

ALEXANDRE PINHEIRO LIMA DE CARVALHO

**Avaliação microbiológica de um protocolo de tratamento endodôntico
utilizando procedimentos complementares de desinfecção após o preparo
químico-cirúrgico em dentes com periodontite apical**

São Paulo

2019

ALEXANDRE PINHEIRO LIMA DE CARVALHO

**Avaliação microbiológica de um protocolo de tratamento endodôntico
utilizando procedimentos complementares de desinfecção após o preparo
químico-cirúrgico em dentes com periodontite apical**

Versão Corrigida

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

Coorientador: Prof. Dr. Giulio Gavini

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

Carvalho, Alexandre Pinheiro Lima de.

Avaliação microbiológica de um protocolo de tratamento endodôntico utilizando procedimentos complementares de desinfecção após o preparo químico-cirúrgico em dentes com periodontite apical / Alexandre Pinheiro Lima de Carvalho ; orientador Ericka Tavares Pinheiro; coorientador Giulio Gavini. -- São Paulo, 2019.

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

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

Versão corrigida

1. Tratamento endodôntico. 2. Periodontite periapical. 3. XP-endo Finisher. 4. Ativação ultrassônica. 5. Hidróxido de Cálcio. 6. RT-PCR quantitativo. I. Pinheiro, Ericka Tavares. II. Gavini, Giulio. III. Título.

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 apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 15/02/2019

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Rielson José Alves Cardoso

Instituição: CPO - São Leopoldo Mandic

Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Ceci Nunes Carvalho

Instituição: Universidade CEUMA

Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Mary Caroline Skelton-Macedo

Instituição: Universidade de São Paulo – FOU SP

Julgamento: Aprovado

Dedico este trabalho,

*Primeiramente a **DEUS***

*Aos meus pais **Maria Cristina e Ramon** “In Memoriam”,*

*Aos meus irmãos **Fernando, Ramon, Suzana, Heloisa, e Eduardo,***

*E à minha companheira **Bruna...***

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Ericka Pinheiro**, pela orientação dada durante toda a minha pós-graduação. Por me ensinar tudo que sei, por estar sempre presente em todas as vezes que precisei. Por me receber de braços abertos e me transferir o conhecimento que, com certeza, vou levar comigo para vida. Obrigado pela confiança.

Ao **Prof. Dr. Giulio Gavini**, pela coorientação neste trabalho de pesquisa. Por abrir as portas da Universidade de São Paulo para que pudesse realizar o meu sonho. Por todo o exemplo e por todos os ensinamentos durante esta jornada. Muito obrigado.

Ao **Prof. Dr. Rielson José Alves Cardoso**, meu grande espelho e exemplo. Considero o meu Pai na Endodontia. Obrigado por sempre me incentivar e sempre ter um bom conselho. Por acreditar em mim desde o início e me tornar uma pessoa melhor. Sou grato a Deus por cruzar minha jornada com a do senhor. Gratidão eterna.

À **Profa. Dra. Mary Caroline Skelton Macedo**, por ter plantado a semente e iniciado essa idéia. Muito obrigado por todo o carinho, pelos ensinamentos e pela amável convivência.

À **Profa. Dra. Ceci Nunes Carvalho**, por tudo o que fez por mim desde a minha chegada. Não tenho palavras para descrever o quanto sou grato a você. Sem você isso não seria possível. Obrigada pela amizade, companheirismo, pelos ensinamentos e por ser uma pessoa tão especial e iluminada.

Aos colegas, **Roberto Romero, Carlos Nogales, Yeska Braga, Luiza Paz, Laura Nardello, Laís Prado, Fernanda Fernandes, Fernanda Bruno, Bruna Gontijo, Renata Bommarito e Bárbara Guedes** que foram fundamentais no desenvolvimento desta pesquisa, (grandes triagens, coleta de amostras, avaliação da dor, preservação e laboratório) sem duvida alguma cada procedimento foi realizado com sucesso por cada um de vocês.

A todos os **professores do Departamento de Endodontia**, pelo convívio, atenção e conhecimentos partilhados. Sempre muito dispostos a ajudar.

Aos meus **amigos de Pós-graduação**, todos, sem exceção, por toda ajuda e momentos compartilhados.

Aos **alunos de Graduação** por terem me ensinado mais do que eu tentei ensinar a eles.

À secretaria do Departamento de Dentística, **David e Selma e Leandro**, que sempre me ajudaram.

À bibliotecária, **Glauci**, pela paciência e ajuda na normatização do trabalho. Obrigada por todo cuidado e atenção.

A todos da minha **família e amigos** que torceram por mim, que me dão carinho e incentivo. Pelas orações e energia positiva.

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..

"A principal causa de problemas no mundo é que os estúpidos estão cheios de certezas e os inteligentes estão cheios de dúvidas."

Bertrand Russell

RESUMO

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. Versão Corrigida.

Procedimentos clínicos complementares realizados após o preparo químico-cirúrgico de canais radiculares visam potencializar a limpeza e desinfecção após a fase de preparo. O objetivo deste trabalho foi avaliar, por métodos moleculares baseados em rDNA e rRNA, a eficácia antimicrobiana de procedimentos complementares de primeira e de segunda sessão, realizados após o PQC em dentes com periodontite apical. Baseado em estudo piloto prévio, amostras microbiológicas dos canais radiculares de 20 dentes unirradiculares com periodontite apical foram coletadas na primeira sessão clínica: após a cirurgia de acesso (S1), após o PQC realizado com Sistema Reciproc e NaOCl 2,5% (S2), após a utilização do instrumento XP-endo Finisher (S3a), e após a ativação ultrassônica (S3b). Na segunda sessão clínica as amostras foram coletadas após medicação intracanal entre sessões por 14 dias (S4), e após o reprepáro dos canais na segunda sessão de tratamento (S5). 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 das amostras baseados nos dados dos ensaios de qPCR. Os dados foram analisados pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas ($p < 0,05$). Todas amostras S1 foram positivas para bactérias (mediana: $1,79 \times 10^5$ cópias de rDNA). Doze canais (60%) permaneceram infectados em S2, com uma redução significativa de rDNA (mediana: $7,58 \times 10^3$; $P = 0,0001$). Em S3a e S3b, o número de canais infectados reduziu para 11 (55%) e 10 (50%), respectivamente, e aumentou para 14 (70%) em S4; porém não houve diferenças significativas entre os níveis de rDNA bacteriano quando essas amostras foram comparadas às amostras S2 ou comparadas entre si ($P > 0,05$). A prevalência de canais infectados voltou a cair em

S5 para 6 (30%) e o número cópias de rDNA bacteriano detectado reduziu de maneira significativa quando comparado às amostras S4 ($p = 0,0061$). Nas amostras positivas para os 2 métodos, os níveis de rRNA foram significativamente maiores do que os níveis de rDNA nas amostras S1 ($p = 0,0007$) e S4 ($p = 0,0499$), indicando um alto metabolismo bacteriano. A relação dos níveis de rRNA e de rDNA revelou uma redução do metabolismo de bactérias totais em S2, S3a e S3b e um aumento significativo do metabolismo bacteriano em S4 ($p = 0,0173$) quando comparado a S3b. Concluiu-se que: o PQC promoveu redução dos níveis e da atividade metabólica de bactérias nos canais radiculares; o uso do instrumento XP-endo Finisher e ativação ultrassônica não contribuiu para uma desinfecção adicional na primeira sessão; após o uso de Ca(OH)_2 como medicação intracanal, houve um aumento no metabolismo de bactérias persistentes; o reparo dos canais radiculares após medicação intracanal, na segunda sessão, promoveu maior desinfecção do que os procedimentos realizados na primeira sessão do tratamento de dentes com periodontite apical.

Palavras-chave: Tratamento endodôntico. Periodontite apical. XP-endo Finisher. Ativação Ultrassônica. Hidróxido de cálcio. RT-PCR quantitativo.

ABSTRACT

Carvalho APL. Microbiological evaluation of an endodontic treatment protocol using supplementary disinfection procedures after the chemical-surgical preparation in teeth with apical periodontitis. [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Corrigida.

Supplementary procedures performed after the chemical-surgical preparation of root canals aim to enhance cleaning and disinfection in endodontic treatment. The objective of this clinical study was to evaluate using molecular microbiological techniques based on rDNA and rRNA, the antimicrobial efficacy of supplementary disinfection procedures performed in multiple sessions after the chemical-surgical preparation in teeth with apical periodontitis. Based on a previous pilot study, microbiological samples of the root canals of 20 unirradicular teeth with apical periodontitis were taken after the access surgery (S1), after the chemical-surgical preparation using Reciproc and 2,5% NaOCl (S2) after the XP-endo Finisher (S3a), after ultrasonic activation (S3b), after intracanal medication for 14 days (S4), and after re-preparation of the root canals in the second treatment appointment (S5). The samples were submitted to DNA and RNA extraction. The RNA was subjected to the reverse transcription reaction (RT-PCR) to make the complementary DNA double strand (cDNA). The effect of endodontic procedures on bacterial reduction was determined by rDNA-based qPCR using universal primers for the 16S *rRNA* region of the *Bacteria* domain. The metabolic activity of the bacteria was assessed by the rRNA/rDNA ratio based on qPCR assay data. Data were analyzed by the Wilcoxon signed-rank test ($P < 0.05$). All S1 samples were positive for bacteria (median 1.79×10^5 rDNA copies). Twelve root canals (60%) remained infected in S2, with a significant reduction of rDNA (median: 7.58×10^3 ; $P = 0.0001$). In S3a and S3b, the number of infected teeth decreased to 11 (55%) and 10 (50%), respectively, and increased to 14 (70%) in S4; however there were no significant differences between bacterial rDNA levels when these samples were compared to the S2 samples or compared to each other ($P > 0.05$). The prevalence of infected canals dropped back to 6 (30%) in S5 and the number of bacterial rDNA detected significantly reduced when compared to S4 samples ($p = 0.0061$). In samples with positive reactions for

both methods, rRNA levels were significantly higher than the rDNA levels in S1 ($p = 0.0007$) and S4 ($p = 0.0499$), indicating a high metabolic activity of bacteria. The results of the rRNA/rDNA ratio revealed a reduction in the metabolism of total bacteria in S2, S3a and S3b and a significant increase in metabolic activity of bacteria in S4 ($p = 0.0173$) when compared to S3b. It was concluded that: PQC promoted reduction of the levels and metabolic activity of bacteria in the root canals; the use of XP-endo Finisher plus ultrasonic activation did not contribute to an additional disinfection in the first session; after the use of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ as intracanal medication, there was an increase in the metabolism of persistente bacteria; the re-preparation of the root canals in the second session after the use of intracanal medication, promoted greater disinfection than the procedures performed in the first session of the treatment of teeth with apical periodontitis.

Keywords: Root Canal Treatment. Apical Periodontitis. XP-endo Finisher. Ultrasonic Activation. Calcium Hydroxide. Quantitative RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Fluxograma dos procedimentos clínicos e coletas microbiológicas (FASE I)	39
Figura 4.2 - Fluxograma dos procedimentos clínicos e coletas microbiológicas (FASE II)	46
Figura 5.1 - Fluxograma do ensaio clínico	56
Figura 5.2 - Níveis médios de rDNA e rRNA em amostras qPCR positivas para ambos os métodos após: cirurgia de acesso (S1), preparo químico-cirúrgico (S2), XPF (S3a), PUI (S3b), medicação intracanal entre sessões (S4) e reparo dos canais radiculares (S5).....	62

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1 - Valores de mediana (mínimo - máximo) dos níveis de rDNA bacteriano nos canais radiculares após os seguintes procedimentos: cirurgia de acesso (S1), preparo químico-cirúrgico (S2), XPF (S3), medicação intracanal entre sessões (S4) e reparo dos canais radiculares (S5).54
- Tabela 5.2 - Distribuição de 20 casos segundo idade, gênero, localização do dente, grupo dental, diâmetro apical inicial e final55
- Tabela 5.3 - Valores de mediana (mínimo - máximo) dos níveis de rDNA bacteriano nos canais radiculares após os seguintes procedimentos: cirurgia de acesso (S1), preparo químico-cirúrgico (S2), XPF (S3a), PUI (S3b), medicação intracanal entre sessões (S4) e reparo dos canais radiculares (S5).....57
- Tabela 5.4 - Valores de mediana (mínimo - máximo) dos níveis de rRNA bacteriano nos canais radiculares após os seguintes procedimentos: cirurgia de acesso (S1), preparo químico-cirúrgico (S2), XPF (S3a), PUI (S3b), medicação intracanal entre sessões (S4) e reparo dos canais radiculares (S5).....58
- Tabela 5.5 - Taxa de detecção dos métodos baseados em rDNA e rRNA nos canais radiculares após os seguintes procedimentos: cirurgia de acesso (S1), preparo químico-cirúrgico (S2), XPF (S3a), PUI (S3b), medicação intracanal entre sessões (S4) e reparo dos canais radiculares (S5)..59
- Tabela 5.6 - Valores de mediana (mínimo - máximo) do número cópias de rDNA e rRNA das amostras com reações de qPCR positivas para os 2 métodos após os seguintes procedimentos: cirurgia de acesso (S1), preparo químico-cirúrgico (S2), XPF (S3a), PUI (S3b), medicação intracanal entre sessões (S4) e reparo dos canais radiculares (S5).....61

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
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	Ativação ultrassônica
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
XPF	XP-endo Finisher

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	Efeito do preparo químico-cirúrgico no controle da infecção	27
2.2	Otimização da desinfecção pós-preparo: manobras de efeito imediato e mediato	30
3	PROPOSIÇÃO	35
3.1	Objetivo geral	35
3.2	Objetivos específicos	35
3.3	Hipótese nula	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	Aspectos éticos	37
4.2	Recrutamento de pacientes elegíveis	37
4.3	FASE I - Estudo piloto para validação de um protocolo clínico de utilização do instrumento XPF	38
4.3.1	Preparo dos canais radiculares e coletas microbiológicas.....	40
4.3.1.1	<i>Procedimentos clínicos iniciais e desinfecção do campo (C1)</i>	40
4.3.1.2	<i>Odontometria eletrônica e primeira coleta (S1)</i>	41
4.3.1.3	<i>Preparo dos canais radiculares e segunda coleta (S2)</i>	41
4.3.1.4	<i>Protocolo final de irrigação e terceira coleta (S3)</i>	43
4.3.1.5	<i>Segunda sessão de tratamento, quarta e quinta coletas (S4;S5)</i>	44
4.4	FASE II - Pesquisa clínica com protocolo antimicrobiano definido após estudo piloto	45
4.4.1	Protocolo final de irrigação em duas etapas, e coletas S3a e S3b.....	47
4.5	Análise quantitativa de bactérias	48
4.5.1	Extração de DNA/RNA e síntese do cDNA.....	48
4.5.2	Reação em cadeia de polimerase em tempo real.....	49
4.6	Análise estatística	50
5	RESULTADOS	53
5.1	FASE I - Estudo piloto para validação de um protocolo clínico de utilização do instrumento XPF	53

5.2	FASE II - Pesquisa clínica com protocolo antimicrobiano definido após estudo piloto.....	55
5.2.1	Análise por qPCR baseada em rDNA: quantificação bacteriana.....	57
5.2.2	Análise por qPCR baseada em rRNA e rDNA: metabolismo bacteriano.	58
6	DISCUSSÃO.....	63
6.2.1	Análise por qPCR baseada em rDNA: quantificação bacteriana.....	64
6.2.2	Análise por qPCR baseada em rRNA e rDNA: metabolismo bacteriano.....	68
7	CONCLUSÕES.....	71
	REFERÊNCIAS.....	73
	APÊNDICES.....	79
	ANEXOS.....	89

1 INTRODUÇÃO

O papel das bactérias em canais radiculares com polpa necrótica na indução da periodontite apical é amplamente reconhecido na literatura. O objetivo da terapia endodôntica em dentes com periodontite apical é promover a diminuição da carga microbiana em níveis que permitam o reparo dos tecidos periapicais. Para isso, é fundamental a execução minuciosa de todas as etapas do tratamento; entre as quais, destaca-se a fase de preparo químico-cirúrgico (PQC). Essa fase é caracterizada pela utilização de instrumentos endodônticos associados ao processo de irrigação/aspiração de soluções antimicrobianas no intuito de promover modelagem, limpeza e desinfecção dos canais radiculares. Entretanto, devido à complexidade anatômica, algumas superfícies do canal principal não são tocadas pelos instrumentos endodônticos. Além disso, áreas de istmos e ramificações apicais são inacessíveis aos instrumentos.

Aliada aos aspectos anatômicos, a organização das bactérias em biofilme intrarradicular pode dificultar a sanificação dos canais radiculares de dentes com periodontite apical. Estes biofilmes polimicrobianos, aderidos às paredes dentinárias não tocadas pelos instrumentos, oferecem resistência à ação antimicrobiana das substâncias químicas. Esse fato ocorre devido ao sinergismo entre os membros da comunidade microbiana, que passam a reagir às alterações ambientais como uma unidade, e não como células isoladas. Portanto, a complexidade anatômica do sistema de canais radiculares associada à organização bacteriana em biofilmes contribuem para persistência de bactérias nos canais radiculares. Estudos clínicos utilizando técnicas microbiológicas sensíveis mostram que mais de 50% dos canais radiculares ainda permanecem infectados após o PQC, independente do sistema de preparo e da solução irrigadora utilizada durante o tratamento endodôntico.

Para solucionar esse problema, procedimentos complementares de desinfecção foram propostos para otimizar a sanificação após o preparo dos canais radiculares na primeira sessão do tratamento endodôntico. Esses procedimentos baseiam-se na ativação das soluções irrigadoras, principalmente do hipoclorito de sódio (NaOCl), gerando uma combinação benéfica de dinâmica de fluido e ação química do irrigante. O movimento do líquido pode gerar uma tensão de contato nas

paredes dos canais radiculares, promovendo a limpeza do canal principal, além de alcançar áreas de ramificações e istmos.

Entre os procedimentos complementares de desinfecção, destaca-se a ativação ultrassônica da solução irrigadora, denominada pela maioria dos autores de irrigação ultrassônica passiva (PUI, acrônimo do termo em inglês *passive ultrasonic irrigation*). Esse método se baseia na transmissão de energia para o irrigante por meio de um inserto ativado por ultrassom no interior dos canais radiculares. A energia dissipada na solução irrigadora por ondas ultrassônicas geram correnteza acústica e cavitação (formação de bolhas e implosão), com o objetivo de potencializar a ação mecânica de limpeza e a ação antimicrobiana do NaOCl. Estudos *in vitro* mostraram que a PUI melhorou a limpeza dos canais radiculares, potencializando a remoção mecânica de debris dentinários após o PQC. Entretanto, há controvérsias na literatura se a PUI é capaz de promover uma redução adicional de bactérias além daquela promovida durante o PQC. Recentemente, um estudo clínico randomizado revelou que a PUI foi capaz de promover uma maior redução do nível de bactérias dos canais radiculares quando comparada ao grupo sem ativação do irrigante.

Outra estratégia estudada na atualidade para complementar a limpeza e desinfecção do canal radicular é o uso do instrumento XP-endo Finisher (Brasseler USA®, Savannah, Georgia). Este novo instrumento é fabricado com uma liga de níquel-titânio especial (MaxWire), que sofre uma mudança de fase quando aquecida acima de 35°C, promovendo uma alteração da forma do instrumento, de retilíneo para uma forma semelhante a de uma colher. Desta maneira, em temperatura corpórea, o instrumento XP-endo Finisher (XPF) executa movimentos excêntricos quando acionado por rotação no interior dos canais radiculares. Por apresentar 0,25 mm diâmetro e não possuir conicidade, esse instrumento é extremamente flexível e resistente à fadiga cíclica. Além disso, XPF se molda à forma do canal com o potencial de promover a remoção de debris e de biofilmes em áreas não preparadas. Por se tratar de um novo instrumento, até o presente momento, existem poucos trabalhos na literatura avaliando o XPF. Estudos *in vitro* mostraram que esse instrumento apresentou uma boa capacidade de remoção de debris dentinários. A eficácia do XPF em promover redução bacteriana na luz do canal principal e no interior de túbulos dentinários também foi demonstrada em estudos *in vitro*. Entretanto, são necessários estudos clínicos para investigar se este procedimento

complementar de desinfecção é capaz de promover uma redução adicional de bactérias dos canais radiculares na primeira sessão do tratamento.

Outra estratégia de otimização da desinfecção pós-preparo consiste no emprego de uma medicação intracanal entre sessões. Essa manobra de efeito mediato é a estratégia mais estudada na literatura endodôntica visando a máxima redução bacteriana em dentes com periodontite apical. As pastas de hidróxido de cálcio são reconhecidamente as mais utilizadas para este fim, graças à sua comprovada ação antimicrobiana quando em contato direto com os micro-organismos, associada à capacidade de preencher os canais radiculares e funcionar como uma barreira físico-química, prevenindo a reinfecção antes da obturação. Entretanto, existem limitações na sua utilização relacionadas a fatores como: capacidade tampão da dentina, que reduz o pH da pasta, reduzindo sua eficácia antimicrobiana no interior de túbulos dentinários; a localização dos micro-organismos em áreas de istmos e ramificações; e a organização da microbiota endodôntica em forma de biofilmes, tornando-a mais resistente à ação da medicação. Além disso, existe uma enorme variação nos estudos clínicos quanto ao tempo de atuação, à forma de inserção e a composição da pasta de Ca(OH)_2 , tornando difícil a comparação entre os resultados obtidos pelos diferentes estudos. Por esse motivo, existe ainda na literatura uma divergência entre os autores a respeito da eficácia antimicrobiana deste procedimento.

Para a avaliação microbiológica dos procedimentos endodônticos, o uso de métodos moleculares independentes de cultura se tornam importantes, pois a microbiota endodôntica é composta predominantemente de bactérias ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo. Além disso, eles apresentam uma maior sensibilidade do que os métodos dependentes de cultura bacteriana. O número de estudos clínicos utilizando métodos moleculares para avaliação microbiológica do tratamento endodôntico vem crescendo nos últimos 20 anos. Entre estes estudos, a maioria realizou a detecção/ quantificação do DNA bacteriano, mais especificamente, do gene 16S *rRNA* (denominado rDNA). Como as bactérias possuem uma ou poucas cópias desse gene, esse método permite uma quantificação absoluta das bactérias baseada no número de cópias de rDNA revelados pela reação de polimerase em cadeia quantitativa (qPCR). Entretanto, a qPCR baseada em rDNA apresenta como desvantagem a não distinção entre células vivas e mortas, o que pode levar a uma

superestimação do número de bactérias em coletas microbiológicas após os procedimentos endodônticos.

Por sua vez, métodos moleculares baseados na detecção do RNA ribossômico (rRNA) funcionam como uma alternativa para a distinção entre células vivas e mortas, servindo de indicador da viabilidade celular de bactérias cultiváveis e não cultiváveis. Entretanto, como o número de cópias de rRNA varia grandemente dependendo do estado fisiológico da bactéria, esta molécula não permite a quantificação absoluta das bactérias. Devido às limitações das reações de qPCR baseadas em rDNA e rRNA, estudos têm proposto o uso combinado dos métodos para possibilitar a avaliação simultânea da quantificação e da viabilidade de células bacterianas presentes nas amostras. Considerando que o número de cópias de rRNA se apresenta elevado em bactérias metabolicamente ativas, a razão rRNA/rDNA poderá fornecer dados sobre a atividade metabólica da comunidade bacteriana presente. Na literatura, poucos estudos utilizaram métodos baseados em rRNA para avaliar a viabilidade de bactérias persistentes após procedimentos endodônticos de desinfecção.

Diante do exposto, a proposta deste trabalho foi realizar um estudo clínico para o monitoramento microbiológico de um protocolo de tratamento endodôntico de dentes com periodontite apical primária, realizado em 2 sessões, utilizando procedimentos complementares, imediatos e mediatos, após o PQC. Os procedimentos avaliados na primeira sessão do tratamento endodôntico incluem o PQC e a ativação das soluções irrigadoras com XPF e PUI; enquanto os procedimentos monitorados na segunda sessão do tratamento incluem a medicação intracanal com hidróxido de cálcio por 14 dias, seguida do reparo dos canais radiculares previamente à obturação. A avaliação microbiológica foi realizada por métodos moleculares baseados em rDNA e rRNA para análise dos níveis e do metabolismo de bactérias após os procedimentos endodônticos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção serão revisados os estudos clínicos que avaliaram os procedimentos endodônticos de desinfecção por métodos moleculares independentes de cultura.

2.1 Efeito do preparo químico-cirúrgico no controle da infecção

O preparo químico-cirúrgico de canais radiculares com polpa necrótica e periodontite apical tem como principal objetivo reduzir a carga microbiana em níveis compatíveis com o reparo dos tecidos periapicais (Siqueira; Rôças, 2008). A ação conjunta de instrumentos endodônticos, sistema de irrigação/ aspiração e soluções irrigadoras permitem que o conteúdo bacteriano, matéria orgânica e debris sejam arrastados e removidos do interior dos canais radiculares durante a modelagem.

A ação mecânica sobre o biofilme bacteriano pode ser realizada com diferentes instrumentos e cinemáticas, através de técnicas manuais ou automatizadas. Um estudo clínico, comparando o emprego de instrumentos rotatórios com instrumentos manuais de níquel-titânio (NiTi), revelou que não houve diferença na redução bacteriana promovida pelas duas técnicas quando os mesmos parâmetros de alargamento e irrigação foram utilizados (Rôças et al., 2013). Por outro lado, Neves et al. (2014), avaliando a lima auto-ajustável (SAF, do inglês *Self Adjustment File*), relataram que este novo instrumento de preparo foi altamente eficaz na redução bacteriana, com melhor desempenho do que o preparo manual dos canais radiculares de dentes unirradiculares. O sistema SAF reduziu os valores médios de bactérias de $1,96 \times 10^7$ para $1,34 \times 10^4$ células (99,9% de taxa de redução); enquanto os instrumentos manuais promoveram redução de $5,67 \times 10^7$ para $1,12 \times 10^5$ células (95,1% de taxa de redução). O sistema SAF também resultou em um menor número de reações de qPCR positivas (45,5%) quando comparado ao grupo do preparo manual (95,5%).

Os instrumentos de NiTi automatizados podem ser acionados por sistemas rotatórios, contendo múltiplos instrumentos, ou por sistemas reciprocantes, de lima única. Estudos recentes na literatura, utilizando métodos moleculares quantitativos baseados em rDNA (qPCR), não encontraram diferença na redução bacteriana promovida pelos diferentes sistemas durante o PQC (Rodrigues et al., 2015; Neves et al., 2016). Enquanto Rodrigues et al. (2015) compararam o sistema SAF a um sistema rotatório - TFA (*Twisted File Adaptive*), Neves et al. (2016) compararam um sistema de lima única (*Reciproc*) a um sistema de rotação contínua com múltiplos instrumentos (*BioRace*). Todos os sistemas apresentaram-se altamente eficazes na redução bacteriana, com os valores médios da carga bacteriana inicial reduzindo de uma ordem de grandeza de 10^5 para 10^2 nas coletas após o PQC dos canais radiculares. Neves et al. (2016) chamaram atenção para o fato que, independente do sistema utilizado, aproximadamente metade dos dentes ainda apresentavam bactérias detectáveis.

Levando em consideração as dimensões do preparo, Rodrigues et al. (2017) avaliaram a redução bacteriana após o preparo utilizando o sistema TFA em dentes tratados endodonticamente. Amostras microbiológicas foram coletadas antes e após o uso do primeiro e do terceiro instrumento do sistema. O aumento no tamanho do preparo apical melhorou de maneira significativa a desinfecção do canal radicular. Além disso, preparos apicais mais amplos favoreceram a ação antimicrobiana da solução irrigadora.

Embora a ação mecânica dos instrumentos seja suficiente para remover os biofilmes e promover uma grande redução microbiana no interior do sistema de canais radiculares, substâncias químicas utilizadas durante o preparo possuem propriedades químicas e físicas que potencializam a ação dos instrumentos. A ação antimicrobiana dos irrigantes endodônticos é capaz de promover uma redução adicional da microbiota residente em canais radiculares infectados. Além disso, as manobras de irrigação e aspiração contribuem para a remoção de bactérias e seus subprodutos da luz dos canais radiculares.

Entre as substâncias químicas auxiliares do preparo, o hipoclorito de sódio (NaOCl) destaca-se como sendo a mais utilizada em Endodontia (Zehnder, 2006). Isso porque, além de excelente atividade antimicrobiana, possui a capacidade de dissolver matéria orgânica, auxiliando a eliminação de restos necróticos e de micro-

organismos durante o PQC (Zehnder et al., 2002). Diversos estudos clínicos, utilizando métodos moleculares quantitativos, avaliaram a atividade antimicrobiana do NaOCl usado como irrigante durante o PQC (Sakamoto et al., 2007; Rôças et al., 2010; Rôças et al., 2011a; Paiva et al., 2012; Paiva et al., 2013a; Paiva et al., 2013b; Rôças et al., 2013; Neves et al., 2014; Rôças et al., 2014; Rodrigues et al., 2015; Zandi et al., 2016; Neves et al., 2016; Rodrigues et al., 2017; Nakamura et al., 2018; Prado, 2018; Nardelo, 2018; Romero Cazares, 2018). A maioria destes estudos demonstrou uma prevalência de 50 a 70% dos casos apresentando reações qPCR positivas após o PQC com NaOCl. Os níveis de bactérias detectáveis nos canais radiculares após o PQC com NaOCl variou de uma ordem de grandeza de 10^5 - 10^6 para 10^3 - 10^4 cópias. A concentração de NaOCl mais comumente utilizada nos trabalhos revisados foi a de 2,5%. Entretanto, nenhum estudo clínico comparou a eficácia antimicrobiana de diferentes concentrações de NaOCl utilizando métodos moleculares.

A clorexidina (CHX) têm sido estudada como uma substância alternativa para a fase de PQC, por possuir excelente capacidade antimicrobiana frente a uma enorme gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de ser menos citotóxica aos tecidos perirradiculares (Yesilsoy et al., 1995). Outra vantagem da clorexidina em relação ao NaOCl é a de possuir substantividade, fazendo com que seja liberada mais lentamente, prolongando a sua ação no interior dos canais radiculares (Rosenthal et al., 2004). Entretanto, como desvantagem não apresenta poder de dissolução de matéria orgânica, o que pode dificultar a sua ação direta sobre os micro-organismos. Estudos comparando CHX e NaOCl revelaram que as duas substâncias foram altamente eficazes em reduzir o número de canais infectados para aproximadamente 50% - 60% após o PQC, com níveis bacterianos na ordem de 10^5 - 10^3 , quando analisados por métodos moleculares baseados em rDNA (Rôças et al., 2011b; Provenzano et al., 2015; Rôças et al., 2016; Zandi et al., 2016). Entretanto, Vianna et al. (2006) relataram que o NaOCl 2,5% apresentou maior capacidade de matar e remover células bacterianas do interior dos canais radiculares quando comparado à clorexidina 2 %, com a carga bacteriana inicial reduzindo da ordem de 10^6 para 10^2 após o PQC com NaOCl 2,5%, e para 10^4 no grupo da clorexidina.

Alguns estudos utilizaram métodos moleculares baseados em rRNA para verificar a viabilidade de bactérias persistentes após o PQC. Roças e Siqueira (2010) encontraram bactérias viáveis em 100% das amostras iniciais e em 60% dos casos após o PQC. Pinheiro et al. (2015) calcularam a razão rRNA/rDNA para análise do metabolismo bacteriano de *E. faecalis*, que permaneceu metabolicamente ativo nas infecções persistentes após o PQC de canais radiculares de dentes tratados endodonticamente com periodontite apical assintomática. Nardello (2018) observou redução significativa da atividade metabólica de bactérias após o PQC, ao passo que Romero Cazares (2018) relatou que 80% a 90% dos casos permaneceram com bactérias metabolicamente ativas após o preparo.

2.2 Otimização da desinfecção pós-preparo: manobras de efeito imediato e mediato

Apesar da significativa redução microbiana conseguida após o PQC, o número de canais infectados e níveis bacterianos ainda permanecem relativamente altos após esta etapa da terapia endodôntica, indicando a necessidade de complementação do preparo visando a máxima redução ainda na primeira sessão de tratamento. Outrossim, com o advento dos novos sistemas de preparo automatizado, principalmente os de lima única, o tempo clínico necessário para que se realize a modelagem dos condutos diminuiu drasticamente, reduzindo o tempo de ação das substâncias químicas auxiliares durante o PQC. A partir destas premissas, passou-se a dar maior importância aos protocolos de desinfecção complementar, realizados imediatamente após o preparo.

Alguns estudos clínicos utilizaram métodos moleculares baseados em rDNA para avaliar a quantificação bacteriana após a realização de procedimentos complementares de desinfecção ao final da primeira consulta, em análises intragrupo. Paiva et al., 2012 compararam a eficácia antimicrobiana da ativação ultrassônica de NaOCl 1% e da irrigação convencional com CHX 2%, e concluíram que os dois protocolos propostos contribuíram para a redução de culturas positivas e resultados de PCR, porém sem diferenças significativas em relação ao PQC ou nas

comparações entre os grupos. Mais além, Paiva et al. (2013a), e Rodrigues et al. (2015), revelaram que a ativação ultrassônica do NaOCl 2,5% mostrou-se ineficaz, não influenciando significativamente na melhoria da desinfecção dos canais radiculares após o PQC. Por outro lado, Nakamura et al. (2018) realizaram um estudo clínico randomizado com o objetivo de avaliar a efetividade da ativação ultrassônica frente à irrigação convencional realizada com seringas e agulhas na redução de bactérias do interior do sistema de canais radiculares. Após os protocolos complementares de desinfecção, 68% dos casos continuaram positivos no grupo da irrigação ultrassônica, e 72% dos casos positivos após a irrigação convencional. Nas análises intragrupo, relataram que ambos os protocolos reduziram os níveis bacterianos de maneira significativa em relação ao PQC. Na comparação entre os grupos, os autores relataram diferenças significativas com a ativação ultrassônica promovendo maior redução do número total de células bacterianas no interior dos canais radiculares em dentes portadores de periodontite apical.

Da mesma maneira que o PQC não é suficiente para eliminar as bactérias e seus subprodutos do sistema de canais radiculares, os procedimentos complementares de desinfecção, apesar de contribuírem para uma redução adicional dos níveis microbianos, ainda permitem a detecção de bactérias viáveis no interior dos condutos ao final da primeira consulta. Por este motivo, alguns autores recomendam o uso da medicação intracanal entre sessões para complementar os efeitos antibacterianos do PQC em dentes com polpa necrótica e periodontite apical.

O uso da medicação intracanal entre sessões de tratamento ainda é um dos assuntos mais controversos na literatura endodôntica (Bergenholtz; Spangberg, 2004), e a mais amplamente estudada e comumente utilizada é a pasta de hidróxido de cálcio.

Levando em consideração estudos moleculares que avaliaram a eficácia da medicação intracanal entre sessões na redução microbiana de canais radiculares com polpa necrótica e periodontite apical, os resultados mostram-se bastante divergentes. Isso pode estar relacionado ao fato de que os protocolos utilizados em cada um dos estudos diferem em relação aos veículos utilizados e ao tempo em que a medicação permanece no interior dos canais entre as sessões de tratamento.

Paiva et al. (2013b) utilizaram pasta de Ca(OH)_2 associado à CHX 2% por 7 dias, e encontraram redução significativa dos níveis bacterianos após a medicação intracanal ($9,13 \times 10^3$) quando comparadas às amostras coletadas após a irrigação final ($3,14 \times 10^4$). Os autores concluíram que a irrigação final com CHX 2% seguida da medicação intracanal à base de Ca(OH)_2 foram capazes de promover uma redução bacteriana adicional quando comparada ao PQC. Da mesma forma, Provenzano et al. (2015) relataram que após o uso de medicação intracanal com pasta de Ca(OH)_2 , em veículo inerte por 7 dias, houve redução significativa do número de casos com reações qPCR positivas, entretanto aproximadamente 50% dos casos permaneceram contaminados.

Sakamoto et al. (2007) utilizaram pasta de hidróxido de cálcio veiculada com paramonoclorofenol canforado e glicerina durante 7 dias, e observaram que a medicação intracanal não promoveu redução significativa de bactérias quando comparada ao preparo químico-cirúrgico. Da mesma maneira, Rôças e Siqueira (2011a) compararam o uso do Ca(OH)_2 pelo mesmo período, utilizando um veículo inerte (glicerina) e um veículo com ação antimicrobiana (paramonoclorofenol canforado com glicerina), e não encontraram diferenças significativas entre a ação antimicrobiana do PQC e da medicação intracanal em ambos os grupos.

Blome et al. (2008), Nakamura et al. (2018), Prado (2018) e Nardello (2018), utilizaram medicação intracanal com Ca(OH)_2 em veículo inerte durante 14 dias e obtiveram resultados semelhantes em relação à quantificação dos níveis de bactérias totais encontrados, não encontrando diferenças significativas tanto quando comparados os resultados à fase de preparo dos canais radiculares. Da mesma maneira, Teles et al. (2014) compararam a pasta de Ca(OH)_2 utilizada nas mesmas condições frente a um gel de clorexidina 2%, e concluíram que a medicação intracanal não contribuiu de maneira eficaz na redução bacteriana. Contudo, a utilização de Ca(OH)_2 durante os 14 dias apresentou-se significativamente melhor que a CHX, particularmente em casos com periodontite apical. Por outro lado, Romero Cazares (2018) utilizando veículo inerte pelo mesmo período de 14 dias, encontrou uma redução significativa no número de casos com reações qPCR positivas no grupo em que realizou a ativação ultrassônica da medicação no momento da inserção da pasta de Ca(OH)_2 no interior dos condutos.

Zandi et al. (2018) apesar de encontrarem uma prevalência de casos qPCR positivos menor após o uso de medicação intracanal com Ca(OH)_2 , observaram um aumento na carga bacteriana total quando comparada ao momento pós-PQC. Como a medicação intracanal com hidróxido de cálcio resultou em um aumento da carga bacteriana nos casos em que a presença de bactérias foi detectada, concluíram que a eficácia do tratamento antimicrobiano pode ser influenciada pela carga bacteriana inicial encontrada no interior dos canais radiculares.

Dois estudos mais recentes utilizaram métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA, o que permitiu além de quantificar os níveis bacterianos, observar a viabilidade celular após o uso do Ca(OH)_2 entre sessões. A razão rRNA/rDNA possibilitou determinar a atividade metabólica de bactérias persistentes. Nardello, 2018, observou que após o uso da medicação intracanal o metabolismo bacteriano aumentou, enquanto Romero Cazares (2018) concluiu que a ativação da pasta de hidróxido de cálcio foi mais efetiva na redução do metabolismo bacteriano do que a pasta não ativada.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

- Avaliar, por métodos moleculares baseados em rDNA e rRNA, a eficácia antimicrobiana de procedimentos complementares de primeira e de segunda sessão, realizados após o preparo químico-cirúrgico em dentes com periodontite apical.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar, por métodos moleculares baseados em rDNA, a redução bacteriana após PQC e procedimentos complementares imediatos realizados na primeira sessão do tratamento endodôntico; e após a medicação intracanal com hidróxido de cálcio por 14 dias, seguida do reparo dos canais radiculares previamente à obturação.
- Avaliar, por métodos moleculares baseados em rRNA, o metabolismo das bactérias persistentes após cada etapa do tratamento endodôntico.

3.3 Hipótese nula

- Os procedimentos complementares avaliados na segunda sessão do tratamento endodôntico não promovem redução dos níveis de rDNA e rRNA bacteriano além dos níveis observados após os procedimentos da primeira sessão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada nesta pesquisa para procedimentos clínicos e coletas microbiológicas baseou-se em estudos previamente publicados. Todos os procedimentos foram reproduzidos de maneira criteriosa, seguindo rigorosos protocolos de assepsia e antisepsia a fim de se garantir a confiabilidade dos resultados.

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), e foi registrado no banco de dados de ensaios clínicos clinicaltrials.gov (ANEXO B).

A seleção de pacientes foi iniciada em agosto de 2017 e os procedimentos clínicos realizados entre setembro de 2017 e agosto de 2018 na Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) por cada um dos pacientes participantes da pesquisa (APÊNDICE A). Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Microbiologia Molecular do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

4.2 Recrutamento de pacientes elegíveis

Para a execução deste estudo, a seleção da amostra foi realizada utilizando-se critérios de acordo com Nakamura (2014). Foram selecionados 30 pacientes com idade entre 18 e 65 anos portadores de dentes permanentes unirradiculares com

necrose pulpar e periodontite apical assintomática, verificada através de exame radiográfico que evidenciasse rarefação óssea periapical e que não possuíssem tratamento endodôntico prévio. As radiografias foram realizadas com auxílio de posicionador, a fim de padronizar as tomadas radiográficas permitindo o controle pós terapia endodôntica.

Não puderam participar desta pesquisa pacientes que apresentavam alterações sistêmicas relevantes, como doenças degenerativas crônicas, processos infecciosos, doenças autoimunes ou imunodeficiências induzidas ou adquiridas, além de pacientes que porventura tivessem feito uso de antibióticos nos 90 dias anteriores ao início da pesquisa por quaisquer motivos.

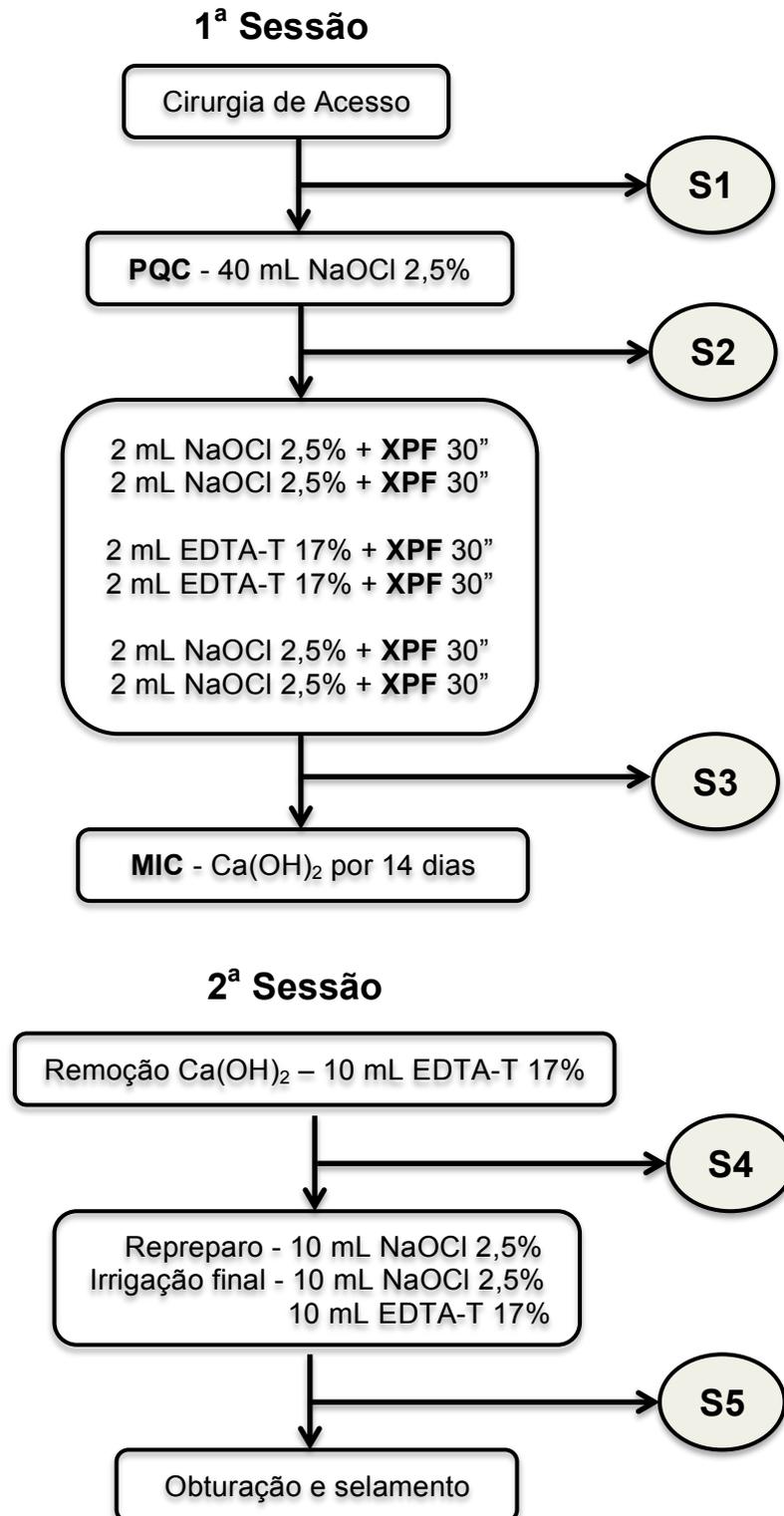
Foram excluídos da amostra dentes que apresentavam perda de tecido dentário impossibilitando o isolamento absoluto, bolsa periodontal superior a 4 mm, raízes com comprimento inferior a 15 mm ou superior a 25 mm, curvaturas radiculares superiores a 25°, apicigênese incompleta, ou alterações na luz do canal radicular visíveis radiograficamente, como calcificações ou reabsorções.

4.3 FASE I - Estudo piloto para validação de um protocolo clínico de utilização do instrumento XPF

A primeira etapa de atendimentos clínicos da pesquisa realizou-se de setembro a novembro de 2017 executada por um único operador, e os resultados encontrados serviram para direcionar o protocolo da etapa seguinte do trabalho.

O fluxograma do protocolo de atendimento clínico e coletas microbiológicas da primeira fase da pesquisa está representado na figura 4.1.

Figura 4.1 – Fluxograma dos procedimentos clínicos e coletas microbiológicas (FASE I)



4.3.1 Preparo dos canais radiculares e coletas microbiológicas

4.3.1.1 Procedimentos clínicos iniciais e desinfecção do campo (C1)

Iniciando a primeira sessão de atendimento clínico, os pacientes receberam 10 mL de antisséptico bucal 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 (Rôças et al., 2004).

Com o auxílio de brocas 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 e a cirurgia de acesso 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 excluídos da pesquisa.

4.3.1.2 Odontometria eletrônica e primeira coleta (S1)

Dando prosseguimento aos procedimentos clínicos, o conteúdo da câmara pulpar foi aspirado e os canais radiculares preenchidos com solução salina esterilizada e aprotogênica. Com auxílio de um localizador foraminal Endex Plus (Osada Inc., Los Angeles, CA, USA) e um instrumento endodôntico tipo K #10 (Dentsply Maillefer, Baillagues, Suíça), a odontometria foi realizada e o comprimento real de trabalho (CRT) estabelecido a 1,0 mm aquém do forame apical. Em seguida, um instrumento tipo H #15 foi pressionado contra as paredes do canal para produzir raspas de dentina e suspender bactérias na solução.

Quatro cones de papel número 15 esterilizados foram utilizados para coletar o conteúdo inicial de bactérias de cada canal (S1). Os cones foram introduzidos um a um até o CRT sendo mantidos em posição até ficarem embebidos na solução, e então, juntamente com a parte ativa do instrumento utilizado para criar as raspas de dentina, foram depositados em microtubos esterilizados contendo 300 µL de solução RNA later (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), para posterior análise de bactérias.

4.3.1.3 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 se determinar o diâmetro apical inicial e a consequente escolha dos instrumentos que seriam utilizados 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), 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, foi utilizado no preparo o instrumento Reciproc R40; se por acaso o travamento ocorresse com os instrumentos #30, #35 ou #40, o instrumento Reciproc R50 foi o escolhido para a realização do preparo do canal.

Com o auxílio de um motor WDW-silver (VDW GmbH, Munique, Alemanha), o instrumento Reciproc selecionado foi levado ao interior do conduto em movimento recíprocante, seguindo sequências de três ciclos de penetração/retrocesso, de maneira a avançar em direção apical a cada ciclo. Ao término de cada sequência, o instrumento foi limpo com gaze esterilizada para remoção dos debris e o canal irrigado com NaOCl 2,5%, atingindo-se o CRT apenas no último ciclo de penetração.

Durante o preparo foram utilizados 40 mL de NaOCl a 2,5% por canal, sendo 10 mL antes de cada ciclo de instrumentação e mais 10 mL ao final do preparo, com as pontas irrigadoras posicionadas a aproximadamente 1 mm aquém do CRT, utilizadas em movimentos de vai e vem com 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, ao passo que 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) conforme descrito anteriormente.

4.3.1.4 Protocolo final de irrigação e terceira coleta (S3)

Durante esta etapa do tratamento, foi utilizado um novo instrumento XP-endo Finisher para cada um dos dentes estudados, para que não ocorressem mudanças nas propriedades do instrumento durante os processos de limpeza e esterilização.

Imediatamente após realizada a segunda coleta (S2), realizou-se o protocolo de irrigação final realizado com 4 mL de NaOCl 2,5%, seguidos de 4 mL de EDTA-T 17%, e finalmente mais 4 mL de NaOCl 2,5%. A cada 2 mL de solução irrigadora utilizada, um instrumento complementar de preparo (XP-endo Finisher) com ponta #25, conicidade .00 e sem ação de corte, foi acionado por motor VDW-silver (VDW GmbH) em movimento de rotação contínua a 1000 rpm e 1 Ncm de torque para ativação das substâncias. O instrumento XPF foi utilizado até o comprimento de trabalho (CRT) conforme orientação do fabricante, realizando movimentos lentos de penetração e retrocesso com amplitude de 7 a 8 mm de extensão durante 30 segundos. Desta maneira, foram realizados 6 ciclos de ativação das substâncias irrigadoras por 30 segundos, iniciando com irrigação de 2mL de NaOCl 2,5% mais ativação por 30 segundos, renovação de mais 2mL e nova ativação por 30 segundos, e em seguida da mesma maneira para o EDTA-T 17% e novamente para o NaOCl 2,5%, totalizando 3 minutos de ativação por canal radicular. Os canais foram então aspirados com pontas endodônticas Capillary Tips 0,014” e 0,019”, irrigados com 5 mL de tiosulfato de sódio 5%, novamente aspirados, secos, e preenchidos com soro fisiológico para que a coleta S3 fosse realizada conforme descrito anteriormente.

Após realizada a coleta, os canais foram aspirados e secos com pontas de papel absorvente, e foram então preenchidos com a pasta de hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 Ultracal XS (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA), e verificado o completo preenchimento através de radiografia periapical. Por fim, as cavidades de acesso foram seladas com uma camada de 2 mm de espessura de obturador provisório endodôntico (Dentalvile, Joinville, SC, Brasil), cobertos com uma camada de cimento de ionômero de vidro Riva Self Cure (SDI Limited, Victoria, Austrália).

4.3.1.5 Segunda sessão de tratamento, quarta e quinta coletas (S4;S5)

Os pacientes participantes da pesquisa 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.

Após a remoção do selamento provisório e nova coleta para verificação da desinfecção do campo (C2), a medicação intracanal foi removida do interior dos canais radiculares utilizando-se 10 mL de EDTA-T 17% por canal e leve agitação com limas manuais tipo K número 15. Em seguida, uma nova coleta (S4) foi realizada seguindo os mesmos procedimentos realizados nas coletas anteriores.

No passo seguinte, os canais foram irrigados com 10 mL de NaOCl 2,5% e reinstrumentados com o mesmo instrumento Reciproc utilizado na primeira sessão de tratamento. Em seguida, foi realizada irrigação final com 10 mL de NaOCl 2,5%, seguido de 10 mL de EDTA-T 17%, e então realizou-se a última coleta (S5) utilizando-se os mesmos procedimentos descritos anteriormente.

Após a secagem dos condutos através de aspiração e a utilização de cones de papel absorvente, os canais foram obturados por meio da técnica de condensação lateral de guta-percha e cimento AH Plus (Dentsply Maillefer), e os acessos coronários devidamente selados com restaurações de resina composta (Z350, 3M Corporation, St. Paul, MN, EUA).

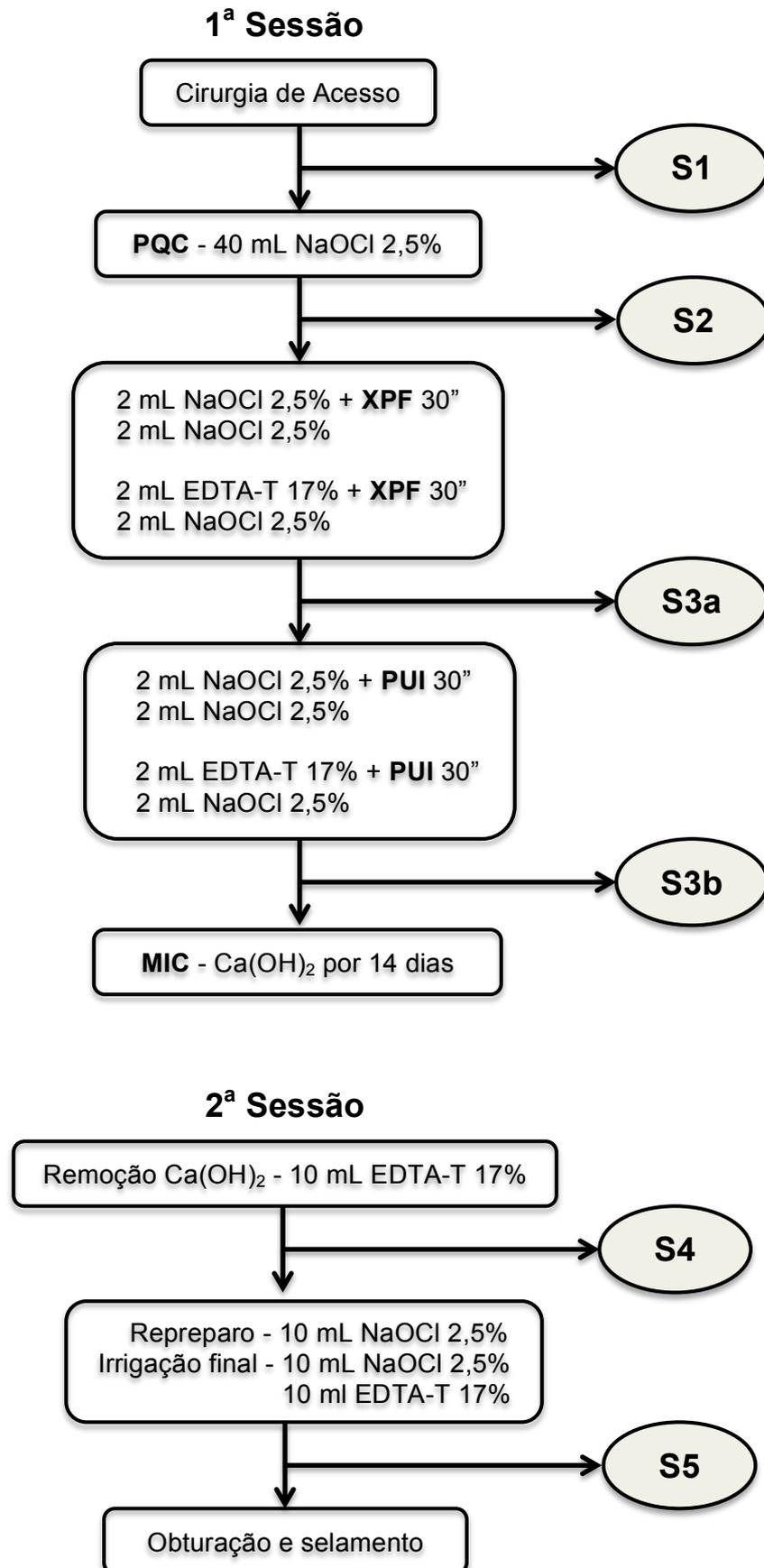
Ao final do tratamento endodôntico, foi realizada uma nova radiografia na técnica do paralelismo novamente com auxílio de um posicionador.

4.4 FASE II - Pesquisa clínica com protocolo antimicrobiano definido após estudo piloto

Durante esta etapa da pesquisa, os procedimentos clínicos de anestesia, isolamento absoluto, desinfecção do campo operatório (C1 e C2), cirurgia de acesso, odontometria, preparo dos canais radiculares, medicação intracanal entre sessões, reparo, obturação e selamento foram realizados conforme descrito nos itens anteriores. Da mesma maneira, as coletas microbiológicas S1, S2, S4 e S5, seguiram os mesmos passos realizados durante a execução do estudo piloto.

O protocolo complementar de desinfecção da segunda fase clínica da pesquisa foi dividido em dois passos distintos e está descrito a seguir. O fluxograma de atendimento clínico e coletas microbiológicas está representado na figura 4.2.

Figura 4.2 – Fluxograma dos procedimentos clínicos e coletas microbiológicas (FASE II)



4.4.1 Protocolo final de irrigação em duas etapas, e coletas S3a e S3b

O primeiro ciclo de desinfecção foi realizado com ativação das substâncias químicas por intermédio do instrumento XP-endo Finisher (Brasseler USA®, Savannah, Georgia). O instrumento foi acionado por motor VDW-silver (VDW GmbH) ajustado em movimento de rotação contínua a 1000 rpm e 1 Ncm de torque, e utilizado até o CRT com movimentos lentos de penetração e retrocesso e amplitude de 7 a 8 mm de extensão.

Imediatamente após realizada a segunda coleta (S2), foi realizada irrigação com 2 mL de NaOCl 2,5% seguida de ativação com um instrumento XP-endo Finisher durante 30 segundos, e então nova irrigação com 2 mL de NaOCl 2,5% para remover o conteúdo do canal. Em seguida, o procedimento de ativação com o XPF por 30 segundos foi repetido após irrigação com 2 mL de EDTA-T 17%, seguido de nova irrigação com 2 mL de NaOCl 2,5%. Os canais foram então aspirados com pontas endodônticas Capillary Tips 0,014” e 0,019”, irrigados com 5 mL de tiosulfato de sódio 5%, novamente aspirados, secos, e preenchidos com soro fisiológico para que a coleta S3a fosse realizada conforme os procedimentos descritos na fase anterior.

Em seguida, um segundo ciclo de desinfecção foi realizado com a ativação ultrassônica das substâncias, com auxílio de um aparelho de ultrassom (Piezo Light D5 Led, Olsen, SC, Brasil) ajustado em 30% de potência, utilizando um inserto liso Irrisonic com 0,2 mm de diâmetro e conicidade .01 (Helse, Ribeirão Preto, SP, Brasil), posicionado 2 mm aquém do CRT conforme orientação do fabricante e ativado por 30 segundos, com o cuidado de não tocar as paredes do canal.

Após realizada a coleta S3a, os canais foram novamente irrigados com 2 mL de NaOCl 2,5%, ativação ultrassônica por 30 segundos e irrigação com 2 mL de NaOCl 2,5%; Da mesma maneira, realizou-se irrigação com 2 mL de EDTA-T 17%, ativação ultrassônica por 30 segundos e nova irrigação com 2 mL de NaOCl 2,5%. Os canais foram então aspirados, irrigados com 5 mL de tiosulfato de sódio 5%, novamente aspirados, secos, e preenchidos com soro fisiológico para que a coleta S3b fosse realizada seguindo os mesmos procedimentos das etapas anteriores.

No total, durante os dois protocolos de desinfecção pós PQC, foram utilizados 12 mL de NaOCl 2,5% e 4 mL de EDTA-T 17% de irrigação final, com um tempo total de ativação de 1 min para cada solução irrigadora (30s com *XP-endo Finisher* e 30s com uso do aparelho de ultrassom).

4.5. Análise quantitativa de bactérias

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

4.5.1 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 FOUSP, 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 °C até o momento das análises.

4.5.2 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*, conforme descrito por Shelburne et al. (2000). 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 H₂O.

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.

4.6 Análise estatística

O cálculo amostral do estudo clínico foi realizado com base nas médias e desvio padrão dos níveis de rDNA do estudo piloto utilizando o software BioEstat 5.3 (Instituto de desenvolvimento sustentável Mamirauá – Tefé, Amazonas, Brasil). O número de amostras foi estimado em 17 pacientes, utilizando o teste *t* para amostras pareadas (análise unilateral, com nível de significância de 5% e poder do teste de 80%) para detectar diferença nos níveis bacterianos após os procedimentos realizados na segunda sessão do tratamento (S5) em relação aos procedimentos realizados na primeira sessão (S3). Prevendo uma possível perda, uma amostra final de 20 pacientes foi estimada para a realização do ensaio clínico final.

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, S3a, S3b, S4 e S5 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. Conforme descrito por Campbell et al. (2011), as bactérias foram consideradas metabolicamente ativas se a razão rRNA/rDNA fosse maior ou igual a 1.

5 RESULTADOS

Nesta seção serão descritos os resultados do estudo piloto e os resultados finais do ensaio clínico utilizando um protocolo antimicrobiano definido.

5.1 FASE I - Estudo piloto para validação de um protocolo clínico de utilização do instrumento XPF

Os 10 primeiros pacientes que obedeceram aos critérios de seleção foram tratados com um protocolo inicial utilizando os seguintes procedimentos complementares após o PQC (S2): a ativação da solução irrigadora com o instrumento XPF (S3) imediatamente após o PQC, seguido da medicação intracanal entre sessões (S4) e o reparo dos canais radiculares antes da obturação (S5). Os dados das reações de qPCR baseada em rDNA estão descritos na tabela 5.1. Houve uma redução significativa entre as amostras S1-S2, S1-S3, S1-S4 e S1-S5 ($p < 0,05$). Porém, não houve diferença significativa dos níveis bacterianos entre S2-S3, S2-S4 e S2-S5. Da mesma forma, não houve redução significativa dos níveis de rDNA entre S3 e S4. Por outro lado, o efeito cumulativo da medicação intracanal e do reparo dos canais radiculares (S5) na segunda sessão do tratamento promoveu uma redução significativa dos níveis de rDNA bacteriano em relação às amostras S3 ($p = 0,0216$).

No estudo piloto, foi observado um leve aumento do nível de bactérias nas amostras S3 (mediana: $1,55 \times 10^3$, intervalo: 0 - $5,64 \times 10^4$) quando comparadas às amostras S2 (mediana: $9,75 \times 10^2$, intervalo: 0 - $9,40 \times 10^3$), sugerindo o deslocamento de bactérias das paredes dentinárias para a luz do canal após o uso do XPF. Portanto, uma etapa de irrigação final com PUI foi adicionada ao protocolo do instrumento XPF com o objetivo de melhorar a limpeza dos canais radiculares no final da primeira sessão do tratamento.

Tabela 5.1 - Valores de mediana (mínimo - máximo) dos níveis de rDNA bacteriano nos canais radiculares após os seguintes procedimentos: cirurgia de acesso (S1), preparo químico cirúrgico (S2), XPF (S3), medicação intracanal entre sessões (S4) e reparo dos canais radiculares (S5)

	rDNA				
	S1	S2	S3	S4	S5
Mediana	$1,49 \times 10^5$	$9,75 \times 10^2$	$1,55 \times 10^3$	0	0
Intervalo	$(3,42 \times 10^4 - 6,61 \times 10^5)$	$(0 - 9,40 \times 10^3)$	$(0 - 5,64 \times 10^4)$	$(0 - 5,81 \times 10^5)$	$(0 - 1,16 \times 10^4)$
N	10	10	10	10	10
n (%)	10 (100%)	5 (50%)	5 (50%)	3 (30%)	2 (20%)

N = número de dentes incluídos no estudo.

n = número de reações qPCR positivas

Fonte: O autor

5.2 FASE II - Pesquisa clínica com protocolo antimicrobiano definido após estudo piloto

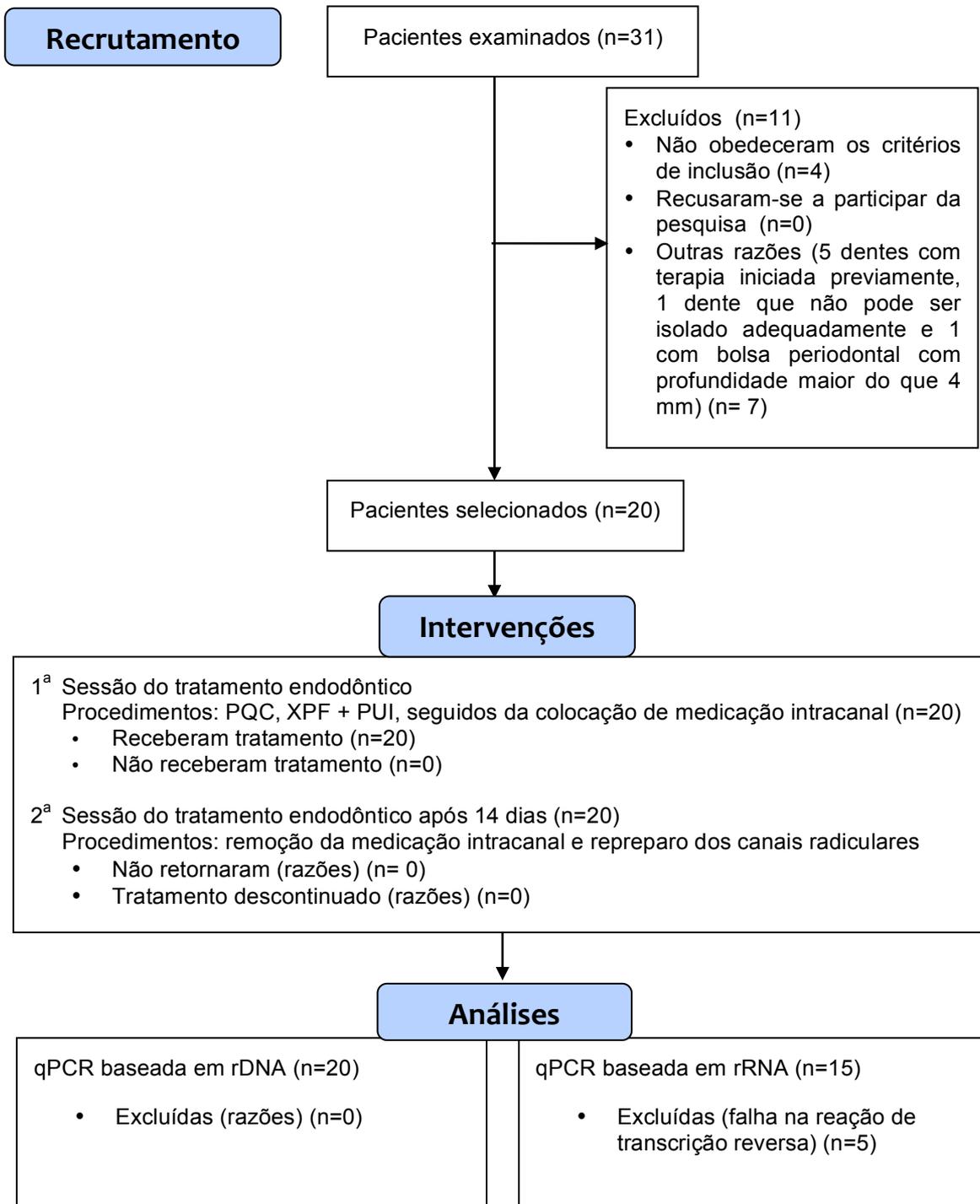
Seguindo os mesmos critérios de seleção, 20 novos pacientes foram selecionados para a realização do ensaio clínico com o protocolo de desinfecção complementar modificado (XPF associado à PUI). Um fluxograma ilustrando a seleção dos pacientes está representado na figura 5.1. As características clínicas dos 20 dentes incluídos nas análises microbiológicas estão descritas na tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Distribuição de 20 casos segundo idade, gênero, localização do dente, grupo dental, diâmetro apical inicial e final

Características clínicas		N	%
Idade	20 - 40	8	40
	> 40	12	60
Gênero	Masculino	9	45
	Feminino	11	55
Localização do dente	Maxila	12	60
	Mandíbula	8	40
Grupo Dental	Anterior	11	55
	Pré-molar	9	45
Diâmetro apical inicial	0,20 / 0,25 mm	12	60
	0,30 / 0,40 mm	8	40
Diâmetro apical final	# R40 (0,40 mm)	12	60
	# R50 (0,50 mm)	8	40

Fonte: O autor

Figura 5.1 - Fluxograma do ensaio clínico



5.2.1 Análise por qPCR baseada em rDNA: quantificação bacteriana

Os níveis de bactérias e o número de canais radiculares com reações de qPCR positivas para rDNA estão descritos na tabela 5.3. Bactérias foram detectadas em 20 amostras iniciais (S1). O número de canais com reações qPCR positivas decresceu de maneira significativa após o PQC (60%; $p = 0,0059$). Após a utilização do XPF (S3a), PUI (S3b), medicação intracanal entre sessões (S4) e reprepáro (S5) não houve redução significativa do número de canais infectados em relação às amostras S2. Ao término do tratamento, apenas 30% (6/20) das amostras S5 apresentaram níveis de rDNA acima do limite de detecção da reação de qPCR, com diferença significativa em relação às amostras S4 ($p = 0,0207$).

O número inicial de cópias rDNA em S1 reduziu significativamente em S2 ($p < 0,0001$). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de rDNA entre as amostras pós-prepáro (S2) e as amostras após os procedimentos complementares de desinfecção imediatos (S3a e S3b) ou mediatos (S4). Por outro lado, o reprepáro dos canais radiculares (S5), na segunda sessão do tratamento, promoveu uma drástica redução bacteriana, com diferença significativa em relação às amostras S2 ($p = 0,0247$), S3a ($p = 0,0346$), S3b ($p = 0,0481$) e S4 ($p = 0,0031$).

Tabela 5.3 - Valores de mediana (mínimo - máximo) dos níveis de rDNA bacteriano nos canais radiculares após os seguintes procedimentos: cirurgia de acesso (S1), prepáro químico-cirúrgico (S2), XPF (S3a), PUI (S3b), medicação intracanal entre sessões (S4) e reprepáro dos canais radiculares (S5)

	rDNA					
	S1	S2	S3a	S3b	S4	S5
Mediana	$1,79 \times 10^5$	$7,58 \times 10^3$	$6,40 \times 10^3$	$3,82 \times 10^3$	$1,56 \times 10^4$	0
Intervalo	$(6,21 \times 10^3 - 2,52 \times 10^6)$	$(0 - 8,35 \times 10^5)$	$(0 - 7,37 \times 10^5)$	$(0 - 1,84 \times 10^5)$	$(0 - 2,09 \times 10^5)$	$(0 - 9,62 \times 10^4)$
N	20	20	20	20	20	20
n (%)	20 (100%)	12 (60%)	11 (55%)	10 (50%)	14 (70%)	6 (30%)

N = número de dentes incluídos no estudo.

n = número de reações qPCR +

Fonte: O autor

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

Das 20 amostras iniciais com resultados positivos para a análise de rDNA, 5 foram excluídas da análise de rRNA por falha na reação de transcrição reversa (RT) dessas amostras. Os níveis de rRNA das amostras e o número de canais com reações qPCR positivas para rRNA estão descritos na tabela 5.4. Com exceção de 5 amostras dos canais radiculares (2 S3a, 1 S3b e 2 S5), rRNA permaneceu em níveis detectáveis em todas as amostras analisadas.

A redução dos níveis de rRNA bacteriano nas diferentes etapas do tratamento foi similar à observada na análise dos níveis de rDNA, descrita no item anterior. O total de rRNA reduziu significativamente de S1 para S2 ($p = 0,0004$). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de rRNA encontrados nas amostras coletadas após os procedimentos complementares de desinfecção (S3a, S3b e S4) quando comparadas às amostras S2. Por outro lado, após o reparo (S5), os níveis de rRNA reduziram de maneira significativa quando comparado aos das amostras S2 ($p = 0,009$), S3b ($p = 0,0186$) e S4 ($p = 0,0012$).

Tabela 5.4 - Valores de mediana (mínimo - máximo) dos níveis de rRNA bacteriano nos canais radiculares após os seguintes procedimentos: cirurgia de acesso (S1), preparo químico-cirúrgico (S2), XPF (S3a), PUI (S3b), medicação intracanal entre sessões (S4) e reparo dos canais radiculares (S5)

	rRNA					
	S1	S2	S3a	S3b	S4	S5
Mediana	$4,08 \times 10^5$	$8,75 \times 10^4$	$4,40 \times 10^4$	$6,33 \times 10^4$	$8,66 \times 10^4$	$1,29 \times 10^4$
Intervalo	$(6,27 \times 10^4 - 8,75 \times 10^6)$	$(7,1 \times 10^3 - 6,8 \times 10^5)$	$(0 - 5,84 \times 10^5)$	$(0 - 3,66 \times 10^5)$	$(6,63 \times 10^3 - 4,41 \times 10^5)$	$(0 - 1,85 \times 10^5)$
N	15	15	15	15	15	15
n (%)	15 (100%)	15 (100%)	13 (86,7%)	14 (93,3%)	15 (100%)	13 (86,7%)

N = número de dentes incluídos no estudo.

n = número de reações qPCR positivas

Fonte: O autor

A comparação entre os métodos baseados em rRNA e rDNA revelou que estes foram concordantes quanto à detecção de bactérias na maioria das amostras S1, S2, S3a, S3b e S4 (Tabela 5.5). Por outro lado, o método baseado em rRNA foi capaz de detectar bactérias em canais com reações qPCR negativas para rDNA, ou seja, amostras com níveis de rDNA abaixo do limite de detecção da reação (10^2 cópias de rDNA).

Tabela 5.5 - Taxa de detecção dos métodos baseados em rDNA e rRNA nos canais radiculares após os seguintes procedimentos: cirurgia de acesso (S1), preparo químico-cirúrgico (S2), XPF (S3a), PUI (S3b), medicação intracanal entre sessões (S4) e reparo dos canais radiculares (S5)

Amostras		Taxas de detecção		Valor de <i>p</i>
		rDNA	rRNA	
S1	rRNA	+	15	1.00
		-	0	
S2	rRNA	+	10	0.06
		-	0	
S3a	rRNA	+	9	0.12
		-	0	
S3b	rRNA	+	9	0.06
		-	0	
S4	rRNA	+	12	0.50
		-	0	
S5	rRNA	+	4	0,0039*
		-	0	

(*) Teste de McNemar foi utilizado para comparar as diferenças entre as taxas de detecção dos métodos ($p < 0,05$ indica diferenças estatísticas significantes).

- = amostras com reações de qPCR negativas

+ = amostras com reações de qPCR positivas

Fonte: O autor

A comparação entre os níveis de rRNA e rDNA foi realizada nas amostras com reações de qPCR positivas para os 2 métodos (Tabela 5.6). Os níveis medianos de rRNA foram significativamente maiores do que os níveis de rDNA nas 15 amostras S1 analisadas ($p = 0,0007$), indicando atividade metabólica das bactérias nas amostras iniciais dos canais radiculares de dentes com periodontite apical. Nas amostras S2, S3a e S3b os níveis de rRNA e rDNA foram similares, sugerindo uma diminuição do metabolismo bacteriano após o PQC e procedimentos complementares imediatos. Por outro lado, nas amostras S4, os níveis de rRNA foram maiores do que os de rDNA bacteriano ($p = 0,0499$), indicando que o uso da medicação intracanal não impediu a atividade das bactérias que persistiram após os procedimentos endodônticos realizados na primeira sessão do tratamento. A fase de reparo promoveu uma redução substancial de rRNA e rDNA bacteriano, resultando nos menores níveis de infecção observados durante o tratamento. Porém, devido ao baixo número de casos positivos para o método de rDNA nas amostras S5 (4 casos), não foi possível realizar a análise estatística dessas amostras. A Figura 5.2 ilustra a alteração nos níveis de rDNA e rRNA durante as etapas do tratamento endodôntico.

Para as amostras positivas em ambos os ensaios de qPCR, também foi calculada a razão rRNA/rDNA como um índice de atividade metabólica bacteriana em cada amostra. Todas as 15 amostras S1 apresentaram razão rRNA/rDNA positivas (mediana: 2,63; intervalo: 1,03 a 26,37), sugerindo a presença de bactérias metabolicamente ativas nos canais radiculares infectados, porém com grande variação no estado metabólico. Após o PQC, os valores da razão rRNA/rDNA sofreram uma diminuição (mediana: 1,76; intervalo: 0,16 a 15,74). O metabolismo bacteriano permaneceu baixo em S3a (mediana: 1,05; intervalo: 0,2 a 9,54) e S3b (mediana: 1,23; intervalo: 0,08 a 8,3), porém sem diferenças significativas em relação às amostras S2. Entretanto, houve um aumento significativo da razão rRNA/rDNA nas amostras S4 (mediana: 1,97; intervalo: 0,06 a 15,27) quando comparadas às amostras S3b ($p = 0,0173$), indicando um aumento do metabolismo bacteriano durante a utilização de medicação intracanal com hidróxido de cálcio por 14 dias.

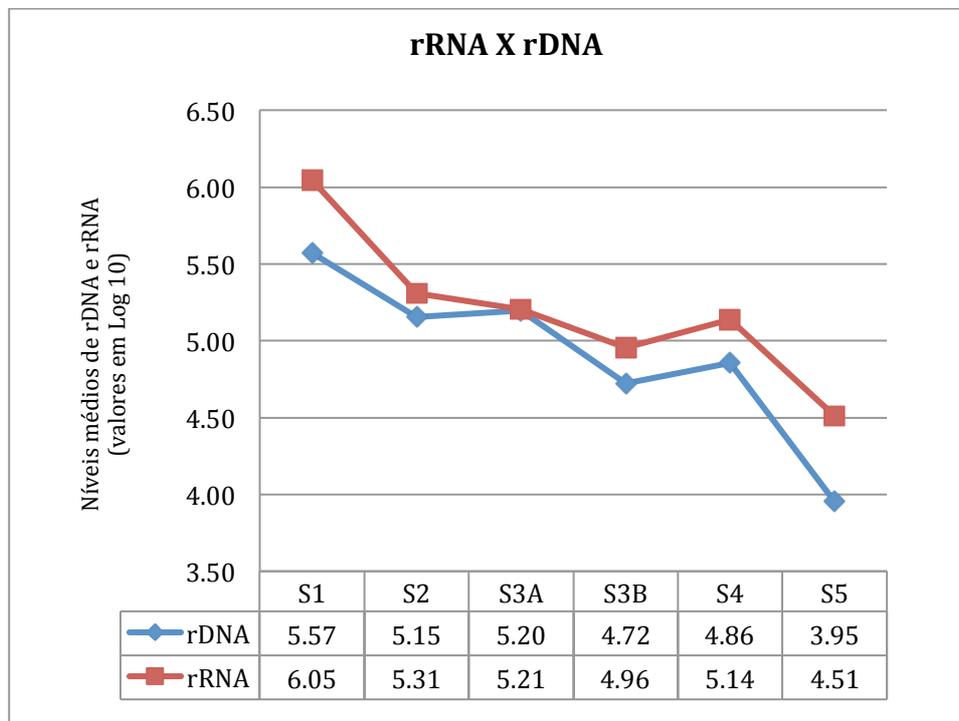
Tabela 5.6 - Valores de mediana (mínimo - máximo) do número cópias de rDNA e rRNA das amostras com reações de qPCR positivas para os 2 métodos após os seguintes procedimentos: cirurgia de acesso (S1), preparo químico-cirúrgico (S2), XPF (S3a), PUI (S3b), medicação intracanal entre sessões (S4) e reparo dos canais radiculares (S5)

	rDNA	rRNA	Valor de <i>p</i>
S1	1,62 x 10 ⁵ (6,21 x 10 ³ - 2,52 x 10 ⁶)	4,08 x 10 ⁵ (6,27 x 10 ⁴ - 8,75 x 10 ⁶)	0,0007 *
S2	4,84 x 10 ⁴ (8,28 x 10 ³ - 8,35 x 10 ⁵)	8,30 x 10 ⁴ (7,37 x 10 ³ - 6,80 x 10 ⁵)	0,5076
S3a	5,48 x 10 ⁴ (7,03 x 10 ³ - 7,37 x 10 ⁵)	5,50 x 10 ⁴ (1,06 x 10 ⁴ - 5,84 x 10 ⁵)	0,5940
S3b	4,48 x 10 ⁴ (7,63 x 10 ³ - 1,84 x 10 ⁵)	6,26 x 10 ⁴ (4,63 x 10 ³ - 3,66 x 10 ⁵)	0,2135
S4	7,58 x 10 ⁴ (7,40 x 10 ³ - 1,92 x 10 ⁵)	9,48 x 10 ⁴ (6,63 x 10 ³ - 4,41 x 10 ⁵)	0,0499 *
S5	8,91 x 10 ³ (4,63 x 10 ³ - 1,36 x 10 ⁴)	3,09 x 10 ⁴ (8,63 x 10 ³ - 5,97 x 10 ⁴)	N.A.

O símbolo (*) indica que houve diferença entre os valores de mediana de rDNA e rRNA nas amostras S1 e S4 (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 após: cirurgia de acesso (S1), preparo químico-cirúrgico (S2), XPF (S3a), PUI (S3b), medicação intracanal entre sessões (S4) e reparo dos canais radiculares (S5)



Fonte: O autor

6 DISCUSSÃO

O presente estudo clínico avaliou a eficácia antimicrobiana de um protocolo de tratamento endodôntico em dentes com periodontite apical. O tratamento endodôntico foi realizado em 2 sessões: os procedimentos avaliados na primeira consulta foram PQC e o uso do XPF seguido de PUI; enquanto, a análise na segunda sessão inclui o procedimento complementar mediato (medicação intracanal), seguido de um reparo previamente à obturação dos canais radiculares. O presente estudo mostrou que o efeito cumulativo dos procedimentos realizados na segunda sessão do tratamento foram eficazes em promover uma redução adicional de bactérias quando comparados aos procedimentos da consulta inicial; rejeitando-se, portanto, a hipótese de nulidade.

No ensaio clínico presente, rRNA (cDNA) e seus respectivos genes (rDNA) foram utilizados como alvos para as reações de qPCR. Apesar de possibilitar a quantificação dos níveis de bactérias totais nas amostras, a análise de rDNA não permite diferenciar células viáveis das não viáveis, uma vez que o DNA de bactérias mortas pode persistir nos canais radiculares por longo tempo após a morte celular (Brundin et al., 2015). Por outro lado, o uso do rRNA permite avaliar a viabilidade de bactérias por ser rapidamente degradado após a morte da célula. A associação de métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA permite uma avaliação simultânea da quantidade e do metabolismo de bactérias (Matsuda et al., 2007; Campbell et al., 2011; Pitkänen et al., 2013; Romero Cazares, 2018). Por possuírem poucos genes que codificam o rRNA, o nível de rDNA bacteriano está relacionado diretamente à quantidade de bactérias presentes nas amostras. Por outro lado, devido à grande quantidade de ribossomos presentes nas células ativas, a análise da relação entre os níveis de rRNA e rDNA possibilita a avaliação da atividade metabólica bacteriana após os procedimentos endodônticos de desinfecção. O presente trabalho visa contribuir para o conhecimento do efeito dos procedimentos endodônticos sobre o metabolismo bacteriano e se torna relevante por existirem poucos estudos analisando a microbiota metabolicamente ativa após os procedimentos endodônticos de desinfecção (Pinheiro et al., 2015; Nardello, 2018; Romero Cazares, 2018).

6.1 Análise por qPCR baseada em rDNA: quantificação bacteriana

A reação de qPCR baseada em rDNA permitiu a quantificação absoluta das bactérias nas diferentes etapas do tratamento endodôntico. Para validar o protocolo de desinfecção do campo operatório, foi realizada a análise das amostras de controle de esterilidade do campo, que apresentaram reações de qPCR negativas, corroborando estudos prévios (Gomes et al., 2013; Moraes et al., 2015; Pinheiro et al., 2015; Nakamura et al., 2018; Prado, 2018; Romero Cazares, 2018). As 20 amostras iniciais (S1) apresentaram resultados positivos nas reações de qPCR. O PQC realizado com instrumentos Reciproc e 40 mL de NaOCl 2,5% promoveu uma redução substancial do número de cópias de rDNA presente nos canais radiculares. Esses dados estão de acordo com estudos moleculares prévios que avaliaram a efetividade do PQC utilizando instrumentos de NiTi e irrigação com NaOCl a 2,5% na redução dos níveis bacterianos em canais radiculares de dentes portadores de periodontite apical (Vianna et al., 2006; Sakamoto et al., 2007; Rôças et al., 2010; Rôças et al., 2011a; Rôças et al., 2011b; Paiva et al., 2012; Paiva et al., 2013a; Paiva et al., 2013b; Rôças et al., 2013; Neves et al., 2014; Rôças et al., 2014; Rodrigues et al., 2015; Provenzano et al., 2015; Zandi et al., 2016; Neves et al., 2016; Rôças et al., 2016; Rodrigues et al., 2017; Nakamura et al., 2018; Nardello, 2018; Prado, 2018; Romero Cazares, 2018). O presente estudo confirmou que o PQC é uma das fases mais importante para a redução da carga microbiana durante o tratamento endodôntico. O uso de instrumentos reciprocantes de NiTi com grandes conicidades, utilizados neste estudo, podem ter contribuído para a remoção ou a disrupção dos biofilmes aderidos às paredes dos canais radiculares através da ação mecânica destes instrumentos. Além disso, o grande volume e a ação química antimicrobiana da solução irrigadora utilizada neste ensaio clínico (40 mL de NaOCl 2,5%) pode ter contribuído para aumentar a desinfecção no interior do sistema de canais radiculares.

O número de casos com reações de qPCR positivas para rDNA bacteriano também decresceu de maneira significativa após o PQC; porém, 60% dos casos ainda permaneceram com níveis detectáveis de bactérias. Esses dados estão de acordo com estudos moleculares prévios, que encontraram uma prevalência de 50%

a 71% de casos infectados após PQC (Sakamoto et al., 2007; Paiva et al., 2012; Paiva et al., 2013b; Provenzano et al., 2015; Neves et al., 2016). Outros dois estudos encontraram índices mais baixos de prevalência de reações qPCR positivas, detectando rDNA bacteriano em 40% dos casos aproximadamente (Rodrigues et al., 2015; Rôças et al., 2016). As diferenças encontradas entre os diversos estudos publicados pode estar relacionada ao momento de realização das coletas microbiológicas, considerando ou não protocolos de irrigação final após o preparo. Podem ainda influenciar os resultados, aspectos técnicos relacionados ao preparo, como técnicas de instrumentação e sistemas utilizados, substâncias químicas auxiliares, volume dos irrigantes utilizados, além do treinamento e habilidade do operador.

Procedimentos complementares de desinfecção realizados após o PQC têm sido investigados com o objetivo de promover a máxima redução da microbiota endodôntica ainda na primeira sessão de tratamento (Siqueira; Rôças, 2011). A fim de validar um protocolo de utilização do instrumento XPF como um procedimento complementar de desinfecção pós PQC, realizou-se inicialmente um estudo piloto. A análise de qPCR baseada em rDNA revelou que o instrumento XPF não contribuiu para a redução bacteriana após o PQC. Ao contrário do esperado, observou-se uma ligeira tendência de aumento no número de bactérias após o uso do instrumento XPF. Esse fato pode estar relacionado ao protocolo utilizado no estudo piloto, que incluía 3 minutos de ativação das substâncias químicas irrigadoras com o XPF, semelhante a um protocolo previamente testado para PUI (Nakamura, 2014). Este protocolo pode ter favorecido a remoção de biofilmes das paredes dentinárias, em áreas não tocadas durante preparo, e colocado o DNA de células bacterianas em suspensão no canal principal. Estudo *in vitro* recente revelou que o uso do XPF realizado em etapas, com a renovação das soluções irrigadoras, foi mais eficaz na desinfecção intracanal (Bao et al., 2017). A renovação das substâncias químicas permite a remoção da solução saturada de debris/ restos orgânicos do interior dos canais, substituindo-a por uma solução com maior capacidade de dissolução tecidual e ação antimicrobiana. Portanto, o protocolo complementar de desinfecção foi modificado, sendo adicionado um passo de irrigação após a ativação com XPF, que foi realizada por menor tempo (1 minuto, sendo 2 ativações de 30 segundos). Além disso, a PUI foi adicionada ao protocolo com o objetivo de melhorar a limpeza

dos canais radiculares. O estudo piloto também permitiu a realização do cálculo amostral para comparação dos níveis de rDNA das amostras coletadas no término da primeira e segunda consulta do tratamento endodôntico (17 casos).

Na análise quantitativa de rDNA, os resultados do presente estudo mostraram que não houve diferenças significativas entre a prevalência de casos qPCR positivos e dos níveis de bactérias totais encontrados nas amostras coletadas após o uso do XPF (S3a) e da PUI (S3b) quando comparadas às amostras S2. Estes achados estão de acordo com estudos clínicos prévios, nos quais os procedimentos complementares de desinfecção imediatos não contribuíram para a redução da quantidade de bactérias quando comparados à fase de PQC (Paiva et al., 2012; Paiva et al., 2013b; Prado, 2018). A grande redução do número de cópias de rDNA após o PQC pode ter influenciado para que a redução adicional promovida pelos procedimentos subsequentes não fosse significativa. Além disso, a ausência de diferença significativa pode estar relacionada ao baixo número de casos avaliados nos estudos clínicos. O cálculo amostral do presente estudo foi realizado para investigar diferença entre as amostras coletadas no final da primeira e segunda sessão do tratamento. Para análise da diferença entre os procedimentos complementares e PQC, seria necessário um número maior de amostras. Recentemente, um estudo clínico randomizado mostrou que os níveis de bactérias detectados após a PUI eram menores do que os encontrados após um protocolo de irrigação não ativada (Nakamura et al., 2018).

A análise das amostras S4 mostrou que o uso da medicação intracanal, um procedimento complementar mediato, também não foi capaz de promover uma redução do número de cópias de rDNA dos canais radiculares quando comparadas às amostras S2 e S3b. Esses dados corroboram achados anteriores de estudos moleculares baseados em rDNA que demonstraram a capacidade limitada do Ca(OH)_2 em eliminar bactérias dos canais radiculares com infecções primárias (Sakamoto et al., 2007; Blome et al., 2008; Rôças; Siqueira, 2011b; Teles et al., 2014). Os resultados desses estudos foram concordantes, apesar de apresentarem variações quanto ao veículo e ao tempo de ação da pasta de hidróxido de cálcio. O protocolo antimicrobiano avaliado no presente estudo mostrou que o uso da medicação intracanal com Ca(OH)_2 em veículo inerte, durante 14 dias, não foi capaz de alterar o nível de bactérias que persistiram nos canais radiculares após os

procedimentos realizados na primeira sessão. Resultados semelhantes foram relatados por outros autores que utilizaram a pasta de Ca(OH)_2 associada a veículos antimicrobianos, como paramonoclorofenol canforado (Sakamoto et al., 2007) ou clorexidina (Teles et al., 2014). Da mesma forma, Rôças e Siqueira (2011a) relataram que não houve diferença na atividade antimicrobiana do Ca(OH)_2 associado a um veículo inerte ou a um veículo com ação antimicrobiana (paramonoclorofenol canforado com glicerina), ressaltando que uma grande porcentagem de canais radiculares permaneceram infectados mesmo após o uso da medicação intracanal. Esses achados mostram a limitação da atividade antimicrobiana do Ca(OH)_2 no interior dos canais radiculares e indicam a necessidade da busca de novas substâncias químicas ou novas formulações da pasta de Ca(OH)_2 para complementar a desinfecção endodôntica em casos de dentes com periodontite apical.

Por sua vez, nas amostras coletadas após o reparo dos canais radiculares (S5), a análise de qPCR mostrou que tanto o número de bactérias totais detectadas nos canais radiculares, quanto o número de casos com reações positivas diminuíram de maneira significativa quando comparadas às amostras S4. Estes resultados estão de acordo com os achados de Waltimo et al. (2005) e Beus et al. (2012), que obtiveram máxima redução bacteriana após a reparo dos casos na segunda sessão de tratamento endodôntico. As amostras S5 também apresentaram menores níveis de rDNA quando comparadas às amostras S2, S3a e S3b. Como o objetivo dos procedimentos endodônticos realizados em dentes portadores de necrose pulpar e periodontite apical é conseguir um ambiente livre de micro-organismos ou o mais próximo disso, o efeito cumulativo dos procedimentos complementares após o PQC, imediatos ou mediatos, seguidos do reparo representa uma boa estratégia de desinfecção dos canais radiculares.

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

A qPCR baseada em rRNA foi capaz de detectar um maior número de canais infectados quando comparada ao método baseado em rDNA, especialmente nas amostras realizadas ao término do tratamento, onde o nível de rDNA se encontra bastante reduzido. Esses dados corroboram estudos prévios que evidenciaram a maior sensibilidade do método baseado em rRNA em relação ao rDNA na detecção de bactérias em uma comunidade bacteriana (Matsuda et al., 2007; Pitkänen et al., 2013; Pinheiro et al., 2015; Nardello, 2018; Romero Cazares, 2018).

Os níveis elevados de rRNA em relação ao rDNA bacteriano nas amostras iniciais dos canais radiculares confirmaram o alto metabolismo bacteriano em dentes com periodontite apical. O PQC e os procedimentos complementares imediatos refrearam a atividade bacteriana na primeira sessão do tratamento. Porém, após o uso da medicação intracanal entre sessões, foi observado um considerável aumento do número de cópias de rRNA em relação ao rDNA. Esses dados indicam que as bactérias persistentes são capazes de manter sua atividade metabólica após o uso do Ca(OH)_2 , resultados semelhantes aos encontrados por Nardello (2018). Esses achados podem estar relacionados à inacessibilidade de bactérias presentes no complexo sistema de canais radiculares e à organização de bactérias em biofilmes polimicrobianos, prevenindo o efeito antimicrobiano do Ca(OH)_2 . Além disso, alguns micro-organismos podem tolerar alterações de pH devido à bomba de prótons e/ou outros dispositivos de tamponamento, o que ajuda a manter constante o pH interno (Siqueira et al., 1998; Siqueira; Uzeda, 1998; Padan et al., 1981).

Uma das estratégias sugeridas na literatura para melhorar a ação da medicação intracanal é a ativação ultrassônica da pasta de Ca(OH)_2 (Duarte et al., 2012). Um estudo *in vitro* revelou que a ativação ultrassônica da pasta levou a um aumento do pH no interior dos canais radiculares (Duarte et al., 2012). Além disso, esse procedimento promoveu um maior contato da pasta de Ca(OH)_2 com as paredes dos canais radiculares, possibilitando o alcance em áreas onde as bactérias podem permanecer viáveis, como no interior dos túbulos dentinários ou em áreas com variações da anatomia interna dos canais radiculares (Arias et al., 2016). Recentemente, um estudo clínico randomizado, utilizando rRNA e rDNA para análise

microbiológica, mostrou que a ativação ultrassônica da pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ foi mais efetiva do que a pasta não ativada em reduzir o metabolismo bacteriano dos canais radiculares (Romero Cazares, 2018). Esse autor relatou que a ativação da pasta proporcionou um melhor preenchimento dos canais radiculares, evidenciado pelo extravasamento apical encontrado comumente na análise radiográfica após a colocação da medicação. Esses dados sugerem que a forma de inserção da medicação intracanal pode ter influenciado os resultados insatisfatórios encontrados no presente estudo.

Um fato a ser ressaltado é a importância do reparo dos canais radiculares para o controle da infecção após o uso da medicação intracanal. No presente estudo, os menores níveis de rRNA e rDNA foram observados no término da segunda sessão. A ação mecânica do instrumento endodôntico associada à ação química da solução irrigadora utilizada no reparo promoveu uma redução significativa dos níveis bacterianos de S4 para S5. Os níveis de rRNA e rDNA em S5 (reparo) também foram significativamente menores do que os encontrados em S2 e S3b. Assim, os níveis de rRNA e rDNA sofreram redução em S2, permaneceram constantes em S3b/ S4, e foram reduzidos em S5 para níveis abaixo do limite de detecção do método utilizado nesse estudo. Consequentemente, apenas 30% das amostras S5 (final da segunda sessão) permaneceram positivas nas reações de qPCR baseada em rDNA bacteriano. Em contraste, 55% das amostras S3b (final da primeira sessão) foram positivas para análise de rDNA.

O presente estudo mostrou que o PQC, independente do uso de XPF e PUI, resultou em uma redução significativa dos níveis e do metabolismo bacteriano. O aumento significativo do metabolismo bacteriano após a medicação intracanal revelou que o $\text{Ca}(\text{OH})_2$, quando utilizado no protocolo descrito neste estudo, foi ineficiente contra as bactérias persistentes, sendo necessário o reparo dos canais radiculares para o controle da infecção. Os menores níveis de infecção foram observados no final da segunda sessão do tratamento endodôntico. Entretanto, é importante ressaltar que estudos longitudinais devem ser realizados para estudar a relação entre a persistência de bactérias revelada por métodos moleculares e a taxa de sucesso do tratamento endodôntico realizados em 1 ou 2 sessões.

7 CONCLUSÕES

Com base nos dados da avaliação microbiológica do protocolo de tratamento, por métodos moleculares baseados em rDNA e rRNA, concluiu-se que:

- O preparo químico-cirúrgico promoveu uma redução dos níveis e da atividade metabólica de bactérias nos canais radiculares. Porém, o uso do instrumento XP-endo Finisher e irrigação ultrassônica não contribuiu para uma desinfecção adicional na primeira sessão de tratamento.

- Após o uso de Ca(OH)_2 como medicação intracanal entre sessões, houve um aumento no metabolismo de bactérias persistentes nos canais radiculares. Por sua vez, o reparo dos canais radiculares proporcionou os menores níveis de rDNA e rRNA.

- O reparo dos canais radiculares após medicação intracanal, na segunda sessão, promoveu maior desinfecção do que os procedimentos realizados na primeira sessão do tratamento de dentes com periodontite apical.

REFERÊNCIAS¹

- Arias MP, Maliza AG, Mideda RZ, Graeff MS, Duarte MA, Andrade FB. Effect of ultrasonic streaming on intra-dentinal disinfection and penetration of calcium hydroxide paste in endodontic treatment. *J Appl Oral Sci.* 2016 Nov-Dec;24(6):575-81. doi: 10.1590/1678-775720150553
- Bao P, Shen Y, Lin J, Haapasalo M. In vitro efficacy of XP-endo Finisher with 2 different protocols on biofilm removal from apical root canals. *J Endod.* 2017 Feb;43(2):321-5.
- 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.
- Bergenholtz G, Spangberg L. Controversies in endodontics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004 Jan;15(2):99-114.
- 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.
- Brundin M, Figdor D, Sundqvist G, Sjögren U. Preservation of *Fusobacterium nucleatum* and *Peptostreptococcus anaerobius* DNA after loss of cell viability. *Int Endod J* 2015 Jan;48(1):37-45.
- Campbell BJ, Yu L, Heidelberg JF, Kirchman DL. Activity of abundant and rare bacteria in a coastal ocean. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Aug 2;108(31):12776-81. doi: 10.1073/pnas.1101405108. doi: 10.1073/pnas.1101405108.
- Duarte MA, Balan NV, Zeferino MA, Vivan RR, Morais CA, Tanomaru-Filho M, et al. Effect of ultrasonic activation on pH and calcium released by calcium hydroxide pastes in simulated external root resorption. *J Endod.* 2012 Jun;38(6):834-7. doi: 10.1016/j.joen.2012.03.005.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Gomes GB, Sarkis-Onofre R, Bonow ML, Etges A, Jacinto RC. An investigation of the presence of specific anaerobic species in necrotic primary teeth. *Braz Oral Res.* 2013 Mar-Apr;27(2):149-55.

Matsuda K, Tsuji H, Asahara T, Kado Y, Nomoto K. Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Jan;73(1):32-9. Epub 2006 Oct 27. Erratum in: *Appl Environ Microbiol.* 2007 Oct;73(20):6695. doi: 10.1128/AEM.01224-06

Moraes LC, Fatturi-Parolo CC, Ferreira MB, Só MV, Montagner F. Saliva, supragingival biofilm and root canals can harbor gene associated with resistance to lactamic agents. *Braz Oral Res.* 2015;29:52. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0052.

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

Nakamura, VC. Influência da irrigação ultrassônica passiva na redução de bactérias e endotoxinas dos canais radiculares: um estudo clínico randomizado [tese] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. doi: 10.11606/T.232014.tde-19022015154527.

Nakamura VC, Pinheiro ET, Prado LC, Silveira AC, Carvalho APL, Mayer MPA, Gavini G. Effect of ultrasonic activation on the reduction of bacteria and endotoxins in root canals: a randomized clinical trial. *Int Endod J.* 2018 Jan; 51 Suppl1:e12-e22. doi: 10.1111/iej.12783.

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

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

Padan E, Zilberstein D, Schuldiner S. pH homeostasis in bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1981 Dec;650(2-3):151-66. Review.

Paiva SS, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Carmo FL, Ferreira DC, Curvelo JA, Soares RM, Rosado AS. Supplementing the antimicrobial effects of chemomechanical debridement with either passive ultrasonic irrigation or a final rinse with chlorhexidine: a clinical study. *J Endod.* 2012 Sep;38(9):1202-6. doi: 10.1016/j.joen.2012.06.023. Epub 2012 Jul 25.

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

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

Pinheiro ET, Candeiro GT, Teixeira SR, Shin RC, Prado LC, Gavini G, Mayer MP. RNA-based Assay Demonstrated *Enterococcus faecalis* Metabolic Activity after Chemomechanical Procedures. *J Endod.* 2015 Sep;41(9):1441-4. doi: 10.1016/j.joen.2015.04.020.

Pitkänen T, Ryu H, Elk M, Hokajärvi AM, Siponen S, Vepsäläinen A, Räsänen P, Santo Domingo JW. Detection of fecal bacteria and source tracking identifiers in environmental waters using rRNA-based RT-qPCR and rDNA-based qPCR assays. *Environ Sci Technol.* 2013;47(23):13611-20. doi: 10.1021/es403489b.

Prado LC. Avaliação da quantidade de bactérias e endotoxinas após o tratamento endodôntico de dentes com periodontite apical primária e a correlação com a indução de citocinas pró-inflamatórias em cultura de fibroblastos humanos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018.

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

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

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

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

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

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

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

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

Rodrigues RC, Antunes HS, Neves MA, Siqueira JF Jr, Rôças IN. Infection Control in Retreatment Cases: In Vivo Antibacterial Effects of 2 Instrumentation Systems. *J Endod.* 2015 Oct;41(10):1600-5. doi: 10.1016/j.joen.2015.06.005. Epub 2015 Jul 30.

Rodrigues RCV, Zandi H, Kristoffersen AK, Enersen M, Mdala I, Ørstavik D, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Influence of the apical preparation size and the irrigant type on bacterial reduction in root canal-treated teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2017 Jul;43(7):1058-1063. doi: 10.1016/j.joen.2017.02.004. Epub 2017 May 5.

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.

Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;88:488-92.

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

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

Siqueira JF Jr, Lopes HP, de Uzeda M. Recontamination of coronally unsealed root canals medicated with camphorated paramonochlorophenol or calcium hydroxide pastes after saliva challenge. *J Endod.* 1998 Jan;24(1):11-4.

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

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Optimizing single-visit disinfection with supplementary approaches: a quest for predictability. *Aust Endod J* 2011 Dec;37(3):92-8. doi: 10.1111/j.1747-4477.2011.00334.x.

Siqueira JF Jr, de Uzeda M. Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. *J Endod.* 1998 Oct;24(10):663-5.

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

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

Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Ørstavik D. Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *J Endod.* 2005 Dec;31(12):863-6.

Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects os established and potential root canal irrigants. *J Endod.* 1995;21:513-5.

Zandi H, Kristoffersen AK, Ørstavik 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.

Zandi H, Rodrigues RC, Kristoffersen AK, Enersen M, Mdala I, Ørstavik D, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Antibacterial effectiveness of 2 root canal irrigants in root-filled teeth with infection: a randomized clinical trial. *J Endod*. 2016 Sep;42(9):1307-13. doi: 10.1016/j.joen.2016.06.006.

Zehnder M, Kosichi D, Luder H, et al. Tissue dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:756-62.

Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod*. 2006;32:389-98.

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 nucleicos

- 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 NUCLEICOS 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

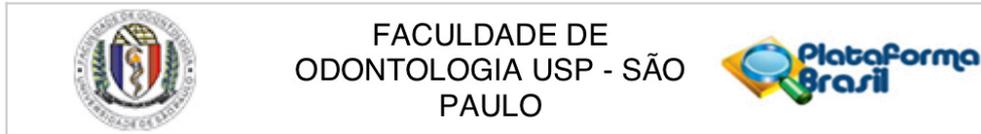
- Despejar o gel de agarose ainda líquido na cuba previamente preparada
- Aguardar o líquido gelificar
- Remover a placa desnada, desprender a cuba da prensa e posicioná-la na bandeja de eletroforese, com as casas voltadas para o polo positivo (fio preto)
- Encher a bandeja, cobrindo totalmente a placa 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

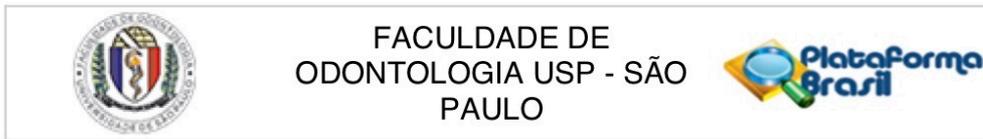
DADOS DO PARECER

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		CEP: 05.508-900
Bairro: Cidade Universitária		
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	termodeconsentimentolivreeseclarecido.pdf	14/06/2017 14:54:21	Ericka Tavares Pinheiro	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Ericka_2017.pdf	16/05/2017 16:25:28	Laura Cristina Leite Nardello	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 04 de Agosto de 2017

Assinado por:

**Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)**

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

ANEXO B – Banco de dados de ensaios clínicos - Clinical Trials



ClinicalTrials.gov Protocol Registration and Results System (PRS) Receipt
Release Date: May 15, 2018

ClinicalTrials.gov ID: NCT03537664

Study Identification

Unique Protocol ID: FAPESP 2016/15473-0

Brief Title: Adjunctive Steps for Disinfection of Teeth With Primary Endodontic Infections

Official Title: Analysis of Metabolically Active Bacteria After Adjunctive Steps for Disinfection of Teeth With Primary Endodontic Infections: RNA- and DNA-based Molecular Study

Secondary IDs:

Study Status

Record Verification: May 2018

Overall Status: Recruiting

Study Start: August 4, 2017 [Actual]

Primary Completion: February 2019 [Anticipated]

Study Completion: August 2019 [Anticipated]

Sponsor/Collaborators

Sponsor: University of Sao Paulo

Responsible Party: Principal Investigator
Investigator: Ericka Tavares Pinheiro [epinheiro]
Official Title: Professor
Affiliation: University of Sao Paulo

Collaborators:

Oversight

U.S. FDA-regulated Drug: No

U.S. FDA-regulated Device: No

U.S. FDA IND/IDE: No

Human Subjects Review: Board Status: Approved

Approval Number: 2.201.768

Board Name: Brazil: National Committee of Ethics in Research

Board Affiliation: University of São Paulo - School of Dentistry

Phone: +55113091-7960

Email: cepfo@usp.br

Address:

Av Prof Lineu Prestes 2227
 Cidade Universitária
 05.508-900
 São Paulo- SP- Brazil

Data Monitoring: Yes

FDA Regulated Intervention: No

Study Description

Brief Summary: This study aim to evaluate an endodontic treatment protocol using adjunctive steps for disinfection of teeth with primary endodontic infections.

Detailed Description: The success of endodontic treatment in teeth with necrotic pulp and apical periodontitis depends on the reduction of viable microorganisms of root canals by endodontic disinfection procedures. This study aims to evaluate by molecular methods the effect of different disinfection procedures on reduction, diversity and microbial metabolic activity. Patients with necrotic pulps and apical periodontitis in single-rooted teeth will be selected. Microbiological samples will be taken from root canals after access cavity (S1), after chemomechanical preparation with Reciproc System and 2.5% NaOCl (S2), after irrigant activation using the XP-Endo Finisher instrument (S3a) and ultrasonic activation (S3b); and after intracanal medication with calcium hydroxide for 14 days (S4). DNA and RNA will be extracted from root canal samples, and cDNA synthesized using reverse transcription reaction. The effect of treatment protocols on total microbiota will be determined by rDNA-based qPCR using universal primers for Bacteria domain. RNA of root canal samples will be used to determine the diversity of metabolically active microbiota by Reverse Transcriptase Reaction (RT), followed by amplification (PCR) and high throughput sequencing of the hypervariable region V1-V2-V3 of 16S rRNA gene. The metabolic activity of the most prevalent species / taxa will be calculated by rRNA- and rDNA-based molecular methods. The data will be analyzed by statistical tests, with 5% significance level.

Conditions

Conditions: Periapical Periodontitis
 Bacterial Infections

Keywords: Periapical Periodontitis
 Bacterial Infections
 Root Canal Preparation
 Calcium Hydroxide
 Real-Time Polymerase Chain Reaction
 RNA-Directed DNA Polymerase

Study Design

Study Type: Interventional

Primary Purpose: Treatment

Study Phase: N/A

Interventional Study Model: Single Group Assignment

Number of Arms: 1

Masking: None (Open Label)

Allocation: N/A
 Enrollment: 20 [Anticipated]

Arms and Interventions

Arms	Assigned Interventions
<p>Experimental: Root canal preparation and medication First endodontic treatment session includes the root canal preparation with Reciproc System and NaOCl 2.5%, followed by final irrigation protocol using activation techniques: XP Endo-Finisher and ultrasonic activation. The second endodontic treatment includes the intracanal medication with calcium hydroxide paste.</p>	<p>Procedure/Surgery: Root canal preparation First endodontic treatment session includes the root canal preparation with Reciproc System and NaOCl 2.5%, followed by final irrigation protocol using activation techniques: XP Endo-Finisher and ultrasonic activation. Procedure/Surgery: Intracanal medication The second endodontic treatment includes the intracanal medication with calcium hydroxide paste.</p>

Outcome Measures

Primary Outcome Measure:

1. Metabolic activity of persistent bacteria
 The metabolic activity of total bacteria and of the most prevalent species / taxa will be calculated by rRNA/ rDNA ratio estimated by qPCR using universal and species-specific primers.
 [Time Frame: Through study completion, an average of 2 years]

Secondary Outcome Measure:

2. Bacterial levels
 Quantitative data of total bacterial counts determined by a DNA-based qPCR (quantitative polymerase chain reaction) assay
 [Time Frame: Through study completion, an average of 2 years]
3. Bacterial community diversity
 RNA will be used to determine the diversity of metabolically active microbiota by Reverse Transcriptase Reaction (RT), followed by amplification (PCR) and high throughput sequencing of the hypervariable region V1-V2-V3 of 16S rRNA gene.
 [Time Frame: Through study completion, an average of 2 years]

Other Pre-specified Outcome Measures:

4. Endodontic success
 Absence of clinical signs/ symptoms and reduction/ absence of apical radiolucency in radiologic examination
 [Time Frame: Through study completion, an average of 2 years]

Eligibility

Minimum Age: 18 Years
 Maximum Age: 65 Years
 Sex: All
 Gender Based: No
 Accepts Healthy Volunteers: No
 Criteria: Inclusion Criteria:

- Teeth with necrotic pulps and asymptomatic apical periodontitis

Exclusion Criteria:

- patients who had received antibiotics during the previous 3 months or had any general disease,
- teeth that could not be properly isolated with rubber dam,
- non-restored teeth,
- periodontal pockets depths greater than 4 mm,
- previous endodontic treatment,
- open apex,
- crown/root fracture
- root resorption or calcifications.

Contacts/Locations

Central Contact Person: Ericka T Pinheiro, PhD
Telephone: 551126488293
Email: erickapinheiro@usp.br

Central Contact Backup: Giulio Gavini, PhD
Telephone: 551126488025
Email: ggavini@usp.br

Study Officials: Ericka T Pinheiro, PhD
Study Principal Investigator
University of São Paulo

Locations: Brazil
University of São Paulo
[Recruiting]
São Paulo, Brazil, 05508000
Contact: Ericka T Pinheiro, PhD 551126488293 erickapinheiro@usp.br
Contact: Giulio Gavini, PhD 551126488025 ggavini@usp.br

IPDSharing

Plan to Share IPD:

References

Citations:

Links:

Available IPD/Information: