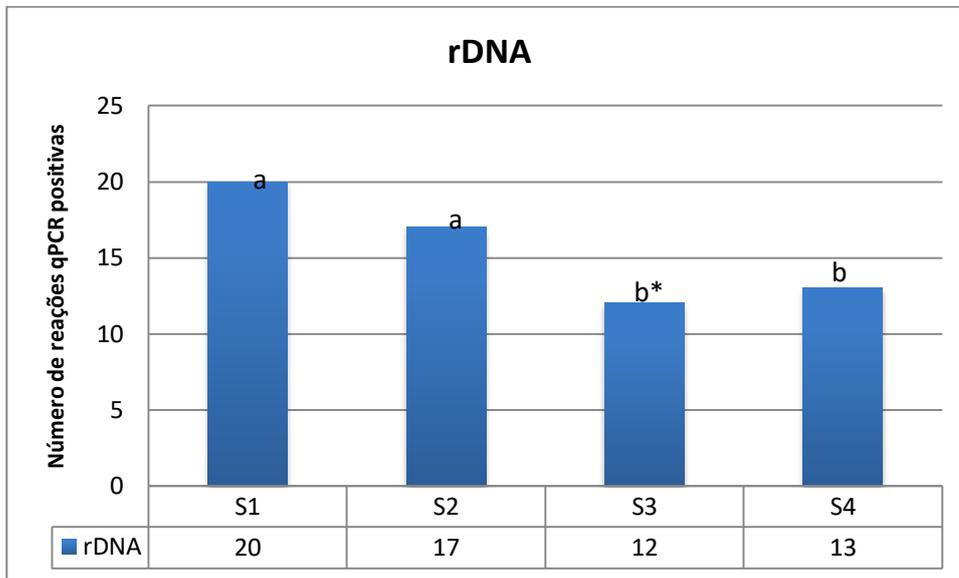
Características clínicas		N	%
Idade	20 – 40	12	60
	> 40	8	40
Gênero	Masculino	7	35
	Feminino	13	65
Grupo Dental	Anterior	11	55
	Pré-molar	9	45
Preparo do canal radicular	# R40 (0,40 mm)	9	45
	# R50 (0,50 mm)	11	55

Fonte: O autor

5.1 Análise por qPCR baseada em rDNA: quantificação bacteriana

O número de canais radiculares com reações de qPCR positivas para rDNA em cada etapa do tratamento está descrito na figura 5.1. O número de amostras positivas em S3 foi menor do que nas amostras S1 ($p = 0,0046$) e S2 ($p = 0,0081$).

Figura 5.1- Número de casos com reações qPCR positivas para rDNA após os seguintes procedimentos endodônticos: cirurgia de acesso (S1), preparo químico-cirúrgico (S2), PUI (S3) e medicação intracanal entre sessões (S4)



*Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa no teste de Q de Cochran, seguido de análise pos-hoc pelo teste de McNemar ($p < 0,05$).

Fonte: O autor

Os níveis de rDNA bacteriano nos canais radiculares dos 20 dentes analisados nas diferentes etapas do tratamento endodôntico estão descritos na tabela 5.2. Houve uma redução significativa da carga bacteriana após o PQC ($p = 0,0003$). Por sua vez, a PUI promoveu uma redução adicional do nível de bactérias quando comparada ao PQC ($p = 0,0113$). Por outro lado, a medicação intracanal não contribuiu para redução dos níveis de rDNA bacteriano dos canais radiculares

Tabela 5.2 - Valores da mediana (mínimo - máximo) dos níveis de rDNA bacteriano em 20 canais radiculares após os seguintes procedimentos endodônticos: cirurgia de acesso (S1), preparo químico-cirúrgico (S2), PUI (S3) e medicação intracanal entre sessões (S4)

rDNA				
	S1	S2	S3	S4
Mediana	$1,25 \times 10^5$ ^a	$2,5 \times 10^4$ ^{b*}	$2,94 \times 10^3$ ^{c*}	$6,49 \times 10^3$ ^{bc}
Intervalo	$(1,83 \times 10^4 - 9,20 \times 10^6)$	$(0 - 9,52 \times 10^4)$	$(0 - 1,35 \times 10^4)$	$(0 - 3,21 \times 10^5)$

*Valores seguidos por letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as amostras pelo teste de Wilcoxon signed rank ($p < 0,05$).

Fonte: O autor

5.2 Análise por qPCR baseada em rRNA e rDNA: metabolismo bacteriano

A tabela 5.3 mostra a taxa de detecção de bactérias por ambos os métodos, rRNA e rDNA. Estes métodos foram concordantes na maioria das amostras analisadas. Nas amostras positivas para os 2 métodos, foi realizada a comparação entre os níveis de rDNA e rRNA (tabela 5.4). Níveis de rRNA maiores do que os de rDNA foram observados nas amostras S1, S2 e S4, sugerindo que as bactérias estão metabolicamente ativas. Por outro lado, o menor nível de atividade bacteriana foi encontrado nas amostras S3. A figura 5.2 ilustra a alteração nos níveis médios de rDNA e rRNA durante as etapas do tratamento endodôntico.

Tabela 5.3 - Taxa de detecção dos métodos baseados em rDNA e rRNA em 20 canais radiculares após os seguintes procedimentos: cirurgia de acesso (S1), preparo químico-cirúrgico (S2), PUI (S3), e medicação intracanal entre sessões (S4)

Amostras		Taxas de detecção			Valor de p^*
			rDNA		
			+	-	
S1	rRNA	+	20	0	1,0
		-	0	0	
S2	rRNA	+	17	1	1,0
		-	0	2	
S3	rRNA	+	11	5	0,22
		-	1	3	
S4	rRNA	+	13	5	0,07
		-	0	1	

- = amostras com reações de qPCR negativas; + = amostras com reações de qPCR positivas. As amostras positivas para os 2 métodos estão destacadas em negrito. * Teste de McNemar foi utilizado para comparar a diferença entre as taxas de detecção dos métodos baseados em rRNA e rDNA nas diferentes etapas do tratamento ($p < 0,05$).

Fonte: O autor

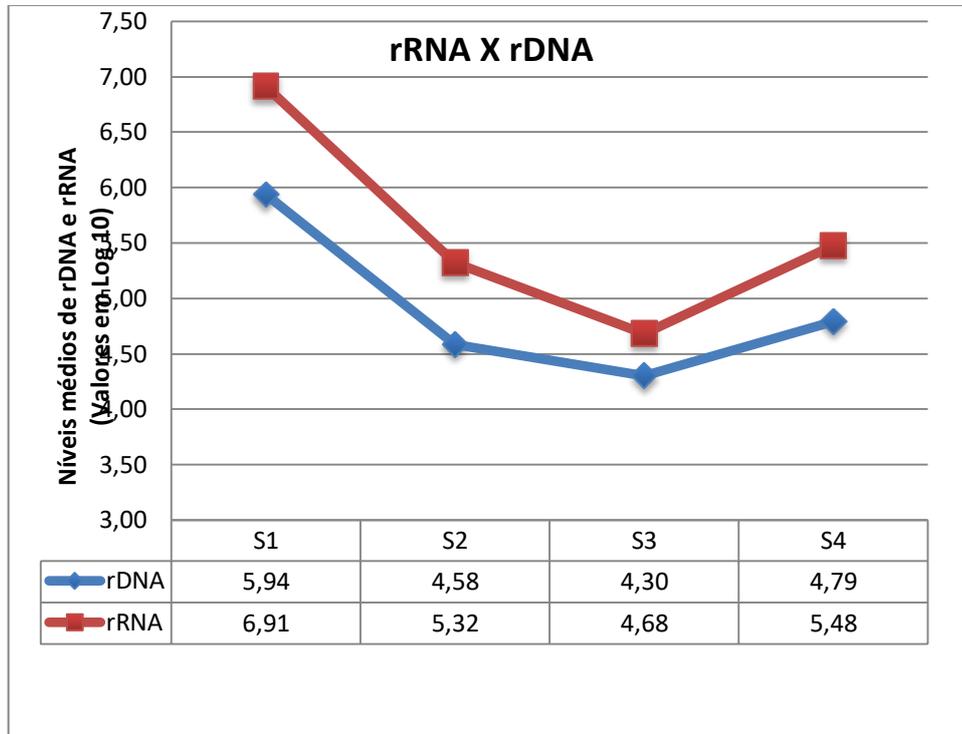
Tabela 5.4 - Valores da mediana (mínimo - máximo) dos níveis de rDNA e rRNA das amostras com reações de qPCR positivas para os 2 métodos nas diferentes etapas do tratamento.

Amostras	rDNA	rRNA	Valor de p
S1	$1,25 \times 10^5$ ($1,83 \times 10^4 - 9,2 \times 10^6$)	$5,47 \times 10^5$ ($7,8 \times 10^4 - 5,95 \times 10^7$)	0,002 *
S2	$3,70 \times 10^4$ ($2,26 \times 10^3 - 9,52 \times 10^4$)	$7,84 \times 10^4$ ($2,91 \times 10^3 - 1,09 \times 10^6$)	0,01*
S3	$7,74 \times 10^3$ ($2,70 \times 10^3 - 1,09 \times 10^5$)	$3,03 \times 10^4$ ($1,82 \times 10^3 - 1,39 \times 10^5$)	0,07
S4	$3,73 \times 10^4$ ($1,98 \times 10^3 - 3,21 \times 10^5$)	$1,08 \times 10^5$ ($3,41 \times 10^3 - 1,60 \times 10^6$)	0,02*

O símbolo (*) indica que houve diferença entre os valores de mediana de rDNA e rRNA (teste de Wilcoxon signed rank, $P < 0,05$)

Fonte: O autor

Figura 5.2 – Níveis médios de rDNA e rRNA em amostras qPCR positivas para ambos os métodos antes e após os procedimentos clínicos



6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou, por métodos moleculares baseados em rDNA e rRNA, o efeito da irrigação ultrassônica passiva (PUI) e medicação intracanal com Ca(OH)_2 sobre o nível e o metabolismo bacteriano em dentes com periodontite apical. Os resultados mostraram que a PUI promoveu uma redução do número e do metabolismo de bactérias quando comparada ao PQC. Por outro lado, bactérias permaneceram metabolicamente ativas após o uso da medicação intracanal com Ca(OH)_2 . Este capítulo será dividido em sub-tópicos referentes à discussão da metodologia utilizada e dos resultados obtidos no presente estudo.

6.1 Metodologia

Diversos estudos sugerem que os métodos moleculares são os de eleição para avaliar o efeito antimicrobiano dos procedimentos endodônticos (Siqueira e Rôças, 2005a; 2005b; Sakamoto et al. 2007; Blome et al. 2008; Rôças e Siqueira, 2010; 2011; Paiva et al. 2013; Rôças et al. 2014; Pinheiro et al. 2015; Zandi et al. 2018). Esses estudos mostraram que os métodos moleculares apresentam uma sensibilidade maior que o método baseado em cultura microbiológica para detecção de bactérias nos canais radiculares (Siqueira; Rôças, 2009; Alves et al., 2012; Rôças et al., 2013a; Paiva et al., 2013a). Quando se utiliza o rDNA bacteriano para a análise molecular, é possível quantificar o número de bactérias, porém não é possível diferenciar entre bactérias viáveis e não viáveis (Siqueira; Rôças, 2005a; Rôças et al., 2014). Uma forma de vencer essa limitação é a utilização do rRNA bacteriano para essa análise (Siqueira; Rôças 2009). A associação dos métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA tem sido sugerida para a avaliação simultânea da quantidade e do metabolismo de bactérias (Pinheiro et al., 2015). A metodologia empregada no presente estudo foi baseada no estudo de Pinheiro et al. (2015), que utilizaram a qPCR baseada em rRNA e rDNA para análise da quantidade e do metabolismo de *Enterococcus faecalis* antes e após o PQC de canais radiculares de dentes com periodontite apical persistente após o tratamento

endodôntico. Os resultados do presente estudo indicaram que, embora o PQC tenha promovido uma drástica redução dos níveis de bactérias, estas persistiram metabolicamente ativas, corroborando com os achados de Pinheiro et al. (2015).

Os critérios de seleção utilizados no presente estudo, que incluíram apenas dentes unirradiculares, foram semelhantes a diversos estudos (Vianna et al., 2006; Sakamoto et al., 2007; Rôças; Siqueira, 2011a; 2011b; Paiva et al., 2012; Neves et al., 2013; Rôças et al., 2013; Paiva et al., 2013a; Paiva et al., 2013b; Rôças et al., 2014; Provenzano et al., 2015; Rôças et al., 2016). Em estudo piloto com dentes multirradiculares, foi encontrada uma dificuldade técnica em realizar as coletas de canais radiculares atrésicos, especialmente em raízes mesiais de molares. Esta situação foi descrita por Alves et al. (2012) e Rodrigues et al. (2017), onde o volume e formato intracanal apresentou importância fundamental para a avaliação microbiológica dos canais radiculares. Além disso, coletas microbiológicas de dentes unirradiculares, com canais únicos, apresentam a vantagem de limitar a análise a um único ambiente, evitando uma possível contaminação advinda de outros canais. Diante destas prerrogativas, somente dentes unirradiculares, com canal único, foram incluídos neste estudo.

Uma revisão recente dos estudos utilizando métodos moleculares em endodontia revelou que o controle de descontaminação do campo operatório é um fato negligenciado em alguns estudos. Esses autores ressaltaram a importância da realização de um controle para checar a ausência de DNA após a limpeza do campo operatório a fim de evitar contaminação da coleta dos canais radiculares. Portanto, o primeiro passo do presente estudo foi checar a desinfecção do campo operatório por meio de reações de PCR utilizando iniciadores universais para o domínio *Bacteria* (C1 e C2). As amostras C1 e C2 dos 20 casos avaliados apresentaram resultados negativos nas reações de PCR baseada em DNA e RNA, indicando a eficácia do protocolo utilizando peróxido de hidrogênio 30% e hipoclorito de sódio 2,5% para desinfecção do campo operatório. Esse protocolo foi similar ao descrito em estudos prévios, que também descreveram resultados negativos das amostras de controle do campo operatório analisada por PCR (Pinheiro et al., 2015; Nakamura et al., 2018; Carvalho, 2019).

O método da coleta microbiológica dos canais radiculares apresenta a desvantagem de representar apenas a condição bacteriológica dos canais principais.

Por outro lado, como o objetivo central do tratamento endodôntico é o retorno do dente à função e estética, fica impossibilitado o emprego de métodos de coleta mais invasivos. Portanto, esta é uma limitação da técnica inerente a qualquer estudo clínico e microbiológico, independente dos métodos utilizados para análise das amostras: moleculares ou métodos baseados em cultura bacteriana. É importante ressaltar que, para uma boa realização de um estudo clínico e microbiológico, inicialmente, é necessário executar criteriosamente todas as etapas descritas no protocolo de coleta microbiológica dos canais radiculares, o que exige treinamento prévio do operador. Além disso, torna-se necessário o treinamento nas diversas etapas que envolvem a análise molecular, incluindo: extração de DNA/ RNA, reação de transcrição reversa e reação de qPCR. A falta de observância de uma das etapas da coleta ou análise microbiológica pode levar à resultados falso-negativos nas coletas iniciais dos canais radiculares. Estes fatos foram observados em estudo piloto que antecedeu esse estudo clínico.

6.2 Discussão dos resultados

A análise microbiológica dos canais radiculares foi realizada nas diferentes fases do tratamento endodôntico de 20 dentes unirradiculares com periodontite apical. A primeira coleta microbiológica (S1) foi realizada imediatamente após a cirurgia de acesso, representando o ponto de partida para a análise das fases subsequentes. Nas amostras S1, os níveis de rRNA ($5,47 \times 10^5$) foram maiores que os de rDNA ($1,25 \times 10^5$), revelando que as bactérias estavam metabolicamente ativas. Esses dados foram semelhantes aos de estudos anteriores que utilizaram métodos baseados em rDNA e rRNA (Pinheiro et al., 2015; Nardello, 2018; Carvalho, 2019).

Em seguida, foi feito o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares empregando-se instrumento do sistema Reciproc associado a 40 mL da solução de NaOCl 2,5%. O presente estudo evidenciou uma redução significativa do número de cópias de rDNA bacteriano após o PQC, partindo de $1,25 \times 10^5$ em S1 para $2,5 \times 10^4$ em S2. Uma redução bacteriana semelhante foi descrita em diversos estudos

clínicos que consideram a fase de preparo como a mais importante no tratamento endodôntico, justamente por promover essa diminuição na carga bacteriana (Blome et al., 2008; Rôças; Siqueira, 2010; Rôças; Siqueira, 2011a; 2011b; Paiva et al., 2012; Rôças et al., 2013; Paiva et al., 2013a; 2013b; Neves et al., 2014; Rôças et al., 2014; Pinheiro et al., 2015; Neves et al., 2016; Rôças et al., 2016; Nakamura et al., 2018; Carvalho, 2019). Além de bactérias, estudos mostraram redução significativa de metabólitos bacterianos (Provenzano et al., 2015) e de endotoxinas (Nakamura et al., 2018) nos canais radiculares após a fase de PQC.

Entretanto, apesar da drástica redução da carga bacteriana, 85% (17/20) dos casos permaneceram com reações de qPCR positivas para o rDNA após PQC. Esses resultados estão de acordo com estudos moleculares prévios que ressaltaram a alta incidência de canais infectados após PQC. Porém, o número de canais com resultados positivos para rDNA bacteriano após o PQC é variável nos diversos estudos moleculares analisados. No estudo de Vianna et al. (2006), dos 32 casos avaliados após o PQC, apenas 1 não apresentou bactérias detectáveis por qPCR, ou seja, 97% permaneceram contaminados. Por sua vez, Provenzano et al. (2015) detectaram 71% de casos positivos para rDNA após o PQC. Já no estudo de Sakamoto et al. (2007), rDNA bacteriano foi detectado em 67% dos casos avaliados após o PQC. Rôças et al. (2013), comparando a instrumentação manual com a rotatória, encontraram 95% e 60% dos casos com reações de qPCR positivas, respectivamente. No estudo de Neves et al. (2014), 55% dos dentes preparados com um sistema de instrumento único com movimento recíproco foram positivos para rDNA; similar aos resultados encontrados para o grupo de dentes preparados com um sistema de múltiplos instrumentos com rotação contínua. Rôças et al. (2016) relataram que 44% dos dentes tratados com NaOCl 2,5% e 40% dos dentes tratados com a clorexidina 2% permaneceram com bactérias detectáveis após o PQC. Os resultados discrepantes entre os estudos podem estar relacionados a fatores relacionados a técnica de preparo dos canais radiculares (instrumentos, tempo de preparo, tipo e volume da solução irrigadora), à experiência dos operadores (estudantes de graduação/ especialistas), à sensibilidade dos métodos moleculares utilizados para análise microbiológica e ao número amostral reduzido dos estudos analisados. No presente estudo, os procedimentos utilizados para o PQC e para a reação de qPCR foram semelhantes aos de estudos prévios (Nakamura et al., 2018;

Carvalho, 2019). Esses autores relataram que 60% a 80% dos casos preparados com o sistema Reciproc e 40 mL de NaOCl 2,5% foram positivos para reação de qPCR baseada em rDNA.

No presente estudo, a comparação dos níveis de rRNA e rDNA das amostras S2 mostrou valores superiores de rRNA ($7,84 \times 10^4$) em relação ao rDNA ($3,70 \times 10^4$). Desta forma, é possível inferir que as bactérias encontram-se metabolicamente ativas após o PQC, concordando com estudo anterior utilizando métodos baseados em rRNA e rDNA (Pinheiro et al., 2015). Os altos níveis de rDNA e rRNA encontrados nos canais radiculares após o PQC podem ter resultado de dificuldades técnicas relacionadas ao preparo, especialmente a limitação do instrumento em tocar as paredes dentinárias durante a instrumentação, resultado em áreas intocadas dos canais radiculares (Alves et al., 2012).

Os resultados do presente estudo, assim como os de estudos prévios, ressaltam a necessidade de potencializar a descontaminação do sistema de canais radiculares após o PQC. Os procedimentos complementares realizados após o preparo dos canais radiculares tem ganhado cada vez mais espaço (Siqueira et al., 2011). Nesse sentido, a ativação ultrassônica, mais especificamente a PUI, é um tema que tem sido bastante discutido pela literatura científica, porém ainda controverso. Moreira et al. (2018), em um trabalho de revisão sistemática e meta-análise, discutiram que ainda há uma distância grande entre os achados laboratoriais, *in vitro* ou *ex vivo*, e os dados encontrados por estudos clínicos.

No presente estudo clínico, a PUI promoveu uma redução significativa dos níveis de bactérias dos canais radiculares quando comparada à fase de PQC: de $2,5 \times 10^4$ em S2 para $2,94 \times 10^3$ em S3. Além disso, houve uma diminuição no número de casos com reações qPCR positivas para rDNA (60%) após a ativação ultrassônica das soluções irrigadoras. Estes resultados estão de acordo com os achados de Nakamura et al. (2018), que encontraram uma redução nos níveis bacterianos ($4,29 \times 10^3$) e no número de canais infectados (68%) quando a PUI foi utilizada após o PQC. Por outro lado, estudos clínicos avaliando por qPCR a ação suplementar da PUI, concluíram que a ativação ultrassônica não foi eficiente em promover uma melhoria significativa na desinfecção dos canais radiculares quando comparada ao PQC (Paiva et al. 2012, 2013). A diferença entre os estudos pode

estar relacionada ao reduzido número de amostras e ao protocolo de ativação avaliado. O presente estudo avaliou 20 dentes e empregou um protocolo utilizando 8mL de NaOCl 2,5% e 4 mL de EDTA-T, em um tempo de ativação total de 2 minutos (4 ciclos de 30 segundos). Um protocolo similar foi avaliado em 25 dentes por Nakamura et al. (2018). Por outro lado, Paiva et al. (2012) avaliaram 10 dentes e a metodologia empregada utilizou ativação em 3 mL de NaOCl 2,5% por 1 min. Estes autores relataram que, embora a PUI tenha promovido uma leve diminuição no número de reações positivas, a maioria dos casos ainda apresentava bactérias detectáveis pelos métodos de cultura e molecular.

Além da redução do número de bactérias observada na qPCR baseada em rDNA, a análise de rRNA revelou que o metabolismo bacteriano foi refreado após a PUI. A redução do nível e do metabolismo bacteriano nos canais radiculares após a PUI pode estar relacionada a fenômenos como a cavitação e a onda acústica, além da potencialização da ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio (Ahmad et al., 1987, van der Sluis et al., 2007). Esses conceitos foram bastante estudados em trabalhos *in vitro*. A onda acústica pode ser definida como um rápido movimento do fluido, gerando força de cisalhamento que potencializa a limpeza das paredes dos canais radiculares (van der Sluis et al., 2007). Embora o mecanismo de ação da ativação ultrassônica não seja totalmente compreendido, a onda acústica parece ser a principal força associada a insertos endodônticos durante a PUI (Mozo et al., 2012; Macedo et al., 2014a,b). Conseqüentemente, a PUI tem o potencial de promover o desalojamento de biofilmes bacterianos em áreas não alcançadas pelo instrumento e, assim, contribuir para uma maior desinfecção dos canais radiculares (Townsend et al., 2009; Harrison et al., 2010).

Outro fenômeno associado à PUI é a cavitação transiente, definida como microbolhas que, colapsando, produzem ondas de choque contra as paredes dentinárias e o aumento da temperatura da solução irrigadora. Porém, esse fenômeno pode ser influenciado por diversos fatores dentro do canal radicular: os pequenos volumes de irrigante (van der Sluis et al., 2007, Macedo et al., 2014a); o tempo de agitação ultrassônica (Macedo et al., 2014b); a potência do equipamento de ultrassom (Chen et al., 2013); o contato da solução ativada com o ar atmosférico (Chen et al., 2013; Macedo et al., 2014a); o tipo de instrumento ativado (van der Sluis et al., 2007; Chen et al., 2013; Macedo et al., 2014a,b); a anatomia do canal

radicular (Castelo-Baz et al., 2012; 2016; Vasconcelos et al., 2017), e as regiões de istmos (Thomas et al., 2014). Nesse contexto, os resultados dos estudos *in vitro* são conflitantes. No estudo de Chen et al. (2013), a ponta do instrumento ativado por ultrassom apresentou movimento insignificante e o movimento do irrigante tendeu sempre à região coronária em uma velocidade constante e gerando maior tensão de cisalhamento nessa área. Por outro lado, Macedo et al. (2014a) observaram que a cavitação foi produzida até 2 mm além da ponta do instrumento. No presente estudo, o inserto foi inserido a 2 mm do comprimento de trabalho, o que está de acordo com os estudos prévios que recomendam uma distância de 1 a 2 mm do comprimento de trabalho em casos de ativação ultrassônica em canais retos (Paiva et al., 2012, 2013; Nakamura et al., 2018).

Macedo et al. (2014a) observaram que a cavitação aconteceu tanto em canais retos como em canais curvos, na entrada de canais laterais e istmos. Da mesma forma, Harrison et al. (2010) e Castelo-Baz et al. (2012) demonstraram a efetividade da PUI na penetração do irrigante no terço apical, gerando energia capaz de superar as bolhas de vapor no terço apical de canais retos. Por outro lado, em outro estudo *in vitro*, Castelo-Baz et al. (2016) relataram que a PUI, quando empregada em canais curvos, foi eficaz em levar a solução de NaOCl até o terço apical em apenas 40% dos casos. Além disso, os autores afirmaram que a PUI não gerou força suficiente para vencer as bolhas de vapor apical após a curvatura dos canais. Diante dessas observações, podemos sugerir que a anatomia dos dentes unirradiculares selecionados para o presente estudo pode ter contribuído para os resultados favoráveis da PUI. Futuros estudos clínicos utilizando outros grupos dentais com maior complexidade anatômica devem ser realizados para testar a eficácia da PUI como procedimento complementar de desinfecção dos canais radiculares.

No presente estudo clínico, os resultados da análise microbiológica dos canais radiculares após o uso da PUI estão de acordo com estudos laboratoriais prévios (Harrison et al., 2010; Cachovan et al., 2013). A PUI apresentou os melhores níveis de desinfecção em dentes contaminados com *Enterococcus faecalis* em canais com anatomia transversal ovalada (Vasconcelos et al., 2017). Estudo *in vitro*, comparando a efetividade antimicrobiana da PUI com sistema de irrigação por pressão negativa, mostrou que a PUI foi mais efetiva na desinfecção de canais simulados do que o sistema EndoVac (Townsend et al. 2009).

Após a realização da PUI, os canais foram medicados com Ca(OH)_2 por 14 dias. Os resultados do presente estudo revelaram que, após o uso da medicação intracanal, não houve redução da quantidade de bactérias nos canais radiculares, concordando com estudos moleculares prévios baseados em rDNA (Sakamoto et al., 2007; Blome et al., 2008; Nakamura et al., 2018). Embora, alguns estudos moleculares tenham mostrado uma diminuição no número de canais infectados após o uso da medicação intracanal, essa redução não foi significativa (Provenzano et al., 2015, Rôças; Siqueira, 2010). Por outro lado, Paiva et al. (2013b) relataram que o efeito cumulativo da irrigação final com clorexidina e a medicação intracanal com Ca(OH)_2 associado à clorexidina foi eficaz em reduzir o número de canais infectados e a carga bacteriana dos canais radiculares quando comparada ao PQC. A diferença entre os estudos pode estar relacionada a fatores como composição da pasta de Ca(OH)_2 , tempo de permanência, sensibilidade dos métodos moleculares utilizados para análise microbiológica e baixo número de amostras dos estudos analisados. Sharma et al. (2018), em uma revisão sistemática de literatura, ressaltaram que ainda não há consenso sobre a efetividade na redução bacteriana após o uso da medicação intracanal e também no seu tempo de permanência.

A análise da relação entre rRNA e rDNA no presente trabalho revelou que as bactérias presentes no momento da coleta S4 estavam metabolicamente ativas. Esses resultados estão de acordo com os estudos prévios utilizando os mesmos métodos empregados neste estudo (Nardello, 2018; Romero Cazares, 2018; Carvalho, 2019). Os resultados obtidos no presente estudo utilizando Ultracal foram semelhantes aos reportados por outros estudos utilizando pastas de Ca(OH)_2 com veículos inertes, como polietilenoglicol 400 (Nakamura et al., 2018) ou água destilada (Blome et al., 2008). Estudos clínicos e moleculares avaliando os veículos da pasta de Ca(OH)_2 com ação antimicrobiana têm mostrado resultados conflitantes. Rôças e Siqueira (2011) avaliaram o efeito da pasta de Ca(OH)_2 , associada ou não ao paramonoclorofenol canforado, por métodos moleculares baseados em rDNA. Esses autores revelaram que não houve diferença entre às medicações quanto ao número de canais infectados. Da mesma forma, Provenzano et al. (2015) relataram que o uso da pasta de hidróxido de cálcio, glicerina e paramonoclorofenol canforado não foi capaz de promover uma redução significativa da carga bacteriana intracanal na análise de qPCR baseada em rDNA. Por outro lado, Paiva et al. (2013b), também

utilizando qPCR baseada em rDNA, apresentaram resultados promissores em termos de redução de carga bacteriana quando associaram o hidróxido de cálcio com a clorexidina. Até o presente momento, poucos estudos clínicos avaliaram por métodos moleculares a ação antimicrobiana da pasta de Ca(OH)_2 , associada ou não a veículos ativo. Além disso, esses estudos incluem um pequeno número de casos. A metodologia empregada no presente estudo, associando a análise do rDNA e rRNA em qPCR mostrou-se eficaz para a avaliação da quantidade e do metabolismo de bactérias após os procedimentos endodônticos. Dessa forma, a associação desses métodos pode ser indicada para futuros estudos, incluindo um maior número de amostras, que tenham o objetivo de investigar a ação antimicrobiana da pasta de Ca(OH)_2 ou outras futuras medicações como possíveis alternativas de complemento da ação antimicrobiana do preparo químico-cirúrgico.

Além de fatores relacionados à composição da pasta de Ca(OH)_2 , fatores relacionados ao preenchimento dos canais radiculares devem ser considerados na análise da ação antibacteriana da medicação intracanal. O presente estudo utilizou o hidróxido de cálcio em seringa e uma ponta aplicadora para preencher o canal, o que está de acordo com estudos prévios (Beus et al., 2012, Nakamura et al., 2018). Por outro lado, a lentulo foi empregada em outros estudos, o que pode ter proporcionado um melhor preenchimento dos canais radiculares (Paiva et al., 2013b; Provenzano et al., 2015). Recentemente, a ativação ultrassônica da pasta de Ca(OH)_2 foi avaliada por métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA (Romero Cazares, 2018). Esse estudo mostrou que o metabolismo bacteriano foi menor no grupo da pasta de Ca(OH)_2 ativada com ultrassom do que no grupo da pasta não ativada. Os autores sugeriram que a melhor ação antibacteriana no grupo da ativação ultrassônica poderia estar relacionada a um maior contato da pasta de Ca(OH)_2 com as paredes dos canais radiculares (Arias et al., 2016) e ao aumento do pH da pasta ativada por ultrassom (Duarte et al., 2012).

Em uma revisão sistemática recente (Manfredi et al., 2016), os autores concluíram que não há evidência de que o tratamento endodôntico em sessão única é melhor que o tratamento em múltiplas-sessões, e vice-versa. Nenhum deles é capaz de prevenir complicações em curto ou longo prazo. Os autores ainda ressaltaram a escassez de estudos clínicos de qualidade. Entre os estudos microbiológicos avaliando o uso da medicação intracanal na redução bacteriana em

casos de periodontite apical, apenas 2 estudos foram considerados de qualidade (Molander et al., 2007; Weiger et al., 2000); e esses estudos apresentaram resultados conflitantes. Enquanto Molander et al. (2007) associaram o sucesso do tratamento da periodontite apical ao uso da medicação intracanal; Weiger et al. (2000) propuseram o tratamento endodôntico de casos com periodontite apical em uma única consulta. Portanto, torna-se clara a necessidade de novos estudos prospectivos de qualidade para avaliar ambas as modalidades de tratamento.

Este estudo comprovou que a irrigação ultrassônica promoveu uma redução do número e do metabolismo bacteriano após o preparo químico-cirúrgico. Além disso, após o uso da medicação intracanal a base de Ca(OH)_2 , as bactérias persistiram ativas. Porém, é imperativo estabelecer uma relação direta dos achados microbiológicos obtidos pelos métodos moleculares com as análises prospectivas de reparo, buscando identificar o número mínimo de carga bacteriana residual compatível com a cura da periodontite apical.

7 CONCLUSÕES

Diante da metodologia empregada para avaliação microbiológica do protocolo endodôntico, concluiu-se que:

- A irrigação ultrassônica passiva contribuiu para uma melhor desinfecção do canal radicular, promovendo uma redução do número e do metabolismo de bactérias quando utilizada após o preparo químico-cirúrgico.
- Bactérias persistiram ativas nos canais radiculares após o uso de Ca(OH)_2 como medicação intracanal em dentes com periodontite apical.

REFERÊNCIAS¹

Alves FR, Rôças IN, Almeida BM, Neves MA, Zoffoli J, Siqueira JF, Jr. Quantitative molecular and culture analyses of bacterial elimination in oval-shaped root canals by a single-file instrumentation technique. *Int Endod J*. 2012;45(9):871-7.

Ahmad M, Pitt Ford TR, Crum LA. Ultrasonic debridement of root canals: an insight into the mechanisms involved. *J Endod*. 1987;13:93-101.

Beus C, Safavi K, Stratton J, Kaufman B. Comparison of the effect of two endodontic irrigation protocols on the elimination of bacteria from root canal system: a prospective, randomized clinical trial. *J Endod*. 2012 Nov;38(11):1479-83. doi: 10.1016/j.joen.2012.07.005.

Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Oct;23(5):384-90. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00440.

Cachovan G, Schiffner U, Altenhof S, Guentsch A, Pfister W, Eick S. Comparative antibacterial efficacies of hydrodynamic and ultrasonic irrigation systems *in vitro*. *J Endod*. 2013;39:1171-5.

Carvalho APL. Avaliação microbiológica de um protocolo de tratamento endodôntico utilizando procedimentos complementares de desinfecção após o preparo químico-cirúrgico em dentes com periodontite apical [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019.

Castelo-Baz P, Martin-Biedma B, Cantatore G, Ruiz-Pinon M, Bahillo J, Rivas-Mundina B, et al. In vitro comparison of passive and continuous ultrasonic irrigation in simulated lateral canals of extracted teeth. *J Endod*. 2012;38(5):688-91.

Castelo-Baz P, Varela-Patino P, Cantatore G, Dominguez-Perez A, Ruiz-Pinon M, Miguens-Vila R, et al. In vitro comparison of passive and continuous ultrasonic irrigation in curved root canals. *J Clin Exp Dent*. 2016;8(4):e437-e41.

¹ De acordo com Estilo Vancouver

Chen JE, Nurbakhsh B, Layton G, Busmann M, Kishen A. Irrigation dynamics associated with positive pressure, apical negative pressure and passive ultrasonic irrigations: a computational fluid dynamics analysis. *Aust Endod J.* 2014;40(2):54-60.

Donyavi Z, Ghahari P, Esmailzadeh M, Kharazifard M, Yousefi-Mashouf R. Antibacterial Efficacy of Calcium Hydroxide and Chlorhexidine Mixture for Treatment of Teeth with Primary Endodontic Lesions: A Randomized Clinical Trial. *Iran Endod J.* 2016;11(4):255-60.

Goncalves LS, Rodrigues RC, Andrade Junior CV, Soares RG, Vettore MV. The Effect of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine as Irrigant Solutions for Root Canal Disinfection: A Systematic Review of Clinical Trials. *J Endod.* 2016;42(4):527-32.

Gu LS, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *J Endod.* 2009;35(6):791-804.

Harrison AJ, Chivatxaranukul P, Parashos P, Messer HH. The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals. *Int Endod J.* 2010;43(11):968-77.

Layton G, Wu WI, Selvaganapathy PR, Friedman S, Kishen A. Fluid Dynamics and Biofilm Removal Generated by Syringe-delivered and 2 Ultrasonic-assisted Irrigation Methods: A Novel Experimental Approach. *J Endod.* 2015;41(6):884-9.

Liang YH, Jiang LM, Jiang L, Chen XB, Liu YY, Tian FC, et al. Radiographic healing after a root canal treatment performed in single-rooted teeth with and without ultrasonic activation of the irrigant: a randomized controlled trial. *J Endod.* 2013;39(10):1218-25.

Macedo R, Verhaagen B, Rivas DF, Versluis M, Wesselink P, van der Sluis L. Cavitation measurement during sonic and ultrasonic activated irrigation. *J Endod.* 2014;40(4):580-3.

Macedo RG, Verhaagen B, Fernandez Rivas D, Gardeniers JG, van der Sluis LW, Wesselink PR, et al. Sonochemical and high-speed optical characterization of cavitation generated by an ultrasonically oscillating dental file in root canal models. *Ultrason Sonochem.* 2014;21(1):324-35.

Mancini M, Cerroni L, Iorio L, Armellini E, Conte G, Cianconi L. Smear layer removal and canal cleanliness using different irrigation systems (EndoActivator, EndoVac, and passive ultrasonic irrigation): field emission scanning electron microscopic evaluation in an in vitro study. *J Endod.* 2013;39(11):1456-60.

Miller WD. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. *Dent Cosmos*, 1894;11:145-58

Molander A, Warfvinge J, Reit C, Kvist T. Clinical and radiographic evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of asymptomatic necrotic teeth with apical periodontitis: a randomized clinical trial. *J Endod.* 2007;33(10):1145-8.

Moreira RN, Pinto EB, Galo R, Falci SGM, Mesquita AT. Passive ultrasonic irrigation in root canal: systematic review and meta-analysis. *Acta Odontol Scand.* 2018;77(1):55-60.

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

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

Nardello LCL. Análise da atividade metabólica de bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção: estudo molecular baseado em RNA e DNA [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018.

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

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;42(1):25-9.

Ng YL, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part 1: periapical health. *Int Endod J.* 2011;44(7):583-609.

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

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

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

Pinheiro ET, Candeiro GT, Teixeira SR, Shin RC, Prado LC, Gavini G, et al. RNA-based assay demonstrated enterococcus faecalis metabolic activity after chemomechanical procedures. *J Endod.* 2015;41(9):1441-4.

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;41(6):831-5.

Ricucci D, Siqueira Jr JF. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 2010;36:1277-1288.

Ricucci D, Russo J, Rutberg M, Burleson JA, Spangberg LS. A prospective cohort study of endodontic treatments of 1,369 root canals: results after 5 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112(6):825-42.

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;36(1):45-52.

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;37(2):143-50.

Rôças IN, Siqueira JF, Jr. In vivo antimicrobial effects of endodontic treatment procedures as assessed by molecular microbiologic techniques. *J Endod.* 2011b;37(3):304-10.

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;46(7):681-7.

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;40(1):33-7.

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;42(6):943-7.

Rodrigues RCV, Zandi H, Kristoffersen AK, Enersen M, Mdala I, Orstavik D, et al. Influence of the Apical Preparation Size and the Irrigant Type on Bacterial Reduction in Root Canal-treated Teeth with Apical Periodontitis. *J Endod.* 2017;43(7):1058-63.

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

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

Sharma G, Ahmed HMA, Zilm PS, Rossi-Fedele G. Antimicrobial properties of calcium hydroxide dressing when used for long-term application: A systematic review. *Aust Endod J.* 2018;44(1):60-5.

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

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

Siqueira JF, Jr., Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* 2008;34(11):1291-301.e3.

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

Siqueira JF, Jr., Rôças IN. Optimising single-visit disinfection with supplementary approaches: a quest for predictability. *Aust Endod J.* 2011;37(3):92-8.

Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps [Dissertação]. Umeå: University of Umeå; 1976.

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

Thomas AR, Velmurugan N, Smita S, Jothilatha S. Comparative evaluation of canal isthmus debridement efficacy of modified EndoVac technique with different irrigation systems. *J Endod.* 2014;40(10):1676-80.

Townsend C, Maki J. An in vitro comparison of new irrigation and agitation techniques to ultrasonic agitation in removing bacteria from a simulated root canal. *J Endod.* 2009;35(7):1040-3.

van der Sluis LW, Shemesh H, Wu MK, Wesselink PR. An evaluation of the influence of passive ultrasonic irrigation on the seal of root canal fillings. *Int Endod J.* 2007;40(5):356-61.

Vasconcelos LRSM, Midená RZ, Minotti PG, Pereira TC, Duarte MAH, Andrade FB. Effect of ultrasound streaming on the disinfection of flattened root canals prepared by rotary and reciprocating systems. *J Appl Oral Sci.* 2017;25(5):477-82.

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

Weiger R, Rosendahl R, Lost C. Influence of calcium hydroxide intracanal dressings on the prognosis of teeth with endodontically induced periapical lesions. *Int Endod J.* 2000;33(3):219-26.

Zandi H, Kristoffersen AK, Orstavik D, Rôças IN, Siqueira JF, Jr., Enersen M. Microbial analysis of endodontic infections in root-filled teeth with apical periodontitis before and after irrigation using pyrosequencing. *J Endod.* 2018;44(3):372-8.

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

PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA/RNA E CONFECÇÃO DE cDNA

Kits Comerciais

- MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit – Epicentre Biotechnologies
- Proteinase K – Invitrogen
- DNase I Amplification Grade – Invitrogen
- Kit Superscript III First-Strand – Invitrogen

Equipamentos

- Fluxo laminar
- Centrífuga refrigerada 4°C
- Banho-maria 65°C

Preparação para os procedimentos de extração de ácidos nucléicos

- Ligar os equipamentos supracitados
- Retirar as amostras do freezer e coloca-las no gelo
- Realizar antisepsia das bancadas, sendo:
 - i) Bancada de DNA com álcool 70%
 - ii) Bancada de RNA com RNase Away

1- PURIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS

Estes procedimentos devem ser realizados no fluxo exclusivo para bactérias, podendo utilizar ponteiras sem filtro e luvas sem talco.

Material

<ul style="list-style-type: none"> • Proteinase K • Tissue and Cell Lysis Solution • MPC Protein Precipitation 	<ul style="list-style-type: none"> • Microtubos 1,5mL • Ponteiras sem filtro de 10uL, 200uL e 1000uL • Tubo Falcon estéril de 50mL
<ul style="list-style-type: none"> • Isopropanol e Etanol 70% 	

Estes procedimentos devem ser realizados no fluxo exclusivo para bactérias, podendo utilizar ponteiras sem filtro e luvas sem talco.

1.1- Lise das células bacterianas

- Agitar as amostras no Vortex – 1 min
- Centrifugar – 10 min, 4°C, 13.000 rpm
- Em um tubo eppendorf (2mL) ou tubo Falcon estéril (50mL) fazer um MIX dos seguintes reagentes, levando em conta o número de amostras + 1.
 - Tissue and Cell Lysis – 300uL
 - Proteinase K – 2uL
- Descartar o sobrenadante **mantendo** o pellet
- Adicionar 300uL do MIX em cada amostra
- Agitar no Vortex – 10s
- Banho-maria 65°C – 15 min
- Agitar no Vortex a cada 5 min por 10 seg
- Manter as amostras em gelo – 5min

1.2- Precipitação dos ácidos nucléicos totais

- Adicionar 150uL de MPC Protein Precipitation Reagent em cada amostra
- Agitar Vortex – 10 seg
- Centrifugar – 10 min, 4°C, 13.000 rpm
- Se o pellet não ficar aderido ao tubo ou estiver misturado com o sobrenadante, acrescentar 25uL de MPC e centrifugar novamente
- Nomear novos eppendorfs de acordo com as amostras
- Transferir o sobrenadante para o novo microtubo
- Descartar o pellet
- Adicionar 500uL de isopropanol
- Inverter os microtubos 30/40 vezes
- Centrifugar – 10 min, 4°C, 13.000 rpm
- Descartar o isopropanol com cuidado para não deslocar o pellet
- Lavar o pellet com 50uL de etanol 70%
- Centrifugar – 5 min, 4°C, 13.000 rpm
- Descartar o etanol 70%
- Lavar o pellet com 50uL de etanol 70%
- Centrifugar – 5 min, 4°C, 13.000 rpm
- Remover todo o etanol 70% com ponteiros de 200uL
- Adicionar 36uL de TE Buffer em cada amostra

1.3- Divisão das amostras DNA e RNA

- Hidratar as amostras no termomixer por 10 minutos a 10°C. Alternativamente, colocar as amostras em gelo sobre uma mesa agitadora (22rpm) por 10 minutos.
- Dividir as amostras em dois tubos, sendo:
 - 18uL em um microtubo denominado com o nº da amostra + RNA, que seguirá para a ETAPA 2.
 - 18uL restantes ficarão no microtubo contendo o DNA, que será imediatamente armazenado a -20°C.

2- REMOÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTAIS

Estes procedimentos devem ser realizados na bancada de RNA, utilizando ponteiras com filtro e luvas sem talco (trocar a luva utilizada para o DNA).

- Fazer um MIX dos seguintes reagentes de acordo com o número de amostras +1.
 - DNase I – 2uL
 - DNase I Reaction Buffer – 2uL
- Adicionar 4uL do MIX em cada amostra dos microtubos que foram identificados com o nº da amostra + RNA.
- Incubar por 15 min, 37°C
- Adicionar 200uL de 2X T&C Lysis Solution
- Agitar no vortex por 5 seg
- Adicionar 200uL de MPC
- Agitar no vortex por 10 seg
- Manter no gelo por 5 min
- Centrifugar – 10 min, 4°C, 13.000 rpm
- Transferir o sobrenadante para microtubos limpos e devidamente identificados
- Descartar o pellet
- Adicionar 500uL de isopropanol
- Inverter os microtubos 30/40 vezes
- Centrifugar – 10 min, 4°C, 13.000 rpm
- Retirar o isopropanol com cuidado para não deslocar o pellet
- Lavar o pellet com 50uL de etanol 70%
- Centrifugar – 5 min, 4°C, 13.000 rpm
- Descartar o etanol 70%
- Lavar o pellet com 50uL de etanol 70%
- Centrifugar – 5 min, 4°C, 13.000 rpm
- Remover todo etanol 70% com ponteiras de 200uL
- Submeter o pellet ao segundo tratamento com DNase I

3- TRATAMENTO COM A DNASE I AMPLIFICATION GRADE (INVITROGEN): 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

- Fazer um MIX dos seguintes reagentes de acordo com o número de amostras +1.
 - DNase I – 1uL
 - 10x DNase I Reaction Buffer – 1uL
 - DEPC – treated water – 8uL
- Acrescentar 10uL do MIX em cada amostra
- Fazer um SPIN para homogeneizar as amostras

- Incubar por 15 min em temperatura ambiente
- Inativar a DNase com a adição de 1uL de EDTA 25mM (Invitrogen)
- Banho-maria a 65°C por 10 min
- As amostras estão prontas para serem analisadas por PCR convencional, para posterior reação de transcrição reversa.
- O PCR convencional deve ser realizado com primers universais para a região do gene 16S rRNA para conferir se as amostras de RNA estão livres de DNA

4- PREPARO PARA PCR CONVENCIONAL (gene 16S rRNA – primer universal)

Todas as misturas a seguir devem ser realizadas dentro do fluxo laminas próprio para realização de preparo para PCR convencional, com ponteiras sem filtro e microtubos novos, abertos dentro do fluxo.

Reação padrão de 25uL – produto de 1500pb

- Fazer um MIX dos seguintes reagentes de acordo com o número de amostras +3 pois agora devemos considerar os controles positivo e negativo
 - Buffer – 2,5uL
 - Mg – 0,75uL
 - dNTP de trabalho – 2uL
 - Primer universal forward – 0,5uL
 - Primer universal reverse – 0,5uL
 - Taq polimerase – 0,25uL
 - H₂O Milli-Q – 18uL
- Adicionar 1uL de cada amostra no respectivo microtubo devidamente identificado, cada um contendo 24uL do MIX
- Adicionar 1uL do controle positivo (DNA de *E. Faecalis*) no respectivo microtubo
- Adicionar 1uL de H₂O Milli-Q no tubo do controle negativo
- Homogeneizar as amostras com o mixer de microtubos de 200uL, por 2 segundos
- Levar as amostras para o Termociclador
 - 94°C por 4 min
 - 30 ciclos:
 - 94°C por 45 seg
 - 60°C por 45 seg
 - 72°C por 1,5 min
 - 72°C por 15 min
 -

5- ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

5.1- Preparo do Gel de Agarose

- 0,60g de agarose
- 60mL de TAE 1X (0,8mL de TAE 50X + 39,2 de H₂O)
- Misturar o pó de agarose com TAE 1X
- Levar ao micro-ondas por aproximadamente 40 seg, mexendo a cada 10 seg, para não deixar ferver
- Aguardar esfriar
- Adicionar 2uL de gel Red Nucleic Acid com ponteira de 10uL

5.2- Preparo da Cuba de Eletroforese

- Despejar o gel de agarose ainda líquido na cuba previamente preparada
- Aguardar o líquido gelificar
- Remover a placa denada, desprender a cuba da prensa e posicioná-la na bandeja de eletroforese, com as casas voltadas para o polo positivo (fio preto)
- Encher a bandeja, cobrindo totalmente a placa de gel, com TAE 1X
- Em um papel plastificado, depositar 2uL de corante Load, em quantidade igual ao número de amostras + 3.
- Misturar 5uL de marcador Mass Ladder de 1kb à uma gota de corante e, com a mesma ponteira, levar a mistura à primeira casa da placa de gel de agarose
- Repetir o passo anterior para cada amostra, **substituindo** o marcador por 5uL de amostra
- Fechar a bandeja e conectá-la ao aparelho
- Ligar o aparelho e ajustar:
 - Voltagem 80V
 - 30 minutos
 - Current 400
- Depois de terminada a corrida, ligar o aparelho de luz UV
- Posicionar a placa de gel no centro da gaveta da câmara UV
- Ligar a luz UV
- No computador, abrir o software
- Selecionar luz UV
- Alterar as definições de velocidade, exposição e contraste até conseguir a imagem desejada
- Fechar o programa, retirar a placa de gel e desligar o aparelho

6- PCR DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR)

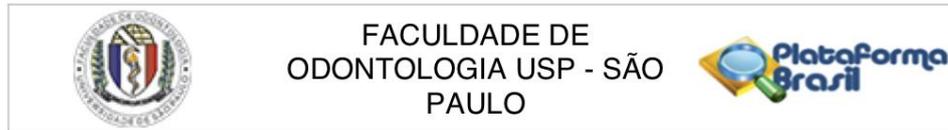
Utilizando o Kit Superscript III First-Strand; Realiza-se a RT-PCR para confeccionar a fita dupla de cDNA a partir do RNA da amostra

- Nomear novos microtubos de acordo com cada amostra
- Fazer um MIX dos seguintes reagentes de acordo com o número de amostras +1
 - RNA das amostras – 7uL
 - Random Hexamer – 1uL
 - dNTP do kit – 1uL
 - Água DPEC – 1uL

- Adicionar 10uL do MIX em cada amostra
- Banho-maria a 65°C por 5 minutos
- Manter em gelo por 1 minuto
- Fazer um MIX dos seguintes reagentes de acordo com o número de amostras+1
 - Buffer – 2uL
 - MgCl – 4uL
 - DTT – 2uL
 - RNase OUT – 1uL
 - SuperScript III – 1uL
 -

- Adicionar 10uL do MIX em cada amostra
- Homogeneizar
- Incubar no termociclador 2720 (Applied Biosystem)
- Utilizar programa RT-PCR 20uL
 - 25°C por 10 minutos
 - 50°C por 50 minutos
 - 85°C por 5 minutos
- Aguardar o término do programa
- Adicionar 1uL de RNaseH
- Incubar por 20 minutos na estufa a 37°C
- Armazenar as amostras a -20°C

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética e m Pesquisa



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

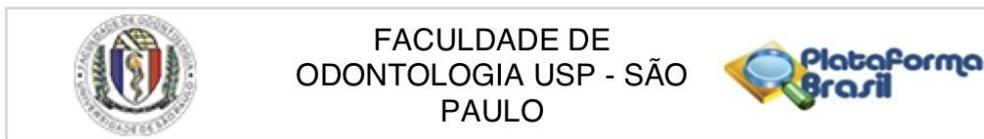
DADOS DO PARECER

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



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

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



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA USP - SÃO
PAULO



Continuação do Parecer: 2.201.768

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 04 de Agosto de 2017

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

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