BRUNA GONTIJO VILELA

**Efeito do preparo químico-cirúrgico na atividade bacteriana em canais
radiculares associados a periodontite apical assintomática:
estudo molecular baseado em RNA e DNA**

São Paulo

2020

BRUNA GONTIJO VILELA

**Efeito do preparo químico-cirúrgico na atividade bacteriana em canais
radiculares associados a periodontite apical assintomática:
estudo molecular baseado em RNA e DNA**

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Endodontia

Orientadora: Profa. Dra. Ericka Tavares Pinheiro

São Paulo

2020

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

Vilela, Bruna Gontijo.

Efeito do preparo químico-cirúrgico na atividade bacteriana em canais radiculares associados a periodontite apical assintomática: estudo molecular baseado em RNA e DNA / Bruna Gontijo Vilela; orientadora Ericka Tavares Pinheiro. -- São Paulo, 2020.

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

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

Versão corrigida.

1. Infecção endodôntica. 2. Tratamento do canal radicular. 3. Reação em cadeia da polimerase. I. Pinheiro, Ericka. II. Título.

Vilela BG. Efeito do preparo químico-cirúrgico na atividade bacteriana em canais radiculares associados a periodontite apical assintomática: estudo molecular baseado em RNA e DNA. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 28 / 01 /2021

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Carla Renata Sipert

Instituição: FO-USP

Julgamento: aprovada

Prof(a). Dr(a). George Táccio de Miranda Candeiro

Instituição: UniChristus

Julgamento: aprovada

Prof(a). Dr(a). Elaine Faga Iglecias

Instituição: FO-UNIP

Julgamento: aprovada

Aos meus pais, Susana Borges Gontijo e Rogério Julio Vilela, que por infinitas vezes abdicaram dos próprios sonhos para que os meus fossem realizados. Cada passo desse trabalho só foi possível graças ao infinito amor, apoio e confiança que sempre depositaram nas minhas escolhas. Amo vocês! Obrigada!

A todos os professores que passaram pela minha formação. É uma honra, hoje, poder transmitir tudo que me foi ensinado. Minha eterna gratidão e admiração.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Susana Borges Gontijo e Rogério Julio Vilela**, por apoiarem minhas decisões e torná-las possíveis. Ao meu grande amor, **Guilherme Gulias**, pela paz que traz ao meu coração. A conclusão desse trabalho jamais seria a mesma sem você. Obrigada por embarcar comigo nesse e em tantos outros sonhos.

À **Profª Dra. Ericka Pinheiro**, muito obrigada pela confiança e paciência em cada etapa vivida ao longo desses anos. Obrigada por ter me ensinado uma das maiores lições da minha vida: que a ansiedade se resolve com muito trabalho. Me lembro disso todos os dias. Que o seu caminho seja eternamente abençoado e feliz.

À **Profª Dra. Elaine Iglecias** pela amizade e principalmente pela confiança creditada ao meu trabalho. Você foi a ponte para que tudo isso fosse concretizado. Te levo para sempre com muito carinho no meu coração.

Aos professores do Curso de Especialização em Endodontia da Equipe Prof. Dr. Abílio Moura: **Prof. Dr. Cacio Moura Netto, Profª Dra. Marcia Bardauil, Profª Dra Elaine Iglecias e Profª Dra. Lilian Maekawa** por terem me dado a base do conhecimento para ser a endodontista que sou hoje. Minha eterna admiração e gratidão.

Ao **Profº Dr. Cacio Moura Netto** pela oportunidade única de vivenciar a docência de perto. Obrigada pela confiança e amizade.

À minha grande e eterna amiga, **Profª Laura Nardello**, por ter sido meu braço direito em tantos momentos que tivemos o privilégio de dividir. Obrigada por ter me ensinado tanto e pelas infinitas conversas que sempre me fizeram ter a certeza de que eu não estava sozinha.

À minha chilena preferida, **Profª Kareen Andrade Sepúlveda**, pela amizade e companhia. Que privilégio poder te chamar de amiga. O Brasil estará sempre de portas abertas e com saudades de você. Obrigada por cada momento que passamos juntas.

Aos queridos amigos, Prof. Dr. **Roberto Romero**, Prof. Dr. **Carlos Nogales**, Prof. Dr. **Alexandre Pinheiro Lima de Carvalho**, Prof. Dr. **Eduardo Akisue**, Profª **Dra. Angela Araki**, Profª **Luiza Riomar Paz**, Profª **Laura Nardello**, Profª **Dra. Lais Prado**, Profª **Dra. Fernanda Fernandes**, Profª **Fernanda Bruno**, que foram fundamentais no desenvolvimento desta pesquisa, (grandes triagens, coleta de amostras, avaliação da dor, preservação e laboratório) sem dúvida alguma cada procedimento foi realizado com sucesso por cada um de vocês.

Aos professores do departamento de Dentística **Prof. Dr. Giulio Gavini**, Prof. Dr. **Celso Luiz Caldeira**, Prof. Dr. **Manoel Eduardo Lima Machado**, Prof. Dr. **Marcelo dos Santos**, Profa. Dra. **Mary Caroline Skelton Macedo**, Profa. Dra. **Carla Renata Sipert** e Prof. Dr. **José Luiz Lage-Marques** por tudo que me ensinaram, por mais breve que tenha sido nosso convívio.

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

À **Secretaria do Departamento de Dentística**, Sr. **Aldo**, **David**, **Selma** e **Leandro**, sempre dispostos a me ajudar.

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

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

À **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - FOUSP**, por ter sido minha casa nos últimos dois anos e meio.

“Tudo tem seu tempo determinado e há tempo para
todo propósito debaixo do céu”

Eclesiastes 3,1

RESUMO

Vilela BG. Efeito do preparo químico-cirúrgico na atividade bacteriana em canais radiculares associados a periodontite apical assintomática: estudo molecular baseado em RNA e DNA [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

O preparo químico-cirúrgico (PQC) representa a principal estratégia para a desinfecção dos canais radiculares. Entretanto, apesar da significativa redução bacteriana promovida pelo PQC, um grande número de casos permanece infectado após estes procedimentos. Como as células metabolicamente ativas apresentam maior quantidade de RNA ribossômico (rRNA) que de rDNA (genes rRNA), os resultados obtidos pela reação em cadeia da polimerase quantitativa baseada em rDNA (qPCR) e rRNA (RT-qPCR) foram correlacionados a fim de detectar bactérias metabolicamente ativas após o preparo químico-cirúrgico (PQC). Além disso, a capacidade dos dois métodos de detectar bactérias nas amostras endodônticas foi avaliada. Amostras de canais radiculares foram coletadas de 40 dentes com infecções endodônticas primárias antes (S1) e após o PQC (S2). DNA e cDNA (sintetizado a partir do RNA) foram utilizados como molde para a reação de qPCR utilizando iniciadores universais para o domínio *Bacteria*. Após o PQC foi observada uma drástica redução do número total de bactérias. Os níveis de cópias de rRNA nas amostras S2 foram significativamente maiores que os níveis correspondentes de rDNA ($p < 0.05$), demonstrando a persistência de bactérias metabolicamente ativas após o PQC. O ensaio de qPCR baseado em rDNA apresentou baixa sensibilidade e alta especificidade quando comparado ao ensaio de RT-qPCR. Todas amostras positivas para rDNA também exibiram resultados positivos para rRNA (valor preditivo positivo = 100%). O uso combinado de qPCR e RT-qPCR revelou que bactérias permaneceram metabolicamente ativas após o PQC. Embora menos sensível que o ensaio de RT-qPCR, o ensaio de qPCR baseado em rDNA apresentou baixo risco de resultados falso-positivos na análise de bactérias totais em amostras pós-preparo.

Palavras-chave: Infecção endodôntica. Tratamento endodôntico. Reação em cadeia da polimerase quantitativa. Reação em cadeia da polimerase quantitativa baseada em RNA ribossômico.

ABSTRACT

Vilela BG. Effect of chemomechanical procedures on bacterial activity in root canals associated with asymptomatic apical periodontitis: molecular study based on RNA and DNA [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

Chemomechanical procedures (CMP) represent the main strategy for root canal disinfection. However, despite substantial bacterial reduction, many canals remain infected after these procedures. As active cells present a higher abundance of ribosomal RNA (rRNA) than rDNA (rRNA genes), data obtained with rDNA-based quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and rRNA-based qPCR (RT-qPCR) were correlated to search for active bacteria after chemomechanical procedures (CMP). Additionally, the ability of both assays to detect bacteria in endodontic samples was evaluated. Root canal samples were taken from 40 teeth with primary endodontic infections before (S1) and after CMP (S2). DNA and cDNA (synthesized from RNA) were used as templates for qPCR using universal primers for *Bacteria* domain. After CMP, there was a drastic reduction in the number of total bacteria. The concentration of rRNA copies in S2 samples was significantly higher than the corresponding levels of rDNA ($p < 0.05$), indicating the persistence of active bacteria after CMP. The rDNA-based qPCR presented low sensitivity and high specificity when compared to RT-qPCR. All samples positive for rDNA were also positive for rRNA (positive predictive value = 100%). The combined qPCR and RT-qPCR approach revealed that bacteria persisted active after CMP. Although less sensitive than RT-qPCR, the rDNA-based qPCR assays had a low risk of providing false-positive results in the analysis of total bacteria in postinstrumentation samples.

Keywords: Endodontic infection. Root canal treatment. Quantitative polymerase chain reaction. Ribosomal RNA-based quantitative polymerase chain reaction.

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Grupo dental, diâmetro do instrumento utilizado para o preparo do canal radicular e porcentagem de redução das bactérias totais nas amostras de canais radiculares coletadas antes e após o preparo químico-cirúrgico	42
Tabela 5.2 - Taxa de detecção de bactérias totais utilizando RNA ribossômico (rRNA) e rDNA (rRNA genes) como moldes para a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)	43
Tabela 5.3 - Sensibilidade, especificidade, e valor preditivo positivo (VPP) para qPCR de bactérias totais baseado em rDNA em comparação às análises de RT-qPCR baseados em rRNA	44
Tabela 5.4 - Níveis de bactérias totais nos canais radiculares determinados por qPCR baseada em rDNA (genes 16S rRNA) em amostras obtidas antes (S1) e após o preparo químico-cirúrgico (S2)	44
Tabela 5.5 - Valores de mediana (intervalo) dos níveis de rDNA e rRNA para bactérias totais em canais radiculares com reações de qPCR positivas para ambos os métodos	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

=	Igual
>	Maior
<	Menor
μL	Microlitro
Ca(OH)_2	Hidróxido de cálcio
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CHX	Digluconato de clorexidina
CRT	Comprimento real de trabalho
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
G	Gauge
h	Hora
MgCl_2	Cloreto de magnésio
MIC	Medicação intracanal
mL	Mililitro
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NiTi	Níquel-Titânio
nM	nanoMol

pb	Pares de base
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PQC	Preparo químico-cirúrgico
PUI	Ativação ultrassônica
qPCR	Reação de polimerase em cadeia quantitativa
rDNA	Gene 16S rRNA
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
RT-PCR	Reação de transcriptase reversa
ssp	Espécies
TE	Tris + EDTA

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	Métodos de estudo da microbiota endodôntica	24
2.2	Efeito do preparo químico-cirúrgico na redução de bactérias totais nos canais radiculares: estudos clínicos e moleculares	25
2.3	Efeito do preparo químico-cirúrgico na atividade metabólica de bactérias totais nos canais radiculares: estudos clínicos e moleculares	28
3	PROPOSIÇÃO	31
3.1	Objetivo geral.....	31
3.2	Objetivos específicos	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	Delineamento do estudo e cálculo amostral	33
4.2	Critérios de inclusão e exclusão de pacientes	33
4.3	Procedimentos clínicos e coletas microbiológicas.....	34
4.4	Extração de DNA/RNA e síntese do Cdna	37
4.5	Ensaio de qPCR baseados em rDNA e rRNA	38
4.6	Análise dos dados	39
5	RESULTADOS	41
5.1	Dados clínicos e microbiológicos.....	41
5.2	Comparação entre os testes baseados em rDNA (qPCR) e rRNA (RT-qPCR)	43
5.3	Efeito do preparo químico-cirúrgico na redução bacteriana	44
5.4	Efeito do preparo químico-cirúrgico na atividade bacteriana	45
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS.....	55
	ANEXO	63

1 INTRODUÇÃO

O preparo químico-cirúrgico (PQC) representa a principal estratégia para a desinfecção dos canais radiculares. Entretanto, apesar da significativa redução bacteriana promovida pelo PQC, um grande número de casos permanece infectado após estes procedimentos. Os níveis de bactérias remanescentes nos canais radiculares após o PQC e a identificação das espécies persistentes já foram amplamente explorados através de métodos dependentes de cultura bacteriana e de métodos moleculares independentes de cultura. Este último tornou-se o método de escolha para análise da microbiota endodôntica devido à sua alta sensibilidade e capacidade de detecção de bactérias ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo.

A maioria dos estudos moleculares na área da Endodontia se baseia na detecção dos genes 16S rRNA (aqui denominado rDNA) para identificação ou quantificação bacteriana. Esses genes possuem regiões conservadas e variáveis que permitem a identificação de bactérias totais e espécies específicas. Também apresentam um número limitado dentro do genoma bacteriano, o que permite uma quantificação bacteriana baseada no número de cópias de rDNA. Estudos utilizando a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) baseada em rDNA fornecem informações relevantes quanto à redução bacteriana promovida pelos procedimentos endodônticos. Entretanto, permanece o questionamento se os níveis de rDNA bacteriano detectados nos canais radiculares após os procedimentos de desinfecção são de bactérias viáveis ou mortas.

Uma estratégia para o estudo de bactérias ativas é a combinação de métodos baseados no RNA ribossômico (rRNA) e seus respectivos genes (rDNA). Para isso, é necessário um passo prévio de transformação do RNA em DNA complementar (cDNA) através da reação de transcrição reversa. Essa reação seguida da qPCR é denominada RT-qPCR. O uso do rRNA como molde para a reação de RT-qPCR permite a análise da viabilidade celular, porém não permite a quantificação de bactérias pelo fato da quantidade de rRNA variar de acordo com o metabolismo celular. Portanto, a associação dos ensaios de RT-qPCR e qPCR permite a análise simultânea da viabilidade e dos níveis das bactérias. Além disso, a comparação dos níveis de rRNA e dos seus respectivos genes (rDNA) pode revelar a atividade

metabólica da célula, onde as células ativas apresentam níveis maiores de rRNA que de rDNA.

O uso combinado de métodos baseados em rRNA e rDNA é amplamente empregado na área de microbiologia ambiental, e foi recentemente utilizado para avaliar a atividade de bactérias em amostras endodônticas após diferentes protocolos de tratamento. Entretanto, o pequeno número de casos incluídos nos estudos prévios impediu uma análise mais acurada do efeito dos procedimentos endodônticos no metabolismo bacteriano. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a redução e a atividade metabólica de bactérias totais após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares, incluindo um tamanho amostral adequado e uma análise de correlação entre os dados microbiológicos e clínicos. Além disso, este estudo comparou os ensaios de qPCR e RT-qPCR, permitindo a análise da sensibilidade, especificidade e valor preditivo desses métodos na detecção de bactérias nas infecções endodônticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O papel dos micro-organismos na etiologia das doenças pulpares e periapicais é bem estabelecido na literatura (Takehashi et al., 1965). Apesar de fungos, *Archaea* e vírus contribuírem para a diversidade microbiológica das infecções endodônticas, as bactérias são os micro-organismos mais comumente encontrados nessas infecções (Siqueira; Rôças, 2009). Durante o tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar e periodontite apical é necessário que a população bacteriana seja reduzida em níveis compatíveis com o reparo dos tecidos periapicais. Entretanto, apesar das estratégias de antissepsia utilizadas, bactérias podem persistir nos canais radiculares após o tratamento endodôntico (Rôças; Siqueira, 2008).

Diversos fatores podem favorecer a persistência de micro-organismos nos canais radiculares após os procedimentos endodônticos. Bactérias alojadas nas complexidades anatômicas dos canais radiculares, como ramificações e istmos, podem permanecer protegidas da ação dos instrumentos e substâncias químicas (Haapasalo; Orstavik, 1987; Siqueira; Uzeda, 1996; Nair et al., 2005). Além disso, elas podem se encontrar aderidas às paredes dentinárias na forma de biofilmes, apresentando uma maior resistência aos agentes antimicrobianos (Distel et al., 2002). Se essas bactérias tiverem acesso aos nutrientes necessários para sua manutenção e se estiverem em contato com os tecidos perirradiculares, elas podem promover a manutenção da inflamação e consequente prejuízo do reparo apical após o tratamento endodôntico (Engström et al., 1964; Heling; Shapira, 1978; Sjögren et al., 1997; Waltimo et al., 2005; Fabricius et al., 2006; Rôças; Siqueira, 2008).

Estudos sugerem que a persistência da periodontite apical possui correlação com o número total de bactérias remanescentes e não com a presença de um espécie bacterianas específicas (Molander et al., 1998; Sundqvist et al., 1998; Pinheiro et al., 2003; Rôças et al., 2004; Siqueira; Rôças, 2004; Gomes et al., 2008).

Nesse contexto, os métodos microbiológicos quantitativos se tornam importantes para análise da eficácia dos procedimentos endodônticos em reduzir os níveis de bactérias viáveis nos canais radiculares.

2.1 Métodos de estudo da microbiota endodôntica

Por mais de um século, os métodos dependentes de cultura bacteriana foram o padrão ouro no diagnóstico de doenças infecciosas, incluindo as infecções endodônticas. As vantagens desses métodos incluem seu amplo espectro e o estudo da fisiologia e patogenicidade bacteriana. Por outro lado, existem limitações relacionadas ao seu alto custo, baixa sensibilidade e especificidade, além do tempo e dificuldade de cultivo/ identificação de diversas espécies bacterianas (Siqueira; Rôças, 2005).

Com o avanço dos métodos de análise microbiológica, métodos moleculares baseados no gene 16S rRNA (rDNA) foram propostos para identificação de bactérias nas infecções endodônticas. As vantagens dos métodos moleculares incluem a detecção de espécies ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo, alta sensibilidade e especificidade, além da rapidez na obtenção de resultados. Por essas razões, os achados microbiológicos resultantes de métodos dependentes de cultura têm sido amplamente enriquecidos e expandidos através das atuais análises moleculares (Siqueira; Rôças, 2005a, b). Dados obtidos através de estudos baseados em cultura e métodos moleculares, demonstraram que mais de 460 espécies ou filotipos bacterianos diferentes pertencentes a 100 gêneros e 9 filos podem ser encontrados nas infecções endodônticas (Siqueira; Rôças, 2009). Os filos com maior riqueza de espécies foram *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*. No geral, mais espécies bacterianas foram detectadas nas infecções endodônticas por meio de métodos moleculares que por cultura, sendo a maioria espécies ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo (Siqueira; Rôças, 2009). Portanto, os métodos moleculares são considerados os métodos de escolha para o estudo da microbiota endodôntica (Siqueira; Rôças, 2005b, 2009, 2017).

Entre os métodos moleculares, a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) permite a quantificação das bactérias baseadas no número de cópias do gene 16S rRNA (rDNA). Embora o número de cópias de rDNA varie entre as espécies bacterianas, a maioria possui uma ou poucas cópias desse gene, o que permite uma análise quantitativa da infecção. Por outro lado, a capacidade da qPCR em detectar DNA de células mortas pode representar um fator limitante para avaliação imediata

da eficácia antimicrobiana dos procedimentos endodônticos. A detecção de células mortas ou metabolicamente inativas pode originar resultados falso-positivos e a superestimação no que diz respeito ao papel destas células no processo patológico (Siqueira; Rôças, 2005a, b, 2009, 2017).

Uma das estratégias para identificar células viáveis por métodos moleculares é a utilização do RNA bacteriano, que é um indicador de viabilidade celular (Siqueira; Rôças, 2005a, b). Além de propiciar a identificação da espécie bacteriana, métodos baseados em RNA ribossômico (rRNA) apresentam grande sensibilidade, um fator essencial na análise de amostras com baixos níveis de bactérias, como aquelas obtidas do canal radicular após os processos de desinfecção. Porém, esses métodos não possibilitam a quantificação absoluta das bactérias, pois os níveis de rRNA variam fortemente dependendo do estado fisiológico da célula. Devido às limitações de cada método, estudos recentes têm proposto uma associação dos métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA para uma avaliação simultânea da viabilidade e abundância das bactérias em uma comunidade bacteriana (Campbell et al., 2011; Pitkänen et al., 2013; Pinheiro et al., 2015; Carvalho et al., 2020).

2.2 Efeito do preparo químico-cirúrgico na redução de bactérias totais nos canais radiculares: estudos clínicos e moleculares

O preparo químico-cirúrgico é a fase de maior redução da carga bacteriana nos canais radiculares. Entretanto, estudos clínicos utilizando ensaios de qPCR revelam que 50% a 70% dos casos permanecem infectados após a fase de preparo dos canais radiculares, com bactérias numa ordem de grandeza de 10^2 – 10^4 cópias de rDNA (Sakamoto et al., 2007; Rôças; Siqueira, 2010; Rôças ;Siqueira, 2011a; Paiva et al., 2012; Paiva et al., 2013a; Paiva et al., 2013b; Rôças et al., 2013; Neves et al., 2014; Rôças et al., 2014; Rodrigues et al., 2015; Neves et al., 2016; Zandi et al., 2016; Rodrigues et al., 2017; Nakamura et al., 2018; Carvalho et al., 2020).

A ação mecânica dos instrumentos endodônticos aliada à ação química das soluções irrigadoras permite que micro-organismos, matéria orgânica e debris sejam removidos do sistema de canais radiculares (Siqueira; Rôças, 2008). Desde a introdução do níquel-titânio (NiTi) na Endodontia por Walia et al. (1988), uma infinidade de instrumentos tornaram-se disponíveis no mercado odontológico. Dessa forma, a ação mecânica pode ser realizada com diferentes instrumentos e cinemáticas, através de técnicas manuais ou automatizadas. Em relação aos instrumentos endodônticos, estudos moleculares mostram não haver diferença quanto à redução bacteriana promovida pelas diferentes técnicas de preparo dos canais radiculares (Rôças; Siqueira, 2012; Neves et al., 2016). Rôças e Siqueira (2012) não encontraram diferença na redução bacteriana promovida pela instrumentação manual com instrumentos de NiTi e a instrumentação com o sistema rotatório BioRace, quando os mesmos parâmetros de alargamento e irrigação foram empregados. Da mesma forma, Neves et al. (2016), comparando o sistema de lima única (Reciproc) a um sistema de rotação contínua e múltiplos instrumentos (BioRace), destacaram a eficácia de ambos os sistemas de instrumentação na redução bacteriana. Contudo, os autores ressaltaram que, independente do sistema utilizado, 50 a 55% dos dentes ainda apresentavam resultados positivos para bactérias. Neves et al. (2014) também encontram 45,5% de reações de qPCR positivas após o preparo com o sistema de lima auto-ajustável (SAF, do inglês *Self Adjustment File*), que promoveu 99,9% de redução bacteriana, reduzindo os valores médios bacterianos de $1,96 \times 10^7$ para $1,34 \times 10^4$. Semelhante ao sistema SAF, o sistema Twisted File Adaptive também demonstrou alta taxa de redução bacteriana após o preparo (Rodrigues et al., 2015).

O tamanho do preparo exerce um papel importante na redução bacteriana. Rodrigues et al. (2017) avaliaram amostras microbiológicas antes do preparo e após o uso do primeiro e do terceiro instrumentos do sistema Twisted File Adaptive. Os autores ressaltaram que o aumento no tamanho do preparo apical melhorou de maneira significativa a desinfecção dos canais radiculares. Nesse estudo, os autores também avaliaram o tipo de solução irrigadora, comparando a solução salina com o hipoclorito de sódio (NaOCl). Embora somente a ação mecânica da instrumentação e irrigação com solução salina tenha sido capaz de promover uma grande redução microbiana na luz do canal, a ação antimicrobiana da solução irrigadora foi capaz de

promover uma redução adicional de bactérias, especialmente nos preparos mais amplos.

O hipoclorito de sódio é a solução irrigadora mais utilizada na Endodontia, principalmente pela sua ação antimicrobiana e capacidade de dissolução de matéria orgânica (Zehnder et al., 2002; Zehnder, 2006). A concentração de NaOCl mais utilizada em estudos clínicos é de 2,5% (Sakamoto et al., 2007; Rôças; Siqueira, 2010; Rôças; Siqueira, 2011a; Paiva et al., 2012; Paiva et al., 2013a; Paiva et al., 2013b; Rôças et al., 2013; Neves et al., 2014; Rôças et al., 2014; Rodrigues et al., 2015; Neves et al., 2016; Zandi et al., 2016; Rodrigues et al., 2017; Nakamura et al., 2018; Carvalho et al., 2020). A clorexidina (CHX), apesar de não apresentar a vantagem de dissolução de matéria orgânica, têm sido estudada como uma substância alternativa de irrigação, devido ao seu amplo espectro de ação antimicrobiana, sua menor toxicidade aos tecidos (Yesilsoy et al., 1995) e sua ação prolongada no interior dos canais radiculares graças a sua substantividade (Rosenthal et al., 2004). Estudos clínicos e moleculares comparando NaOCl e CHX mostram que as duas substâncias foram semelhantes quanto à ação antimicrobiana quando utilizados durante o preparo dos canais radiculares. Provenzano et al. (2015) chamam atenção para os níveis de bactérias detectáveis por qPCR após o preparo com NaOCl 2,5% (67% de reações positivas) e CHX 2% (75% de reações positivas), não encontrando diferenças estatísticas entre as duas substâncias. Da mesma forma, Rôças et al. (2016) não encontraram diferenças entre NaOCl 2,5% e CHX 0,12%, que apresentaram, respectivamente, 44% 40% de reações de qPCR positivas após o preparo. Zandi et al. (2016) reforçam a eficácia das duas substâncias, com uma redução bacteriana na ordem de 10^4 para 10^2 no grupo do NaOCl 1% e na ordem de 10^5 para 10^3 no grupo da CHX 2%. Por outro lado, Vianna et al. (2006) encontraram uma maior redução bacteriana nos canais radiculares após o preparo utilizando NaOCl 2,5% quando comparado ao preparo com CHX gel 2% como substância química auxiliar.

Os estudos acima citados utilizaram o ensaio de qPCR para quantificação de bactérias totais baseada no número de cópias de rDNA presentes nos canais radiculares, antes e após a etapa de alargamento dos canais radiculares. De uma forma geral, os estudos clínicos não revelaram diferença na redução bacteriana promovida pelos diferentes sistemas de instrumentação e soluções irrigadoras utilizadas durante o preparo. Por outro lado, o tamanho do preparo aparece como um

fator importante para a redução bacteriana. Embora, esses estudos tenham contribuído para o maior entendimento da eficácia dos procedimentos endodônticos em reduzir os níveis de rDNA bacteriano nos canais radiculares, a informação sobre a viabilidade das bactérias que persistiram nos canais radiculares após o preparo ainda não foi muito explorada pelos métodos moleculares.

2.3 Efeito do preparo químico-cirúrgico na atividade metabólica de bactérias totais nos canais radiculares: estudos clínicos e moleculares

Estudos moleculares detectaram rRNA bacteriano em 60% a 100% dos casos após o preparo químico-cirúrgico (Rôças; Siqueira 2010, Carvalho et al., 2020). As estratégias moleculares para detecção da viabilidade foram diferentes nos estudos prévios. Rôças e Siqueira (2010) utilizaram rRNA (cDNA) como molde para a reação de hibridização de DNA-DNA, enquanto outros estudos utilizaram o uso combinado de qPCR baseada em rDNA e rRNA para detecção de bactérias totais nos canais radiculares (Romero Cazares, 2018; Nogales, 2019; Carvalho et al., 2020). A simples detecção do rRNA bacteriano não determina se a bactéria está ativa. Por outro lado, a estratégia combinada utilizando rDNA e rRNA bacteriano tem a vantagem de determinar o estado metabólico das bactérias, que podem variar de dormentes a altamente ativas (Campbell et al., 2011).

Carvalho et al. (2020) foram os primeiros autores a utilizar uma estratégia baseada em qPCR e RT-qPCR para estudo do metabolismo de bactérias totais nos canais radiculares. Esses autores analisaram a atividade bacteriana pela diferença entre os níveis de rRNA e rDNA. Nesse estudo, não houve diferença significativa entre os níveis de rRNA e rDNA de bactérias totais nas amostras após o PQC de dentes com infecções primárias, sugerindo que o preparo foi suficiente para refrear o metabolismo bacteriano. Porém, uma limitação do estudo de Carvalho et al. (2020) e de outros trabalhos semelhantes (Romero Cazares, 2018; Nogales, 2019) foi o pequeno número de amostras, variando de 15 a 20 casos por estudo. O dobro de amostras seria necessário para identificar diferenças significativas entre rDNA e rRNA após o PQC de acordo com um cálculo amostral utilizando os dados do estudo de

Carvalho et al. (2020). Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade metabólica de bactérias totais após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares com um tamanho amostral adequado. Além disso, considerando que vários fatores clínicos podem afetar a redução bacteriana durante o preparo, como os aspectos anatômicos dos canais radiculares e o tamanho do preparo apical, este estudo também realizou uma análise acurada dos dados clínicos dos casos estudados e sua correlação com os achados microbiológicos.

3 PROPOSIÇÃO

Diante da revisão da literatura atual apresentada, observa-se a importância da realização de trabalhos clínicos que avaliem o efeito do preparo químico-cirúrgico na atividade bacteriana em canais radiculares associados a periodontite apical assintomática. Assim, propõe-se com este trabalho os objetivos descritos neste capítulo.

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito do preparo químico-cirúrgico na atividade metabólica de bactérias totais utilizando métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do preparo químico-cirúrgico nos níveis e na atividade metabólica de bactérias totais nos canais radiculares.
- Correlacionar os dados clínicos (grupo de dentes e tamanho do preparo apical) com os dados microbiológicos (redução bacteriana).
- Comparar a taxa de detecção bacteriana dos ensaios de qPCR e RT-qPCR.
- Investigar a sensibilidade, especificidade e valor preditivo do ensaio de qPCR quando comparado ao RT-qPCR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada nesta pesquisa para procedimentos clínicos e coletas microbiológicas baseou-se em um estudo prévio (Carvalho et al., 2020). Esta pesquisa foi submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e aprovada sob o nº 2.201.768 (ANEXO A). Os pacientes participantes da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.1 Delineamento do estudo e cálculo amostral

O foco principal deste estudo clínico foi avaliar os níveis de atividade das bactérias persistentes ao PQC. A atividade bacteriana após o preparo dos canais radiculares foi analisada pelos ensaios de qPCR baseados em rRNA e rDNA para bactérias totais. O software OpenEpi (<http://www.openepi.com>) foi utilizado para o cálculo amostral baseado no número médio de cópias de rRNA e rDNA de bactérias totais das amostras pós-preparo, utilizando os dados do estudo de Carvalho et al. (2020). Um total de 29 pacientes foi estimado para avaliar a atividade das bactérias totais após o PQC, com um poder de 80% e nível de significância de 5%. Considerando possíveis desistências ou perda de amostras durante a análise microbiológica, foi decidido um tamanho amostral de 40 pacientes (1 dente por paciente).

4.2 Critérios de inclusão e exclusão de pacientes

Os critérios de inclusão foram: pacientes portadores de dentes permanentes unirradiculares com necrose pulpar e periodontite apical assintomática. Essas condições foram verificadas através de testes de sensibilidade pulpar e de exame

radiográfico com evidência de rarefação óssea periapical e ausência de tratamento endodôntico prévio.

Os critérios de exclusão foram: dentes que apresentavam perda de tecido dentário impossibilitando o isolamento absoluto, bolsa periodontal superior a 4 mm, raízes com comprimento inferior a 15 mm ou superior a 25 mm, curvaturas radiculares superiores a 25°, apicigênese incompleta ou alterações na luz do canal radicular visíveis radiograficamente, como calcificações ou reabsorções. Também foram excluídos pacientes com alterações sistêmicas relevantes, como doenças degenerativas crônicas, processos infecciosos, doenças autoimunes ou imunodeficiências induzidas ou adquiridas, além de pacientes que tivessem feito uso de antibióticos nos 90 dias anteriores ao início do tratamento.

4.3 Procedimentos clínicos e coletas microbiológicas

Os procedimentos clínicos e coletas microbiológicas foram realizados por três especialistas em Endodontia. Inicialmente foram realizados os exames clínicos e radiográficos e os dados foram catalogados em uma ficha clínica. Após os procedimentos de profilaxia e anestesia, foi realizado o isolamento absoluto do dente a ser tratado com auxílio de arco plástico (SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), lençol de borracha (Madeitex, São José dos Campos, SP, Brasil), grampos metálicos apropriados (SSWhite) e barreira gengival (Top Dam, FGM, São Paulo, SP, Brasil). Foi então realizada a primeira desinfecção da coroa do dente e do campo operatório com swab esterilizado (Berkshire Corporation, North Carolina, EUA) embebido em peróxido de hidrogênio 30% por 30s, seguido por hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% (Fórmula e Ação farmácia de manipulação, São Paulo, SP, Brasil) por mais 30s, e tiosulfato de sódio 5% por 30s para a neutralização do hipoclorito (Rôças et al., 2004).

Com o auxílio de brocas diamantadas esféricas de pescoço longo de diâmetro compatível com a coroa do dente e a câmara pulpar (Microdont Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil), utilizadas em alta-rotação e refrigeradas com auxílio de irrigação com soro fisiológico esterilizado (Laboratórios B. Braun, São Gonçalo, RJ, Brasil), realizou-se a cirurgia de acesso em duas etapas, tomando-se o

cuidado de não acessar a câmara pulpar em um primeiro momento. Após a remoção de tecido cariado e restaurações prévias, a coroa dental e o campo operatório foram novamente desinfetados, como descrito anteriormente, e a cirurgia de acesso finalizada com novas brocas esterilizadas, igualmente refrigeradas com seringas contendo soro fisiológico. Neste momento foram realizadas coletas da coroa dental e das imediações da câmara pulpar para comprovar a eficácia das manobras de desinfecção (C1). A ausência de bactérias no campo operatório foi comprovada por meio de PCR convencional utilizando-se iniciadores universais para o domínio *Bacteria*.

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

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

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

A fim de se determinar o diâmetro apical inicial e a consequente escolha dos instrumentos que seriam utilizados no preparo, instrumentos manuais tipo K de primeira série foram levados até o CRT em ordem crescente de calibre, do #20 ao #40

(Dentsply Maillefer), até que o instrumento se ajustasse a essa medida demonstrando ligeiro travamento. A escolha do instrumento Reciproc (VDW GmbH, Munique, Alemanha) a ser utilizado no preparo químico-cirúrgico ocorreu da seguinte maneira: quando o primeiro instrumento a se ajustar ao diâmetro do canal foi o #20 ou #25, o instrumento Reciproc R40 foi utilizado no preparo. Quando o travamento ocorreu com os instrumentos #30, #35 ou #40, o instrumento Reciproc R50 foi o escolhido para a realização do preparo do canal.

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

Durante o preparo foram utilizados 40 mL de solução irrigadora por canal, sendo 10 mL antes de cada ciclo de instrumentação e mais 10 mL ao final do preparo. As pontas irrigadoras foram posicionadas a aproximadamente 1 mm aquém do CRT, utilizadas em movimentos de vai e vem com pequena amplitude. A irrigação durante o PQC foi realizada com seringas plásticas esterilizadas de 10 mL e pontas endodônticas de irrigação Endo-EZE (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) com diâmetro de 27G e saída em meia cana lateral. A aspiração da substância extravasada foi realizada através de cânulas de aspiração SurgiTip (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) acopladas à bomba a vácuo odontológica. Ao término do preparo, o conteúdo do canal foi aspirado com pontas endodônticas Capillary Tips 0,014' e 0,019'' (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) e foi realizada uma nova irrigação com 5 mL de tiosulfato de sódio 5% por um minuto para neutralizar o NaOCl. Após os procedimentos de aspiração, secagem com cones de papel absorvente e preenchimento do canal com soro fisiológico, foi realizada uma nova coleta microbiológica (S2), conforme descrito anteriormente. Após o preparo dos canais radiculares, foi dada a sequência ao tratamento endodôntico, que foi finalizado em uma segunda sessão, após o uso da medicação intracanal com pasta de hidróxido de cálcio por 14 dias. Os microtubos contendo as amostras microbiológicas foram armazenados em freezer a -80°C até o momento da análise.

4.4 Extração de DNA/RNA e síntese do Cdna

As extrações de DNA e RNA foram realizadas utilizando o kit de purificação *MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit* (Epicentre Technologies, Madison, WI, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras endodônticas mantidas em RNA later foram descongeladas, homogeneizadas através de um agitador de vórtex (1 min) e centrifugadas a 4°C e 13000 rpm (10 min). Após a centrifugação, o sobrenadante da amostra foi descartado e o conteúdo precipitado no tubo foi suspenso em uma solução contendo 2 µL de Proteinase K e 300 µL da solução de lise celular (*Tissue and Cell Lysis Solution*). Após incubação a 65 °C por 15 min e resfriamento por 5 min, foram adicionados 150 µL de solução de precipitação proteica (*MPC Protein Precipitation Reagent*) por amostra. A seguir, foi realizada uma nova centrifugação e o sobrenadante foi coletado e tratado com isopropanol 100%, seguido de etanol 70%. Para cada amostra, foram adicionados 35µL do tampão fornecido no kit (*TE Buffer*). A seguir, a concentração de ácidos nucleicos foi analisada no espectrofotômetro (NanoDrop 1000 - Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA).

As amostras contendo os ácidos nucleicos totais foram então divididas em duas partes iguais. A primeira alíquota foi separada e armazenada em freezer -20 °C para posterior análise de DNA. A segunda alíquota passou por um processo de purificação de RNA, seguindo as recomendações do fabricante (Epicentre Technologies) e uma etapa de tratamento final com DNase I (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Para conferir a ausência de DNA nas amostras de RNA, foi realizada uma reação de PCR convencional utilizando iniciadores universais específicos para o domínio *Bacteria*. Em seguida, para confeccionar a fita dupla de cDNA a partir do RNA purificado da amostra, foi realizada a reação de Transcrição Reversa (RT-PCR) utilizando-se o kit comercial *Superscript III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen, São Paulo, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA foi armazenado em freezer -20 °C até o momento da análise.

4.5 Ensaios de qPCR baseados em rDNA e rRNA

A análise quantitativa dos níveis de rDNA e rRNA (cDNA) foi realizada por qPCR, utilizando o termociclador StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As reações de qPCR foram realizadas com iniciadores universais para a região conservada do gene 16S rRNA 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 foram realizadas em placas de 96 poços com um volume total de 20 µL contendo: 10 µL Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 100 nM de cada iniciador, 2 µL do DNA ou cDNA extraído das amostras e H₂O.

Para a realização da curva padrão, conforme descrito por Carvalho et al. (2020), foram utilizadas diluições de concentrações conhecidas de plasmídeos recombinantes (10^8 a 10 cópias de DNA) contendo fragmentos de 1.500 pb do gene 16S rRNA de *Enterococcus faecalis*. Cada concentração foi testada em triplicata para obtenção da curva com a maior eficiência e coerência possível, e o limite de detecção foi 10^2 cópias de DNA.

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

Os dados baseados em rDNA foram utilizados para quantificação bacteriana, enquanto os dados de rRNA (cDNA) foram utilizados para estimar a atividade metabólica nas amostras positivas para rDNA. A razão entre rRNA e rDNA foi calculada para investigar a atividade bacteriana nas amostras coletadas antes e depois do PQC, sendo consideradas ativas as bactérias $rRNA/DNA \geq 1$ (Campbell et al., 2011).

4.6 Análise dos dados

O teste McNemar foi utilizado para comparar a frequência de detecção (presença/ ausência bacteriana) entre os ensaios de qPCR baseados em rDNA (qPCR) e rRNA (RT-qPCR). A sensibilidade, especificidade e valor preditivo do ensaio de qPCR foi calculado em comparação ao ensaio de RT-qPCR (rRNA considerado o padrão ouro). Dessa forma, a sensibilidade do teste baseado em rDNA indica sua habilidade de detectar amostras positivas para rRNA; enquanto a especificidade indica sua capacidade em identificar corretamente as amostras negativas para rRNA. Por sua vez, o valor preditivo positivo indica quantas reações positivas para rDNA também foram positivas para rRNA.

O teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para comparar o número de cópias do gene 16S rDNA das amostras S1 e S2, permitindo a análise da redução bacteriana. A influência dos grupo de dentes e do instrumento Reciproc na porcentagem da redução bacteriana foi analisada através dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, respectivamente. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar o número de cópias de rRNA e rDNA, permitindo a análise da atividade metabólica das bactérias no interior dos canais radiculares. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes se $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

Dos 40 pacientes incluídos no estudo, 19 eram do sexo masculino e 21 do feminino, com uma média de idade de 41 anos, variando de 18 a 65 anos. Todas as amostras de controle de antissepsia do campo operatório deram resultados negativos para bactérias. Portanto, todos os dentes foram incluídos nas análises microbiológicas.

5.1 Dados clínicos e microbiológicos

As características clínicas dos dentes estudados são apresentadas na tabela 5.1. A menor porcentagem de redução bacteriana foi encontrada após o preparo dos incisivos centrais superiores (82,06%), porém não houve diferença significativa na redução bacteriana encontrada nos diferentes grupos dentais ($P > 0,05$). Da mesma forma, o tamanho do instrumento Reciproc não teve efeito significativo na porcentagem de redução bacteriana promovida durante o preparo dos canais radiculares ($P > 0,05$).

Tabela 5.1 - Grupo dental, diâmetro do instrumento utilizado para o preparo do canal radicular e porcentagem de redução das bactérias totais nas amostras de canais radiculares coletadas antes e após o preparo químico-cirúrgico

Características clínicas	N	% de redução bacteriana	P*
Dente			0,079
Incisivo central superior	7	82,06% (53,82 – 99,89)	
Incisivo lateral superior	8	99,96% (99,26-100)	
Canino superior	3	100% (99,49-100)	
2º Pré-molar superior	6	89,40% (81,22-97,16)	
Incisivo central inferior	2	98,77% (97,84-99,69)	
Incisivo lateral inferior	1	100% (100-100)	
Canino Inferior	1	96,76% (96,76-96,76)	
1º/2º Pré-molar inferior	12	99,97 (91,11-100)	
Preparo do canal radicular			0,932
# Reciproc 40	25	99,69% (85,27-100)	
# Reciproc 50	15	99,89% (88,97-100)	

*O teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$) foi utilizado para avaliar diferenças na porcentagem de redução bacteriana entre os diferentes dentes, enquanto o teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$) foi utilizado para comparar diferenças entre os instrumentos Reciproc utilizados para o preparo dos canais radiculares. O incisivo lateral ($n=1$) e canino inferior ($n=1$) foram excluídos da análise estatística.

Fonte: A autora.

5.2 Comparação entre os testes baseados em rDNA (qPCR) e rRNA (RT-qPCR)

A taxas de detecção bacteriana dos ensaios qPCR e RT-qPCR são mostradas na tabela 5.2. A análise baseada em rRNA demonstrou maior taxa de detecção de bactérias totais nas amostras após o PQC quando comparada ao teste baseado em rDNA ($P = 0,003$).

Tabela 5.2 - Taxa de detecção de bactérias totais utilizando RNA ribossômico (rRNA) e rDNA (rRNA genes) como moldes para a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

		S1			S2		
		rDNA		P^*	rDNA		P^*
		+	-		+	-	
Bactérias totais							
($n = 40$)	rRNA +	40	0	NA	27	11	0,003
	-	0	0		0	2	

n, número de casos avaliados; +, amostras com resultados qPCR-positivos; -, amostras com resultados qPCR-negativos; S1, amostras coletadas antes do preparo químico-cirúrgico; S2, amostras coletadas após o preparo químico-cirúrgico.

*O teste McNemar foi utilizado a fim de comparar a diferença das taxas de detecção entre os métodos; $P < .05$ indica diferença estatística significativa (em negrito). NA = não aplicável para análise estatística.

Fonte: A autora.

Quando comparado ao ensaio de RT-qPCR, o método baseado em rDNA apresentou baixa sensibilidade, alta especificidade e alto valor preditivo positivo (PPV) (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Sensibilidade, especificidade, e valor preditivo positivo (VPP) para qPCR de bactérias totais baseado em rDNA em comparação às análises de RT-qPCR baseados em rRNA

Amostras	Sensibilidade	Especificidade	VPP
S1	100%	NA	100%
S2	71%	100%	100%

Sensibilidade, probabilidade das reações de qPCR (rDNA) serem positivas quando rRNA está presente; especificidade, probabilidade das análises de qPCR (rDNA) serem negativas quando rRNA está ausente; valor preditivo positivo (VPP), probabilidade das análises de qPCR (rDNA) serem positivas para rRNA; S1, amostras coletadas antes do preparo; S2, amostras coletadas após o preparo dos canais radiculares.

Fonte: A autora.

5.3 Efeito do preparo químico-cirúrgico na redução bacteriana

A tabela 5.4 fornece uma visão geral dos dados de qPCR baseado em rDNA. O valor da mediana para bactérias totais em S1 decresceu significativamente em S2 ($P < 0,001$).

Tabela 5.4 - Níveis de bactérias totais nos canais radiculares determinados por qPCR baseada em rDNA (genes 16S rRNA) em amostras obtidas antes (S1) e após o preparo químico-cirúrgico (S2)

Nº de cópias de rDNA	S1	S2
Mediana	$1,79 \times 10^5$ ^a	$3,30 \times 10^3$ ^b
Intervalo	$1,67 \times 10^4 - 4,46 \times 10^7$	$0 - 3,51 \times 10^5$
Total de amostras (n)	40	40
Amostras positivas para rDNA [N (%)]	40 (100%)	27 (67,5%)

n, número total de casos avaliados; N (%), número e porcentagem de amostras com resultados qPCR-positivos. Diferentes letras nas linhas horizontais (a, b) mostram diferenças significativas nos valores medianos de rDNA em amostras de canais radiculares coletadas antes e após o preparo químico-cirúrgico (teste não paramétrico de Wilcoxon, $P < 0,05$).

Fonte: A autora.

5.4 Efeito do preparo químico-cirúrgico na atividade bacteriana

Para as amostras positivas nas análises de qPCR e RT-qPCR, a concentração de rRNA foi significativamente maior que a de rDNA, indicando atividade bacteriana nas amostras S1 e S2 (Tabela 5.5). A figura 5.1 mostra os valores da razão entre o número de cópias de rRNA e rDNA (rRNA/rDNA) das amostras S1 e S2.

Tabela 5.5 - Valores de mediana (intervalo) dos níveis de rDNA e rRNA para bactérias totais em canais radiculares com reações de qPCR positivas para ambos os métodos

Amostras	N	rRNA	rDNA	P*
S1	40	5,32 x 10 ⁵ (5,91 x 10 ³ – 1,1 x 10 ⁸)	1,79 x 10 ⁵ (1,67 x 10 ⁴ – 4,46 x 10 ⁷)	0,01
S2	27	7,48 x 10 ⁴ (2,91 x 10 ³ - 1,09 x 10 ⁶)	1,32 x 10 ⁴ (1,75 x 10 ³ – 1,33 x 10 ⁵)	0,03

*O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar os valores medianos dos ensaios baseados em rRNA e rDNA; P <0,05 indica diferença significativa (em negrito). N, número de amostras com ambos os resultados de qPCR para rRNA e rDNA acima do limite de quantificação. NA = não aplicável para análise estatística.

Fonte: A autora.

Figura 5.1 - Razão entre o número de cópias de rRNA e rDNA (rRNA/rDNA) das amostras S1 e S2

*Cada ponto representa uma amostra endodôntica. A linha horizontal representa os valores médios da razão rRNA/rDNA (valores transformados em $\log_{10}$).

Fonte: A autora.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a suscetibilidade de bactérias totais ao preparo químico-cirúrgico (PQC) dos canais radiculares de dentes com periodontite apical. Os pontos relevantes deste estudo são o rigoroso critério de inclusão utilizado para a seleção dos pacientes, a análise bacteriana obtida através de uma abordagem integrada de RNA/DNA e a correlação entre os dados clínicos e os achados microbiológicos. Por outro lado, as suas limitações incluem os procedimentos utilizados para as coletas microbiológicas, que limitam a análise ao canal principal, e a inclusão de apenas dentes unirradiculares. A utilização de dentes unirradiculares neste trabalho possibilitou a realização das coletas microbiológicas em todo o comprimento de trabalho. Por outro lado, a coleta microbiológica dos canais radiculares em molares geralmente são mais difíceis de serem realizadas devido às dificuldades anatômicas, especialmente nos canais radiculares curvos e atrésicos. As limitações encontradas neste estudo também foram apontadas na maioria dos estudos prévios das infecções endodônticas (Sakamoto et al., 2007; Roças; Siqueira, 2010; Rôças et al., 2011a; Paiva et al., 2012; Paiva et al., 2013a; Paiva et al., 2013b; Rôças et al., 2013; Neves et al., 2014; Rôças et al., 2014; Rodrigues et al., 2015; Neves et al., 2016; Rodrigues et al., 2017; Carvalho et al., 2020).

No presente estudo, rRNA (cDNA) e seus respectivos genes (rDNA) foram utilizados como alvos para as reações de qPCR. Os genes 16S rRNA (rDNA) foram utilizados para estimar o número de bactérias, enquanto o rRNA foi utilizado como um indicador de viabilidade bacteriana. Como os níveis de ribossomos variam muito dependendo do estado fisiológico das células, os resultados dos métodos baseados em rRNA refletem a atividade metabólica das amostras e não sua quantificação absoluta. Por isso, a associação de métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA permitiu a análise simultânea do metabolismo e quantidade de bactérias após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares. Essa estratégia foi inicialmente empregada na área de microbiologia ambiental e médica (Matsuda et al., 2007; Campbell et al., 2011; Pitkänen et al., 2013) e foi recentemente utilizada para avaliar a atividade de bactérias em amostras endodônticas após diferentes protocolos de tratamento (Romero Cazares, 2018; Nogales, 2019; Carvalho et al., 2020).

Apesar de possibilitar a quantificação das bactérias, as análises baseadas em rDNA não têm a capacidade de diferenciar células viáveis das não viáveis. O uso de métodos baseados em rDNA para avaliação de procedimentos antimicrobianos ainda permanece controverso na literatura endodôntica, uma vez que DNA de bactérias mortas pode permanecer no interior dos canais radiculares, superestimando o número de bactérias persistentes (Sundqvist; Figdor, 2003; Nair, 2007; Siqueira, 2008). Estudos laboratoriais prévios mostraram que o DNA de algumas espécies bacterianas pode ser identificado por qPCR no interior dos canais radiculares mesmo após a morte celular, devido à sua afinidade de ligação à hidroxiapatita (Brundin et al., 2010, 2013, 2015). Esses estudos sugerem que a persistência do DNA de células mortas pode levar a resultados falso-positivos (Brundin et al., 2015). Da mesma forma, Prado et al. (2019), utilizando rRNA e rDNA como moldes para reações de RT-PCR e PCR específicas para *Streptococcus* spp., encontraram diferenças nas taxas de detecção dos métodos. Esses autores ressaltaram que a PCR baseada em rDNA pode detectar células metabolicamente inativas, comprometendo a análise da suscetibilidade de bactérias específicas aos procedimentos antimicrobianos utilizados durante o tratamento endodôntico. Em contraste com os estudos analisando espécies bacterianas específicas, o presente estudo encontrou que todos os casos positivos para bactérias totais na análise por qPCR baseado em rDNA também foram positivos na análise por RT-qPCR. Este achado está em concordância com o estudo prévio de Rôças e Siqueira (2010) comparando as reações de PCR baseadas em rDNA e rRNA para detecção de bactérias totais em amostras endodônticas após o PQC. Os autores relataram que apenas 3 das 45 amostras apresentaram resultados discrepantes para bactérias totais quando os métodos foram comparados. Esses achados sugerem que análises baseadas em rDNA são métodos confiáveis para a quantificação de bactérias totais após os procedimentos endodônticos. Entretanto, é importante ressaltar que os dois métodos podem divergir na detecção de espécies específicas, devido à diferença na suscetibilidade das espécies bacterianas aos procedimentos antimicrobianos. Portanto, estudos são necessários para comparar a habilidade entre os métodos baseados em rRNA e rDNA em detectar diferentes espécies bacterianas nas infecções endodônticas. Nesse contexto, o Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing*) baseado em rRNA e rDNA aparece como uma alternativa mais sofisticada para análise da atividade de diferentes espécies bacterianas nos canais radiculares (Nardello et al., 2020).

A avaliação da qualidade dos testes utilizados para diagnóstico é um assunto de relevância na investigação clínica (Parikh et al., 2008). Assim, o teste diagnóstico ideal é aquele que fornece a resposta correta, ou seja, um resultado positivo nos indivíduos com a doença e um resultado negativo nos indivíduos sem a doença. Nesse contexto, a sensibilidade é a capacidade de detectar os pacientes verdadeiramente positivos, ou seja, de diagnosticar corretamente os doentes. Já a especificidade diz respeito à capacidade de detecção dos verdadeiros negativos, ou seja, do diagnóstico correto dos indivíduos saudáveis. Já a correlação entre sensibilidade, especificidade e prevalência da doença diz respeito ao valor preditivo do teste, onde o valor positivo demonstra a proporção de doentes entre os que testaram positivos (Gopikrishna et al., 2007). Os conceitos de sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo foram utilizados no presente estudo. O ensaio de qPCR baseado em rDNA apresentou menor sensibilidade quando comparado ao RT-qPCR para a detecção de bactérias nas amostras após o preparo dos canais radiculares. Esses achados podem ser explicados pelo fato das bactérias ativas possuírem uma grande quantidade de ribossomos (rRNA) e somente poucos genes 16S rRNA (rDNA) (Waters; McCuthan, 1990). Consequentemente, o rRNA das bactérias remanescentes foi detectado em quase todas as amostras S2, confirmando que o PQC é capaz de reduzir a carga microbiana mas não de eliminar bactérias dos canais radiculares (Siqueira; Rôças, 2008). Embora menos sensível que o ensaio de RT-qPCR, o ensaio de qPCR baseado em rDNA apresentou alta especificidade e alto valor preditivo positivo, indicando que a qPCR baseada em rDNA tem baixo risco de exibir resultados falso-positivos na análise de bactérias totais em amostras pós-preparo. Entretanto, é importante ressaltar que os resultados obtidos com métodos moleculares de alta sensibilidade devem ser analisados com cuidado, pois a implicação de bactérias persistentes no sucesso do tratamento endodôntico ainda precisa ser determinada por estudos longitudinais.

A análise quantitativa baseada em rDNA revelou uma redução significativa de bactérias após o PQC com instrumentos Reciproc e irrigação com NaOCl 2,5%. Entretanto, apesar da redução bacteriana, 67,5% dos casos permaneceram positivos para rDNA bacteriano após o PQC. Esse dado está de acordo com estudos moleculares prévios que relataram 50% a 70% de casos infectados após a fase de preparo dos canais radiculares (Sakamoto et al., 2007; Rôças; Siqueira, 2010; Rôças;

Siqueira, 2011a; Paiva et al., 2012; Paiva et al., 2013a; Paiva et al., 2013b; Rôças et al., 2013; Neves et al., 2014; Rôças et al., 2014; Rodrigues et al., 2015; Neves et al., 2016; Zandi et al., 2016; Rodrigues et al., 2017; Nakamura et al., 2018; Carvalho et al., 2020). Embora o tamanho do instrumento Reciproc (R40 e R50) e o grupo de dentes não tenham apresentado efeito significativo na porcentagem de redução bacteriana, vale ressaltar que a menor porcentagem de redução bacteriana foi encontrada após o preparo dos incisivos centrais superiores (82,06%). Esse fato pode ser devido ao diâmetro apical dos incisivos centrais superiores, que pode ser mais amplo que o maior instrumento utilizado para o preparo (R50). De fato, Liang et al. (2013) observaram uma menor taxa de sucesso em canais amplos (com diâmetro maior que a lima #50), ressaltando a dificuldade em promover um adequado alargamento apical e consequente desinfecção em canais radiculares amplos.

Nas amostras positivas em ambos os métodos (RT-qPCR e qPCR), altos níveis de cópias de rRNA em relação ao rDNA sugerem que bactérias persistiram ativas mesmo após o estresse causado pelo PQC. Esses achados reforçam a necessidade da busca por estratégias mais efetivas que potencializem a desinfecção após o preparo dos canais radiculares (Rôças; Siqueira, 2011a, b). Com o advento dos novos sistemas de instrumentação automatizada, o tempo clínico necessário para a modelagem dos canais radiculares diminuiu consideravelmente, reduzindo consequentemente, a ação das substâncias químicas auxiliares durante o PQC. Dessa forma, passou-se a dar maior destaque aos procedimentos complementares de desinfecção visando a máxima redução microbiológica ainda na primeira sessão do tratamento (Rôças; Siqueira, 2011a, b). Essas estratégias se baseiam principalmente nos sistemas de ativação da irrigação. Nesse contexto, Nakamura et al. (2018) demonstraram que a ativação ultrassônica do hipoclorito de sódio foi mais efetiva que a irrigação convencional na redução do número de bactérias dos canais radiculares. Entretanto, devido ao número limitado de estudos clínicos, a eficácia antimicrobiana dessa e de outras estratégias complementares de desinfecção ainda precisam de maiores comprovações científicas (Rôças; Siqueira, 2011a, b).

Em resumo, a presente análise mostrou que o preparo químico-cirúrgico foi efetivo em promover a redução dos níveis bacterianos, mas não em refrear totalmente a atividade metabólica das bactérias. Todas as amostras positivas para rDNA também foram positivas para rRNA nos testes de qPCR para bactérias totais. Entretanto a qPCR baseada em rDNA foi menos sensível que a RT-qPCR para a detecção de bactérias após o PQC. Mais estudos são necessários a fim de avaliar se a carga de bactérias viáveis que persistem após o tratamento endodôntico pode ter um impacto nas taxas de sucesso clínico.

7 CONCLUSÕES

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

- O preparo químico-cirúrgico foi efetivo em promover a redução de bactérias, porém estas permaneceram ativas nos canais radiculares.
- O grupo de dentes e o instrumento utilizado para o preparo não tiveram um impacto importante na porcentagem de redução bacteriana.
- O ensaio de RT-qPCR apresentou maior taxa de detecção bacteriana que o ensaio de qPCR nas amostras obtidas após o preparo dos canais radiculares.
- Embora menos sensível que o ensaio de RT-qPCR, o ensaio de qPCR baseado em rDNA apresentou baixo risco de resultados falso-positivos na análise de bactérias totais em amostras pós-preparo, provando ser um método confiável para análise de procedimentos endodônticos.

REFERÊNCIAS¹

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

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

Brundin M, Figdor D, Sundqvist G, Sjögren U. Preservation of *Fusobacterium nucleatum* and *Peptostreptococcus anaerobius* DNA after loss of cell viability. *Int Endod J*. 2015;48(1):37-45. doi: 10.1111/iej.12273.

Campbell BJ, Yu L, Heidelberg JF, Kirchman DL. Activity of abundant and rare bacteria in a coastal ocean. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug;108(31):12776- 81. doi: 10.1073/pnas.1101405108.

Carvalho APL, Nardello LCL, Fernandes FS, Bruno FP, Paz LR, Iglecias EF, et al. Effects of Contemporary Irrigant Activation Schemes and Subsequent Placement of an Interim Dressing on Bacterial Presence and Activity in Root Canals Associated with Asymptomatic Apical Periodontitis. *J Clin Med*. 2020 Mar 20;9(3):854. doi: 10.3390/jcm9030854.

Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod*. 2002 Oct;28(10):689-93. doi: 10.1097/00004770-200210000-00003.

Engström B, Hard AF, Segerstad L, Ramström G, Frostell G. Correlation of positive cultures with the prognosis for root canal treatment. *Odontol Revy*. 1964;15(3):257-70.

Fabricius L, Dahlén G, Sundqvist G, Happonen RP, Möller AJ. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *Eur J Oral Sci*. 2006 Aug;114(4):278-85. doi: 10.1111/j.1600-0722.2006.00380.x.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod*. 2008 May;34(5):537-40. doi: 10.1016/j.joen.2008.01.016.

Gopikrishna V, Tinagupta K, Kandaswamy D. Evaluation of efficacy of a new custom-made pulse oximeter dental probe in comparison with the electrical and thermal tests for assessing pulp vitality. *J Endod*. 2007 Apr;33(4):411-4. doi: 10.1016/j.joen.2006.12.003.

Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res*. 1987 Aug;66(8):1375-9. doi: 10.1177/00220345870660081801.

Heling B, Shapira J. Roentgenologic and clinical evaluation of endodontically treated teeth, with or without negative culture. *Quintessence Int Dent Dig*. 1978 Nov;9(11):79-84.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965 Sep;20:340-9. doi: 10.1016/0030-4220(65)90166-0.

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.

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

Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1998 Jan;31(1):1-7.

Nair PN. Abusing technology? Culture-difficult microbes and microbial remnants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Oct;104(4):569-70. doi: 10.1016/j.tripleo.2007.06.003.

Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 Feb;99(2):231-52. doi: 10.1016/j.tripleo.2004.10.005.

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

Nardello LCL, Amado PPP, Franco DC, Cazares RXR, Nogales CG, Mayer MPA, et al. Next-generation sequencing to assess potentially active bacteria in endodontic infections. *J Endod*. 2020 Aug;46(8):1105-112. doi: 10.1016/j.joen.2020.05.004.

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

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

Nogales CG. Efeito da irrigação ultrassônica e da medicação intracanal com hidróxido de cálcio na quantidade e no metabolismo de bactérias que persistiram após o preparo dos canais radiculares de dentes com periodontite apical [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. doi: 10.11606/T.23.2019.tde-08072020-132221.

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*. 2013a Mar;46(3):225-33. doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02111.

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

Parikh R, Mathai A, Parikh S, Chandra Sekhar G, Thomas R. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian J Ophthalmol*. 2008 Jan-Feb;56(1):45-50. doi: 10.4103/0301-4738.37595.

Pinheiro ET, Candeiro GT, Teixeira SR, Shin RC, Prado LC, Gavini G, et al. RNA-based assay demonstrated *Enterococcus faecalis* metabolic activity after chemomechanical procedures. *J Endod*. 2015 Sep;41(9):1441-4. doi: 10.1016/j.joen.2015.04.020.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*. 2003 Jan;36(1):1-11. doi: 10.1046/j.1365-2591.2003.00603.x.

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

Prado LC, Gavini G, Silveira ADC, Nakamura VC, Mayer MPA, Pinheiro ET. Comparison of rRNA-based reverse transcription PCR and rDNA-based PCR for the detection of streptococci in root canal infections. *J Appl Oral Sci*. 2019 Jul 29;27:e20180256. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0256.

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

Rôças IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF Jr. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. *J Endod*. 2004 Jul;30(7):504-8.

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

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

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

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

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

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

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

Rôças IN, Siqueira JF Jr. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *J Clin Microbiol*. 2008 Nov;46(11):3599-606. doi: 10.1128/JCM.00431-08.

Rodrigues RCV, Antunes HS, Neves MA, Siqueira JF Jr, Rôças IN. Infection control in retreatment cases: in vivo antibacterial effects of 2 instrumentation systems. *J Endod*. 2015 Oct;41(10):1600-5. doi: 10.1016/j.joen.2015.06.005.

Rodrigues RCV, Zandi H, Kristoffersen AK, Enersen M, Mdala I, Ørstavik D, et al. Influence of the apical preparation size and the irrigant type on bacterial reduction in root canal-treated teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 2017 Jul;43(7):1058-63. doi: 10.1016/j.joen.2017.02.004.

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

Rosenthal S, Spångberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Oct;98(4):488-92. doi: 10.1016/j.tripleo.2003.07.005.

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.

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. On the issue of uncultivated bacteria and dead cell detection by molecular methods: reply to Dr. Nair's commentary. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Jan;105(1):5-8. doi: 10.1016/j.tripleo.2007.07.046. author reply 8-10.

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.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod*. 2005a Jun;31(6):411-23. doi: 10.1097/01.don.0000157989.44949.26.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--redefining the endodontic microbiota. *J Endod*. 2005b Jul;31(7):488-98. doi: 10.1097/01.don.0000157990.86638.49.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Jan;97(1):85-94. doi: 10.1016/s1079-2104(03)00353-6.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent Res*. 2009 Jan;88(1):61-5. doi: 10.1177/0022034508328124.

Siqueira JF, Rôças IN. The oral microbiota in health and disease: an overview of molecular findings. *Methods Mol Biol* 2017;1537:127-38. doi: 10.1007/978-1-4939-6685-1.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Treponema species associated with abscesses of endodontic origin. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Oct;19(5):336-9. doi: 10.1111/j.1399-302x.2004.00156.x.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. *J Clin Microbiol.* 2005 Jul;43(7):3314-9. doi: 10.1128/JCM.43.7.3314-3319.2005.

Siqueira JF Jr, Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod.* 1996 Dec;22(12):674-6. doi: 10.1016/S0099-2399(96)80062-8.

Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997 Sep;30(5):297-306. doi: 10.1046/j.1365-2591.1997.00092.x. Erratum in: *Int Endod J* 1998 Mar;31(2):148.

Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen: ecological differences between the untreated and root-filled root canal. *Endod Topics.* 2003 Nov;6(1):3-28. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2003.00054.x>.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Jan;85(1):86-93. doi: 10.1016/s1079-2104(98)90404-8.

Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Contrads 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

Walia HM, Brantley WA, Gerstein H. An initial investigation of the bending and torsional properties of Nitinol root canal files. *J Endod.* 1988 Jul;14(7):346-51. doi: 10.1016/s0099-2399(88)80196-1.

Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Ørstavik D. Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *J Endod.* 2005 Dec;31(12):863-6. doi: 10.1097/01.don.0000164856.27920.85.

Waters AP, McCuthan TF. Ribosomal RNA: nature's own polymerase-amplified target for diagnosis. *Parasitol Today.* 1990 Feb;6(2):56-9. doi: 10.1016/0169-4758(90)90071-b.

Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. J Endod. 1995 Oct;21(10):513-5. doi: 10.1016/s0099-2399(06)80524-8.

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

Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod. 2006 May;32(5):389-98. doi: 10.1016/j.joen.2005.09.014.

Zehnder M, Kosicki D, Luder H, Sener B, Waltimo T. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002 Dec;94(6):756-62. doi: 10.1067/moe.2002.128961.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

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

Título da Pesquisa: Análise da Comunidade Bacteriana Metabolicamente Ativa nas Infecções Endodônticas Persistentes após Diferentes Protocolos Clínicos de Desinfecção: Estudo Molecular baseado em RNA e DNA

Pesquisador: Ericka Tavares Pinheiro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 71367517.0.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.201.768

Apresentação do Projeto:

Este projeto pretende avaliar o efeito de diferentes métodos de desinfecção em dentes com periodontite apical. Serão selecionados 100 pacientes com necrose pulpar e periodontite apical. Coletas microbiológicas dos canais radiculares serão realizadas no início do tratamento endodôntico (S1) e após o preparo químico-mecânico com Sistema Reciproc e NaOCl 2,5% (S2). A seguir, os pacientes serão igualmente divididos em grupos de acordo com procedimentos complementares de desinfecção realizados após o preparo químico-mecânico: Grupo XP (XP-endo Finisher), Grupo PIPS (irrigação ativada a laser utilizando as pontas PIPS (Photon-Induced Photoacoustic Streaming), Grupo PUI (irrigação ultrassônica passiva) e Grupo IC (irrigação convencional com seringas, sem ativação). Novas coletas microbiológicas dos canais radiculares serão feitas após os procedimentos complementares de desinfecção (S3) e após a medicação intracanal com hidróxido de cálcio por 14 dias (S4) e re-instrumentação dos canais radiculares antes da obturação (S5). As amostras dos canais radiculares serão submetidas à extração dos ácidos nucleicos totais. O efeito dos protocolos de tratamento sobre a microbiota total será determinado por qPCR baseada em rDNA, utilizando iniciadores universais para o Domínio Bacteria.

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

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA USP - SÃO
PAULO**

Continuação do Parecer: 2.201.768

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste projeto de pesquisa é avaliar a eficácia antimicrobiana de diferentes protocolos clínicos de desinfecção endodôntica e também analisar a diversidade e atividade metabólica de bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são os inerentes ao tratamento endodôntico convencional e os benefícios diretos ao pacientes são o tratamento de canal realizado e a possível diminuição da infecção do dente, colaborando para uma melhor saúde bucal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, que pode indicar melhores métodos de tratamento endodôntico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentadas as informações básicas do projeto, o projeto detalhado, o TCLE e a folha de rosto, estando todos conformes.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_888126.pdf	17/07/2017 13:33:24		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	17/07/2017 13:32:33	Ericka Tavares Pinheiro	Aceito
Cronograma	cronogramadeduracaodapesquisa.docx	17/07/2017 13:32:11	Ericka Tavares Pinheiro	Aceito

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

Continuação do Parecer: 2.201.768

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 04 de Agosto de 2017

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

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