LAÍS CUNHA PRADO

**Estudo *in vivo* da susceptibilidade de bactérias Gram-positivas após
procedimentos químico-cirúrgico e medicação intracanal pelo método de
reação de cadeia de polimerase baseado em DNA e RNA**

São Paulo

2014

LAÍS CUNHA PRADO

**Estudo *in vivo* da susceptibilidade de bactérias Gram-positivas após
procedimentos químico-cirúrgico e medicação intracanal pelo método de
reação de cadeia de polimerase baseado em DNA e RNA**

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Giulio Gavini

São Paulo

2014

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 da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Prado, Laís Cunha.

Estudo *in vivo* da susceptibilidade de bactérias Gram-positivas após procedimentos químico-cirúrgico e medicação intracanal pelo método de reação de cadeia de polimerase baseado em DNA e RNA / Laís Cunha Prado; orientador Giulio Gavini. -- São Paulo, 2014.

65 p. : il. : fig. , tab. ; 30 cm.

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

Versão corrigida.

1. Bactérias Gram-positivas. 2. Tratamento do canal radicular. 3. Reação em cadeia por polimerase. 4. Canal radicular - Patologia. 5. Microbiologia oral. I. Gavini, Giulio. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Prado LC. Estudo *in vivo* da susceptibilidade de bactérias Gram-positivas após procedimentos químico-cirúrgico e medicação intracanal pelo método de reação de cadeia de polimerase baseado em DNA e RNA. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho a meu marido, meu companheiro e amor da minha vida, muito obrigado por acreditar, apoiar e me incentivar, pela paciência e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

A meus pais por serem a razão de tudo, pela criação, dedicação, pela torcida em todos os momentos e por me enxergarem melhor do que eu sou.

A minha irmã, minha melhor amiga, em quem sempre posso confiar, pela paciência, pelas palavras de conforto, pelas risadas e por sempre me estender as mãos.

AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Doutor Giulio Gavini** pela confiança e acolhida, pelas orientações e ensinamentos, por ser um grande exemplo de profissional. Você é uma inspiração para seguir em frente. Muito obrigado por esses anos de mestrado.

À **Professora Doutora Ericka Tavares Pinheiro** pelo grande incentivo, dedicação, ensinamentos e pela imensa ajuda em todas as etapas deste trabalho.

Ao **Professor Doutor Oscar Pessoa** pela grande confiança, amizade, e torcida. Obrigada por ter acreditado em mim. Sou eternamente grata.

À **Professora Doutora Márcia Pinto Alves Mayer** e a todos os professores, alunos e funcionários do Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pela colaboração no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao **Professor Doutor e colega Vitor Nakamura** por toda paciência, por todo o ensinamento e por toda ajuda. Você é um grande profissional.

À **Mestranda Amanda Silveira**, por sempre estar ao meu lado, por sempre me incentivar e ajudar. Obrigada por tudo, por mais uma vitória juntas, você é mais que uma amiga.

À todos os amigos e colegas da Pós-graduação em Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, por todos os momentos em que aprendi e ri com vocês. Em especial, **Aline Pereira, Ana Laura Carvalho, Nágila Mustafá e Elaine Iglecias**.

Aos funcionários da Clínica Odontológica e da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo apoio e colaboração.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de
água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

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

Este estudo identificou a presença e a viabilidade de *Streptococcus spp.*, *Propionibacterium acnes* e *Enterococcus faecalis* antes e após os procedimentos endodônticos, utilizando o método de reação de cadeia de polimerase (PCR) baseado em RNA ribossômico (rRNA) e seus respectivos genes (rDNA). Foram coletadas amostras de 20 dentes com infecção primária antes (S1) e após o preparo químico-cirúrgico (S2), e depois do emprego do Ca(OH)_2 como medicação intracanal (S3). DNA e RNA foram extraídos da mesma amostra de canal radicular e utilizados como moldes para reação de PCR com iniciadores específicos para a região 16S rRNA das espécies analisadas. *Streptococcus* espécies foram detectados em 20% e 25% das amostras S1 utilizando os métodos baseados em rRNA e rDNA, respectivamente; enquanto *P. acnes* foi detectado apenas pela análise de rRNA, estando presente em 10% das amostras S1. Após o preparo químico-cirúrgico, *Streptococcus spp.* foram detectado em 10% das amostras S2 quando se utilizou rDNA, porém não foi detectado pelo método baseado em rRNA, indicando ausência de células viáveis. Por outro lado, *P. acnes* foi detectado por ambos os métodos nas amostras S2, com prevalência de 10% e 5% quando se utilizou rRNA e rDNA como molde para PCR, respectivamente. Nas amostras S3, *P. acnes* foi a única espécie detectada nos ensaios baseados em rRNA, presente em 10% dos casos, enquanto o método baseado em rDNA falhou em detectar essa espécie. Por sua vez, *E. faecalis* não foi detectado em nenhuma amostra pelos métodos utilizados. Portanto, conclui-se que a suscetibilidade bacteriana aos procedimentos endodônticos varia entre as espécies Gram-positivas. Enquanto *Streptococcus spp.* foram suscetíveis, *P. acnes* persistiu ativo em canais radiculares após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal. Esses dados sugerem que há necessidade de novas estratégias para a eliminação de espécies resistentes ao tratamento endodôntico.

Palavras-chave: Bactérias gram-positivas. Periodontite apical. Tratamento do canal radicular. Reação de polimerase em cadeia.

ABSTRACT

Prado LC. In vivo study of the susceptibility of Gram-positive bacteria after chemo-surgical preparation and intracanal medication by RNA and DNA-based polymerase chain reaction [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Corrected Version.

This study identified the presence and viability of *Streptococcus* spp., *Enterococcus faecalis* and *Propionibacterium acnes* before and after endodontic procedures, using the polymerase chain reaction (PCR) based on ribosomal RNA (rRNA) and their genes (rDNA). Samples of 20 teeth with primary infection were collected before (S1) and after chemical-surgical preparation (S2), and after Ca(OH)₂ as temporary dressing (S3). DNA and RNA were extracted from the same root canal sample and used as templates for PCR with specific primers for 16S rRNA region of the analyzed species. *Streptococcus* species were detected in 20% and 25% of the S1 samples using methods based on rRNA and rDNA, respectively; while *P. acnes* was only detected by analysis of rRNA, present in 10% of the samples S1. After chemical-surgical preparation, *Streptococcus* spp. were detected in 10% of S2 samples when using rDNA as template, but they were not detected by the method based on rRNA, indicating the absence of viable cells. Furthermore, *P. acnes* was detected by both methods in samples S2, with a prevalence of 10% and 5% when using as template rRNA and rDNA for PCR, respectively. In S3 samples, *P. acnes* was the only species detected in assays based on rRNA, present in 10% of cases, while the rDNA-based method failed to detect this species. *E. faecalis* was not detected in any sample by the methods used. Therefore, it is concluded that bacterial susceptibility to endodontic procedures may vary among Gram-positive species. While *Streptococcus* spp. were susceptible, *P. acnes* persisted active in root canals after chemical-surgical preparation and dressing. These data suggest the need for new strategies to eliminate resitant species to endodontic treatment.

Keywords: Gram-positive bacteria. Periodontitis, apical. Root canal therapy. Polimerase chain reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1- Organograma dos procedimentos clínicos e de coleta do tratamento endodôntico.....	27
Figura 4.2- Eletroforese em gel de agarose da reação em cadeia da polimerase - Controle positivo - <i>Streptococcus species</i>	34
Figura 4.3- Eletroforese em gel de agarose da reação em cadeia da polimerase - Controle positivo - <i>Propionibacterium acnes</i>	34
Figura 4.4- Eletroforese em gel de agarose da reação em cadeia da polimerase - Controle positivo <i>Enterococcus faecalis</i>	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1-	Prevalência de taxa bacteriana antes e após procedimentos químico-mecânico e medicação intracanal pelo método PCR baseado em rDNA e RNA (n=20).....	37
Tabela 5.2-	Taxas de detecção de <i>Streptococcus species</i> por ensaios baseados em DNA e rRNA.....	38
Tabela 5.3-	Taxas de detecção de <i>P. acnes</i> por ensaios baseados em DNA e rRNA.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celsius
Ca(OH) ₂	hidróxido de cálcio
CHX	digluconato de clorexidina
CRT	comprimento real de trabalho
EDTA	ácido etileno diamino tetra-acético
IC	irrigação convencional
µL	microlitros
mL	mililitros
min	minutos
mm	milímetro
NaOCl	hipoclorito de sódio
PCR	Reação em cadeia de polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
PQC	preparo químico-cirúrgico
RPM	Rotações por minuto
s	segundos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 ESTUDOS IN VIVO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DO PQC.....	15
2.2 ESTUDOS IN VIVO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DO PQC E MIC ...	19
3 PROPOSIÇÃO	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 ASPÉCTOS ÉTICOS	25
4.2 SELEÇÃO DE PACIENTES	25
4.3 PREPARO DOS CANAIS E COLETAS MICROBIOLÓGICAS	28
4.4 EXTRAÇÃO DO DNA E RNA.....	31
4.5 ANÁLISE QUALITATIVA DE PCR CONVENCIONAL	32
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5 RESULTADOS.....	36
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS.....	48
APÊNDICES	55
ANEXO.....	64

1 INTRODUÇÃO

O objetivo do tratamento endodôntico é restabelecer ou manter a saúde dos tecidos perirradiculares. A periodontite apical, é uma doença causada por bactérias que infectam o canal radicular e para se ter o sucesso do tratamento endodôntico, é necessário que se controle a infecção, reduzindo ao máximo o nível de bactérias no canal radicular.

As principais etapas do tratamento endodôntico responsáveis pela redução bacteriana são: o preparo químico-cirúrgico (PQC) e a medicação intracanal. Diversos são os estudos que demonstraram que tais passos apresentam uma eficácia considerável quando se refere ao controle da infecção no canal radicular, porém alguns estudos microbiológicos mostram uma ineficácia desses procedimentos, comprovando a existência de bactérias que resistem ao efeito do tratamento e colocam em risco o sucesso endodôntico dependendo da quantidade, fator de virulência e acesso de espécies bacterianas aos tecidos periapicais.

Apesar de vários estudos *in vivo* investigarem os efeitos antimicrobianos do tratamento endodôntico, apenas alguns identificaram as espécies bacterianas que persistem após o tratamento. A maioria destes estudos foram baseados em métodos dependentes de cultura, que apesar de adequados para detectar bactérias cultiváveis, apresentam limitações relevantes como: incapacidade de detectar a viabilidade de bactérias ainda não cultiváveis e a baixa sensibilidade. Essas limitações podem subestimar as *taxa* bacterianas resistentes aos procedimentos endodônticos.

Enquanto isso, a identificação das espécies ou grupos microbianos é facilitada com emprego de métodos moleculares baseados na detecção de fragmentos de DNA ou RNA ou LPS. Estes métodos podem permitir a detecção de bactérias ainda não-cultiváveis, além de possuir alta sensibilidade, sendo capazes de detectar espécies mesmo que presentes em baixas proporções.

Devido a estas observações, os métodos moleculares são considerados métodos de escolha para a avaliação microbiológica dos procedimentos endodônticos. Notavelmente, uma limitação da metodologia baseada em DNA é a

sua incapacidade em distinguir entre células vivas e mortas, comprometendo a avaliação das terapias antimicrobianas.

Uma estratégia é a utilização de métodos de detecção do RNA, pois esta molécula é considerada como um indicador de viabilidade microbiana. Estes métodos envolvem a realização de PCR por transcriptase reversa (RT-PCR), que amplifica o RNA e sintetiza DNA complementar (cDNA), que é usado como molde para a amplificação (Siqueira Jr; Rôças, 2005). Entretanto, até o presente momento, poucos estudos clínicos foram realizados utilizando métodos moleculares para esse fim. Dentre esses, apenas dois estudos identificaram as espécies bacterianas persistentes, revelando uma alta prevalência de bactérias Gram-positivas após os procedimentos endodônticos de antisepsia (Rôças; Siqueira Jr, 2010; Rôças et al., 2014). Especificamente, *Streptococcus* spp., *Propionibacterium acnes* e *Enterococcus faecalis* foram frequentemente detectadas.

Portanto, se faz necessário identificar por métodos moleculares os micro-organismos que podem ser resistentes às manobras antimicrobianas do tratamento endodôntico. O conhecimento da microbiota persistente é importante para compreender o seu papel no resultado final do tratamento e definir medidas mais eficazes e previsíveis para a redução das mesmas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A diversidade microbiana na Endodontia, tem um papel fundamental na instalação e persistência da doença. Caracterizar a microbiota e entender sua função em cada fase da infecção aumenta a chance de sucesso no tratamento. Os procedimentos endodônticos que visam a redução ou eliminação das bactérias dentro do canal radicular, como o preparo químico cirúrgico e medicação intracanal, são de grande importância no reparo da lesão e cura da doença.

2.1 ESTUDOS *IN VIVO* DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DO PREPARO QUÍMICO-CIRÚRGICO.

Gomes et al. (1996) investigaram as variações na susceptibilidade dos membros da microbiota do canal radicular ante e após procedimentos biomecânicos. Quarenta e dois canais radiculares foram investigados microbiologicamente. As amostras foram coletadas antes e após a instrumentação e os resultados foram comparados. Em 15 casos de canais previamente não tratados, apesar das mudanças no tamanho da população microbiana, nenhuma mudança significativa na composição de espécies da microbiota foi observada. No entanto, em 27 casos, após o tratamento endodôntico, foi encontrada uma diminuição no número de *Peptostreptococcus spp.* ($P = 0,008$). Quando todos os 42 casos foram considerados em conjunto, foram encontradas reduções significativas entre a primeira e segunda amostra para anaeróbios ($P = 0,0117$) e para as espécies Gram-positivas ($p = 0,008$), especialmente *Peptostreptococcus spp.* ($P = 0,02$). Por conseguinte, concluiu-se que certas espécies são mais resistentes aos procedimentos biomecânicos do que outros.

Bystrom e Sundqvist (1985) avaliaram o efeito antibacteriano da irrigação de canais radiculares infectados com soluções de hipoclorito de sódio a 0,5 % e 5%. Foram estudados sessenta dentes unirradiculares com necrose pulpar, paredes da câmara pulpar intactas e evidências radiográficas de destruição óssea periapical. Em 20 canais radiculares foi utilizado a solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % (pH 9), e em outros 20 canais, solução de hipoclorito de sódio a 5% (pH 9), e em mais 20 canais foram usados para irrigação solução hipoclorito de sódio a 5% e e EDTA a 15% (pH 8). Os resultados indicaram que não houve diferença no efeito anti-

bacteriano entre as duas soluções, a utilização combinada de EDTA e solução de hipoclorito de sódio a 5% foi mais eficiente do que apenas a utilização da solução de hipoclorito de sódio.

Chavez de Paz et al. (2003), estudaram o padrão de bactérias que permaneceram após o tratamento químico-cirúrgico de canais radiculares em dentes com periodontite apical. Foram analisadas amostras de 200 dentes que receberam tratamento endodôntico. Para ser incluído, as amostras tiveram que ser coletadas em uma sessão subsequente àquele em que a terapia endodôntica foi iniciada. Achados bacteriológicos foram ligados a parâmetros clínicos e radiográficos. Um total de 248 amostras foram isoladas de 107 dentes, no qual apresentaram crescimento bacteriano. Houve um prevaletênica de bactérias Gram-positivas (85%). *Lactobacillus spp.* (22%), estreptococos (18%), e *Enterococcus spp.* (12%) foram os mais frequentes. Anaeróbios Gram-negativos foram relativamente esporádicos. As lesões ósseas radiográficas, dor persistente e a utilização de hidróxido de cálcio como medicação intracanal foram correlacionadas à presença de bactérias ($P < 0,05$). Uma vez estabelecidas, *Streptococos*, *Enterococos* e *Lactobacilos* parecem sobreviver normalmente após o tratamento endodôntico de dentes com periodontite apical.

Vianna et al. (2006) analisaram *in vivo*, a redução microbiana, após o PQC de 32 canais radiculares humanos com polpa mortificada, com NaOCl 2,5% ou gel de CHX 2%. A avaliação da redução bacteriana foi realizada por meio de qPCR com kits SybrGreen e TaqMan e métodos de cultura. Observou-se nos resultados das contagens de UFCs que a quantidade de bactérias foi reduzida significativamente em ambos os grupos (mais de 96 %). No entanto, usando qPCR a quantidade de bactérias antes e após o PQC foi maior do que quando avaliado por contagem de UFCs. Além disso, a redução de bactérias no grupo NaOCl (SybrGreen: 99,99%; TaqMan: 99,63%) foi significativamente maior do que no grupo CHX (SybrGreen: 96,62%; TaqMan: 96,60%). De acordo com a técnica de cultura, 75% dos casos estavam livres de bactérias após o PQC no grupo NaOCl, enquanto 50% dos casos estavam livres de bactérias no grupo CHX.

Siqueira Jr. (2007d) estudaram a eficácia do NaOCl 2,5% e CHX 0,12% como irrigantes na redução bacteriana em canais radiculares de dentes infectados com periodontite apical. Foram selecionados 32 dentes com infecções primárias. Amostras bacterianas foram coletadas no início do estudo (S1) e após o preparo

químico-cirúrgico usando NaOCl (n = 16) ou CHX (n = 16) como irrigantes (S2). Os isolados das amostras S2 foram identificados por meio de análise de seqüenciamento genético da região 16rRNA. Na S1, todos os canais foram positivos para as bactérias, e o número médio de bactérias por canal foi de $7,32 \times 10^5$ para o grupo NaOCl e $8,5 \times 10^5$ para o grupo de clorexidina. No S2, o número médio de bactérias em canais irrigados com NaOCl e clorexidina foi de $2,35 \times 10^3$ e 2×10^2 , respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos NaOCl e clorexidina em relação ao número de casos que produziram culturas negativas (p = 0,72) ou redução bacteriana quantitativa (P = 0,609). O ensaio de identificação das espécies encontradas no interior dos canais demonstrou que as taxa de bactérias mais observada foram *Streptococci*, correspondendo a 6 dos 13 táxons identificados.

Rôças e Siqueira Jr (2011a), compararam os efeitos antimicrobianos do NaOCl 2,5% CHX 0,12% usados como irrigantes durante o tratamento de dentes com periodontite apical. Amostras bacterianas de quarenta e sete dentes unirradiculares com necrose pulpar, foram coletadas antes (S1) e depois (S2) do preparo químico-cirúrgico utilizando NaOCl 2,5% (n = 30) ou CHX 0,12% (n = 17). A presença de bactérias, *Archaea* e de fungos foi avaliada por PCR convencional. Identificações bacterianas foram realizadas por checkerboard considerando segmentação de 28 patógenos endodônticos. Todas as amostras S1 de PCR, foram positivas para presença de bactérias, mas negativas para archaea e fungos. Ambos os protocolos baseados em CHX e NaOCl foram significativamente eficazes na redução dos níveis de bactérias e número de espécies. As espécies mais prevalente em amostras S2 do grupo NaOCl foram *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus*, *Porphyromonas endodontalis* e *Selenomonas sputigena*. No grupo CHX, as taxa mais prevalentes em S2 foram *Dialister invisus*, *Actinomyces israelii*, *Prevotella baroniae*, *Propionibacterium acidifaciens*, e espécies de *Streptococcus*.

Paiva et al. (2012) avaliaram *in vivo* a capacidade de 2 técnicas diferentes de irrigação quanto aos seus efeitos antimicrobianos, após o PQC de canais radiculares de dentes com periodontite apical. Amostras microbiológicas do conteúdo intracanal foram coletadas no início do tratamento (S1), após o preparo com instrumentos de níquel-titânio BioRace e irrigação com NaOCl 2,5% (S2) e, em seguida, após PUI com NaOCl 1% ou irrigação convencional com CHX 2% (S3). A análise foi realizada por meio de incidência de cultura positiva para bactérias e

fungos, e reação de PCR para bactérias, fungos e *Archaea*. Todas as amostras iniciais foram positivas para as bactérias, fungos não foram detectados, e archaea ocorreu em apenas uma amostra. O PQC foi significativamente eficaz na redução da incidência de cultura positiva e resultados de PCR. Embora ambas as abordagens complementares tenham reduzido a incidência de resultados bacteriológicos positivos quando comparados com amostras S2, a redução não foi estatisticamente significativa. A análise entre os grupos não demonstrou haver diferença significativa entre as técnicas.

Rôças et al. (2013), compararam a eficácia antibacteriana de duas técnicas de instrumentação, uma usando instrumentos manuais de níquel-titânio (NiTi) e outra por meio de instrumentos de NiTi rotatórios BioRaCe, em canais radiculares de dentes com periodontite apical. O irrigante de ambos os grupos foi NaOCl 2,5%. A análise qualitativa e quantitativa foi realizada por meio de culturas e PCR quantitativo em tempo real (qPCR) das amostras coletadas antes e após o PQC. Na análise de cultura, 45% e 35% dos canais eram ainda positivos para presença bacteriana após instrumentação manual e automatizada, respectivamente ($P > 0,05$). A comparação intergrupos de dados quantitativos não apresentou diferença significativa entre as duas técnicas. Porém, o preparo com instrumentos rotatórios resultou em menos casos qPCR-positivos (60%) do que a instrumentação manual (95%) ($P = 0,01$).

Rôças et al. (2014), pesquisaram a susceptibilidade de sete filotípos bacterianos ainda não cultivados e uma espécie de difícil cultura, após os procedimentos químicos-mecânicos. Canais radiculares de 28 dentes unirradiculares com periodontite apical foram preparados utilizando instrumentos rotatórios de níquel-titânio e NaOCl 2,5% como irrigante. Amostras de DNA coletadas antes (S1) e depois (S2) do preparo químico-cirúrgico foram submetidas à análise quantitativa do total de bactérias e das taxas mais prevalentes. *Bacteroidaceae sp. HOT-272* (24%) e *Fretibacterium fastidiosum* (20%) foram as espécies mais prevalentes em S1. Após o preparo químico-cirúrgico houve redução significativa no total de bactérias ($P < 0,001$), mas 64% dos canais ainda foram positivos para a presença de bactérias. Apenas *Bacteroidaceae sp. HOT-272* e *F. fastidiosum* foram detectados em S2 (cada um em uma amostra). A taxa de redução em ambos também foi altamente significativa ($P < 0,001$). Os resultados confirmaram que várias bactérias

ainda não cultivadas e de difícil crescimento podem estar associadas à periodontite apical e que os procedimentos químico-mecânico foram altamente eficazes na eliminação ou redução das taxas bacterianas.

Neves et al. (2014) avaliaram *in vivo* a eficácia antibacteriana do instrumento self-adjusting file (SAF), utilizando métodos moleculares. Os canais radiculares de dentes unirradiculares com periodontite apical foram instrumentados com o sistema SAF sob irrigação contínua com NaOCl 2,5%. Extratos de DNA de amostras coletadas antes e após a instrumentação foram submetidos à análise quantitativa de contagens totais de bactérias e níveis de estreptococos por qPCR. O ensaio de hibridização de DNA-DNA por checkerboard foi utilizado para identificar as taxa bacterianas antes (S1) e após a instrumentação (S2). O SAF também foi comparada com instrumento de níquel-titânio utilizando a técnica de instrumentação manual para redução bacteriana total. O sistema SAF reduziu significativamente as contagens de bactérias totais. Quantitativamente, a redução de 99,9% no total das contagens bacterianas associadas ao sistema SAF foi superior à redução de 95,1% obtido pela instrumentação manual ($P < 0,001$). O SAF resultou em e mais casos com resultados negativos de PCR para bactérias (54,5%) do que a instrumentação manual (4,5%) ($P < 0,001$). Análise checkerboard revelou que alguns estreptococos anaeróbios e até mesmo bactérias ainda-não cultivadas podem resistir aos efeitos de procedimentos químico-cirúrgico.

2.2 ESTUDOS *IN VIVO* DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DO PREPARO QUÍMICO-CIRÚRGICO E MEDICAÇÃO INTRA CANAL

Shuping et al. (2000), avaliaram a redução bacteriana com instrumentação rotatória de níquel-titânio e irrigação com NaOCl 1,25%. Além disso, foi testado o efeito anti-bacteriano adicional do hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) por uma semana. Foram coletadas amostras de quarenta e dois dentes com lesão periapical crônica antes do tratamento, durante e após a instrumentação, e após a medicação intracanal com Ca(OH)_2 . Houve um padrão de redução significativamente maior de bactérias quando NaOCl foi utilizado como irrigante, comparado com solução salina

estéril ($p < 0,05$). Após a instrumentação com NaOCl, 61,9% dos canais estavam livres de bactérias. A colocação de Ca(OH)_2 durante pelo menos 1 semana mostrou 92,5% dos canais livres de bactérias. Os resultados do estudo indicam que o preparo do canal com instrumentos rotatórios e NaOCl é um passo importante na redução de bactérias do canal e a adição de Ca(OH)_2 como medicação intracanal deve ser realizado para alcançar índices satisfatórios.

Siqueira Jr. et al. (2007c) avaliaram a eficácia antimicrobiana do NaOCl 2,5% e da medicação intracanal de Ca(OH)_2 associado a paramonoclorofenol canforado (PMCC). Utilizaram onze pré-molares inferiores portadores de periodontite apical crônica, os quais foram submetidos ao PQC, com instrumentos de níquel-titânio manuais, e medicados com Ca(OH)_2 /PMCC por 7 dias. Coletas microbianas foram realizadas antes e depois do preparo do canal, e após a remoção da medicação intracanal. A análise microbiana foi realizada por meio de PCR. O PQC com NaOCl 2,5% não foi capaz de eliminar as bactérias de todos os canais avaliados, pois 5 continham bactérias em suas luzes. Após a utilização da medicação, este índice diminuiu para 1.

Sakamoto et al. (2007) avaliaram a redução bacteriana promovida por procedimentos endodônticos e identificaram as taxa persistentes após o tratamento. Amostras de canais de dentes com periodontite apical foram coletadas antes (S1) e após o PQC com NaOCl 2,5% (S2) e após a medicação entre as sessões com uma pasta de Ca(OH)_2 (S3). As amostras foram submetidas a identificação de espécies bacterianas persistentes por clonagem de DNA e análise de biblioteca de clones e as bactérias foram quantificadas por qPCR. As amostras S2 e S3 de cinco dos 15 canais apresentaram resultados negativos. Nos outros casos, a instrumentação e a medicação intracanal promoveram redução significativa de 99,67 % e 99,85 %, respectivamente, em comparação com amostras S1. Foram identificadas quarenta e três taxa de bactérias distintas, dos quais 24 (56%) eram filotipos ainda não cultivados. *Streptococos* foram as taxa mais prevalentes inclusive nas amostras de pós-tratamento.

Rôças et al. (2010), identificaram as taxa bacterianas persistentes nos procedimentos do tratamento endodôntico utilizando método de RT-PCR e checkerboard por captura reversa. As amostras foram coletadas de canais

infectados de 15 dentes com periodontite apical antes do tratamento (S1), após o preparo químico-cirúrgico com NaOCl como irrigante (S2), e após a medicação intracanal entre as sessões com uma pasta de Ca(OH)_2 (S3). As bactérias foram encontrados em todas as amostras S1. Níveis detectáveis de RNA ribossômico bacteriano, usado como um indicador de viabilidade, foram observadas em 60% dos casos após o preparo químico-mecânico e medicação intracanal após 53%. As taxa mais prevalentes em S1 foram *O. Uli* (67%), *Pyramidobacter piscolens* (60%), *Streptococcus sp* (53%), e *Bacteroidetes X083* (53%). *Streptococcus sp* (47%), *Fusobacterium nucleatum* (40%), e *O. uli* (33%) prevaleceram em S2. *Streptococcus sp* (47%), *P. acnes* (27%), e *O. uli* (27%) foram mais freqüentes em S3.

Rôças et al. (2011b), avaliaram por método molecular independente de cultura, os efeitos antimicrobianos do preparo químico- cirúrgico complementado por medicação intracanal, durante o tratamento de dentes com periodontite apical. Foram coletadas amostras de 24 canais radiculares necrosados, antes do químico-cirúrgico (S1), após o preparo químico-cirúrgico, utilizando 2,5% NaOCl como irrigante (S2), e depois de 7 dias com medicação de Ca(OH)_2 com glicerina (CHG) ou paramonoclorofenol canforado / glicerina (CHPG) (S3). As presenças de bactérias, archaea e fungos foram avaliadas por PCR, e identificações bacterianas foram realizadas pelo checkerboard de captura reversa com 28 candidatos a patógenos endodônticos. Todas as amostras deram positivas para bactérias em S1, mas negativas para *Archaea* e fungos. Os procedimentos de tratamento foram altamente eficazes na redução dos níveis de bactérias e número de taxa. No geral, 46% das amostras S2 e 62,5% das amostras S3 foram negativas para bactérias. Especificamente, as amostras de S2 e S3 produziram resultados negativos de PCR em, respectivamente, 50% e 58% dos canais medicados com CHG, e em 42% e 67% para os canais no grupo CHPG. Diversas taxa ainda foram encontrados em amostras S2 e S3, e os mais prevalentes foram *P. acnes* e *Streptococcus spp*. Os níveis de bactérias e o número de taxa foram substancialmente reduzidos após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal. No entanto, os níveis detectáveis de bactérias persistentes, indicam que novas estratégias deve ser tomadas para tornar mais eficaz o tratamento antimicrobiano.

Beus et al. (2012) compararam *in vivo* os resultados da irrigação convencional com NaOCl 1% e da PUI com NaOCl 1% + EDTA 17% + CHX 2%,

bem como os efeitos da medicação intracanal de Ca(OH)_2 , na eliminação de bactérias de canais de dentes com periodontite apical de 50 pacientes. Os indivíduos foram divididos em 2 grupos e receberam tratamento endodôntico em 2 sessões, com uso de medicação intracanal de Ca(OH)_2 por um período de 14 dias. Após o PQC, Os dentes foram tratados aleatoriamente com um dos protocolos na primeira visita. Amostras microbiológicas foram coletadas em quatro momentos: (S1) antes de instrumentação, (S2), após o protocolo de irrigação, (S3) após a medicação, e (S4) antes da obturação. A irrigação convencional e a PUI resultaram em canais livres de bactérias em 80% e 84% dos casos, respectivamente, ao final da primeira visita. Após a medicação o total da amostra aumentou para 87% livre de bactérias, e a reinstrumentação gerou um total de 91%. Não houve diferença estatística entre os métodos de irrigação ou entre os resultados obtidos em uma ou duas sessões.

Paiva et al. (2013), avaliaram clinicamente os efeitos antibacterianos de procedimentos endodônticos utilizando análises de microbiologia molecular. Foram coletadas 14 amostras de canais radiculares necrosados de dentes com periodontite apical antes (S1) e após a instrumentação, com NaOCl (S2) como irrigante, e irrigação final com clorexidina (CHX) (S3) e depois de uma semana de medicação com Ca(OH)_2 (S4). Os parâmetros analisados foram os seguintes: incidência de resultados positivos para a presença de bactérias por meio de PCR de amplo espectro; impacto sobre as estruturas da comunidade bacteriana por PCR-desnaturation Gradient Gel Electrophoresis (DGGE); dados quantitativos de redução bacteriana por qPCR; e identificação de bactérias persistentes por clonagem e sequenciamento. Todas as amostras S1 foram positivas para bactérias em todos os testes. Os procedimentos promoveram a diminuição da diversidade microbiana e reduziram significativamente a incidência de resultados positivos e as contagens bacterianas ($P < 0,05$).

Nakamura (2014) analisou os efeitos dos procedimentos endodônticos e da irrigação ultrassônica passiva (PUI) em bactérias e endotoxinas de canais radiculares. Foram realizadas coletas microbiológicas de cinquenta pacientes com dentes com periodontite apical primária antes (S1) e após o PQC (S2), realizado com instrumentos reciprocantes e NaOCl 2,5% e EDTA 17%. após os protocolos de irrigação (S3) convencional (IC) e ultrassônica passiva, após a medicação intracanal

(S4) e após a reinstrumentação dos canais (S5). Em ambos os grupos, houve diminuição significativa na concentração de endotoxinas entre uma etapa do tratamento e a etapa posterior ($p < 0,05$). O mesmo foi observado quanto ao número de bactérias, exceto entre a remoção da medicação intracanal e a reinstrumentação antes da obturação (S5). A análise intergrupos demonstrou que, com relação às endotoxinas, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$). Com relação à redução bacteriana, a PUI foi capaz de reduzir significativamente mais o número de bactérias do que a IC ($p < 0,05$).

As amostras utilizadas neste estudo prévio quantitativo, serão analisadas no presente estudo com o objetivo de identificar quais bactérias persistem após o preparo químico-cirúrgico e medicação intra canal,

Apesar da grande evolução científica e técnica que a Endodontia apresentou no últimos anos, eliminar completamente o agente contaminante continua sendo um desafio, portanto estudos clínicos que identifiquem as espécies bacterianas persistentes no canal radicular após as manobras endodônticas são de grande importância, para estabelecer medidas eficazes e previsíveis para a redução das mesmas.

3 PROPOSIÇÃO

Diante da revisão da literatura atual apresentada, observa-se a importância da realização de trabalhos clínicos que analisem a susceptibilidade de determinadas bactérias de dentes portadores de periodontite apical após os procedimentos endodônticos. Assim, propõe-se com este trabalho os objetivos descritos neste capítulo.

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a presença e viabilidade de *Streptococcus* spp., *Propionibacterium acnes* e *Enterococcus faecalis* após os procedimentos endodônticos, utilizando o método de PCR baseado em RNA e DNA.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar e comparar as espécies bacterianas antes e após o preparo químico-cirúrgico e o uso de medicação intracanal;
- Determinar se o uso da medicação intracanal de hidróxido de cálcio eleva a redução de bactérias específicas;

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram cuidadosamente realizados, seguindo criteriosos protocolos de assepsia e de manuseio dos materiais a fim de se garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados. Os protocolos clínicos e laboratoriais podem ser visualizados nos Apêndices A, B e C.

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Os procedimentos clínicos foram realizados na Clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, mediante a prévia aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa 13396213.1.0000.0075 (Anexo A) desta instituição e após o consentimento livre e esclarecido dos pacientes (Apêndice D). Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

4.2 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Foram selecionados 20 pacientes portadores de infecção endodôntica primária, totalizando 20 dentes, com rarefação óssea periapical visível na radiografia, sem tratamento endodôntico prévio, em condições que justificavam a realização do tratamento endodôntico. Foram incluídos pacientes sem alterações sistêmicas relevantes, como doenças degenerativas crônicas, processos infecciosos, doenças autoimunes ou imunodeficiências induzidas ou adquiridas.

Foram excluídos desta pesquisa dentes que apresentavam bolsa periodontal superior a 4 mm, raízes com comprimento inferior a 15 mm ou superior a 25mm, apicigênese incompleta, perda de tecido dentário que impossibilite o isolamento absoluto, ou alterações na luz do canal radicular visíveis

radiograficamente, como calcificações ou reabsorções. Também foi necessário, a ausência de uso de antibióticos nos 90 dias anteriores ao início da pesquisa.

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

Figura 4.1 – Organograma dos procedimentos clínicos e de coletas microbiológicas

4.3 PREPARO DOS CANAIS RADICULARES E COLETAS MICROBIOLÓGICAS

Todos os instrumentos endodônticos e cones de papel absorvente utilizados foram adquiridos já livres de pirogênicos e pré-esterilizados pelo fabricante. Além disso, instrumentos clínicos metálicos eram processados e esterilizados em calor úmido a 121° C por 15 minutos. Após esta primeira esterilização, estes instrumentais eram transferidos para caixas metálicas e passavam por novo processo de esterilização e despirogenização em calor seco a 180° C por 4 horas (Hagman, 2012). Materiais termo sensíveis como pontas de irrigação e aspiração eram esterilizados por 20kGy de irradiação de raios Gama com Cobalto 60 por 6 horas.

As substâncias químicas utilizadas durante o tratamento endodôntico eram adquiridas sempre da mesma farmácia de manipulação e renovadas a cada semana a fim de mantê-las na mesma concentração e livres de contaminantes.

Nos dentes birradiculares e multirradiculares, as coletas foram realizadas nos canais de maior volume. Os orifícios de entradas dos outros canais eram selados com cimento endodôntico temporário a fim de se evitar a contaminação durante as coletas. Realizavam-se, então, os procedimentos endodônticos e de coletas no canal pesquisado. Após a conclusão destes procedimentos, este canal era selado provisoriamente e procedia-se com a realização do tratamento endodôntico dos outros canais.

Após o exame clínico e radiográfico inicial, os pacientes recebiam 10mL de antisséptico bucal para bochechar por 1 minuto. Então, os dentes eram anestesiados e procedia-se com o isolamento absoluto com arco plástico (SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), lençol de borracha (SSwhite), grampos metálicos adequados (SSwhite) e barreira gengival (Top Dam, FGM, São Paulo, SP, Brasil). A desinfecção do campo operatório e da coroa do dente era realizada com swabs esterilizados (Berkshire Corporation, North Carolina, Estados Unidos da América) 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, sendo este neutralizado por tiosulfato de sódio 5%.

Realizou-se a cirurgia de acesso em duas etapas, com auxílio de brocas diamantadas esféricas 1015HL (Microdont Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil) em alta-rotação, refrigerados com auxílio de seringas de 10mL (BD Company, São Paulo, SP, Brasil) e soro fisiológico esterilizado e apirogênico (Laboratórios B. Braun, São Gonçalo, RJ, Brasil), tomando-se o cuidado de não acessar a câmara pulpar. Após este procedimento, a coroa dental e o campo operatório eram novamente desinfetados e finalizava-se a cirurgia de acesso com novas brocas esterilizadas e apirogênicas, refrigeradas com soro fisiológico. Coletas da coroa dental e imediações da câmara pulpar eram realizadas para comprovar a eficácia das manobras de antissepsia. Comprovava-se a ausência de bactérias no campo operatório por meio de PCR convencional utilizando *primers* universais para o domínio *Bacteria*.

Ao término destes procedimentos, a câmara pulpar era aspirada e o canal radicular preenchido com solução salina esterilizada e apirogênica. O comprimento real de trabalho (CRT) era estabelecido com um instrumento tipo K número 10 (Dentsply Maillefer, Baillagues, Suíça) em 1,0mm aquém do forame apical, com auxílio de localizador foraminal (J. Morita Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Um instrumento tipo H número 15 era pressionado contra as paredes do canal para criar raspas de dentina e suspender bactérias na solução. Cinco cones de papel número 15 esterilizados e apirogênicos eram introduzidos individualmente no canal para coletar o conteúdo inicial de bactérias (S1), sendo mantidos em posição por 1 minuto cada. A parte ativa da lima utilizada e os os cones eram depositados em microtubos esterilizados contendo 300µL de solução RNA later (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos da América), para análise de bactérias.

Solução de NaOCl 2,5% era depositada na câmara pulpar e levada progressivamente no sentido coroa-ápice com um instrumento tipo K número 10 (Dentsply Maillefer), agitando a substância, de modo a permitir um contato mais rápido do NaOCl com o conteúdo do canal. Este processo era repetido, até se alcançar o CRT estabelecido.

Após a odontometria e o esvaziamento do canal, instrumentos manuais do tipo K eram levados sem pressão até o CRT, em ordem crescente de diâmetro - iniciando do instrumento número 10 ao número 40 (Dentsply Maillefer). O primeiro

instrumento que demonstrasse travamento no CRT era utilizado como base para a escolha do instrumento Reciproc (VDW GmbH, Munique, Alemanha) a ser utilizado. Se este diâmetro fosse compatível com instrumentos 10 ou 15, o dente era excluído da pesquisa, mas para não prejudicar o paciente, o tratamento era continuado, utilizando-se instrumento Reciproc R25 no preparo do canal. Caso houvesse travamento nas limas 20, 25 ou 30, o instrumento Reciproc R40 era escolhido. Já o instrumento Reciproc R50 era utilizado em canais cujo instrumento inicial de referência era de número 35 ou 40. Todo o PQC era realizado na presença de NaOCl 2,5% com a seguinte cinemática: o instrumento era acionado por motor VDW-silver (VDW GmbH) ajustado em movimento recíprocante, seguindo sequências de três ciclos de penetração/retrocesso, de forma a aprofundar o preparo a cada ciclo, ao término da sequência, o instrumento era limpo com uma gaze esterilizada, e o canal irrigado com NaOCl 2,5%. O CRT era alcançado apenas no último ciclo do preparo do canal.

Durante o PQC, a irrigação dos canais foi realizada com seringas plásticas esterilizadas e apirrogênicas de 10mL. A substância extravasada dos canais era aspirada por meio de cânulas de aspiração (SurgiTip - Ultradent Products Inc) acopladas à bomba à vácuo odontológica. Foram utilizados 10mL de NaOCl antes de cada ciclo de instrumentação, assim, o volume total de substância empregada durante o PQC era de 30mL. Ao término do preparo químico mecânico os canais radiculares recebiam nova irrigação com 10mL de NaOCl 2,5%. As pontas irrigadoras eram posicionadas à aproximadamente 2mm aquém do CRT e utilizadas com movimento de vai e vem, com amplitude de aproximadamente 2mm.

Após a finalização do PQC, foi feito o protocolo de irrigação final. Realizava-se irrigação convencional com seringas plásticas e pontas de irrigação endodôntica com diâmetro de 30G e saída lateral (Endo-EZE - Ultradent Products Inc.) com 2mL de NaOCl 2,5%, após a solução de NaOCl 2,5% era renovada (2mL). Repetia-se estes procedimentos duas vezes com 2mL de EDTA-T 17% e, novamente, duas vezes com 2mL de NaOCl 2,5%.

Após o conteúdo do canal era aspirado com pontas *Capillary tips* 0,014" e 0,019" e nova irrigação com 5mL de tiosulfato de sódio 5% por 1 minuto era

realizada. Os canais eram então aspirados e secos novamente, e preenchidos com soro fisiológico esterilizado e aprotínico para a realização de uma nova coleta (S2).

Ao término desse procedimento a coleta canais radiculares procedia-se com a secagem do canal, com pontas de papel absorvente, e o preenchimento com Ca(OH)_2 veiculado em glicerina (Calen, SSwhite). Radiografias periapicais eram realizadas a fim de confirmar o completo preenchimento do canal radicular pela medicação intracanal. As aberturas coronárias eram seladas com uma camada de 2mm de espessura de obturador provisório endodôntico (Dentalvile, Joinville, SC, Brasil) e uma camada de cimento de ionômero de vidro (Vidrion R).

Após o período de 14 dias, os procedimentos de isolamento absoluto, abertura coronária e desinfecção do campo operatório eram realizados seguindo o mesmo protocolo utilizado na primeira sessão. A medicação intracanal era removida utilizando 10mL de EDTA 17% e leve agitação com limas tipo K número 15. Então, uma terceira coleta (S3) era realizada seguindo os mesmos procedimentos realizados nas coletas anteriores. Feito isso, os canais eram irrigados com 10mL de NaOCl 2,5% e instrumentados novamente com um instrumento idêntico ao utilizado na primeira sessão. Procedia-se com nova irrigação com 10mL de NaOCl 2,5%, seguido por 10mL de EDTA-T 17%, com seringa e pontas de irrigação. Então os canais eram obturados por meio de técnica de condensação lateral de guta-percha e cimento AH-Plus (Dentsply Maillefer). As aberturas coronárias eram seladas com resina composta (Z350, 3M Corporation, St. Paul, MN, Estados Unidos da América) e uma radiografia final de tratamento era realizada.

4.4 EXTRAÇÃO DE DNA E RNA

As amostras endodônticas mantidas em RNAlater foram descongeladas a 37°C por 10 min e homogeneizadas por agitação durante 1 min. A extração de DNA e RNA foi realizada com o kit de purificação MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre Technologies, Madison, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. (Apêndice C)

Após a extração dos ácidos nucleicos totais, as amostras foram divididas em duas partes iguais de 17,5 μ L. A primeira constituía os ácidos nucleicos totais para análise de DNA e a segunda, sofreu um processo de purificação para extração de RNA.

Primeiramente foi feito a purificação do RNA de acordo com as recomendações do fabricante e, após, um segundo tratamento com DNase foi realizado para garantir que todo o DNA fosse extraído das amostras de RNA.

Em seguida uma PCR foi realizada para conferir se as amostras estavam livres de DNA. Para isso foram utilizados primers universais para região 16S rRNA. A quantificação dos ácidos nucleicos em cada amostra foi realizada no aparelho do NanoDrop e analisada pelo software ND-1000.

Para as amostras de RNA, foi realizada a transcriptase reversa para sintetizar cDNA da amostra, a partir do RNA, utilizando o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, São Paulo, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante. Para cada amostra analisada foi utilizado 2 μ L de tampão Buffer (Fermentas, Ontário, Canadá), 4 μ L de $MgCl_2$, 2 μ L de DTT, 1 μ L de RNase OUT e 1 μ L de SuperScript III.

4.5 ANÁLISE QUALITATIVA POR PCR

As amostras clínicas foram descongeladas à temperatura ambiente e 2 μ L de alíquotas de DNA e RNA foram utilizados como moldes no gene 16S rRNA baseado em um método de PCR para a detecção de 3 filotipos de bactéria. Os oligonucleotídicos iniciadores são listados no Quadro 4.1. A amplificação por PCR foi realizada em 50 μ L de uma mistura de reação contendo 1 mmol / L de concentração de cada um dos *primers*, 5 μ L de tampão de 10x PCR (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), 3 mmol / L de $MgCl_2$, 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies) e 0,2 mmol / L de cada trifosfato de desoxirribonucleosido (Invitrogen Life Technologies).

Os controles negativos eram constituídos de água estéril, e foram incluídas em cada lote de amostras analisadas. Para controles positivos, foram utilizadas DNA extraído de amostras de *E. faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus mutans* ATCC

25175 e *P. acnes* ATCC 11827, utilizando uma outra técnica molecular de PCR amplificado, usando os mesmos iniciadores e protocolo aqui descrito, e os produtos de PCR foram seqüenciados para confirmar a especificidade do método. Estes produtos de PCR foram diluídos e utilizadas como controlos positivos (Figuras 4.2 a 4.4).

As reações de PCR foram realizadas com *primers* específicos. A sequência utilizada para os primers está descrita no Quadro 4.1.

Taxa alvo	Sequência (5–'3)	Tamanho de pares de base (pb)	Temp. de Anelamento (°C)	Referência
Streptococcus species	5- AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG -3 5-TTA GCC GTC CCT TTC TGG T-3	502	58°	Rôças et al. (2008)
Propionibacterium acnes	5- GGGTTGTAAACCGCTTTC- GCTG -3 5- GGCACACCCATCTCTGAG- CAC -3	600	54°	Rôças e Siqueira Jr. (2010)
Enterococcus faecalis	5- GTT TAT GCC GCA TGG CAT AGG AG -3 5- CCG TCA GGG GAC GTT CAG -3	310	60°	Sundqvist et al. (1998)

Quadro 4.1 – Oligonucleotídicos Iniciadores de 3 filotipos de bactérias

Figura 4.2- Eletroforese em gel de agarose da reação em cadeia da polimerase -Controle positivo - *Streptococcus species* (502bp)

Figura 4.3- Eletroforese em gel de agarose da reação em cadeia da polimerase -Controle positivo - *P. Acnes* (600bp)

Figura 4.4 - Eletroforese em gel de agarose da reação em cadeia da polimerase -Controle positivo – *E. Faecalis* (310bp)

O ciclo de amplificação está descrito no Apêndice C.

As reações foram feitas utilizando o termociclador *Step One Plus* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e os resultados analisados pelo software ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Todas as amostras foram corridas em duplicata, utilizando-se para análise o valor médio entre ambas.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos foram organizados em tabelas para posterior avaliação e discussão dos resultados.

5 RESULTADOS

A análise foi composta por 20 dentes, dos quais 14 dentes unirradiculares e 6 dentes bi ou multirradiculares. As características clínicas de cada caso podem ser visualizadas no Apêndice E.

A análise por PCR convencional das amostras do campo operatório não detectou a presença de DNA bacteriano, confirmando a eficácia dos procedimentos de desinfecção do campo.

Na análise de DNA, a espécie mais prevalente nas amostras S1 foi *Streptococcus* spp. (5/20 canais [25%]). Nenhuma amostra foi positiva para *E. faecalis* e *P. acnes*. Das espécies-alvo, apenas *Streptococcus* spp. e *Propionibacterium acnes* foram detectados após os procedimentos químico-cirúrgico (S2), (2/20 canais [10%]) e (1/20 canais [5%]) respectivamente. Nenhuma amostra foi positiva para *E. faecalis* em S2. Das amostras após 14 dias de medicação intracanal (S3), 20% das amostras (4/20 canais) foram positivo para *Streptococcus* spp.. Nenhuma amostra foi positiva para *E. faecalis* e *P. acnes* em S3 (Tabela 5.1).

Na análise de RNA, a espécie mais prevalente em amostras S1 foram *Streptococcus species* (4/20 canais [20%]), seguido de *P. acnes* (2/20 canais [10%]). Nenhuma amostra S1 foi positiva para *E. faecalis*. Das amostras S2, apenas *P. acnes* foi detectado após os procedimentos químico-cirúrgico (2/20 canais [10%]). Nenhuma amostra foi positiva para *E. faecalis* e *Streptococcus* spp. em S2. Das amostras após 14 dias de medicação intracanal (S3) apenas *Propionibacterium acnes* (2/20 canais [10%]) deram positivo. Nenhuma amostra foi positiva para *E. faecalis* e *Streptococcus* spp. em S3. (Tabela 5.1).

Tabela 5.1– Prevalência de taxa bacteriana antes e após procedimentos químico-cirúrgico e medicação intracanal pelo método PCR baseado em rDNA e RNA (n=20)

TAXA ALVO	S1		S2		S3	
	DNA	RNA	DNA	RNA	DNA	RNA
<i>Streptococcus spp.</i>	5 (25%)	4 (20%)	2 (10%)	0	4 (20%)	0
<i>P. acnes</i>	0	2 (10%)	1 (5%)	2 (10%)	0	2 (10%)
<i>E. faecalis</i>	0	0	0	0	0	0
Bactérias estudadas	5 (25%)	6 (30%)	3 (15%)	2 (10%)	4 (20%)	2 (10%)

As tabelas 5.2 e 5.3 mostram a taxa de detecção de *Streptococcus species* e *P. acnes*, respectivamente, por ensaios baseados em DNA e RNA.

Para *Streptococcus spp.*, em S1, 2/20 canais deram positivos para ambos os métodos DNA e RNA. 2/20 deram positivos apenas para o RNA e 3/20 canais deram positivos apenas para o DNA. Em S2, 2/20 canais deram positivos apenas para o método baseado em DNA, já no método de RNA deram negativo. Para S3 4/20 canais foram positivos apenas para DNA e negativos para RNA. Nenhum caso foi positivo para RNA e negativo para DNA (Tabela 5.2).

Para *P. acnes*, em S1 nenhuma amostra foi positiva para ambos os métodos de DNA e RNA. 2/20 canais foram positivos para RNA e negativo para DNA. Para S2, 1/20 canais foi positivo para DNA, já no método de RNA deram negativo e 2/20 canais foram positivos apenas para o método de RNA. Em S3, 2/20 canais foram positivos para RNA e negativo para DNA. Porém nenhuma amostra foi positiva para ambos os métodos (Tabela 5.3).

Para *E. faecalis* todas as amostras deram negativas para ambos os métodos baseados em DNA e RNA.

Tabela 5.2- Taxas de detecção de *Streptococcus* spp. por ensaios baseados em DNA e rRNA

		S1		S2		S3	
		DNA		DNA		DNA	
		+	-	+	-	+	-
RNA	+	2	2	0	0	0	0
	-	3	13	2	18	4	16

Tabela 5.3- Taxas de detecção de *Propionibacterium acnes* por ensaios baseados em DNA e rRNA

		S1		S2		S3	
		DNA		DNA		DNA	
		+	-	+	-	+	-
RNA	+	0	2	0	2	0	2
	-	0	18	1	17	0	18

6 DISCUSSÃO

Os critérios de inclusão e exclusão dos vinte pacientes portadores de dentes com periodontite apical primária com necessidade de tratamento endodôntico, selecionados para esta pesquisa, foram estabelecidos de acordo com outros trabalhos clínicos previamente publicados (Vianna et al., 2006; Rôças; Siqueira Jr., 2011b). Foram incluídos dentes uni, bi e multirradiculares, devido à dificuldade em se obter casos clínicos que se enquadrassem em todos os critérios de inclusão. Vários trabalhos na literatura também relatam a inclusão de todos os grupamentos dentários (Paiva et al., 2013).

Diversos trabalhos (Vianna et al., 2006; Rôças et al., 2013) utilizaram o método de coleta semelhante ao que se usou nessa pesquisa, no qual, os cones de papel pré-esterilizados e livres de pirogênicos, eram mantidos por um minuto cada no interior dos canais radiculares após a suspensão do conteúdo microbiano com auxílio de limas tipo Hedström. Essa metodologia é utilizada em estudos que avaliam o efeito dos procedimentos endodônticos no conteúdo microbiológico dos canais radiculares. Há limitações, pois a amostra coletada representa apenas o conteúdo da luz do canal e da área que o instrumento teve contato. Logo, as áreas que o instrumento não agiu ou a dificuldade da própria anatomia interna não foram representadas. Porém, como se trata de uma pesquisa *in vivo*, o principal objetivo era a manutenção do dente e a restauração à sua função, impossibilitando neste caso, métodos de coleta mais invasivos.

O método de PCR baseado no RNA utilizado neste estudo permitiu a detecção de bactérias viáveis em canais radiculares de dentes com periodontite apical, antes e após o tratamento. A grande maioria dos estudos clínicos que avaliaram os efeitos anti-bacterianos de procedimentos de tratamento endodôntico foram baseados em técnicas de cultura. Embora o método da cultura tenha a vantagem de detectar células viáveis, é sabido que esta técnica tem limitações importantes, incluindo a baixa sensibilidade, dificuldades na captação de espécies de difícil cultura, e incapacidade de crescimento em condições artificiais de laboratório (Siqueira; Rôças, 2009).

Por outro lado, o método molecular baseado na detecção do RNA bacteriano apresenta vantagens em relação ao método da cultura. O RNA é um indicativo da presença de bactérias vivas em replicação (Van der Vliet et al., 1994). Os níveis de RNA estão correlacionados com a atividade celular bacteriana (Miskin et al., 1999; Kramer; Singleton, 1992, 1993), então, a análise proveniente da sequência de RNA, pode fornecer uma indicação mais representativa dos membros viáveis de uma comunidade bacteriana. O RNA-alvo pode ser o RNA mensageiro (mRNA) ou o RNA ribossômico (rRNA). Segundo Keer e Birch (2003), devido o mRNA ser mais lábil do que o rRNA, seria melhor para analisar a viabilidade bacteriana. Porém, a vantagem do rRNA é que este é um elemento universal entre as bactérias, sendo comumente utilizado para identificação de diferentes espécies bacterianas. Além disso, métodos que têm como alvo o rRNA são mais sensíveis, pois há um elevado número de cópias de rRNA em células bacterianas ativas (Pitkänen et al. 2013). Assim, neste presente estudo optou-se por avaliar a detecção de bactérias e sua viabilidade a partir do rRNA, porque a identificação de bactérias foi o principal objetivo desta pesquisa.

Além de detectar viabilidade bacteriana, o método utilizando o rRNA apresenta uma maior sensibilidade quando comparado ao método da cultura. Embora técnicas baseadas em RNA podem superar muitas das limitações da cultura, só existe um trabalho na literatura que utilizou essa técnica para avaliar os procedimentos endodônticos (Rôças et al., 2010). No estudo anterior o rRNA foi utilizado em associação com o método de checkerboard, enquanto nesse estudo foi utilizado o rRNA em associação com a PCR, que possui uma sensibilidade maior do que o método de checkerboard.

Outra vantagem desta pesquisa é que foi utilizada a mesma amostra do canal radicular para extração simultânea do DNA e RNA, o que permitiu uma comparação direta entre os métodos. A maioria dos trabalhos utiliza amostras diferentes para extração de DNA e RNA, resultando em uma variabilidade intrínseca entre as amostras (Williams et al., 2006; Rôças; Siqueira Jr., 2010). Além disso, a utilização de uma única amostra nesse estudo reduziu o custo e diminuiu o tempo de extração dos ácidos nucleicos, como previamente relatado por Pitkänen et al. (2013).

Quando comparado com o DNA, o RNA possui uma meia-vida mais curta após a morte bacteriana, de modo que eles podem ser mais confiáveis para detectar a viabilidade das bactérias. Os riscos de detecção do DNA de células microbianas que morreram recentemente podem dificultar uma análise confiável dos efeitos antimicrobianos do tratamento por meio de métodos moleculares baseados em DNA. Esse fato foi comprovado no presente estudo, em que 9 amostras foram positivas no ensaio de DNA e negativas no ensaio de RNA. Esta descoberta confirma estudos prévios relatando que o DNA pode persistir por um longo tempo no dente após a morte bacteriana, devido a sua afinidade de ligação à hidroxiapatita, o que o torna menos suscetível à degradação pelo soro e nucleases (Brundin et al., 2010, 2013). Em estudo anterior utilizando um ensaio de PCR baseada em DNA, Sakamoto et al. (2007), sugeriram que o DNA de células mortas poderiam ser destruídos pelos efeitos de substâncias químicas e medicação intracanal. Entretanto, no presente estudo, o DNA detectado em algumas amostras representavam células mortas, fato revelado apenas pela análise de RNA.

Por outro lado, 8 amostras foram positivas no ensaio de RNA e negativas no ensaio de DNA, mostrando que o método de PCR baseado rRNA oferece uma maior sensibilidade quando comparado ao PCR com base em DNA (Kempell et al., 2000, Pitkänen et al., 2013). Isso pode ser explicado pelo fato das bactérias apresentarem um maior número de cópias de rRNA em comparação com os seus genes de DNA (Condon et al., 1995).

No entanto, o RNA é mais difícil de preservar e isolar do que o DNA, isso deve-se principalmente à rápida degradação de moléculas de RNA por enzimas (RNases) que são altamente estáveis. Devido a isso, após a coleta, as amostras do presente estudo eram mantidas em RNAlater. Esse meio de transporte evita a degradação do RNA, tornando os resultados ainda mais confiáveis (Pitkänen et al., 2013). Estudo prévio mostrou que amostras preservadas em RNAlater apresentaram um maior número de cópias do que aquelas preservadas em meios que não continham esse agente estabilizador de RNA (Pitkänen et al., 2013).

As bactérias selecionadas nesse estudo foram espécies Gram-positivas presentes em infecções endodônticas primárias, e provavelmente associadas a infecções persistentes (Rôças; Siqueira Jr., 2010, Rôças; Siqueira Jr., 2012; Siqueira

Jr.; Rôças, 2008). Bactérias Gram-positivas são mais freqüentemente encontradas em casos nos quais o tratamento não foi bem sucedido em reduzir as bactérias a níveis detectáveis pela técnica microbiológica (Bystrom; Sundqvist, 1985; Peters et al., 2002; Siqueira et al., 2007a, 2007b, 2007c; Sakomoto et al., 2007; Sjogren et al., 1997; Chavez de Paz, 2004). Portanto, esse trabalho avaliou os efeitos de procedimentos endodônticos contra algumas espécies Gram-positivas: *Streptococcus* spp., *P. acnes* e *E. faecalis*.

E. faecalis é uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram-positiva, que está associada a infecções persistentes/ secundárias após o tratamento endodôntico. Neste estudo não foram detectados *E. faecalis* em nenhuma das amostras, tanto no método baseado em DNA quanto no RNA. Esse achado está de acordo com estudos prévios relatando uma baixa prevalência de enterococos em infecções primárias do canal radicular (Rôças; Siqueira Jr., 2010) e em contraste com aqueles que relataram uma alta prevalência desse micro-organismo em canais com polpa necrótica (Gomes et al., 2006). A diferença entre os estudos pode ser atribuída aos métodos microbiológicos utilizados e à seleção dos casos. A ausência de *E. faecalis* no nosso estudo e em estudos prévios pode ser devido ao fato de pequenas alíquotas da amostra terem sido utilizadas para análise de PCR ou pelo fato de serem bactérias mais comumente relacionadas infecções persistentes/ secundárias após o tratamento endodôntico (Zacaria et al., 2014; Murad et al., 2014). A natureza resiliente de *E. faecalis* em infecções endodônticas já foi citada por muitos autores (Sundqvist et al., 1998; Peciulienė et al., 2000; Pinheiro et al., 2003). Como este organismo é pouco frequente nas infecções primárias do canal radicular, sua origem no casos pós-tratamento endodônticos é questionada. Nossos resultados corroboram com estudos prévios que sugerem que essas bactérias não estavam presentes em níveis detectáveis nas infecções endodônticas primárias. Portanto, a inclusão dessa espécie durante o tratamento endodôntico pode ter ocorrido por exposição do canal radicular ao meio bucal, bem como pela infiltração das margens de restaurações permanentes (Zehnder; Guggenheim, 2009). Em qualquer caso, parece que uma vez estabelecido no sistema de canais radiculares, os enterococos são capazes de resistir a uma variedade de manobras do tratamento endodôntico para a sua eliminação. Ratificando a importância de um excelente vedamento

coronário após o tratamento endodôntico e de condutas severas de antiseptia para evitar contaminação.

Os *Streptococcus* spp. geralmente são as espécies anaeróbias facultativas mais comumente encontradas em infecções endodônticas primárias (Gomes et al., 2004). Estes organismos são colonizadores primários no biofilme bacteriano e conseguem penetrar nos túbulos dentinários tanto individualmente como em co-agregação com outros organismos (Love, 2004). No presente estudo, o *Streptococcus* spp. foram as mais prevalentes dentre as espécies estudadas, presentes em 25% e 20% das amostras S1 pelos métodos baseados em DNA e RNA, respectivamente. A concordância dos métodos evidencia que essas espécies estavam viáveis e ativas nas infecções endodônticas iniciais na maioria dos canais contaminados por estreptococos. Por possuírem boa adaptação às mudanças do meio ambiente, *Streptococcus* spp. podem ter o potencial de sobreviver após o tratamento de canal. Estas espécies já foram encontradas após os procedimentos endodônticos em estudos prévios utilizando os métodos da cultura (Bystrom; Sundqvist, 1985; Peters et al., 2002; Chavez de Paz et al., 2004) e métodos moleculares baseados em DNA (Siqueira et al., 2007a, 2007b, 2007c; Sakamoto et al., 2007; Vianna et al., 2007). No presente estudo, a PCR baseada em DNA detectou *Streptococcus* spp. nas amostras após PQC (10% das amostras S2) e após MIC (20% das amostras S3). Porém, quando comparado ao método baseado em RNA, os resultados foram negativos para S2 e S3. Esses dados revelaram que o PQC foi eficaz na redução dessa espécie bacteriana e a medicação intra-canal foi capaz de manter essa redução. Esses resultados estão de acordo com estudos recentes *in vivo* utilizando métodos moleculares (Rôças; Siqueira Jr., 2011b) que confirmaram que a maior redução bacteriana dos canais radiculares ocorre após o preparo químico-cirúrgico.

A grande redução de *Streptococcus* spp. nesse estudo pode ser atribuída aos procedimentos utilizados no preparo mecânico e irrigação dos canais radiculares. Os instrumentos endodônticos Reciproc utilizados nesta pesquisa para o PQC são caracterizados por sua cinemática de ativação que, segundo o fabricante, consiste em ciclos de uma rotação de 150° no sentido anti-horário seguida por uma rotação de 30° no sentido horário. A diferença cada movimento diminui a tensão elástica sobre o metal, aumentando sua resistência à fratura cíclica (Gavini et al.,

2012). Vários trabalhos demonstram que os instrumentos endodônticos reciprocantes são tão eficazes quanto os instrumentos de rotação contínua e a instrumentação com técnica manual na diminuição de micro-organismos do canal radicular. Alves et al. (2012), Machado et al. (2013) e Basmaci et al. (2013) comprovaram a eficácia destes instrumentos na antissepsia de canais radiculares.

A substância química utilizada nesta pesquisa durante o PQC foi o NaOCl 2,5%, devido à sua eficácia na desinfecção de canais radiculares, característica já amplamente estudada e comprovada (Siqueira Jr. et al., 2007b; Tirali et al., 2009; Basmaci et al., 2013; Nakamura et al., 2013). Outra substância utilizada neste estudo foi o EDTA 17% cuja ação auxilia na limpeza dos canais radiculares e atua na remoção do magma dentinário resultante do PQC (De Deus et al., 2006; Andrabi et al., 2013). Siqueira Jr. et al. (1998) avaliaram o efeito antimicrobiano do EDTA 17%, ácido cítrico 10%, NaOCl em três diferentes concentrações (0,5%, 2,5% e 4%) e CHX 0,2% e 2%, por meio de halos de inibição em placas de Petri contendo culturas de bactérias de canais radiculares. Observaram que o EDTA 17% e o ácido cítrico 10% possuem ação antimicrobiana superior ao NaOCl 0,5% e inferior ao NaOCl 2,5% e 4%, e ao CHX 0,2% e 2%.

A irrigação deste estudo foi feito pelo método convencional com seringas plásticas, com grande volume de irrigante e em profundidade adequada no canal radicular. Essa técnica de irrigação possui uma eficácia antimicrobiana comprovada em estudos clínicos prévios (Beus et al., 2012). Nakamura (2014) comparou a eficácia da irrigação ultrassônica passiva (PUI) com a irrigação convencional sobre a remoção de bactérias e endotoxinas de canais radiculares. Quarenta dentes com periodontite apical foram divididos em dois grupos, PUI (n = 20) e irrigação convencional (IC) (n = 20). A coleta das amostras realizada antes (S1) e após a preparação do canal radicular (S2), após os protocolos de irrigação (S3), e após a retirada do medicamento intracanal (S4). Houve uma diminuição significativa dos níveis de bactérias e endotoxinas entre um passo e o outro subsequente de tratamento em ambos os grupos ($p < 0,05$). Ambos os métodos de irrigação foram eficazes na redução dos níveis de bactérias e endotoxinas

Nesse estudo, embora o PQC tenha sido eficaz em reduzir *Streptococcus* spp. dos canais radiculares, o mesmo não eliminou *P. acnes*; ou seja, existe

variação de susceptibilidade entre as espécies bacterianas Gram-positivas. Nesse estudo, pelo método de RNA, constatamos que essa bactéria estava presente em 10% das amostras S1, e permanecem ativas em S2 e em S3. Esses achados revelaram que o PQC e a MIC não foram capazes de eliminar *P. acnes* dos canais radiculares infectados por esses micro-organismo, podendo ser este um fator de risco para evolução de uma infecção persistente.

Propionibacterium spp. são bactérias anaeróbias estritas Gram-positivas mais comumente encontradas em casos de infecções persistentes (Zacaria et al., 2014; Rôças; Siqueira Jr., 2010; Fuji et al., 2009), em lesões periapicais refratárias ao tratamento endodôntico (Fuji et al., 2009) e em biofilmes extraradiculares (Wang et al., 2012). Estudos anteriores constataram que estas bactérias são capazes de resistir aos procedimentos do tratamento endodôntico (Siqueira et al., 2007a; Peters et al., 2002; Rôças et al., 2010; Sakamoto et al., 2007; Chavez de Paz et al., 2004). A persistência desse micro-organismo pode estar associada a sua capacidade de se organizar em biofilme, tornando-o mais resistentes aos antimicrobianos. Além disso, a presença de biofilmes microbianos em irregularidades anatômicas inacessíveis aos instrumentos endodônticos podem não ser afetados pelas substâncias químicas de irrigação e medicação intra-canal (Alves et al., 2011; Siqueira Jr.; Rôças, 2008). Chavez de Paz et al. (2007) demonstraram que bactérias que agrupavam-se formando complexos biofilmes aumentam sua resistência aos antimicrobianos e diminuem sua susceptibilidade às alterações ambientais. Além disso, alguns micro-organismos são capazes de suportar a elevações do pH do meio em que se encontram (Evans et al., 2002).

Estudos *in vivo* demonstraram a capacidade limitada do Ca(OH)_2 em eliminar bactérias dos canais radiculares (Sakamoto et al., 2007; Rôças; Siqueira Jr., 2011b; Paiva et al., 2013). Esses achados também foram observados nesse estudo, no qual mesmo após o PQC e medicação intracanal com Ca(OH)_2 o *P. acnes* foi detectado ativo nos canais radiculares. Porém, trabalhos clínicos de acompanhamento radiográfico devem ser realizados para aumentar a compreensão destes resultados e as implicações no sucesso do tratamento.

As bactérias que participam de infecções persistentes podem ser identificadas como aquelas presentes no canal no momento da obturação. É

possível que muitas das bactérias detectadas, possam não estar em número suficiente e não ter tido tempo para estabelecer uma infecção persistente. Provavelmente muitas não resistirão após a obturação. No entanto, aquelas que conseguem persistir no ambiente modificado pela ação das substâncias químicas, instrumentação e medicação intracanal, podem gerar uma infecção persistente e comprometer o sucesso do tratamento.

Nesse estudo foram utilizados métodos moleculares bastante sensíveis para detectar algumas espécies bacterianas viáveis nos canais radiculares. Porém, novos estudos com amostras maiores devem ser realizados com o objetivo de comparar a suscetibilidade de diferentes espécies com o sucesso do tratamento endodôntico. Acompanhamentos radiográficos dos casos investigados microbiologicamente devem ser realizados afim de investigar se as bactérias viáveis remanescentes no canal radicular são capazes de promover infecção.

No presente estudo, a espécie mais comumente identificada em amostras pós-procedimento químico- cirúrgico e pós-medicação intra-canal foi *P. acnes*. Na falta de estudos longitudinais que confirmem a relação entre a presença de bactérias específicas no momento da obturação e a falha de tratamento, os resultados atuais sugerem que algumas espécies bacterianas, como *P. acnes*, tem o potencial de serem consideradas fatores de risco a infecções persistentes. Esses dados sugerem que é necessário melhorias ou modificações em estratégias, técnicas, instrumentos e substâncias para que se tenha uma maior redução das bactérias ou a redução em níveis que não ocorra uma infecção persistente.

7 CONCLUSÃO

Pela metodologia empregada nesse estudo, podemos concluir que:

- a suscetibilidade bacteriana aos procedimentos endodônticos variou entre as espécies Gram-positivas estudadas.
- o método baseado em rRNA revelou que *Streptococcus* spp. foram suscetíveis ao PQC e MIC, enquanto *P. acnes* permaneceu ativo nos canais radiculares mesmo após os procedimentos de antissepsia.

REFERÊNCIAS¹

Alves FR, Almeida BM, Neves MA, et al. Disinfecting oval-shaped root canals: effectiveness of different supplementary approaches. *J Endod*. 2011 Apr;37(4):496-501.

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

Andrabi SM, Kumar A, Mishra SK, et al. Effect of manual dynamic activation on smear layer removal efficacy of ethylenediaminetetraacetic acid and SmearClear: an in vitro scanning electron microscopic study. *Aust Endod J*. 2013 Dec;39(3):131-6

Basmaci F, Oztan MD, Kiyan M. Ex vivo evaluation of various instrumentation techniques and irrigants in reducing *E. faecalis* within root canals. *Int Endod J*. 2013 Sep;46(9):823-30. doi: 10.1111/iej.12067. Epub 2013 Feb 26.

Beus C, Safavi K, Stratton J, et al. 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.

Brundin M, Figdor D, Roth C, et al. Persistence of dead-cell bacterial DNA in ex vivo root canals and influence of nucleases on DNA decay in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Dec;110(6):789-94. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.07.010.

Brundin M, Figdor D, Sundqvist G, et al. DNA binding to hydroxyapatite: a potential mechanism for preservation of microbial DNA. *J Endod*. 2013 Feb;39(2):211-6. doi: 10.1016/j.joen.2012.09.013. Epub 2012 Oct 25.

Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J*. 1985;18:35–40.

Chavez de Paz LE. Gram-positive organisms in endodontic infections. *Endod Topics*. 2004;9:79–96.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Dahlén G, et al. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. *Int Endod J*. 2007 May;40(5):344-55.

Chavez de Paz LE, Dahlen G, Molander A, et al. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J*. 2003;36:500–58.

Chavez de Paz LE, Molander A, Dahlen G. Gram-positive rods prevailing in teeth with apical periodontitis undergoing root canal treatment. *Int Endod J*. 2004;37:579–87.

Condon C, Squires C, Squires CL. Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*. 1995;59:623–45.

De-Deus G, Paciornik S, Mauricio MH. Evaluation of the effect of EDTA, EDTAC and citric acid on the microhardness of root dentine. *Int Endod J*. 2006 May;39(5):401-7.

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, et al. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2002 Mar;35(3):221-8.

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

Gavini G, Caldeira CL, Akisue E, et al. Resistance to flexural fatigue of Reciproc R25 files under continuous rotation and reciprocating movement. *J Endod*. 2012 May;38(5):684-7.

Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J*. 1996 Jul;29(4):235-41.

BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Apr;19(2):71-6.

Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Aug;102(2):247-53.

Hagman DE. Sterilization. In: Allen LV. Remington: The science and practice of pharmacy. 22nd ed. Philadelphia (PA): Pharmaceutical Press; 2012. p. 776-802.

Keer JT, Birch L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *J Microbiol Methods*. 2003;53:175–83.

Kempsell KE, Cox CJ, Hurle M, et al. Reverse transcriptase-PCR analysis of bacterial rRNA for detection and characterization of bacterial species in arthritis synovial tissue. *Infect Immun*. 2000;68:6012–26.

Kramer JG, Singleton FL. Measurement of rRNA variations in natural communities of microorganisms on the southeastern U.S. continental shelf. *Appl Environ Microbiol*. 1993;59:2430–6.

Kramer JG, Singleton FL. Variations in rRNA content of marine *Vibrio* spp. during starvation-survival and recovery. *Appl Environ Microbiol*. 1992;58:201–7.

Love R. Invasion of dentinal tubules by root canal bacteria. *Endod Topics*. 2004;9:52–65.

Machado ME, Nabeshima CK, Leonardo MF, et al. Influence of reciprocating single-file and rotary instrumentation on bacterial reduction on infected root canals. *Int Endod J*. 2013 Nov;46(11):1083-7.

Miskin IP, Farrimond P, Head IM. Identification of novel bacterial lineages as active members of microbial populations in a freshwater sediment using a rapid RNA extraction procedure and RT-PCR. *Microbiology*. 1999;145(Pt 8):1977–87.

Murad CF, Sassone LM, Faveri M, et al. J Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. *Endod*. 2014 Jul;40(7):899-906. doi: 10.1016/j.joen.2014.02.010.

Nakamura VC, Cai S, Candeiro GT, et al. Ex vivo evaluation of the effects of several root canal preparation techniques and irrigation regimens on a mixed microbial infection. *Int Endod J*. 2013 Mar;46(3):217-24.

Nakamura VC. Influência da irrigação ultrassônica passiva na redução de bactérias e endotoxinas dos canais radiculares: um estudo clínico randomizado [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014.

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.

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

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

Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, et al. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root- filled canals in a lithuanian population. *J Endod*. 2000;26:593–95.

Peters LB, van Winkelhoff AJ, Buijs JF, et al. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *Int Endod J*. 2002;35:13–21.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*. 2003;36:1–11.

Pitkänen T, Ryu H, Elk M, et al. Detection of fecal bacteria and source tracking identifiers in environmental waters using rRNA-based RT-qPCR and rDNA-based qPCR assays. *Environ Sci Technol*. 2013 Dec 3;47(23):13611-20. doi: 10.1021/es403489b.

Rôças IN, Hulsman M, Siqueira JF Jr. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *J. Endod*. 2008;34:926-931.

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. Epub 2013 Jan 21.

Rôças IN, Neves MAS, Provenzano JC, et al. Susceptibility of As-yet-uncultivated and Difficult-to-culture Bacteria to Chemomechanical Procedures. *J Endod*. 2014 Jan;40(1):33-7.

Rôças IN, Siqueira JF, Jr. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. *J Clin Microbiol*. 2012 May;50(5):1721-4. doi:10.1128/JCM.00531-12. Epub 2012 Mar 7.

Rôças IN, Siqueira JF, Jr. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *J Endod.* 2010;36:45–52.

Rôças IN, Siqueira JF, Jr. Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. *J Endod.* 2011a;37:143–50.

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

Sakamoto M, Siqueira JF, Jr, Rôças IN, et al. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22:19–23.

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

Siqueira JF Jr., Batista MM, Fraga RC, et al. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod.* 1998 Jun;24(6):414-6.

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

Siqueira JF Jr., Rôças IN. The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent Res.* 2009;88:61–5.

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

Siqueira JF Jr., Paiva SS, Rôças IN. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *J Endod.* 2007a;33:541–7.

Siqueira JF Jr., Guimarães-Pinto T, Rôças IN. Effects of chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite and intracanal medication with calcium hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals. *J Endod.* 2007b;33:800–5.

Siqueira JF Jr., Magalhães KM, Rôças IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *J Endod.* 2007c;33:667–72.

Siqueira JF Jr., Rôças IN, Paiva SS, et al. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007d;104:122–30.

Sjogren U, Figdor D, Persson S, et al. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997;30:297–306.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85:86–93.

Tirali RE, Turan Y, Akal N, et al. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of NaOCl and Octenisept in elimination of endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Nov;108(5):117-20.

Van de Vliet GM, Schepers P, Schukkink RA, et al. Assessment of mycobacterial viability by RNA amplification. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:1959–65.

Vianna ME, Horz HP, Conrads G, et al. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22:411–8.

Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, et al. 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.

Wang J, Jiang Y, Chen W, et al. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. *J Endod.* 2012 Jul;38(7):954-9. doi: 10.1016/j.joen.2012.03.004.

Williams JM, Trope M, Caplan DJ, et al. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J Endod.* 2006 Aug;32(8):715-21. Epub 2006 Jun 6.

Zakaria MN, Takeshita T, Shibata Y, et al. Microbial community in persistent apical periodontitis: a 16S rRNA gene clone library analysis. *Int Endod J*. 2014 Aug 2. doi: 10.1111/iej.12361. [Epub ahead of print].

Zehnder M, Guggenheim B. The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. *Int Endod J*. 2009 Apr;42(4):277-87. doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01537.

APÊNDICE A – Protocolo de desinfecção do campo operatório

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

APÊNDICE B – Procedimentos de coletas de bactérias do canal radicular

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

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

APÊNDICE C – Procedimentos laboratoriais

1 EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO

- Manter os microtubos contendo as amostras no gelo até o completo descongelamento do meio de transporte
- Homogeneizar cada amostra em agitador de vortex durante 1min a fim de desprender a maior quantidade possível de bactérias na solução
- Centrifugar as amostras em centrífuga refrigerada a 4°C e 13.000RPM por 10min
- Em um tubo tipo Falcon de 15mL estéril, preparar uma mistura de 300µL de Tissue e Cell Lysis (MasterPure DNA purification kit - Epicentre) e 2µL de Proteinase K (Life Technologies Corp), em volume necessário para a quantidade de amostras a ser analisada, com sobra (MIX-1)
- Remover as amostras da centrífuga e, com auxílio de pipetas de 1000µL, descartar o sobrenadante mantendo o pellet

- Adicionar 300µL do MIX-1 a cada amostra
- Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 10s
- Aquecer as amostras em banho-Maria a 65°C por 15 min, misturando-as em agitador de vortex por 10s a cada 5min
- Esfriar as amostras em gelo por 5min
- Adicionar 150µl de MPC Protein precipitation reagent (MasterPure DNA purification kit - Epicentre) a cada amostra
- Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 10s
- Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 10min
- Transferir o sobrenadante para microtubos de 1,5mL, esterilizados e devidamente identificados, e descartar o microtubo contendo o pellet
- Adicionar mais 25µl de MPC Protein precipitation reagent a cada amostra
- Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 10s
- Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 10min
- Transferir o novo sobrenadante para novos microtubos de 1,5mL, esterilizados e devidamente identificados, e descartar o microtubo contendo o pellet
- Adicionar 500µL de isopropanol 100% a cada microtubo e invertê-los 30/40 vezes
- Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 10min
- Descartar o isopropanol, com pipetas e ponteiras de 1000µL, atentando para não remover o pellet
- Acrescentar 500µL de etanol 70% ao pellet
- Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 10s
- Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 5min
- Retirar parte do etanol 70%, deixando apenas cerca de 50µL no fundo do microtubo
- Centrifugar novamente a 4°C e 13.000RPM por 5min
- Remover totalmente o etanol 70% com ponteiras de 200µL
- Manter os tubos abertos em temperatura ambiente para evaporar o remanescente de etanol
- Adicionar 35µL de TEBuffer (Life Technologies Corp) em cada amostra
- Hidratar as amostras, mantendo-as no gelo ou, preferencialmente, no termomixer (Eppendorf, Hauppauge, NY, EUA) a 4°C por 10 minutos
- Analisar a concentração de ácidos nucleicos no espectrofotômetro (NanoDrop 1000 – Thermo Fisher Scientific).

2 DIVISÃO DAS AMOSTRAS DNA/RNA

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

3 PRIMEIRA PURIFICAÇÃO DO RNA COM DNase

- Em um microtubo limpo, misturar 2uL de DNase I, Amp Grade e 2uL de 10X DNase I Reaction Buffer para cada amostra.
- Acrescentar 3,4uL do MIX em cada amostra de RNA
- Aguardar 30 min em temperatura ambiente para degradar o DNA
- Adicionar 200uL de 2x T&C Lysis Solution
- Agitar no vortex por 5s
- Manter no gelo 5min
- Adicionar 200uL de MPC
- Agitar no Vortex por 10s
- Centrifugar (4°C 13.000RPM) por 10min
- Transferir o sobrenadante para microtubos limpos e devidamente identificados conforme a amostra
- Descartar o pellet
- Adicionar 500uL de isopropanol
- Inverter as amostras 30-40 vezes
- Centrifugar (4°C 13.000RPM) por 10min
- Retirar o isopropanol sem deslocar o pellet
- Lavar o pellet com 500uL de etanol 70%
- Vortexar por 10s
- Centrifugar (4°C 13.000RPM) por 5min
- Retirar o etanol 70% com uma ponteira de 1000uL, mantendo cerca de 50uL no fundo da microtubo
- Centrifugar (4°C 13.000RPM) por 5 min
- Secar o etanol 70% com uma ponteira de 200uL

4 SEGUNDO PROCESSO DE LISE DO DNA DA AMOSTRA DE RNA

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

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

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

5 QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEÍCOS EM UMA AMOSTRA COM O NANODROP

- Ligar o aparelho do NanoDrop
- Abrir o software ND-1000
- Selecionar Ácidos Nucleicos
- Abrir o leitor do aparelho e limpar a plataforma de leitura e o leitor com água, secar bem com um guardanapo macio
- Gotejar 1uL de água Milli-Q sobre o orifício de leitura
- Clicar em OK no computador
- Abrir o leitor, secar as superfícies de leitura e gotejar 1uL da solução utilizada como solvente (no caso deste experimento, é o DPEC water)
- Clicar em "Blank"
- Abrir novamente o leitor, secar as superfícies de leitura, gotejar 1uL da amostra a ser analisada e clicar em "Measure"
- Repetir o passo anterior com todas as amostras.

6 PCR CONVENCIONAL

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

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

- Manter os tubos contendo as amostras em gelo até o completo descongelamento da solução
- Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 15s
- Centrifugar as amostras por 5 segundos em 1200RPM para coletá-las no fundo do microtubo
- Em uma estante resfriada para PCR, posicionar microtubos de 200µL, em número suficiente para a quantidade de amostras, controle positivo e controle negativo da reação, identificando-os devidamente
- Em um microtubo de 1,5mL realizar uma mistura (MIX-2), com volume suficiente para todas as amostras, controles positivo e negativo da reação, dos seguintes reagentes nas respectivas proporções:

Para *Streptococcus species*:

. PCR Buffer (Life Technologies Corp).....	5µL
. Mg ₂ para PCR (Life Technologies Corp).....	3µL
. dNTP de trabalho (2,5mM; Life Technologies Corp)	4µL
. Taq polimerase (Life Technologies Corp)	0,4µL
. Ultrapure water.....	15,6µL
. Primer universal <i>Forward</i> (Exxtend, Paulínia, SP, Brasil)	10µL
. Primer universal <i>Reverse</i> (Exxtend, Paulínia, SP, Brasil)	10µL

Para *Propionibacterium acnes* e *Enterococcus faecalis*:

. PCR Buffer (Life Technologies Corp).....	5µL
. Mg ₂ para PCR (Life Technologies Corp).....	2µL
. dNTP de trabalho (2,5mM; Life Technologies Corp)	4µL
. Taq polimerase (Life Technologies Corp)	0,2µL
. Ultrapure water.....	32,8µL
. Primer universal <i>Forward</i> (Exxtend, Paulínia, SP, Brasil)	2µL
. Primer universal <i>Reverse</i> (Exxtend, Paulínia, SP, Brasil)	2µL

- Depositar 48µL do MIX-2 em cada microtubo de 200µL
- Adicionar 2µL de cada amostra no respectivo microtubo
- Adicionar 2µL da amostra de DNA/RNA correspondente ao controle positivo no respectivo microtubo
- No tubo a ser utilizado como controle negativo, adicionar 2µL de Ultrapure water.

6.1 AMPLIFICAÇÃO DO DNA EM TERMOCICLADOR

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

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

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

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

6.2 ELETROFORE EM GEL DE AGAROSE

- Em um Becker contendo 80mL de tampão TAE 1X (0,8mL de TAE 50X + 39,2mL de H₂O), acrescentar 0,56g de agarose
- Levar ao micro-ondas por aproximadamente 45s, misturando a cada 20s sem levantar fervura
- Aguardar esfriar um pouco e acrescentar 4μL de GelRed (Biotium Inc, Haiyward, CA, USA)
- Despejar o gel de agarose ainda líquido em um suporte para eletroforese grande e posicionar o pente com o tamanho de casas apropriado
- Aguardar o líquido geleificar (aproximadamente 15 minutos)
- Remover o pente, e posiciona o suporte na cuba de eletroforese (BioRad Laboratories Inc.), com as casas voltada para o pólo negativo (fio preto)
- Encher a bandeja, cobrindo totalmente a placa de gel, com a solução de corrida (TAE 1X)
- Em um papel plastificado, depositar gotas de 2μL de tampão de corifa (Loading buffer), em quantidade igual ao número de amostras, incluindo os controles positivo e negativo, mais um, que será utilizado como marcador da eletroforese
- Misturar 5μL de marcador Mass Ladder 1kb (Life Technologies) à uma gota de corante e, com a mesma ponteira, levar a solução misturada à primeira casa da placa de gel de agarose
- Repetir o passo anterior para cada amostra, substituindo o marcador por 5μL de amostra
- Fechar a bandeja e conectá-la ao aparelho;
- Ligar o aparelho, ajustando a voltagem em 80V e 200mA e o timer em 40 minutos. Após a corrida, proceder com a leitura e documentação fotográfica do gel em luz ultravioleta.

APÊNDICE D – Termo de esclarecimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: INFLUÊNCIA DA IRRIGAÇÃO ULTRASSÔNICA PASSIVA NA REDUÇÃO DE BACTÉRIAS E ENDOTOXINAS DOS CANAIS RADICULARES: UM ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Giulio Gavini

Equipe de pesquisa: Profa. Dra. Ericka T. Pinheiro, Prof. Ms. Vítor C. Nakamura

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

Telefone para contato: (11) 3091-7839 / (11) 94149-3250

Local da coleta de dados: Clínica Odontológica da FOU SP

O objetivo dessa pesquisa é comparar duas diferentes técnicas de irrigação quanto à diminuição de bactérias e endotoxinas do canal radicular. Para isso, serão tratados dentes que apresentam infecção do canal radicular. Durante o tratamento, será utilizada uma das seguintes técnicas de irrigação do canal: 1 – será utilizada uma seringa plástica descartável e pontas metálicas para irrigar o canal; 2 – também será utilizada uma seringa plástica descartável e pontas metálicas, mas, além disso, a substância dentro do canal será agitada com ajuda de um ultrassom. É importante ressaltar que estas duas técnicas já se mostraram eficientes na redução de bactérias do canal radicular em estudos já realizados, e são rotineiramente utilizados nos consultórios odontológicos para o tratamento de canal. Durante o tratamento, o pesquisador irá coletar amostras do conteúdo do canal. Ao término da primeira sessão do tratamento, o pesquisador irá colocar uma medicação de hidróxido de cálcio no interior do canal para aumentar a desinfecção proporcionada. Depois de duas semanas, o tratamento endodôntico será concluído e o dente restaurado. Caso necessário, o paciente será encaminhado para outras disciplinas para que possam ser realizados outros tratamentos. O tratamento será feito com anestesia para conforto do paciente, e serão realizadas apenas as radiografias necessárias para a realização do tratamento. O paciente terá o benefício direto do tratamento de canal realizado com diminuição da infecção do dente, garantindo melhor saúde bucal.

As informações obtidas na pesquisa são sigilosas e apenas para este estudo, e a identidade do paciente não será divulgada. O paciente tem o direito de saber informações durante o andamento da pesquisa que serão dadas pelo dentista. O paciente pode desistir em qualquer momento de participar da pesquisa sem prejuízos no tratamento que vinha recebendo. O paciente não terá qualquer despesa de tratamento de canal realizada, nem ajuda financeira para a realização da pesquisa. O dentista responsável, Vítor Cesar Nakamura, poderá ser encontrado no telefone (11) 3258-3963, ou na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária, São Paulo, SP – CEP. 05508-000 – Fone:(11) 3091-7960).

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

Nome: _____

Endereço: _____

RG _____ tel. _____

São Paulo, _____ de _____ de 20____.

_____	_____
PACIENTE	PESQUISADOR

APÊNDICE E - Características clínicas e radiográficas e dados microbiológicos dos casos de infecção endodônticas primárias, antes (S1) e após o PQC (S2) e MIC (S3), em que 0=ausente e 1=presente.

Paciente	Dente	Idade	Gênero	Diâmetro final	História de dor	Palpação	Percussão Vertical	Percussão Horizontal	Bactérias			Endotoxinas (EU/mL)		
									S1	S2	S3	S1	S2	S3
P1	15	34	FEMININO	40	1	0	0	0	178905	10638	45922	11	0	0
P2	44	18	FEMININO	40	1	1	1	1	9807470	14659	9873	21.8	0.11	0
P3	21	43	FEMININO	50	0	0	0	0	1721662	33564	140477	132	9.28	3.58
P8	22	56	MASCULINO	40	0	0	0	0	13658938	84639	4646	15.3	14.8	11.6
P9	23	27	FEMININO	50	1	0	1	0	855248	37825	13214	18.32	6.66	1.3
P10	23	30	FEMININO	50	0	0	0	0	32343	124995	70244	52.9	3.48	0
P11	11	56	MASCULINO	40	0	0	0	0	6784487	10826	3898	18.1	0.02	2.3
P13	14	24	FEMININO	50	1	1	1	1	18949	0	0	10	0	0
P17	34	58	FEMININO	50	0	1	1	1	457689	3096	0	14.6	11.5	0
P18	17	28	FEMININO	40	1	0	0	0	3043433	7311	4563	30.5	6.1	4.18
P19	25	36	FEMININO	40	1	0	0	0	3748596	0	0	77	13.2	0.41
P22	22	32	FEMININO	50	0	1	1	0	2575749	62385	8938	52.1	10	0
P23	14	66	FEMININO	40	0	0	0	0	378460	0	0	19.6	0.17	0
P25	36	28	MASCULINO	40	1	0	0	0	986648	31169	3276	110	13.3	3.93
P39	45	74	FEMININO	50	0	0	0	0	46576365	9769	0	160	0.2	0.17
P44	14	57	FEMININO	50	0	0	1	0	107426	86592	15331	77	12.7	8.43
P46	45	37	FEMININO	50	0	0	0	0	4657394	38654	15760	153	10.3	1.57
P47	21	34	MASCULINO	50	0	0	1	0	1453705	338466	28545	85.7	5.4	3.2
P48	11	19	FEMININO	50	1	0	0	0	137513	0	0	195	3.65	1.1
P49	25	58	FEMININO	50	1	0	0	0	2658440	0	0	169	5.14	2.9

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Influência da Irrigação Ultrassônica Passiva na Redução de Bactérias e Endotoxinas dos Canais Radiculares: Um Estudo Clínico Randomizado

Pesquisador: Vítor Cesar Nakamura

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 13396213.1.0000.0075

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO CIENT E TEC ODONTOLOGIA

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 428.730

Data da Relatoria: 18/10/2013

Apresentação do Projeto:

50 tratamentos endodônticos com periodontite apical primária serão realizados . 25 usando método tradicional de irrigação e 25 com o auxílio de ultra-som.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar in vivo a eficácia do preparo químico-mecânico utilizando 2 protocolos de irrigação na redução de bactérias e endotoxinas de canais radiculares de dentes portadores de periodontite apical primária.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os participantes terão o benefício do tratamento endodôntico e restaurador dentário.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é importante pois agrega ao tratamento convencional uma outra metodologia no sentido de aumentar a eficiência do tratamento convencional.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Termo está correto, apresenta linguagem técnica porém de fácil explicação aos participantes da pesquisa.

Recomendações:

Nenhuma

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 428.730

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 18 de Outubro de 2013

Assinador 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