AMANDA DA COSTA SILVEIRA

Análise *in vivo* da redução bacteriana em dentes portadores de periodontite apical primária e sua correlação com o sucesso do tratamento endodôntico

São Paulo
2015

AMANDA DA COSTA SILVEIRA

Análise *in vivo* da redução bacteriana em dentes portadores de periodontite apical primária e sua correlação com o sucesso do tratamento endodôntico

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. Celso Luíz Caldeira

São Paulo

2015

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

Silveira, Amanda da Costa.

Análise *in vivo* da redução bacteriana em dentes portadores de periodontite apical primária e sua correlação com o sucesso do tratamento endodôntico / Amanda da Costa Silveira ; orientador Celso Luíz Caldeira . -- São Paulo, 2015.

66 p. : tab. ; 30 cm.

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

Versão corrigida.

1. Tratamento do canal radicular. 2. Periodontite periapical. 3. Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico. I. Caldeira, Celso Luíz. II. Título.

Silveira AC. Análise *in vivo* da redução bacteriana em dentes portadores de periodontite apical primária e sua correlação com o sucesso do tratamento endodôntico. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

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 aos meus pais Nelson e Eliete, por serem o maior exemplo de amor, dedicação, determinação, responsabilidade, caráter e sabedoria. Dessa forma é possível viver bem melhor, tendo apoio nas dificuldades, encerrando os desafios e conquistando as metas e os sonhos de forma digna e feliz.

Aos demais da minha família, principalmente meus irmãos, minha cunhada, minha sobrinha Mariana, meus tios Orlando e Berna, por todo amor, incentivo e torcida.

AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Doutor Giulio Gavini** pelas orientações e confiança. Orientações que o torna um exemplo de líder e profissional. E confiança, que proporcionou uma cobrança interna, gerando grande responsabilidade, comprometimento e crescimento profissional. Muito Obrigada!

Ao **Professor Doutor Celso Luíz Caldeira** por receber meu nome, e permitir assim, realizar o Mestrado na Universidade de São Paulo.

À **Professora Doutora Ericka Tavares Pinheiro** pela orientação, confiança, incentivo e ensinamentos para a realização deste trabalho.

Ao **Professor Doutor Israel Chilvarquer** pela orientação, paciência, ensinamentos, e toda ajuda. Sou muito grata por sua receptividade e enorme contribuição neste trabalho.

Ao **Professor Doutor Oscar Faciola Pessoa** pela confiança, carinho e amizade, obrigada! O meu começo na endodontia foi admirando o seu trabalho.

Aos **colegas de pesquisa Doutor Vitor Nakamura e Mestra Laís Prado** pelo convívio, ensinamentos, conhecimentos e ajuda compartilhada. Dessa forma, formamos uma equipe, com responsabilidade, respeito e comprometimento, e assim realizamos nossos trabalhos.

À **amiga Laís Cunha Prado do Nascimento**, pela amizade diária, companheirismo indescritível, por dividirmos conhecimentos, responsabilidades, incentivos, conquistas, muitas alegrias, alguns lamentos, e pela ajuda sempre ser mútua! Sou eternamente grata por tudo, por todo carinho, deste momento e de sempre!

Às **amiga Aline Pereira Oliveira e Nágila Ali Mustafá**, pela amizade e divertido convívio durante todo curso de pós graduação... E todos os professores, amigos e

colegas da Pós-graduação em Endodontia da Faculdade de Odontologia USP, por todos os momentos de alegria e aprendizado que passamos juntos.

Ao **doutorando Eduardo Duailibi** por todo ensinamento e apoio, durante uma etapa deste trabalho. E, **doutora Ana Laura Pion Carvalho** pela ajuda e grande contribuição quando precisei.

Aos funcionários da Clínica Odontológica, funcionários do INDOR e da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, como o Marcos Apilio, que colaboraram com a realização deste trabalho.

"De tudo ficaram três coisas: a certeza de estar sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de ser interrompido antes de terminar. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro"

Fernando Sabino

RESUMO

Silveira AC. Análise *in vivo* da redução bacteriana em dentes portadores de periodontite apical primária e sua correlação com o sucesso do tratamento endodôntico [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

O principal objetivo do tratamento endodôntico em dentes com infecções primárias é a cura da periodontite apical, o que ocorre geralmente após a máxima redução de micro-organismos do canal radicular. Métodos microbiológicos moleculares são os métodos de escolha para avaliar a redução de micro-organismos após o tratamento endodôntico por serem mais sensíveis, específicos e precisos do que os métodos baseados em cultura bacteriológica. Entretanto, poucos estudos clínicos avaliaram a eficácia antimicrobiana do tratamento endodôntico por métodos moleculares. Além disso, até o presente momento, não há nenhum estudo correlacionando esses dados com o sucesso do tratamento endodôntico. Portanto, os objetivos do presente estudo foram: (a) avaliar *in vivo*, por métodos moleculares quantitativos, a concentração de bactérias nos canais radiculares e sua correlação com aspectos clínicos e radiográficos; (b) correlacionar a redução bacteriana após o tratamento endodôntico com reparo apical após controle radiográfico e tomográfico. Trinta e quatro pacientes portadores de dentes com necrose pulpar e periodontite apical foram selecionados para o estudo. O protocolo de antissepsia consistiu em realizar o Preparo Químico-Cirúrgico (PQC) com sistema Reciproc e NaOCl 2,5%; irrigação final com EDTA-T 17%; e medicação intracanal com pasta de hidróxido de cálcio por 14 dias antes da obturação dos canais radiculares. Foram realizadas coletas microbiológicas dos canais radiculares no início do tratamento e na segunda sessão, após a remoção da medicação intracanal antes da obturação. As amostras microbiológicas foram analisadas por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) para detecção e quantificação de bactérias utilizando iniciadores universais para o domínio Bactéria. Para análise do sucesso do tratamento endodôntico, foram analisados aspectos clínicos, radiográficos e tomográficos após um período mínimo de controle de 1 ano. Os casos foram classificados em 4 categorias: ausência de rarefação óssea periapical, redução ou aumento e incerto. Bactérias foram observadas em 100% das amostras iniciais coletadas, com concentrações medianas de $1,68 \times 10^6$ cópias de DNA. A análise estatística de regressão logística não

apresentou correlação entre concentrações de DNA bacteriano com dados clínicos. Após o tratamento endodôntico, as medianas das concentrações de bactérias foram de 8.72×10^2 , os resultados mostraram que houve diminuição significativa na concentração de DNA bacteriano ($p < 0,05$), correspondendo a porcentagem de redução de 99.98% nos canais radiculares após os procedimentos de antissepsia. Retornaram para o controle, 20 dos 34 pacientes (58,82%), entre 13 a 22 meses após o tratamento endodôntico. Dois dentes foram extraídos, restando um total de 18 dentes para análise clínica e radiográfica. O sucesso classificado por ausência ou redução da rarefação óssea na radiografia periapical foi observada em 16 dos 18 dentes (88,83%). Dos 2 casos de insucesso radiográfico, um apresentou elevada quantidade de bactérias ($>10^4$) persistentes após os procedimentos de antissepsia e um caso apresentou obturação deficiente. Entretanto, a análise estatística de regressão logística não identificou nenhum fator específico associado ao insucesso endodôntico. A análise tomográfica foi realizada em 12 dos 18 pacientes. Os achados tomográficos confirmaram ausência/ redução da rarefação periapical verificada na radiografia, com exceção de um caso onde não houve redução da área da rarefação. Conclui-se que dentes com necrose pulpar e periodontite apical apresentam uma elevada concentração de bactérias no sistema de canais radiculares. O tratamento endodôntico foi eficaz em reduzir significativamente a quantidade de bactérias dos canais radiculares e promover uma elevada taxa de sucesso endodôntico.

Palavras-chave: Tratamento do canal radicular. Periodontite apical. Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico.

ABSTRACT

Silveira AC. In vivo analysis of bacterial reduction in teeth with apical periodontitis primary and its correlation with the success of endodontic treatment [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

The objectives of the endodontic treatment of teeth with primary infections is the healing of apical periodontitis, which usually occurs after the maximum reduction of micro-organisms in the root canal. Molecular methods are the methods of choice for assessing the reduction of micro-organisms after endodontic treatment to be more sensitive, specific and accurate than methods based on bacteriological culture. The objectives of this study were to evaluate in vivo by molecular methods, the concentration of bacteria in root canals and correlation of bacterial reduction after endodontic treatment with apical repair after radiographic control and CBCT. Thirty four teeth with apical periodontitis, with radiographic evidence of periapical were selected for this study. The root canal preparation of all the teeth was carried out with reciprocating files and 2.5% NaOCl during preparation; and 17% EDTA for smear layer removal. The root canals were medicated with calcium hydroxide for 14 days. Microbiological sampling were performed before the preparation and after intracanal medication. The samples were analyzed by real time PCR, for the detection and quantification of bacteria,. Bacteria were observed in 100% of the initial samples. . Bacteria were observed in 100% of the initial samples, with median concentrations of 1.68×10^6 copies of the DNA. After endodontic treatment, the median bacterial concentrations were 8.72×10^2 , the results showed a significant decrease in the concentration of bacterial DNA ($p < 0.05$), corresponding to 99.98% reduction in the percentage of root canals after procedures of antisepsis. 13 to 19 months after treatment, the teeth were examined by using periapical radiography (PA) and cone-beam computed tomography (CBCT). Area and volume of the periapical lesions were measured, and the outcome was presented in 4 categories: absence, reduction or enlargement of the radiolucency, or uncertain. Lesions were classified as reduced or enlarged when the change in size of the radiolucency was 20% or more. The recall rate was 58,82%, and 18 teeth were analyzed. Success classified by the absence or reduction of bone thinning in periapical radiography was observed in 16 of the 18 teeth (88.83%). CT findings confirmed the absence / reduction of periapical

rarefaction observed on radiographs, except for one case. Conclude that teeth with pulp necrosis and apical periodontitis have a high concentration of bacteria in the root canal system. The endodontic treatment was effective in significantly reducing the amount of bacteria from root canals and to promote a high rate of success endodontic.

Keywords: Root canal therapy. Apical periodontitis. Cone-Beam Computed Tomography.

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1-	Distribuição dos dados clínicos dos pacientes. (N= 18)	37
Tabela 5.2-	Concentração de DNA bacteriano de acordo com achados clínicos e tamanho da rarefação óssea por análise radiográfica e tomográficas.	38
Tabela 5.3-	Dados clínicos, microbiológico e classificação de dados radiográficos e tomográficos.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celsius
Ca(OH) ₂	hidróxido de cálcio
CHX	digluconato de clorexidina
CRT	comprimento real de trabalho
cm	centímetros
DICOM	Diagnostic Imaging and Communication in Medicine
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etileno diamino tetra-acético
EDTA-T	ácido etileno diamino tetra-acético tergentol
IC	irrigação convencional
µL	microlitros
mA	miliamperes
mL	mililitros
min	minutos
mm	milímetro
NaOCl	hipoclorito de sódio
PCR	Reação em cadeia de polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
PMCC	paramonoclorofenol canforado
PQC	preparo químico-cirúrgico
PUI	irrigação ultrassônica passiva (do inglês <i>passive ultrasonic irrigation</i>)
qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa
RNA	ácido ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
s	segundos
TCFC	Tomográfica Computadorizada de Feixe Cônico
UFC	unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 ESTUDOS DO CONTEÚDO MICROBIANO NO CANAL RADICULAR	16
2.2 ESTUDOS DA ANÁLISE RADIOGRÁFICA E TOMOGRÁFICA	19
2.3 ESTUDOS RELACIONADOS AO SUCESSO NO TRATAMENTO ENDODÔNTICO	21
3 PROPOSIÇÃO.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	26
4.2 SELEÇÃO DE PACIENTES	26
4.3 PREPARO DOS CANAIS RADICULARES E COLETAS MICROBIOLÓGICAS.	28
4.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DE BACTÉRIAS	31
4.4.1 Extração de DNA	31
4.4.2 Reação em cadeia de polimerase em tempo real.....	32
4.5 TÉCNICA RADIOGRÁFICA E TOMOGRÁFICA	32
4.6 CRITÉRIOS DE ANÁLISE	34
4.6.1 Análise das características clínicas	34
4.6.2 Análise da rarefação óssea por exame radiográfico e tomográfico	35
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5 RESULTADOS.....	36
5.1 DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES	36
5.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ACORDO COM DADOS CLÍNICOS, RADIOGRÁFICOS E TOMOGRÁFICOS	37
5.3 ANÁLISES DAS CARACTERÍSTICAS DO TRATAMENTO, DADOS MICROBIOLÓGICO, RADIOGRÁFICO E TOMOGRÁFICOS DE CONTROLE	39
6 DISCUSSÃO.....	43
7 CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS.....	50
APÊNDICES.....	56
ANEXOS.....	65

1 INTRODUÇÃO

A presença de bactérias no interior do canal radicular apresenta condição fundamental para a mortificação pulpar e desenvolvimento da periodontite apical, sendo dessa forma, os principais agentes etiológicos das doenças da polpa e do periápice. A redução da concentração dos níveis desses micro-organismos consiste em um dos principais objetivos do tratamento endodôntico. O preparo químico cirúrgico (PQC) é uma das principais etapas do tratamento endodôntico em que esses micro-organismos e seus subprodutos são eliminados, mediante a utilização conjunta de instrumentos endodônticos e substâncias químicas.

Dos métodos utilizados para estudar *in vivo* a microbiota das infecções endodônticas e os procedimentos de antissepsia do canal radicular, os métodos moleculares são hoje os meios de avaliação mais sensíveis, específicos e precisos, quando comparados com métodos baseados em cultura bacteriana. Destes, pode-se ressaltar o PCR em tempo real (qPCR) devido a sua capacidade em identificar DNA bacteriano e quantificá-los.

Estudos descrevem critérios relacionados ao sucesso para o tratamento endodôntico, entretanto não há um consenso, até mesmo por diversos trabalhos citarem que esses critérios são multifatoriais. Análise por imagem é um recurso cada vez mais utilizado na endodontia, principalmente por auxiliar de forma mais precisa a análise de rarefações periapicais, visualização e quantificação de rarefações. O método mais tradicional para avaliar presença de rarefação óssea, é utilizando a técnica Radiográfica do Paralelismo com filmes radiográficos periapicais convencionais. Outro método utilizado é a Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico (TCFC) que consiste na obtenção de imagens do corpo em fatias ou cortes, a principal vantagem é a avaliação da área de interesse em três dimensões e de forma mais detalhada e precisa.

Até o presente momento, poucos estudos clínicos avaliaram a eficácia da antissepsia do tratamento endodôntico por métodos moleculares, correlacionando dados microbiológicos com aspectos clínicos, radiográficos e tomográficos da rarefação óssea. Ressalta-se ainda que, com base na literatura atual, os resultados moleculares ainda não foram correlacionados com o sucesso do tratamento

endodôntico, ou seja, não há identificação do nível mínimo de material bacteriano que seja compatível com o reparo periapical, e a correlação com a manutenção da saúde.

Portanto, propõe-se com este estudo avaliar *in vivo*, por métodos moleculares, a redução bacteriana após um protocolo de antissepsia de dentes portadores de necrose pulpar e periodontite apical e uma possível correlação com o sucesso do tratamento por dados clínicos, análise radiográfica e tomográfica após um período mínimo de 1 ano de controle clínico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A presença de bactérias e seus subprodutos no interior do canal radicular apresentam condições fundamentais para a mortificação pulpar e desenvolvimento da periodontite apical, sendo dessa forma, os principais agentes etiológicos das doenças da polpa e do periápice. Na literatura, diversos trabalhos estudam os procedimentos endodônticos que visam a redução ou eliminação das bactérias e seus subprodutos, assim como a identificação, quantificação e a função desses no canal radicular.

2.1 ESTUDOS DO CONTEÚDO MICROBIANO NO CANAL RADICULAR

Vianna et al. (2006) avaliaram *in vivo*, a redução microbiana, após o PQC, utilizando NaOCl 2,5% ou gel de CHX 2%. Foram selecionados 32 canais radiculares com necrose pulpar e avaliada a redução bacteriana por método de cultura e por meio de qPCR com kits SybrGreen e TaqMan. Observou-se nos resultados das contagens de UFCs que a quantidade de bactérias foi reduzida significativamente em ambos os grupos. No entanto, usando qPCR a quantidade de bactérias antes e após o PQC foi maior do que quando avaliado por método de cultura. Além disso, a redução de bactérias no grupo NaOCl foi significativamente maior do que no grupo CHX. 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.

Sakamoto et al. (2007) analisaram a redução bacteriana e identificaram bactérias persistentes após o tratamento endodôntico. Amostras de 15 canais de dentes com periodontite apical foram coletadas antes (S1) e após o PQC com NaOCl 2,5% (S2) e após a medicação de pasta de Ca(OH)_2 (S3). As amostras foram submetidas a identificação de espécies bacterianas persistentes por clonagem de DNA e as bactérias foram quantificadas por qPCR. Cinco amostras apresentaram resultados negativos para S2 e S3. 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 43 taxas de bactérias distintas, dos quais 24 (56%) eram filotipos ainda não cultivados.

Siqueira Jr. et al. (2007a) avaliaram *in vivo* a eficácia antimicrobiana do NaOCl 2,5% e da medicação intracanal de Ca(OH)_2 associado ao paramonoclorofenol canforado (PMCC). Foram utilizados 11 pré-molares inferiores portadores de periodontite apical crônica. A coleta do canal foi realizada antes e depois do PQC, os canais foram medicados com Ca(OH)_2 /PMCC por 7 dias, e nova coleta foi realizada após a remoção da medicação intracanal. A análise microbiana foi realizada por meio de PCR. Os autores concluíram que houve redução bacteriana, mas o PQC com NaOCl 2,5% não foi capaz de eliminar as bactérias de todos os canais avaliados, pois 5 continham bactérias e após a utilização da medicação, este índice foi para 1.

Siqueira Jr. et al. (2007b) compararam *in vivo* a eficácia dos irrigantes, NaOCl 2,5% e CHX 0,12% durante o PQC na redução bacteriana. Foram selecionados 32 dentes portadores de periodontite apical primária. Coletas bacterianas foram realizadas antes do PQC (S1) e após o PQC (S2). A análise microbiana foi realizada por meio de cultura e em S1, todos os canais foram positivos para as bactérias, 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 CHX. As amostras S2 foram identificados por meio de análise de seqüenciamento genético da região 16rRNA. No S2, o número médio de bactérias em canais irrigados com NaOCl e CHX foi de $2,35 \times 10^3$ e 2×10^2 , respectivamente. Dessa forma, os autores observaram redução bacteriana nos grupos, mas nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos em relação ao número de casos que produziram culturas negativas ou redução bacteriana quantitativa.

Rôças e Siqueira Jr (2011) pesquisaram os efeitos antimicrobianos dos irrigantes NaOCl 2,5% e CHX 0,12%, utilizando-os durante o tratamento endodôntico de dentes com periodontite apical. Amostras bacterianas de 47 dentes unirradiculares com necrose pulpar, foram coletadas antes (S1) e depois (S2) do PQC, utilizando NaOCl 2,5% (n = 30) ou CHX 0,12% (n = 17). Todas as amostras S1 foram positivas para presença de bactérias realizando o PCR. Para a identificações bacterianas foram realizadas checkerboard, considerando segmentação de 28 patógenos endodônticos. Ambos os protocolos baseados em NaOCl e CHX foram

significativamente eficazes na redução dos níveis de bactérias e número de espécies, sem diferença significativa entre eles.

Paiva et al. (2012) compararam *in vivo* a capacidade de 2 técnicas de irrigação quanto aos efeitos antimicrobianos. Amostras microbiológicas de 27 canais de dentes com periodontite apical foram coletadas no início do tratamento (S1), após o preparo e irrigação com NaOCl 2,5% (S2) e, em seguida, ativação do PUI com NaOCl 1% (n=13) ou irrigação convencional com CHX 2% (n=14) (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 nos dois métodos. O PQC foi significativamente eficaz na redução da incidência de cultura positiva e resultados de PCR. Ambas técnicas complementares reduziram a incidência positiva para bactéria tanto para cultura quanto para PCR, embora a redução não foi estatisticamente significativa comparada com S2, assim como não houve diferença significativa entre as técnicas.

Paiva et al. (2013) avaliaram *in vivo* os efeitos antibacterianos de procedimentos endodônticos utilizando análises de microbiologia molecular. Foram coletadas 12 amostras de canais radiculares de dentes com periodontite apical antes (S1) e após a instrumentação (S2), utilizando NaOCl como irrigante, irrigação final com CHX (S3) e depois de uma semana de medicação com Ca(OH)_2 (S4). Dentro os parâmetros analisados, destacam-se os seguintes: incidência de resultados positivos para a presença de bactérias por meio de PCR de amplo espectro e dados quantitativos de redução bacteriana por qPCR. Todas as amostras S1 foram positivas para bactérias, a incidência de resultados positivos foram 6/12 em S2, 6/12 em S3 e 5/12 em S4. Na S1, a mediana correspondeu a $8,16 \times 10^5$, no S2 $2,11 \times 10^3$, no S3 $1,61 \times 10^3$ e no S4 0, com redução de 73,3% entre S3 e S4. Os procedimentos promoveram a redução 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 de canais radiculares. Foram realizadas coletas microbiológicas de 40 dentes com periodontite apical primária antes (S1) e após o PQC (S2), após os protocolos de irrigação (S3), convencional (IC) ou PUI, e após a medicação intracanal (S4). Em ambos os grupos, houve diminuição significativa na concentração de bactérias. Com relação à redução

bacteriana, a PUI foi capaz de reduzir significativamente mais o número de bactérias do que a IC ($p < 0,05$).

Cardoso et al. (2015) realizaram um estudo clínico para correlacionar concentrações bacterianas e níveis de endotoxinas em canais radiculares, e análise do volume de destruição óssea periapical determinada por TCFC. Foram selecionados 24 dentes com infecção primária endodontia e registradas as características clínicas e de destruição óssea periapical determinada por análise de TCFC. As coletas foram realizadas com uso de papel estéril / apirogênico no canal radicular. Concentrações de bactérias foram realizadas pela técnica de cultura. Os resultados mostraram que foram detectados bactérias em 100% das amostras, a contagem de bactéria de $7,5 \times 10^5$ UFC/mL e o volume da destruição óssea 100mm^3 . A regressão logística múltiplavariada não apresentou correlação positiva entre maiores níveis de bactérias presentes na infecção do canal radicular e maior volume de destruição óssea.

2.2 ESTUDOS DA ANÁLISE RADIOGRÁFICA E TOMOGRÁFICA

O recurso por imagem para diagnóstico é uma área que tem passado por avanços na Odontologia. O método mais tradicional para avaliar presença de rarefação óssea, é utilizando a técnica Radiográfica periapical de Paralelismo, uma prática comum, de fácil acesso na rotina odontológica, reproduzindo uma imagem bidimensional de uma anatomia tridimensional. Outro método utilizado é a Tomografia que consiste na obtenção de imagens do corpo em fatias ou cortes.

A Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico (TCFC) é um recurso de diagnóstico moderno, a principal vantagem é a avaliação da área de interesse em três dimensões e de forma mais detalhada (Stavropoulos et al., 2007). Tyndall e Rathore (2008) publicaram um artigo referente às aplicações da TCFC no diagnóstico da odontologia, entre eles destaca-se o uso na endodontia, nos diagnósticos de lesões periapicais, visualização dos canais e fraturas, entre outros. Assim como Estrela et al. (2008), referenciando a TCFC ser um dos melhores recursos para analisar rarefações ósseas periapicais.

Bornstein et al. (2011) avaliaram a detecção e dimensão de lesão periapical em molares inferiores, utilizando TCFC em comparação com radiografia Periapical convencional (PA). Os autores concluíram que 25,86% de lesões presentes identificadas por TCFC não foram identificadas nas radiografias periapicais convencionais.

Metska et al. (2013) compararam *in vivo* as alterações volumétricas da rarefação óssea de 45 dentes com periodontite apical e com necessidade de retratamento endodôntico, após 1 ano de tratamento. Foram realizadas TCFC para análise e dois observadores treinados avaliaram as imagens utilizando o software AMIRA. Os resultados mostraram que a mudança volumétrica em radiolucência periapical após 1 ano foi estatisticamente significativa, o volume de radiolucência periapicais foi reduzidas em 20 dentes (57%), manteve-se inalterada em 8 (23%), e um aumento em 7 (20%).

van der Borden et al. (2013) compararam as mudanças no tamanho de lesões periapicais após o tratamento endodôntico, por análise radiográfica (PA) e tomográfica (TCFC), analisando a área e a medição volumétricas como parâmetros. Os exames foram realizados no pré-operatório e no retorno (10-37 meses), de 50 dentes (71 raízes) com evidência de perda óssea periapical em PA e TCFC. A área e o volume foram analisados, e com as imagens do retorno foram classificadas em 4 categorias: lesão não detectada, lesão reduzida em tamanho, lesão inalterada, ou lesão alargada. Os resultados mostraram que 39 casos de 71 (54,9%) mostraram acordo nos exames, enquanto que foi observada em 32 dos 71 (45,1%) estavam em desacordo ($P < 0,001$). Foram classificados como ausentes 45,1% no exame radiográfico e 15,5% em exames tomográficos ($P < 0,001$). Quando o sucesso foi definido como a ausência ou uma redução no tamanho da lesão, 88,7% casos foram classificados como sucesso radiográfico e 77,5% sucesso tomográfico ($p = 0,073$). Desta forma os autores concluíram que as alterações do tamanho da lesão após tratamento de canal determinado com dados volumétricos pela TCFC e dados dimensionais pela PA são diferentes.

Liang et al. (2013) compararam os resultados de tratamentos endodônticos com e sem ativação ultra-sônica passiva (PUI) adicional do irrigante, de 10 – 19 meses, examinando radiografia periapical (PA) e imagens com TCFC. Foram avaliados 84 dentes unirradiculares com evidência radiográfica de perda óssea periapical e atribuído a dois grupos de tratamento. A área radiográfica e a área e o

volume tomográfico das lesões periapicais foram mensuradas, comparadas e classificadas em 4 categorias: ausência, redução ou ampliação da radiolucência, ou incerto. Por TCFC lesões foram significativamente mais detectadas pós-tratamento do que quando foram analisadas por PA, mas as percentagens de ausência e redução foram semelhantes. Os resultados de TCFC mostraram que a ausência de radiolucidez foi observada em 16 de 84 dentes (19%) e a redução em 61 de 84 dentes (72,6%), mas não houve diferença significativa entre os resultados dos 2 grupos. Os autores também concluíram que os tratamentos com ultra-som e sem ativação do irrigante contribuíram igualmente para o reparo periapical.

Venskutonis et al. (2015) apresentaram uma nova escala de status periapical e avaliação do tratamento endodôntico. Os parâmetros foram selecionados a partir de índices já conhecidos na literatura científica para avaliação radiológica. Foram realizados 3 exames radiográficos: imagem por TCFC, radiografia panorâmica e radiografia periapical digital, de 55 pacientes e todos os parâmetros foram avaliados por dois observadores externos. Os resultados mostraram que o TCFC foi superior na localização de lesões comparado com a análise panorâmica, e superior no diagnóstico de destruição óssea quando comparado com os dois métodos. Os autores classificam a proposta do estudo em reprodutível, objetiva, que adiciona informações úteis dos índices existentes, e que futuros estudos devem ser realizados para validar.

2.3 ESTUDOS RELACIONADOS AO SUCESSO NO TRATAMENTO ENDODÔNTICO

Estudos retrospectivos, prospectivos e relato de caso, geralmente baseiam-se por dados clínicos, radiográficos ou tomográficos para realizar o controle e identificar fatores que podem influenciar no sucesso do tratamento.

Sjogren et al. (1990) realizaram um estudo referente a fatores que podem influenciar a longo prazo os resultados de tratamentos endodônticos. Foram avaliados 356 pacientes, entre 8 a 10 anos após o tratamento. Diversos fatores foram correlacionados, entre eles destacam-se: grupo dental, patologia inicial, características clínicas (dor, inchaço, sensibilidade à palpação apical e percussão,

mobilidade do dente, presença de cárie e do tipo de restauração) e análise radiográfica. Os resultados dos tratamentos foram diretamente dependentes quanto à patologia inicial. O comprimento e o preenchimento do canal radicular foram fatores que influenciaram significativamente o resultado. A taxa de sucesso para casos com polpas vitais ou não vitais sem rarefação apical foi de 96%, enquanto os casos de necrose pulpar com rarefação apresentaram 86%. A previsibilidade de características clínicas e radiográficas com casos de lesões periapicais pré-operatórias verificou-se ser baixa, isto indica que outros fatores podem ser fundamentais para o resultado do tratamento. É provável que a persistência da bactéria, pode ser um fator de importância, que merece uma investigação mais aprofundada. Assim, fatores que não foram medidos ou identificados podem ser críticos para os resultados do tratamento endodôntico.

Imura et al. (2007) avaliaram o resultado de 2000 casos de dentes tratados endodônticos realizados por um especialista em consultório particular. Foram avaliados aspectos clínicos e radiográficos. A análise multivariada de associações conjuntas foi avaliada entre vários fatores, usando modelos de regressão logística. A variável dependente para esta análise foi o desfecho dicotômico: cura ou doença. A taxa de sucesso endodôntico foi de 91,45%. A taxa de cura foi significativamente maior para tratamentos endodônticos iniciais quando correlacionado com retratamentos; dentes sem lesão do que para aqueles com lesões; dentes tratados sem complicações do que para aqueles com complicações; e dentes com restauração coronária definitiva do que para aqueles sem. Dos 1.376 dentes com tratamentos endodônticos iniciais, a taxa de sucesso foi 94%. Dos 624 dentes com retratamentos não cirúrgico, 85,9% foram bem sucedidos.

Ricucci et al. (2011) realizaram um estudo prospectivo de tratamentos endodônticos realizados por um único operador, controlado durante o período de 5 anos. Neste período, estavam disponíveis para avaliação 470 pacientes com 816 dentes e 1369 canais tratados, para correlacionar resultado do tratamento com variáveis clínicas. A taxa geral de sucesso entre os 816 dentes / 1369 canais disponíveis para avaliação foi de 88,6% / 90,3%. A taxa de sucesso de 435 dentes / 793 canais radiculares submetidos à terapia de polpa vital foi de 91,5% / 93,1%, enquanto a com necrose pulpar sem lesão óssea periapical detectável foi de 89,5% / 92,3%. Além do diagnóstico, há correlação do sucesso com alguns fatores, entre eles

destacam-se: casos com complicações em necrose pulpar; tamanho da rarefação óssea (dentes com rarefação óssea periapical < 5 milímetro de diâmetro apresentou taxa de 86,6%, e nos casos $\geq 5\text{mm}$ de 78,2%); o limite da obturação no canal (o excesso de material diminui a taxa de sucesso); utilização de medicação intracanal em dente com maior complexidade anatômica (realizando em 2 ou mais sessões o tratamento); uso de medicação intracanal em casos de polpa viva não interfere no resultado; a qualidade da restauração coronária e a colocação de pino intraradicular não afeta o resultado do tratamento e molares inferiores são os dentes mais difíceis para relacionar com sucesso.

Liang et al. (2013) e van der Borden et al. (2013), avaliaram a rarefação óssea por imagem de PA e TCFC e estabeleceram critérios de sucesso com base em exames radiográficos e tomográficos. Os autores classificam a comparação das imagens antes e depois de dentes submetidos a tratamento endodôntico e classificaram em 4 categorias: ausência, aumento ou redução (com 20% de alteração da inicial) e incerto (apresenta menos de 20% de alteração). Por análise de imagem, propuseram que o sucesso radiográfico consiste quando apresenta ausência ou redução comparada com a rarefação inicial.

Estrela et al. (2014) realizaram uma revisão de literatura referente as características de sucesso do tratamento endodôntico. Os principais aspectos observados são: a visão de sucesso para profissional e paciente às vezes é distinta; a qualidade do tratamento depende da base do diagnóstico, antisepsia, planejamento e a excelência da técnica operatória; o entendimento dos fatores de riscos associados aos fracassos alerta para a importância terapêutica; defesas imunológicas do hospedeiro são favoráveis, o sucesso é mais previsível; a presença de dor e aspecto de uma imagem radiolúcida, podem ser sugestivas de fracasso. As características de sucesso do tratamento (ausência de dor, regressão de rarefação apical, preenchimento do espaço do canal radicular e coronário completamente obturado, e dente em função) devem ser avaliadas ao longo do tempo e em casos de dúvida, na correta localização ou detecção na imagem radiográfica, pode ser realizado um exame tomográfico. Os autores concluem que a vida útil do dente implica na análise de resultados biológicos e mecânicos com características multifatoriais ao longo da vida do indivíduo.

O sucesso do tratamento é o principal objetivo em todas as situações clínicas envolvendo tratamento endodôntico. Apesar da grande evolução científica e

técnica que a Endodontia apresentou nos últimos anos, eliminar completamente o agente contaminante continua sendo um desafio. O entendimento dos fatores biológicos e mecânicos, como aspectos associados aos fracassos, são importantes para terapêutica. Assim como as características de sucesso do tratamento que devem ser avaliadas ao longo do tempo. Desta forma, estudos clínicos que identifiquem as bactérias no canal radicular após os procedimentos do tratamento endodôntico e o controle terapêutico desses casos são de grande importância para estabelecer medidas previsíveis da qualidade e manutenção do tratamento.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar *in vivo* a redução bacteriana por métodos moleculares, após o tratamento endodôntico em dentes portadores de periodontite apical primária e a correlação dos dados microbiológicos com características clínicas, análise radiográfica, tomográfica e o sucesso do tratamento endodôntico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada baseou-se em trabalhos clínicos e microbiológicos já descritos na Revisão da Literatura. Os procedimentos foram cuidadosamente realizados, seguindo criteriosos protocolos de assepsia, esterilização e de manuseio dos materiais a fim de garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados. Os protocolos clínicos e laboratoriais podem ser visualizados nos Apêndices A e B.

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Os procedimentos clínicos foram realizados na Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, mediante a prévia aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição, 13396213.1.0000.0075 (Anexo A), e após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por cada paciente (Apêndice C). Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Pesquisas Aplicadas à Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os exames tomográficos foram realizados no Instituto de Documentação Ortodôntica e Radiodiagnóstico (INDOR), localizado na Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Odontologia (Anexo B).

4.2 SELEÇÃO DE PACIENTES

Foram selecionados 34 dentes permanentes unirradiculares e birradiculares, em condições que justificassem a realização do tratamento endodôntico. O critério de inclusão consistiu nos elementos apresentarem infecção primária (sem tratamento endodôntico prévio) e rarefação óssea periapical visível na radiografia periapical.

Os pacientes foram submetidos à criteriosa anamnese. Foram excluídos da pesquisa pacientes com alterações sistêmicas relevantes, como doenças degenerativas crônicas, processos infecciosos, doenças autoimunes ou imunodeficiências induzidas ou adquiridas, portadores de marca-passo ou próteses coronarianas. Assim como, dentes que apresentavam bolsa periodontal superior a 4 mm, raízes com comprimento inferior a 15mm ou superior a 25mm, curvaturas superiores a 25°, apicigênese incompleta, perda de tecido dentário que impossibilitava o isolamento absoluto, ou alterações na luz do canal radicular visíveis radiograficamente, como calcificações ou reabsorções, e dentes abertos, expostos ao meio bucal. Também foi necessária a ausência do uso de antibióticos nos 90 dias anteriores ao início da pesquisa.

Os procedimentos clínicos e de coletas microbiológicas estão descritos 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

Grande importância foi dada ao processo de esterilização e despirogenização dos materiais utilizados. Os instrumentos endodônticos e papel absorvente, foram adquiridos livres de pirogênicos e pré-esterilizados pelo fabricante. Os instrumentos clínicos metálicos eram esterilizados em calor úmido 121°C por 15 minutos e posteriormente ao calor seco a 180°C por 4 horas (Hagman, 2012). Materiais termo sensíveis, como ponta de irrigação e aspiração eram esterilizadas por 20kGy de irradiação de raios Gama com Colbalto 60, por 6 horas, para a eliminação de endotoxinas.

As substâncias químicas utilizadas foram adquiridas sempre da mesma farmácia de manipulação e renovadas a cada semana, com o objetivo de mantê-las na mesma concentração e livre de contaminantes.

Nos dentes birradiculares, todos os procedimentos endodônticos foram realizados em todos os canais. As coletas, no entanto, eram realizadas apenas no canal mais amplo. A fim de evitar contaminação cruzada, os procedimentos eram realizados primeiramente no canal a ser pesquisado, posteriormente os procedimentos eram realizados nos demais canais, ambos eram selados com cimento temporário em cada momento.

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 o isolamento absoluto com arco plástico (SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), lençol de borracha (SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), grampos metálicos adequados (SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e barreira gengival (Top Dam, FGM, Brasil). A antisepsia do campo operatório e da coroa do dente era realizada com swabs esterilizados (Berkshire Corporation, North Carolina, USA) 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% (Rôças et al., 2004).

A cirurgia de acesso era realizada em duas etapas, com auxílio de brocas diamantadas esféricas 1014, 1015, 1014 HL ou 1015HL (Microdont Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil) em alta-rotação refrigerados com auxílio de

seringas de 20mL (BD Company, São Paulo, SP, Brasil) e soro fisiológico esterilizados (Laboratórios B. Braun, São Gonçalo, RJ, Brasil), tomando-se o cuidado de não acessar a câmara pulpar. Após este procedimento, o protocolo de antissepsia da coroa dental e o campo operatório eram novamente realizados como descrito anteriormente e a cirurgia de acesso finalizada com novas brocas esterilizadas, refrigeradas com soro fisiológico. Coletas da coroa com papel absorvente eram realizadas para comprovar a eficácia das manobras de desinfecção. A ausência de bactérias no campo operatório era comprovada 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. A odontometria era realizada com um Instrumento tipo K número 10 (DentsplyMaillefer, Baillagues, Suíça) em 1,0mm aquém do forame apical, com auxílio de localizador foraminal (J. Morita Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Para coleta (S1), um instrumento tipo H número 15 era pressionado contra as paredes do canal para suspender bactérias na solução salina. Quatro cones de papel número 15 eram introduzidos no canal para coletar o conteúdo inicial de bactérias, sendo mantidos em posição por 1 minuto cada. A parte ativa da lima utilizada e os cones eram depositados em microtubos esterilizados contendo 300µL de solução RNAlater (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, até se alcançar o CRT estabelecido.

Após a primeira coleta e o esvaziamento inicial do canal, instrumentos manuais do tipo K eram levados sem pressão até CRT, em ordem crescente de diâmetro - iniciando do instrumento número 10 ao número 40 (DentsplyMaillefer, Baillagues, Suíça). 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 no Preparo Químico Cirúrgico (PQC). Se este travamento fosse compatível com instrumentos 10 ou 15, o dente era excluído da pesquisa, mas para não prejudicar o paciente, o tratamento era realizado 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 será utilizado em canais cujo instrumento inicial de referência era o 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, Munique, Alemanha), ajustado no modelo reciprocante, 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 estéril, e o canal irrigado com NaOCl 2,5%, até alcançar o CRT.

Durante o PQC, a irrigação era realizada com seringas plásticas de 10mL e pontas de irrigação endodôntica com diâmetro de 30G e saída lateral para substância (Endo-EZE - UltradentProducts Inc., South Jordan, UT, Estados Unidos da América). A substância extravasada dos canais era aspirada por meio de cânulas de aspiração (SurgiTip - UltradentProducts Inc., South Jordan, UT, Estados Unidos da América) acopladas à bomba à vácuo odontológica. Foram utilizados 10 mL de NaOCl 2,5% antes de cada ciclo de instrumentação, assim, o volume total de substância empregada durante o PQC foi de 30 mL. Ao término do preparo químico mecânico os canais radiculares eram irrigados com 10mL de NaOCl 2,5%, com pontas irrigadoras posicionadas à 2 mm aquém do CRT e com movimento de vai e vem, com amplitude de aproximadamente 2mm. O conteúdo do canal era aspirado com pontas *Capillarytips* 0,014" e 0,019" (UltradentProducts Inc., South Jordan, UT, Estados Unidos da América).

Após esta etapa, foi realizada a Irrigação Ultrassônica Passiva (PUI). O protocolo consistiu em: 2mL de NaOCl 2,5% utilizando um inserto liso Irrisonic de 0,2mm de diâmetro e conicidade .01 (Helse, Ribeirão Preto, SP, Brasil), acionada por aparelho de ultrassom (CVDentus, São José dos Campos, SP, Brasil) ajustado em 10% de potência. A ponta do inserto era posicionada 2 mm aquém do CRT, com o cuidado de não encostar em nenhuma parede do canal e ativada por 30 segundos. A solução de NaOCl 2,5% era renovada (2 mL) e ativada por mais 30s. Estes procedimentos eram repetidos com 2mL de EDTA-T 17% em 2 ciclos e novamente com 2mL de NaOCl 2,5%, em 2 ciclos, totalizando 3 minutos (modificado de Beus et al., 2012).

O conteúdo do canal era aspirado com pontas *Capillarytips* 0,014" e 0,019" (UltradentProducts Inc., South Jordan, UT, Estados Unidos da América). Os canais radiculares eram preenchidos com hidróxido de cálcio, veiculado com glicerina

(Calen®), seguida de uma radiografia periapical para confirmar o preenchimento. As aberturas coronárias eram seladas com uma camada de obturador provisório (Dentalvile, Joinville, SC, Brasil) e uma camada de cimento de ionômero de vidro (Vidrion R, SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

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-T e leve agitação com limas tipo K número 15. Então, uma nova coleta (S2) foi realizada seguindo os mesmos procedimentos realizados na coleta anterior. Em seguida, os canais foram irrigados com 10mL de NaOCl 2,5%, seguido por 10mL de EDTA-T 17%, com seringa e pontas de irrigação, e obturados por meio de técnica de condensação lateral de guta-percha e cimento AH-Plus (DentsplyMaillefer, Baillagues, Suíça). As aberturas coronárias foram seladas com resina composta (Z100, 3M Corporation, St. Paul, MN, EUA) e uma radiografia periapical final de tratamento era realizada.

4.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DE BACTERIAS

Até o momento da análise, os microtubos contendo as amostras bacterianas eram armazenados em freezer a -80°C.

4.4.1 Extração de DNA

As amostras endodônticas mantidas em RNAlater eram descongeladas a 37°C e homogeneizadas por agitação durante 1 minuto. A extração de DNA foi realizada com o kit de purificação MasterPure (Epicentre, Madison, WI, Estados Unidos da América) de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as amostras iniciais estudadas deveriam ser positivas para a presença de DNA bacteriano. Os protocolos laboratoriais podem ser visualizados no Apêndice D.

4.4.2 Reação em cadeia de polimerase em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas com *primers* universais para a região 16S rRNA específicos do domínio *Bacteria*, conforme descrito por Shelburne et al. (2000). As sequências utilizadas para os *primers* foram: *Forward*: 5'-CCA TGA AGT CGG AAT CGC TAG-3' e *Reverse*: 5'-GCT TGA CGG GCG GTG T-3'. As reações eram realizadas em placas de 96 poços com um volume total de 20 µL contendo: 10 µL Power SYBR Green Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos da América), 0,5 µL de cada primer, 2 µL do DNA extraído das amostras e H₂O.

O ciclo de amplificação foi: 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento a 60°C por 1 min e extensão a 95°C por 15s. As reações foram feitas utilizando o termociclador *Step One Plus* (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos da América) e os resultados analisados pelo software ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos da América). Todas as amostras foram corridas em triplicata, utilizando-se para análise o valor médio entre ambas.

Para a realização da curva padrão, foram utilizadas diluições de concentrações conhecidas de plasmídeos que contêm o gene 16S rRNA, clonados após reação de PCR convencional. Cada concentração foi testada em triplicata para obtenção da curva com a maior eficiência e coerência possível.

4.5 TÉCNICA RADIOGRÁFICA E TOMOGRÁFICA

Após a finalização do tratamento endodôntico, os pacientes eram submetidos a técnica Radiográfica Periapical do Paralelismo para o exame radiográfico (RAD 1) e encaminhados para realizar o exame tomográfico pela técnica Tomográfica Computadorizada de Feixe Cônico (TCFC) no Instituto de Documentação Ortodôntica e Radiodiagnóstico (TOMO 1). Após um ano do tratamento concluído, novas radiografias e tomografias foram realizadas (RAD 2 E TOMO 2).

Para a técnica Radiográfica Periapical do Paralelismo, foram utilizados filmes radiográficos periapicais convencionais de adulto (Filme Dental E-Speed, Kodak, Estados Unidos da América), em posicionador radiográfico de acordo com o grupo dental e posição do dente na arcada (Posicionador de Filmes Radiográficos Periapicais - Adulto – Indusbello, Brasil), e utilizado o equipamento de Raios-X (Timex 70 C, Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil), com os seguintes fatores: 70 kVp, 7 mA e um tempo de exposição de 0,8 segundos. Posteriormente, as radiografias foram processadas e escaneadas para análise.

Para o exame tomográfico de pequeno volume, foi realizada a técnica Tomográfica Computadorizada de Feixe Cônico (TCFC). Utilizou-se o equipamento J Morita Veraviewepocs 3D R100, para as obtenções das imagens, com volume de 4cmx 4cm, 90 kVp, 8 mA e tempo de exposição de 9,4 segundos. Posteriormente as imagens foram transportadas em formato DICOM (Diagnostic Imaging and Communication in Medicine) para análise.

Para analisar as imagens, os arquivos radiográficos foram salvos em JPEG e importados para o programa ImageJ e os tomográficos para o programa Osirix MD 6.5, que permitiram a análise de forma qualitativa, assim como quantitativa para tomográfica. Os filtros, o brilho e o contraste foram ajustados e as imagens analisadas em um visor de 16 polegadas. Dois observadores (1 endodontista e 1 radiologista) foram treinados e examinaram as imagens separadamente, em dois momentos diferente cada imagem. Primeiro foram analisadas RAD 1 de todos os pacientes, depois de uma semana TOMO 1. Um mês mais tarde, foram analisadas as RAD 2 e TOMO 2, da mesma forma. Uma semana depois foi realizada a análise por comparação RAD 1 com RAD 2 e TOMO 1 com TOMO 2. Foi realizado o teste de concordância Kappa, inter e intrabbservadores para classificar o índice de concordância. Em caso de desacordo, o caso era discutido, e foi alcançado um consenso.

4.6 CRITÉRIOS DE ANÁLISE

Os dados pré-operatórios e operatórios foram tabulados. Consultas periódicas foram agendadas e após um ano de tratamento, novos dados eram obtidos: características clínicas e análise da rarefação óssea por exame radiográfico (RAD 2) e tomográfico (TOMO 2). Foram estabelecidos critérios e índices para as análises, selecionados a partir da literatura conhecida.

4.6.1 Análise das características clínicas

Após um ano de tratamento os pacientes foram submetidos a nova anamnese e foi observado: a presença de sinais ou sintomas, alteração no elemento dental, qualidade do selamento e qualidade do tratamento endodôntico.

A qualitativa do tratamento endodôntico foi realizada por análise radiográfica e tomográfica, os critérios foram estabelecidos semelhantes ao método apresentado por Venskutonis et al. (2015), *Periapical and endodontic status scale - PESS*, apresentado no quadro 4.1.

COMPRIMENTO DA OBTURAÇÃO DO CANAL RADICULAR	
C 1	Ponta do cone até o ápice: de 0-2mm
C 2	Ponta do cone até o ápice: > 2mm
C 3	Extrusão de material obturador (Cone)
HOMOGENEIDADES DO PREENCHIMENTO DO CANAL	
H 0	Completo preenchimento
H 1	Preenchimento com falha
QUALIDADE DA OBTURAÇÃO	
Satisfatório C 1 e H 0	
Insatisfatório C 2, C3 e/ ou H1	
SELAMENTO CORONAL	
SO 1	Satisfatório
SO 2	Insatisfatório

Quadro 4.1 – Índice para avaliação do tratamento endodôntico.

4.6.2 Análise da rarefação óssea por exame radiográfico e tomográfico

Os observadores examinaram as imagens e primeiramente foram tabulados os dados das análises qualitativas de forma comparativa. O critério analisado foi a área da rarefação óssea da imagem logo após do tratamento endodôntico realizado, com a imagem após um ano de controle. Comparando as imagens (radiográficas e tomográficas de forma independente), os casos eram classificados em 4 categorias: ausência, aumento ou redução (20% de alteração) e incerto (menor que 20% de alteração). Na análise tomográfica, também foi realizada a análise quantitativa para certificar se o caso apresentava 20% de alteração. As análises foram realizadas nos 3 planos (axial, sagital e coronal), e os dados registrados foram nos planos que apresentavam a maior área de rarefação óssea inicial.

Foi proposto que o sucesso do tratamento endodôntico consistia quando: por análise da imagem, os casos classificados nas categorias ausência e redução da rarefação óssea (Liang et al., 2013) e pela análise da anamnese, o elemento que apresentava ausência de sinais e sintomas.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram tabulados, inseridos em uma planilha e analisados estatisticamente usando SPSS para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL). Observaram-se distribuições não-normais para análise da redução bacteriana, desta forma, optou-se pela realização de testes não-paramétricos numéricos, o teste Wilcoxon. Foram utilizados os testes Qui-quadrado de Pearson ou Teste Exato de Fisher para análise de regressão logística. Os dados Tomográficos foram tabulados e avaliados de forma descritiva.

5 RESULTADOS

Foram analisados 34 casos com dados clínicos, microbiológicos e radiográficos iniciais. O controle clínico foi realizado com 20 pacientes de 13 à 22 meses após o tratamento endodôntico concluído, 2 dentes foram excluídos por motivos não relacionados ao tratamento endodôntico. Para análise radiográfica e tomográfica, os dados foram observados por 2 observadores e os coeficientes de correlação intra examinadores foi de 0,807 e inter examinadores de 0,609.

5.1 DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES

A amostra de 18 pacientes foi caracterizada de forma descritiva de acordo com os dados clínicos pré-operatórios, operatórios e pós-operatórios. A tabela 5.1 apresenta a distribuição dos pacientes de acordo com a idade, o gênero, localização e grupo dental no critério pré-operatório. Durante o tratamento endodôntico, foi registrado o diâmetro apical inicial, de acordo com o primeiro instrumento que demonstrou travamento no CRT, assim como o diâmetro apical final, após o PQC, que apresentou 61.11% de diâmetro 50 e 38.89% 40. O controle terapêutico foi realizado em 55.56% dos casos entre 13 à 18 meses e 44.44% de 19 à 22 meses. Todos os dentes apresentaram selamento satisfatório, nenhum apresentou sintomatologia e nem foi submetido a outro tratamento durante o período de controle. Quanto ao controle radiográfico, 18 (100%) casos foram realizados por radiografias periapicais, e 12 (66.67%) também por análise tomográfica.

Tabela 5.1 – Distribuição dos dados clínicos dos pacientes. (N= 18)

Características clínicas			N	%
Pré-Operatório				
Idade	< 20		2	11.11
	20 - 40		9	50.00
	> 40		7	38.89
Gênero	Masculino		5	27.78
	Feminino		13	72.22
Localização do dente	Maxila		12	66.67
	Mandíbula		6	33.33
Grupo Dental	Anterior		10	55.56
	Pré-molar		8	44.44
Operatório				
Diâmetro apical inicial	# 20 à # 30		7	38.89
	# 35 à # 40		11	61.11
Diâmetro apical final	40		7	38.89
	50		11	61.11
Qualidade da Obturação	Satisfatória		16	88.89
	Insatisfatória		2	11.11
Pós-Operatório				
Período de Retorno	13- 18 meses		10	55.56
	19- 22 meses		8	44.44
Selamento	Satisfatória		18	100.00
	Insatisfatória		0	0.00
Exame Radiográfico	Radiografia Periapical		18	100.00
	TCFC		12	66.67

5.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ACORDO COM DADOS CLÍNICOS, RADIOGRÁFICOS E TOMOGRÁFICOS

Todas as amostras iniciais foram positivas para a presença de DNA bacteriano. O valor mediano inicial das concentrações de DNA bacteriano em canais com periodontite apical primária foi 1.68×10^6 (intervalo de 2.88×10^3 - 1.08×10^7), e após o tratamento endodôntico foi de 8.74×10^2 (intervalo de 0 - 2.85×10^4), os resultados mostraram que houve diminuição significativa na concentração de DNA bacteriano ($p < 0,05$), correspondendo a porcentagem de redução de 99.98%. A tabela 5.2 apresenta as concentrações DNA bacteriano de acordo com os dados clínicos e análise radiográfica e tomográfica das rarefações ósseas. Observa-se que o valor mediano mais elevado de bactéria foi observado em dentes com menor

diâmetro apical inicial 3.75×10^6 com intervalo de 3.71×10^4 à 1.08×10^7 . Dentes instrumentados com limas de diâmetro apical final correspondendo a 40, apresentaram concentrações menores de DNA bacteriano quando comparados com dentes instrumentados com diâmetro 50, apresentando intervalo de 0 à 4.03×10^3 e 0 à 2.85×10^4 , respectivamente.

De acordo com a análise estatística de regressão logística, não houve correção das concentrações de DNA bacteriano com sucesso ou insucesso radiográfico. Quanto a análise do controle terapêutico por radiografia periapical, observa-se que 88,88%, 16/18 casos apresentaram sucesso apresentando um intervalo de concentração de DNA bacteriano de 0 à 1.53×10^4 . Os casos classificados como insucesso 2/18, apresentaram mediana de 1.63×10^4 com intervalo de 4.03×10^3 à 2.85×10^4 . A análise tomográfica apresentou 9/12 casos com sucesso, correspondendo ao intervalo de concentração de DNA bacteriano de 0 à 1.58×10^4 (Figura 5.1). Os casos classificados como insucesso 3/12, apresentaram mediana de 4.03×10^3 com intervalo de 0 à 2.85×10^4 .

Tabela 5.2 – Concentração de DNA bacteriano de acordo com achados clínicos e tamanho da rarefação óssea por análise radiográfica e tomográfica

				Concentração de DNA Bacteriano	
				Mediana	Intervalo
Concentração total de DNA bacteriano das amostras	Inicial		N 18	1.68×10^6	$(2.88 \times 10^3 - 1.08 \times 10^7)$
	Final		N 18	8.74×10^2 (a)	$(0 - 2.85 \times 10^4)$
Diâmetro Apical	Inicial	20 à 30	N 07	3.75×10^6	$(3.71 \times 10^4 - 1.08 \times 10^7)$
		35 à 40	N 11	1.45×10^6	$(2.88 \times 10^3 - 1.17 \times 10^7)$
	Final	40	N 07	0	$(0 - 4.03 \times 10^3)$
		50	N 11	1.78×10^3	$(0 - 2.85 \times 10^4)$
Área Radiográfica	Sucesso (ausência/ redução)		N 16	0	$(0 - 1.53 \times 10^4)$
	Insucesso (aumento/incerto)		N 02	1.63×10^4	$(4.03 \times 10^3 - 2.85 \times 10^4)$
Área Tomográfica	Sucesso (ausência/ redução)		N 09	1.75×10^3	$(0 - 1.58 \times 10^4)$
	Insucesso (aumento/incerto)		N 03	4.03×10^3	$(0 - 2.85 \times 10^4)$

(a) $p < 0,05$.

Figura 5.1 – Imagens tomográficas de caso clínico com sucesso. Redução da área da rarefação óssea observada nos cortes sagital, axial e coronal, com controle de 15 meses. (A, B e C) área inicial, (D, E e F) área no controle.

5.3 ANÁLISES DAS CARACTERÍSTICAS DO TRATAMENTO, DADOS MICROBIOLÓGICO, RADIOGRÁFICO E TOMOGRÁFICOS DE CONTROLE

A tabela 5.3 apresenta a porcentagem de aumento do diâmetro apical, porcentagem de redução na análise microbiológica, e dados dos tratamentos por análise clínica, radiográfica e tomográfica. Todos os dentes apresentaram selamento satisfatório nas consultas de controle, nenhum apresentou sintomatologia, nem foi submetido a outro tratamento como restaurações e reabilitação protética durante o período de controle.

Observa-se que a porcentagem de aumento do diâmetro apical dos dentes depende do diâmetro inicial e do diâmetro final, ou seja, quando o diâmetro inicial corresponde a 20, o diâmetro final é 40, e apresenta um aumento de 300%, 3 vezes mais que o tamanho inicial. Quando diâmetro inicial corresponde a 25, o diâmetro final é 40, e apresenta um aumento de 156%, 1,56 vezes mais que o tamanho inicial. Para o diâmetro inicial 35 e 40, o diâmetro final é 50 e o aumento é de 104% e 56% respectivamente.

Tabela 5.3 – Dados clínicos, microbiológico e classificação de dados radiográficos e tomográficos.

	Diâmetro Apical			Concentração de DNA bacteriano			Qualidade da obturação	Controle	Análise Radiográfica	Análise Tomográfica
	Inicial	Final	% de Aumento	Inicial	Final	% de redução				
P A C I E N T E	40	50	56.000	1.49E+06	0.00E+00	100.000	SATISFATÓRIO	22 meses	AUSENCIA	AUSENCIA
	25	40	156.000	1.00E+07	0.00E+00	100.000	SATISFATÓRIO	19 meses	AUSENCIA	AUSENCIA
	25	40	156.000	3.76E+06	3.77E+03	99.900	SATISFATÓRIO	22 meses	AUSENCIA	AUSENCIA
	35	50	104.000	4.66E+06	1.58E+04	99.662	SATISFATÓRIO	14 meses	AUSENCIA	AUSENCIA
	20	40	300.000	1.08E+07	0.00E+00	100.000	SATISFATÓRIO	15 meses	REDUÇÃO	REDUÇÃO
	25	40	156.000	1.87E+06	0.00E+00	100.000	SATISFATÓRIO	19 meses	REDUÇÃO	REDUÇÃO
	40	50	56.000	2.88E+03	1.78E+03	38.320	INSATISFATÓRIA	16 meses	REDUÇÃO	REDUÇÃO
	35	50	104.000	1.16E+05	6.06E+03	94.780	SATISFATÓRIO	18 meses	AUSENCIA	REDUÇÃO
	40	50	56.000	7.48E+06	1.75E+03	99.977	SATISFATÓRIO	14 meses	REDUÇÃO	REDUÇÃO
	35	50	104.000	1.17E+07	0.00E+00	100.000	SATISFATÓRIO	18 meses	REDUÇÃO	INCERTO
	35	50	104.000	1.45E+06	2.85E+04	98.036	SATISFATÓRIO	13 meses	INCERTO	INCERTO
	25	40	156.000	6.20E+05	4.03E+03	99.350	INSATISFATÓRIA	22 meses	AUMENTO	AUMENTO
	40	50	56.000	1.38E+05	0.00E+00	100.000	SATISFATÓRIO	14 meses	AUSENCIA	
	40	50	56.000	2.58E+06	8.94E+03	99.653	SATISFATÓRIO	21 meses	AUSENCIA	
	35	50	104.000	1.07E+05	1.53E+04	85.729	SATISFATÓRIO	13 meses	AUSENCIA	
	35	50	104.000	4.58E+05	0.00E+00	100.000	SATISFATÓRIO	22 meses	REDUÇÃO	
	20	40	300.000	3.75E+06	0.00E+00	100.000	SATISFATÓRIO	20 meses	REDUÇÃO	
	25	40	156.000	3.71E+04	0.00E+00	100.000	SATISFATÓRIO	15 meses	REDUÇÃO	
				Mediana 1.68E+06	Mediana 8.74E+02	99.988				

Os resultados mostraram pela análise estatística de regressão logística que não há correlação das quantidades de DNA bacteriano final com os critérios analisados dos tratamentos e com sucesso ou insucesso sugerido neste trabalho por análise radiográfica. Observa-se que a porcentagem de redução da concentração de DNA bacteriano corresponde a 99.988% e que de algumas amostras houve redução de 100% do conteúdo bacteriano. A mediana dessa concentração final corresponde a 8.74×10^2 , no intervalo de 0 à 2.85×10^4 .

Na análise da qualidade da obturação, 16/18 dentes foram classificados como satisfatórios na análise radiográfica e 10/12 na análise tomográfica. Um tratamento foi classificado como insatisfatório por apresentar falha na homogeneidade da obturação, quanto a análise radiográfica e tomográfica, este foi classificado como insucesso por apresentar aumento da rarefação óssea. Outro dente foi classificado como insatisfatório por apresentar falha na homogeneidade e extravasamento do material obturador, entretanto foi classificado como sucesso na

análise radiográfica e tomográfica por apresentar redução da área da rarefação óssea (Figura 5.2).

Figura 5.2 – Imagens tomográficas de caso clínico com obturação insatisfatória, entretanto com redução da área da rarefação óssea observada nos cortes sagital, axial e coronal, com controle de 16 meses. (A, B e C) área inicial, (D, E e F) área no controle.

Na análise radiográfica, 16 dos 18 casos foram classificados como sucesso pois não apresentaram rarefação óssea ou houve redução da rarefação quando comparado com a radiografia periapical inicial, e 2 casos foram classificados como insucesso. Um caso apresentou aumento da rarefação, este com porcentagem de aumento do diâmetro apical de 156%, concentração de DNA bacteriano final correspondente a 4.03×10^3 com porcentagem de redução de 99.35% e qualidade da obturação classificado como insatisfatório. O outro caso foi classificado como incerto quando comparado com a área da rarefação inicial, este com porcentagem de aumento do diâmetro apical de 104%, concentração de DNA bacteriano final correspondente a 2.85×10^4 com porcentagem de redução de 98.03% e qualidade da obturação classificado como satisfatório.

Na análise tomográfica, 9 dos 12 casos foram classificados como sucesso pois não apresentaram rarefação óssea ou houve redução da rarefação quando

comparado com tomografia inicial (Figura 5.2), e 3 casos foram classificados como insucesso. Dois destes casos de insucesso, foram os mesmos achados e descritos na análise da radiografia periapical (Figura 5.3). Somente um caso não foi concordante com a análise radiográfica, este classificado como incerto na análise tomográfica, apresentou porcentagem de aumento do diâmetro apical de 104%, concentração de DNA bacteriano final 0, ou seja, 100% de redução, e qualidade da obturação classificado como satisfatório (tabela 5.3).

Figura 5.3 – Imagens tomográficas de caso clínico com insucesso. Controle de 13 meses. (A, B e C) área inicial, (D, E e F) área no controle.

6 DISCUSSÃO

Os critérios de inclusão dos 34 pacientes portadores de dentes com periodontite apical primária foram estabelecidos de acordo com outros trabalhos clínicos publicados que também fizeram uso de tecnologias de quantificação de microrganismos para analisar a eficiência e o conteúdo durante o tratamento endodôntico (Vianna et al., 2006; Sakamoto et al., 2007; Rôças et al., 2013; Paiva et al., 2013). Optou-se pela inclusão de dentes unirradiculares e birradiculares devido ao alto número de sujeitos da pesquisa e à dificuldade em se obter casos clínicos que se enquadrassem em todos os critérios de inclusão. Outros trabalhos também relatam a inclusão de diferentes grupos dentários com objetivos semelhantes a este estudo (Sjogren et al., 1990; Imura et al., 2007; Ricucci et al., 2011; Paiva et al., 2013).

O PQC foi realizado com instrumentos endodônticos reciprocantes, por diversos trabalhos publicados relatarem a eficiência destes instrumentos, destacando-se a diminuição de micro-organismos de canais radiculares (Alves et al., 2012; Machado et al., 2013; Basmaci et al., 2013). Foi utilizado o NaOCl 2,5% como substância química durante o preparo do canal radicular devido à sua eficácia na antissepsia de canais radiculares, característica já comprovada em diversos estudos (Siqueira Jr. et al., 2007a; 2007b; Tirali et al., 2009; Basmaci et al., 2013; Nakamura et al., 2013). Outra substância utilizada foi o EDTA-T 17 como auxiliar na limpeza dos canais radiculares e atuar na remoção do magma dentinário (De Deus et al., 2006; Andrabi et al., 2013).

A utilização da PUI para complementar os procedimentos de limpeza e antissepsia do canal foi realizada pois estudos demonstraram que seu emprego proporciona paredes mais limpas (van der Sluis et al., 2006; Rödíg et al., 2010), e aumento da eficiência antimicrobiana (Townsend; Maki, 2009; Cachovan et al., 2013; Nakamura, 2014), embora outros autores não observam esta diferença (Alves et al., 2011; Paiva et al., 2012; Liang et al., 2013).

O método de coleta empregado é amplamente utilizado em estudos publicados que avaliam o efeito dos procedimentos endodônticos no conteúdo microbiológico dos canais radiculares (Vianna et al., 2006; Rôças et al., 2013;

Nakamura, 2014). Uma de suas limitações é o fato de que a amostragem é representada somente pelo conteúdo da luz do canal.

Os métodos moleculares são hoje os meios de avaliação mais precisos, por apresentarem alta sensibilidade de identificar e quantificar a presença de bactérias. Neste estudo, a análise quantitativa do conteúdo de bactérias dos canais radiculares foi realizada pelo método de PCR em tempo real (qPCR) devido a sua capacidade em identificar micro-organismos e quantificá-los (Vianna et al., 2006; Sakamoto et al., 2007; Rôças et al., 2013; Paiva et al., 2013). Uma das vantagens desta técnica sobre as técnicas de cultura e contagem de UFC é a possibilidade de quantificar tanto as bactérias cultiváveis quanto as não cultiváveis presentes em uma amostra, uma vez que primer utilizado é específico para o domínio *Bacteria*.

Por meio da análise molecular qPCR, 100% das amostras iniciais foram positivas para presença de DNA bacteriano, com concentrações altas, apresentando mediana de 1.68×10^6 para a coleta inicial. Estes valores estão em conformidade com outros trabalhos que utilizaram metodologia semelhante de análise (Sedgley et al., 2006; Sakamoto et al., 2007; Paiva et al., 2013; Nakamura, 2014). Em relação aos níveis detectados na coleta final, após o protocolo do tratamento, o valor foi reduzido para 8.74×10^2 , correspondendo uma porcentagem de redução de 99.98%, semelhante a outros (Sakamoto et al., 2007; Nakamura, 2014). Divergindo dos resultados de Paiva et al. (2013), que apresentaram mediana de 0. Acredita-se que este fato pode ter ocorrido devido ao números de casos, pois quando correlacionado pelo intervalo das concentrações, os resultados são semelhantes, no presente estudo o intervalo foi de 0 à 2.85×10^4 e no estudo citado de 0 à 7.38×10^4 .

Dentes instrumentados com limas de diâmetro apical final correspondendo a 40, apresentaram concentrações menores de DNA bacteriano quando comparados com dentes instrumentados com diâmetro 50, apresentando intervalo de 0 à 4.03×10^3 e 0 à 2.85×10^4 , respectivamente. Fato que pode ser relacionado com a porcentagem de aumento do diâmetro apical final, pois quando o diâmetro inicial corresponde a 20, o diâmetro final foi 40, apresentando um aumento de 300%, 3 vezes mais que o tamanho inicial. Quando diâmetro inicial corresponde a 25, o diâmetro final é 40, apresentando um aumento de 156%, 1,56 vezes mais que o tamanho inicial, já quando o diâmetro inicial é 35 e 40, o diâmetro final é 50 e o aumento cai para de 1,04 e 0,56 vezes, respectivamente.

A taxa de retorno neste estudo foi de 58.82%, mesmo com o controle de 13 à 22 meses, após o tratamento endodôntico concluído. Observou-se que foi menor do que outros estudos, como Liang et al. (2013) com 82% e Ørstavik (1996) 71%. Sabe-se que uma taxa de retorno baixa apresentam resultados parciais, entretanto, um curto período de controle pode apresentar porcentagem subestimadas de dentes com total ausência de rarefação, devido a encontra-se no processo de reparo (Bystrom et al., 1987; Ng et al., 2007). Contudo, dentro dos 13-22 meses de avaliação, pode-se observar ausências de rarefação, assim como redução significativa com mais de 20%, semelhante aos resultados encontrado por Liang et al. (2013).

Neste estudo o controle radiográfico por radiografia periapical foi realizado com 18 pacientes, por ser o método mais tradicional, fácil e acessível na rotina odontológica para avaliar presença de rarefação óssea. Entretanto, devido ao equipamento tomográfico ser localizado em outro ambiente físico e não na clínica odontológica, o número de controle por esse método foi de 12 casos. Foram observado que 100% dos dentes apresentaram selamento satisfatório, nenhum apresentou sinais, sintomatologia e nem foi submetido a outro tratamento durante o período de controle, fato relevante que desconsidera intervenções que poderiam modificar as características das amostras.

A análise das imagens geralmente seguem critérios estabelecidos por autores em diferentes trabalhos e que as vezes diferem em alguns aspectos. Os critérios adotados neste estudo foram baseados em estudo de grande relevância, ou seja, quanto a análise do tratamento os critérios adotados foram de acordo com Venskutonis et al. (2015). Em relação a rarefação óssea por análise radiográfica e tomográfica os critérios foram baseados nos trabalhos de Liang et al. (2013) e van der Borden et al. (2013), com pequenas adaptações. Os autores classificam a comparação das imagens em 4 categorias: ausência, aumento ou redução (com 20% de alteração da inicial) e incerto (apresenta menos de 20% de alteração). Por análise de imagem é posposto que o sucesso consiste quando apresenta ausência ou redução comparada com a rarefação inicial e o insucesso quando apresenta aumento ou classificado como incerto.

De acordo com as categorias estabelecidas para análise das rarefações ósseas, os resultados desse estudo demostraram que 88,8% dos casos apresentaram sucesso, ou seja, ausência ou redução da área radiográfica, resultado

semelhante ao de Liang et al. (2013) que apresentou 91,6% e van der Borden et al. (2013) 88,7%. Em comparação aos dados por PA e por TCFC, van der Borden et al. (2013) apresentaram que 32 dos 71 casos (45,1%) estavam em desacordo, fato não observado no estudo de Liang et al. (2013) e neste estudo, em que ocorreu desacordo em somente 1 caso, entretanto, este fato não foi comparado neste estudo e também não é possível comparar com os demais estudos devido ao número de casos analisados serem distintos.

Correlacionando os resultados microbiológicos e análise radiográfica, destaca-se que houve redução de 100% do conteúdo bacteriano em 9 casos e estes foram classificados como sucesso pela análise radiográfica. Quanto a análise tomográfica, dos 5 casos que apresentaram 100% de redução, 4 foram classificados como sucesso e 1 como insucesso, sendo que este insucesso, encontra-se na categoria incerto, não apresentou redução superior a 20% da inicial, assim, pode-se sugerir que este caso esteja em processo de cicatrização, podendo aumentar o tempo de controle para posterior análise (Ng et al., 2007; Ørstavik et al., 2004).

Na análise radiográfica, em 16 dos 18 casos não foi observada rarefação óssea ou houve redução da área, mesmo quando o conteúdo microbiológico não apresentou redução de 100%. Esses casos apresentaram redução do conteúdo microbiológico com intervalo de redução de 38.32% à 100%. Este fato pode ser relacionado com trabalhos que correlacionam o sucesso do tratamento com a redução de micro-organismos (Sjogren et al., 1990; Siqueira- Júnior; Rôças, 2008; Ricucci et al., 2011). Ou até mesmo, ser correlacionado com a discussão do método de qPCR ser sujeito a apresentar “falsos positivos” na detecção do DNA, quantificando além dos DNAs de bactérias viáveis, fragmentos de DNA de bactérias não viáveis, podendo superestimar a quantidade de bactérias que a amostra realmente possui. Dos 2 casos classificados como insucesso, 1 apresentou aumento da rarefação, fato que pode ser relacionado com a concentração de DNA bacteriano final correspondente a 4.03×10^3 , porcentagem de redução de 99.35% e pela qualidade da obturação ser classificada como insatisfatória. O outro caso classificado como incerto pode ser relacionado com a porcentagem de aumento de o diâmetro apical ser 104%, concentração de DNA bacteriano final correspondente a 2.85×10^4 e com porcentagem de redução de 98.03%, mesmo com a qualidade da obturação sendo satisfatória.

Na análise tomográfica, em 9 dos 12 casos não foi observada rarefação óssea ou houve redução da área e do volume, mesmo quando o conteúdo microbiológico não apresentou redução de 100%. Esses casos apresentaram redução do conteúdo microbiológico com intervalo de redução de 38.32% à 100%. Este fato pode ser relacionado com trabalhos que correlacionam o sucesso do tratamento com a redução de micro-organismos como descrito anteriormente. Os outros 3 casos foram classificados como insucesso, 2 foram semelhantes a análise radiográfica e somente um caso não foi concordante com a análise radiográfica, fato possivelmente ocorrido devido a análise tomográfica ser mais precisa e detalhada em delimitar a rarefação óssea. Este caso classificado como incerto na análise da área tomográfica apresentou concentração de DNA bacteriano com 100% de redução, o que sugere que possa estar em processo de cicatrização, conforme descrito anteriormente.

Estudos descrevem critérios relacionados ao de sucesso para o tratamento endodôntico, entretanto não há um consenso, até mesmo por vários trabalhos citarem que esses critérios são multifatoriais. Depende de fatores fundamentais, como, defesa do hospedeiro, grau de virulência dos microorganismos, estrutura do biofilme, antissepsia satisfatória, instrumentação, irrigação, obturação, fatores relacionados a anatomia do sistema de canal radicular e selamento do dente. (Estrela et al., 2008; Estrela et al., 2009; Nair, 2009).

A redução de micro-organismos é um fator importante e inquestionável, (Siqueira- Júnior; Rôças, 2008; Sjogren et al., 1990; Ricucci et al., 2011; Estrela 2014; Imura et al., 2007). Embora os níveis mínimos de remanescentes microbianos nos canais radiculares que possibilitem a cura ou a manutenção da saúde perirradicular sejam desconhecidos, deve-se lembrar de que mesmo com a permanência de micro-organismos no canal radicular após a correta execução do tratamento endodôntico, o índice de sucesso da é relativamente alto, chegando a alcançar patamares de 80% a 94% (Torabinejad et al., 2007; Ng et al., 2011; Ricucci et al., 2011).

Desta forma, neste estudo foram utilizados métodos moleculares bastante sensíveis para detectar níveis microbianos nos canais radiculares. O tratamento endodôntico foi eficaz em reduzir significativamente a quantidade de bactérias dos canais radiculares e promover uma elevada taxa de sucesso endodôntico, embora o sucesso seja obtido de forma multifatorial. Foi possível estipular os níveis mínimos

aceitáveis de conteúdo microbiano no canal radicular, sugere-se com o método proposto que a redução de até 38.32%, permanecendo 1.78×10^3 ou 85.72%, permanecendo 1.53×10^4 de concentração bacteriana, assim como com qualidade de obturação e selamento satisfatória, ausência de dor e exsudato, e controle radiográfico com ausência ou redução óssea, o caso pode ser considerado como sucesso. Porém, novos estudos com amostras maiores devem ser realizados com o objetivo de comparar e correlacionar os critérios específicos e de alta sensibilidade analisados e citados neste estudo, para assim podermos apresentar e compreender os critérios que influenciam na previsibilidade do sucesso no tratamento endodôntico.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, dentro das limitações da metodologia utilizada, conclui-se, a respeito do estudo proposto em Avaliar *in vivo* a redução bacteriana por métodos moleculares, após o tratamento endodôntico em dentes portadores de periodontite apical primária que:

- Dentes com necrose pulpar e periodontite apical apresentam uma elevada concentração de bactérias nos canais radiculares.
- O protocolo de antissepsia foi eficaz, por apresentar redução significativa do número de DNA bacteriano nos canais radiculares após o tratamento endodôntico realizado.
- Não há correlação da quantidade de DNA bacteriano com a área da rarefação óssea.
- Quanto ao controle terapêutico, a antissepsia foi eficiente e o tempo suficiente para ausência ou redução da rarefação óssea na maioria dos casos estudados, aspecto sugestivo de reparo e sucesso do tratamento por análise clínica, radiográfica e tomográfica.

REFERÊNCIAS¹

Alves FR, Almeida BM, Neves MA, Moreno JO, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Disinfecting oval-shaped root canals: effectiveness of different supplementary approaches. *J Endod*. 2011 Apr;37(4):496-501. doi: 10.1016/j.joen.2010.12.008.

Alves FR, Rôças IN, Almeida BM, Neves MA, Zoffoli J, Siqueira JF Jr. Quantitative molecular and culture analyses of bacterial elimination in oval-shaped root canals by a single-file instrumentation technique. *Int Endod J*. 2012 Sep;45(9):871-7. doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02045.x.

Andrabi SM, Kumar A, Mishra SK, Tewari RK, Alam S, Siddiqui S. 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. doi: 10.1111/j.1747-4477.2012.00350.x.

Basmaci F, Oztan MD, Kiyani 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.

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

Bornstein MM, Lauber R, Sendi P, von Arx T. Comparison of periapical radiography and limited cone-beam computed tomography in mandibular molars for analysis of anatomical landmarks before apical surgery. *J Endod*. 2011 Feb;37(2):151-7. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.014.

Bystrom A, Happonen RP, Sjogren U, Sundqvist G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Endod Dent Traumatol*. 1987 Apr; 3(2):58-63.

Cachovan G, Schiffner U, Altenhof S, Guentsch A, Pfister W, Eick S. Comparative antibacterial efficacies of hydrodynamic and ultrasonic irrigation systems in vitro. *J Endod*. 2013 Sep;39(9):1171-5. doi: 10.1016/j.joen.2013.06.008.

Cardoso FGR, Ferreira NS, Martinho FC, Nascimento GG, Manhães Jr LRC, Rocco MA, Carvalho CAT, Valera MC. Correlation between Volume of Apical Periodontitis

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

Determined by Cone-beam Computed Tomography Analysis and Endotoxin Levels Found in Primary Root Canal Infection. *J Endod*. 2015 Jul;41(7):1015-9. doi: 10.1016/j.joen.2015.02.005.

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.

Estrela C, Holland R, , CRA Estrela, Alencar AH¹, Sousa-Neto MD¹, Pécora JD. Characterization of Successful Root Canal Treatment. *Brazilian Dental Journal*. 2014 Jan-Feb;25(1):3-11. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-6440201302356>.

Estrela C, Bueno MR. Epidemiology and therapy of apical periodontitis. In: Estrela C. *Endodontic science*. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2009. p. 349-420.

Estrela C, Leles CR, Hollanda ACB, Moura MS, Pécora JD. Prevalence and risk factors of apical periodontitis in endodontically treated teeth in a selected population of Brazilian adults. *Braz Dent J*. 2008;19(1):34-39. doi:10.1590/S0103-64402008000100006.

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

Imura N, Pinheiro ET, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. The outcome of endodontic treatment: a retrospective study of 2000 cases performed by a specialist. *J Endod*. 2007 Nov;33(11):1278-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2007.07.018>

Liang YH, Jiang LM, Jiang L, Chen XB, Liu YY, Tian FC, et al. Radiographic healing after a root canal treatment performed in single-rooted teeth with and without ultrasonic activation of the irrigant: a randomized controlled trial. *J Endod*. 2013 Oct;39 (10):1218–25. doi: 10.1016/j.joen.2013.06.024.

Machado ME, Nabeshima CK, Leonardo MF, Reis FA, Britto ML, Cai S. Influence of reciprocating single-file and rotary instrumentation on bacterial reduction on infected root canals. *Int Endod J*. 2013 Nov;46(11):1083-7. doi: 10.1111/iej.12108.

Metska ME, Parsa A, Aartman IHA, Wesselink PROzok AR. Volumetric changes in apical radiolucencies of endodontically treated teeth assessed by cone-beam computed tomography 1 year after orthograde retreatment. *J Endod*. 2013 Oct;39(12):1504-9. doi: 10.1016/j.joen.2013.08.034.

Nair PNR. Biology and pathology of apical periodontitis. In: Estrela C. Endodontic science. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2009. p. 285-347.

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.

Nakamura VC, Cai S, Candeiro GT, Ferrari PH, Caldeira CL, Gavini G. 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.

Ng YL, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part 1: periapical health. *Int Endod J*. 2011 Jul;44(7):583-609. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01872.x.

Ng Y-L, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature—part 1: effects of study characteristics on probability of success. *Int Endod J*. 2007 Dec;40(12):921–39. doi: 10.1111/j.1365-2591.2007.01322.x

Ørstavik D. Time-course and risk analyses of the development and healing of chronic apical periodontitis in man. *Int Endod J*. 1996 Mai;29(3):150-5.

Ørstavik D, Qvist V, Stoltze K. A multivariate analysis of the outcome of endodontic treatment. *Eur J Oral Sci*. 2004 Jun;112(3):224–30. doi: 10.1111/j.1600-0722.2004.00122.x

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

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

Ricucci D, Russo J, Rutberg M, Burleson JA, Spångberg LS. A prospective cohort study of endodontic treatments of 1,369 root canals: results after 5 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Dec;112(6):825-42. doi: 10.1016/j.tripleo.2011.08.003.

Rôças IN, Siqueira JF, Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004 Feb; 30(2):315–20. <http://dx.doi.org/10.1097/00004770-200405000-00004>

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*. 2011 Feb;37(2):143–50. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.006.

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

Rödig T, Bozkurt M, Konietzschke F, Hülsmann M. Comparison of the vibringe system with syringe and passive ultrasonic irrigation in removing debris from simulated root canal irregularities. *J Endod*. 2010 Aug;36(8):1410–3. doi: 10.1016/j.joen.2010.04.023.

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

Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod* 2006 Mar;32(3):173–7. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.037>

Shelburne CE, Prabhu A, Gleason RM, Mullally BH, Coulter WA. Quantitation of *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque comparison of immunoassay and quantitative polymerase chain reaction. *J Microbiol Methods*. 2000 Jan;39(2):97–107. doi:10.1016/S0167-7012(99)00106-2.

Siqueira JF Jr., 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*. 2007a Jun;33(6):667–72. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2007.01.004>.

Siqueira JF, Jr., Rôças IN, Paiva SS, Guimarães-Pinto T, Magalhães KM, Lima KC. 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*. 2007b Jul;104(1):122–30. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.01.027>

Siqueira JF, Jr., Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* 2008 Nov;34(11):1291–301.e3. doi: 10.1016/j.joen.2008.07.028.

Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod.* 1990 Oct;16(10):498 – 504. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0099-2399\(07\)80180-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0099-2399(07)80180-4)

Stavropoulos A, Wenzel A. Accuracy of cone beam dental ct, intraoral digital and conventional film radiography for the detection of periapical lesions. an ex vivo study in pig jaws. *Clin Oral Invest.* 2007 May;11(1):101-6. doi: 10.1007/s00784-006-0078-8.

Tirali RE, Turan Y, Akal N, Karahan ZC. 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. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.07.012.

Torabinejad M, Anderson P, Bader J, Brown LJ, Chen LH, Goodacre CJ, et al. Outcomes of root canal treatment and restoration, implant-supported single crowns, fixed partial dentures, and extraction without replacement: a systematic review. *J Prosthet Dent.* 2007 Oct;98(4):285-311. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3913\(07\)60102-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3913(07)60102-4).

Townsend C, Maki J. An in vitro comparison of new irrigation and agitation techniques to ultrasonic agitation in removing bacteria from a simulated root canal. *J Endod.* 2009 Jul; 35 (7): 1040-3. doi: 10.1016 / j.joen. 2009 .04.007.

Tyndall DA, Rathore S. Cone-beam ct diagnostic applications: caries, periodontal bone assessment, and endodontic applications. *Dent Clin North Am.* 2008 Oct;52(4): 825–841. doi: 10.1016/j.cden.2008.05.002.

van der Borden WG, Wang X, Wu MK, Shemesh H. Area and 3-dimensional volumetric changes of periapical lesions after root canal treatments. *J Endod.* 2013 Oct;39 (10):1245–9. doi: 10.1016/j.joen.2013.07.001.

van der Sluis LW, Gambarini G, Wu MK, Wesselink PR. The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation. *Int Endod J.* 2006 Jun;39(6):472-6. DOI: 10.1111/j.1365-2591.2006.01108.x.

Venskutonis T, Plotino G, Tocci L, Gambarini G, Maminskas J, Gintaras Juodzbalsys G. Periapical and endodontic status scale based on periapical bone lesions and

endodontic treatment quality evaluation using cone-beam computed tomography. J Endod. 2015 Feb;41(2):190–6. doi: 10.1016/j.joen.2014.10.017.

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

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 apirogênica, 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 – 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. Vitor C. Nakamura, C.D Amanda da C. Silveira e C.D Laís C. Prado.

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 FOUASP.

Instituto de documentação Ortodôntico e Radiodiagnóstico Ltda- INDOR.

O objetivo dessa pesquisa é comparar duas diferentes técnicas de irrigação quanto à diminuição de bactérias e endotoxinas do canal radicular, e correlacionar com o sucesso do tratamento, após 1 ano de controle. 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. Para o controle, será realizado um exame radiográfico (na Clínica Odontológica da FO-USP) e um exame tomográfico no INDOR (localizada na Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Odontologia). Cada exame será realizado após o término do tratamento e depois de 1 ano. Caso necessário, o paciente será encaminhado para outras disciplinas para que possam ser realizados outros tratamentos. O paciente terá o benefício direto do tratamento de canal realizado com diminuição da infecção do dente, possibilitando a permanência do dente na boca, que supera os pequenos riscos que podem ocorrer no tratamento, como desconforto da anestesia e do tratamento de canal convencional. Quanto os exames radiográficos e tomográficos, serão realizados apenas as radiografias necessárias para a realização do tratamento e uma de acompanhamento para verificar o provável sucesso. Dois exames de Tomografia serão realizados como manobra terapêutica de alta precisão, com redução da dose de radiação (por ser um equipamento moderno e a técnica utilizada de pequeno volume) que irá verificar com maior exatidão o provável sucesso e a cura do tratamento, 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, Vitor 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 D – 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 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. Os primers utilizados foram baseados no trabalho de Shelburne et al (2000), na concentração de 0,4mM, sendo: *Forward*: 5'-CCA TGA AGT CGG AAT CGC TAG -3' e *Reverse*: 5'-GCT TGA CGG GCG GTG T-3'.

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:

PCR Buffer (Life Technologies Corp)	5µL
Mg ₂ para PCR (Life Technologies Corp)	1,5µL
dNTP de trabalho (2,5mM; Life Technologies Corp)	4µL
Taq polimerase (Life Technologies Corp).....	0,5µL
Ultrapure water	36µL
Primer universal <i>Forward</i> (Exxtend, Paulínia, SP, Brasil)	1µL
Primer universal <i>Reverse</i> (Exxtend, Paulínia, SP, Brasil)	1µL

- Depositar 49µL do MIX-2 em cada microtubo de 200µL
- Adicionar 1µL de cada amostra no respectivo microtubo
- Adicionar 1µL da amostra de DNA correspondente ao controle positivo no respectivo microtubo
- No tubo a ser utilizado como controle negativo, adicionar 1µL de Ultrapure water.

2.1 AMPLIFICAÇÃO DO DNA EM TERMOCICLADOR

- Homogeneizar as soluções nos tubos para PCR em mini-centrífuga por 2s
- Posicionar as microtubos no termociclador (T-100 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA) e programar a corrida conforme descrito:
 - o Etapa de denaturação – 95°C por 2 min
 - o 36 ciclos de 95°C por 30s, 60°C por 1min, e 72°C por 1min
 - o Extensão final a 72°C por 10min

2.2 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 corrida (Loading buffer), em quantidade igual ao número de amostras, incluindo os controles positivo e negativo, mais um, que será utilizado como marcador da eletroforese

- Misturar 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.

3 PCR EM TEMPO REAL

Para evitar contaminação das amostras de DNA, todos os procedimentos devem ser 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, deverão ser abertos dentro da câmara e permanecer em seu interior durante o processo de desinfecção com luz ultravioleta. Os procedimentos devem ser realizados com luvas sem talco para não comprometer a reação. Devem ser utilizadas apenas ponteiras com filtro, adquiridas em racks esterilizados e livres de DNases e RNases, assim como os microtubos.

3.1 PREPARO DA CURVA PADRÃO

Realizar diluições seriadas (1/10) de 10^7 a 10^0 a partir de uma solução “mãe” contendo plasmídios bacterianos em uma concentração de 10^8 cópias por µL. Ao calcular a quantidade necessária para o experimento, atentar para o fato de que em cada corrida do qPCR será utilizado 6µl de cada concentração.

3.2 PREPARO DA REAÇÃO

A reação descrita a seguir foi padronizada para quantificação de cópias de DNA bacteriano com uso de primers universais específicos para o domínio *Bacteria*. O volume total de cada reação é de 20 μ L. Os primers utilizados foram baseados no trabalho de Shelburne et al (2000), na concentração de 0,1mM, sendo: *Forward*: 5'-CCA TGA AGT CGG AAT CGC TAG -3' e *Reverse*: 5'-GCT TGA CGG GCG GTG T-3'. Todas as leituras, incluindo a curva padrão, devem ser realizadas em triplicata.

- Manter os microtubos contendo as amostras de DNA e as diluições da curva padrão em gelo até seu completo descongelamento
- Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 10s
- Levar à centrífuga por alguns segundos (somente o necessário para coletar todo o líquido no fundo do tubo)
- Em uma placa de qPCR de 96 poços, distribuir 2 μ L de cada amostra clínica, as amostras da curva padrão e o controle negativo da reação (DNase/RNase free Ultrapure distilled water) conforme a Figura 1
- Em microtubos de 1,5mL, preparar a seguinte reação (MIX-3), **em volume suficiente para as triplicatas de todas as amostras, curva padrão e controle negativo, com sobra:**

Power SybrGreen PCR Master Mix (Life Technologies Corp)	10 μ L
Primer universal <i>Forward</i> (Exxtend, Paulínia, SP, Brasil)	0,5 μ L
Primer universal <i>Reverse</i> (Exxtend, Paulínia, SP, Brasil)	0,5 μ L
Ultrapure water	7 μ L

- Distribuir 18 μ L do MIX-3 em cada poço
- Aplicar o adesivo ótico (MicroAmp Optical adhesive Film, Life Technologies), cobrindo todos os poços
- Levar a placa à centrífuga a 1200RPM por 1 minuto, em temperatura ambiente
- Posicionar a placa no termociclador Step One Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e programar a reação.

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

<div style="display: inline-block; text-align: center;"> FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO </div>	<div style="display: inline-block; text-align: center;"> FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO </div>
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	
<p>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</p> <p>Título da Pesquisa: Influência da Irrigação Ultrassônica Passiva na Redução de Bactérias e Endotoxinas dos Canais Radiculares: Um Estudo Clínico Randomizado</p> <p>Pesquisador: Vitor Cesar Nakamura</p> <p>Área Temática:</p> <p>Versão: 4</p> <p>CAAE: 13396213.1.0000.0075</p> <p>Instituição Proponente: FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENTO CIENT E TEC ODONTOLOGIA</p> <p>Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO</p> <p>DADOS DO PARECER</p> <p>Número do Parecer: 697.544</p> <p>Data da Relatoria: 25/06/2014</p> <p>Apresentação do Projeto: 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</p> <p>Objetivo da Pesquisa: O objetivo dessa pesquisa é comparar duas diferentes técnicas de irrigação quanto a diminuição de bactérias e endotoxinas do canal radicular, e correlacionar com o sucesso do tratamento, após 1 ano de controle. Esse sucesso será avaliado por tomada radiográfica computadorizada antes e depois pelo aparelho de Cone Beam na técnica adequada para pequenos volumes.</p> <p>Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os riscos para o paciente são os inerentes a tratamentos endodônticos.</p> <p>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Pesquisa adequada e já aprovada anteriormente e os autores introduziram um método de avaliação radiográfica por tomografia, o que atualmente é indicado.</p>	<p>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Foi refletido o termo e adequado as novas condições experimentais.</p> <p>Recomendações: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação</p> <p>Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há pendências.</p> <p>Situação do Parecer: Aprovado</p> <p>Necessita Apreciação da CONEP: Não</p> <p>Considerações Finais a critério do CEP:</p> <p style="text-align: right; margin-top: 20px;">SAO PAULO, 25 de Junho de 2014</p> <p style="text-align: center; margin-top: 10px;">Assinado por: Maria Gabriela Hays Blazevic (Coordenador)</p>
<p><small>Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900 UF: SP Município: SAO PAULO Telefone: (11)3091-7950 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br</small></p>	<p><small>Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900 UF: SP Município: SAO PAULO Telefone: (11)3091-7950 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br</small></p>
<small>Página 01 de 02</small>	<small>Página 02 de 02</small>

ANEXO B – Parecer consubstanciado do Instituto de Documentação Ortodôntica e Radiodiagnóstico

INSTITUTO DE DOCUMENTAÇÃO ORTODÔNTICA E RADIODIAGNÓSTICO LTDA
Fones: (11) 3862-3222 | (11) 3862-8606 | (11) 3864-7508
Homepage: <http://www.indor.com.br> | E-mail: indor@indor.com.br

UNIDADE PACAEMBU
Rua Cardoso de Almeida, 2121
CEP 01251-001 | Pacaembu | São Paulo | SP

UNIDADE JARDINS
Av. Brigadeiro Luiz Antônio, 4778
CEP 01402-002 | Jd Paulistano | São Paulo | SP

Diretores Clínicos: Prof. Israel Chilvarquer - CROSP 18744 | Prof. Jorge Elie Hayek - CROSP 44017
Profa. Lilian Waitman Chilvarquer - CROSP 27371

DECLARAÇÃO

Eu, Jorge Elie Hayek, portador do RG 16.647.483 e CRO-SP 44.017, diretor da clínica de radiologia INDOR – Instituto de Documentação Ortodôntica e Radiodiagnóstico, CNPJ 61.405.197-0003/03, situada a Av. Professor Lineu Prestes, nº 2227 – Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Odontologia, Butantã, São Paulo - SP, declaro que, a partir da presente data, fica disponibilizada e autorizada a realização de imagens de Tomografia Computadorizada Volumétrica para a realização da pesquisa intitulada “INFLUÊNCIA DA IRRIGAÇÃO ULTRASSÔNICA PASSIVA NA REDUÇÃO DE BACTÉRIAS E ENDOTOXINAS DOS CANAIS RADICULARES: UM ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO”, realizada pela aluna Amanda da Costa Silveira portadora do CPF 927.915.902-00, matriculada sob o nº 74929971/1 no Programa de Pós-graduação em Odontologia, Área de Concentração Ciências Odontológicas - Endodontia, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, sob a orientação do Professor Dr. Giulio Gavini, professor titular do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 27 de Maio de 2014.

Prof. Jorge Elie Hayek
Radiologista
CROSP: 44017

Dr. Jorge Elie Hayek

Diretor do Indor – Instituto de Documentação Ortodôntica e Radiodiagnóstico