

LAURA CRISTINA LEITE NARDELLO

Análise Molecular da Comunidade Bacteriana Ativa nas Infecções Endodônticas

São Paulo

2022

LAURA CRISTINA LEITE NARDELLO

Análise molecular da comunidade bacteriana ativa nas infecções endodônticas

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Endodontia

Orientadora: Profa. Dra. Ericka Tavares Pinheiro

Co-orientadora: Profa. Dra. Mary Caroline Skelton Macedo

São Paulo
2022

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

Nardello, Laura Cristina Leite.

Análise molecular da comunidade bacteriana ativa nas infecções endodônticas / Laura Cristina Leite Nardello; orientadora Ericka Tavares Pinheiro; coorientadora Mary Caroline Skelton Macedo -- São Paulo, 2022.

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

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

Versão corrigida.

1. Periodontite periapical. 2. Infecções bacterianas. 3. Tratamento endodôntico. 4. Métodos moleculares. 5. Revisão sistemática. I. Pinheiro, Ericka Tavares. II. Macedo, Mary Caroline Skelton. III. Título.

Nardello LCL. Análise molecular da comunidade bacteriana ativa nas infecções endodônticas. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em:10/03/2022

Banca Examinadora

Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Campinas (FOP - UNICAMP). Julgamento: Aprovada.

Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer

Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB - USP).
Julgamento: Aprovada.

Prof. Dr. Heitor Marques Honório.

Instituição: Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB – USP).
Julgamento: Aprovada.

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus que me carregou no colo nos momentos mais difíceis e sem Ele eu não teria capacidade para desenvolver este trabalho. Este trabalho de pesquisa é também dedicado aos dois maiores incentivadores das realizações dos meus sonhos, meus pais. Aqui deixo o muito obrigado.

Dedico também à Maria da Graça Barbosa Lopes

Câmara (in memoriam)

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Quero agradecer a Deus por todo esse curso de doutorado “Agradeço primeiramente a **Deus** pela alegria durante a caminhada deste estudo. Obrigada **Senhor** pelo envio do seu Espírito Santo para me ensinar, guiar e aconselhar, obrigada por todos aqueles que o **Senhor** colocou na minha vida durante essa trajetória para que eu pudesse aprender cada vez mais, obrigada **Senhor** também por ter podido servir aos seus filhos. Obrigada pelos frutos do seu Espírito agindo em mim: amor, alegria, paz, tolerância, equilíbrio, sabedoria, afabilidade, bondade, fidelidade, brandura e temperança. Obrigada por me encorajares a pedir auxílio quando tenho uma necessidade e me ajudares a entender os anseios do meu coração.

Obrigada **Senhor** pela graça de Te ouvir, de crer em Ti e de me aproximar de Ti. Obrigada por todas as maneiras com que me ajudaste em minha vida a meu favor. Obrigada por Teu plano de amor pessoal e por ter me criado tendo em mente um propósito de felicidade, dando-me assim autoestima. Obrigada por me amares incondicionalmente, por nunca ter me abandonado ou esquecido, não se importando com os meus erros ou acertos. Obrigada por estar presente em todos os momentos da minha vida, tanto nos fáceis quanto nos difíceis, guiando me através deles a uma maturidade maior.

Obrigada **Senhor** por tua Palavra viva que tem me fortalecido e encorajado. Obrigada quando me capacitas a vencer o desânimo e a caminhar na alegria. Obrigada por me levatares quando caio. Obrigada por me guardar na Tua paz, se tenho em Ti a minha mente. Obrigada por fazer com que todas as coisas concorram para o meu bem. Obrigada por me proteger das armadilhas do maligno, guardando a minha vida em segurança.

Obrigada por me dar Teus anjos para me proteger e me guiar em todos os caminhos. Obrigada por me abençoar em todas as minhas idas e vindas. Obrigada por me guiar, dando-me sabedoria. Obrigada por Tua bondade e misericórdia, que me acompanham onde eu estiver. Obrigada por poder me apoiar no entendimento que Tu tens das coisas e não no meu parco entendimento. Obrigada por me capacitares a rejeitar a cada dia toda negatividade e pensamentos vãos, levando-me a pensar o que edifica e é saudável. Obrigada por me dar um novo linguajar que gera vida e cura. Obrigada pela abundância do Teu amor, que lança fora todo o temor. Obrigada por lutar a meu favor contra meus inimigos, conduzindo-nos

inclusive a reconciliação e a paz. Obrigada pela graça de me conceder mais um dia de vida. Obrigada por me capacitar a chegar até aqui.

Obrigada por encheres o meu espírito do Teu poder e do Teu amor, dando-me também uma nova mentalidade. Obrigada quando sou mais que vencedora em Jesus Cristo, transformando em bênçãos as maldições. Em Ti sou mais que vencedora. Obrigada pela renovação da minha mente e por me guiar com segurança pelos Teus caminhos. Obrigada pela abundância das Tuas graças que caem generosas do Céu.

Obrigada pela tua providência, que vem ao encontro de todas as minhas necessidades, rico que és em Tua glória. Obrigada quando encontro favor diante de Ti como também diante dos meus semelhantes. Obrigada quando me curas no corpo, na mente e na alma, e quando tiras o bem dos tempos de tribulação. Obrigada quando me dá sabedoria e entendimento da grande esperança qual sou chamada em Jesus. Obrigada quando transborda meu coração e minha mente com a Tua luz. Obrigada pela graça de caminhar no perdão, na fidelidade e no amor. Pelo crescimento na minha fé. Obrigada quando abre as minhas mãos aos necessitados, quando me fazes perceber as necessidades dos meus irmãos e minhas irmãs, abrindo o meu ouvido ao choro e ao lamento deles, abrindo o meu coração a amar os feridos e perdidos, abrindo os meus lábios para falar do Teu amor, e abrindo, enfim, os meus braços para acolher com amor no meu coração.

*Obrigada meu Deus pela Tua multiforme bênção manifestada em toda minha vida: pelos meus ancestrais, que também foram Teus, pela minha família, amigos, professores, profissionais liberais, clero e Igreja. Obrigada por todos os que me ajudaram nessa caminhada (abençoa-os **Senhor**). Obrigada pelo dom da fé, pela liberdade, pela saúde, pelo trabalho, pelo estudo. Obrigada pela ciência, pela arte e medicina, pelos pequenos e grandes inventos e por todo avanço tecnológico que torna nossa vida melhor. Obrigada pelo dom maravilhoso da minha vida, exatamente do jeito que ela é. Eu a aceito e acolho como um dom inestimável de Tuas mãos. E eu te agradeço pelo maior de todos os dons: **TEU FILHO JESUS.**”*

Linda Schubert

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à peça-chave dessa pesquisa que sem sombra de dúvidas foi minha orientadora, **Profa. Dra. Ericka Tavares Pinheiro**. Professora, preciso te agradecer em todos os sentidos. Primeiro, por me ajudar a realizar dois sonhos, fazer um doutorado e trabalhar em um laboratório para o desenvolvimento de pesquisa de qualidade. Depois, por todos os ensinamentos, conselhos, dicas, incentivos, correções, pela construção de pensamento crítico e ciência. Também preciso te agradecer por ter me ajudado a crescer como pessoa, a senhora melhor do que ninguém sabe que a nossa relação durante todos esses seis anos que passamos juntas não foi fácil. Mas com todos esses ensinamentos a senhora me ajudou com que eu me tornasse uma pessoa melhor. Obrigada. Dedico este momento a esta grande mestra com carinho.

À **Profa. Dra. Mary Caroline Skelton Macedo** meus mais sinceros votos de gratidão, não somente pela orientação na elaboração deste trabalho, mas principalmente pela força, pelo ânimo, pela empolgação, pelo incentivo, pelos ensinamentos e pela sincera amizade que dividimos nesses anos durante a elaboração deste trabalho. Agradeço imensamente a dedicação, a paciência, o incentivo e toda a confiança depositada em mim.

Agradeço ao **Prof. Giulio Gavini** pela confiança e incentivo durante essa jornada e por confiar em mim e no meu trabalho.

Agradeço à **Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer** do Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e ao professor **Victor Elias Arana-Chavez** do Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo que abriram as portas de seus respectivos laboratórios para que esse trabalho fosse realizado. Esse agradecimento também se estende a todos os professores, funcionários e alunos destes laboratórios por serem solícitos sempre que eu precisava.

Agradeço aos componentes desse maravilhoso grupo de pesquisa, **Alexandre Pinheiro Lima Carvalho, Bruna Gontijo Vilela, Carlos Nogales, Fernanda Fernandes, Fernanda Pinheiro Bruno, Lais C. Prado, Luiza Paz, Patricia Cardoso Roberto Romero e Yeska Braga** sem os esforços desmedidos deles esta pesquisa, definitivamente, não poderia ser realizada.

Agradeço ao **Diego Castillo Franco, Dione Kawamoto, Ellen Sá, Jeferson Barbosa Sousa, Karin H Ishikawa, Pamela Pontes Amado e Leo Batista Cruz** por toda ajuda para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Agradeço também aos professores da disciplina de Endodontia da FOU SP, **Prof. Dr. Giulio Gavini, Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira, Prof. Dr. José Luiz da Silva Lage Marques, Prof. Dr. Manoel Eduardo Lima Machado, Prof. Dr. Marcelo dos Santos, Prof. Dr. Igor Prokopowitsch e Profa. Dra. Carla Renata Sipert** por todo o conhecimento compartilhado e por esclarecer dúvidas e questionamentos.

Agradeço aos meus aos colegas de pós-graduação **Breno Nappi Ventura, Bruna Gontijo, Bruno Giliolli Bisi, Carlos Nogales, Caroline H Rodrigues, Caroline Carvalho Dos Santos, Claudia Caroline Bosio Meneses, Giovana Sarra, Gustavo Alberto Rubino, Hermano Camelo Paiva, J. Edgar Valdivia C., Juliana Garuba Rahhal, Juliana Marques, Kareen Andrade Sepúlveda, Karla Nogueira Matos, Layse Ribeiro Schuster, Letícia Martins Santos, Licia Elias de Oliveira, Luiza Paz, Patrícia Silva Cardoso, Raphael da Silva Gomes, Stephanie Isabel D Zamalloa, Tainá Teixeira Franco** que me acompanharam durante toda essa caminhada. Agradeço a cada um de vocês pelos momentos divididos.

Agradeço em especial aos meus colegas **Bruna Gontijo, Elaine Faga Iglecias, Lais C. Prado e Raphael Gomes** por toda a parceria e por todos os momentos compartilhados, tornando essa jornada um pouco mais fácil!

Agradeço à **Pâmela Pontes Amado** que foi quem muito me apoiou e era também para quem eu ligava para me ajudar no difícil caminho que foi fazer as análises do sequenciamento de nova geração... sem ela definitivamente essa análise não seria possível. A você todo o meu carinho e admiração.

Agradeço a todos **os alunos de graduação** por terem me ensinado mais do que eu tentei ensinar a eles.

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

Agradeço 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.

Antonio Elias Nardello e Helena Aparecida Leite Nardello serei infinitamente grata pelo dom da vida, mas vocês não se contetaram e ainda me ensinou a vive-la e a olhá-la com alegria e otimismo, me educando e me auxiliando com a intenção de me fazer seguir pelo melhor caminho. De vocês recebi ainda valores que me transformaram em uma adulta responsável e consciente. Quantas vezes sacrificaram os seus sonhos em favor dos meus. Meu cansaço foi sentido e compartilhado por vocês, num colo ou mesmo num silêncio. Saibam que

mérito das minhas conquistas lhes pertencem, tanto quanto a mim. Eu lhes fui confiada a Deus para ser treinada para a vida. Desta forma o mínimo que posso dizer é amo vocês.

Maria da Graça Barbosa Lopes Câmara (*in memoriam*) dizer obrigada não seria o suficiente. Obrigada por todas as palavras de incentivo, conselhos, carinho e puxões de orelha (que não foram poucos). Obrigada por sempre estar por perto nos momentos que eu mais precisei. Sou e serei eternamente grata por todas as orações, por todas os momentos em que me apoiou e por sempre estar disposta a me ouvir. E confesso que não sei neste instante como retribuir tanto carinho.

“Na incerteza do amanhã escolha hoje para ser feliz, pois amanhã é apenas promessa. Se nunca errarmos não significa que somos perfeitos, e sim que tivemos medo de tentar. Portanto erre, mas tente, afinal o ideal é ser feliz e não perfeito. A arte de viver é acordar a cada dia, levantar a cada tombo, sorrir a cada tristeza, e lembrar que sempre terá um Deus que irá lutar por você o tempo todo”

— **Autor desconhecido**

RESUMO

Nardello LCL. Análise molecular da comunidade bacteriana ativa nas infecções endodônticas. [tese]: São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022; Versão Corrigida.

Introdução: Como as bactérias ativas apresentam uma maior abundância de RNA ribossômico (rRNA) do que DNA (genes rRNA), a razão rRNA/DNA foi utilizada para investigar bactérias ativas em infecções endodônticas. No 1º experimento, a razão rRNA/DNA do sequenciamento de próxima geração (NGS) foi empregada para investigar a comunidade endodôntica ativa. No 2º experimento, a razão rRNA/DNA de ensaios de qPCR foi utilizada para investigar a atividade de bactérias específicas, antes e após o preparo químico-cirúrgico (PQC). Adicionalmente, foi realizada uma revisão sistemática e meta-análise para investigar a prevalência de bactérias ainda não cultivadas/difíceis de cultivar em amostras pós-preparo. **Métodos:** Amostras endodônticas coletadas antes (S1) e após o PQC (S2) foram submetidas à extração de DNA e RNA. Para a análise de NGS, DNA e RNA (cDNA) de 5 amostras S1 foram sequenciados usando MiSeq (Illumina, San Deigo, CA) e as diferenças analisadas pelo teste de Mann Whitney ($P < 0,05$). A atividade metabólica de *Bacteroidaceae* [G-1] bacterium HMT 272 e *Selenomonas* spp. foi determinada pela razão rRNA/DNA baseada nos ensaios de qPCR de 20 amostras pareadas S1-S2. Para a revisão sistemática, foram incluídos estudos moleculares que identificaram espécies bacterianas antes e após o PQC. A meta-análise foi realizada com o RStudio. **Resultados:** Os dados de NGS revelaram que *Bacteroidales* [G-2] bacterium HMT 274, *Porphyromonas endodontalis*, *Tannerella forsythia*, *Alloprevotella tannerae*, *Prevotella intermedia*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Olsenella* sp. HMT 809 e *Olsenella* sp. HMT 939 foram membros ativos ($rRNA/DNA \geq 1$) nas infecções primárias. Os ensaios de qPCR revelaram que a concentração de cópias de rRNA de *Bacteroidaceae* [G-1] bacterium HMT 272 nas amostras S2 foi maior do que os níveis correspondentes de DNA ($P < 0,05$). Por outro lado, houve uma redução da atividade de *Selenomonas* spp. após o PQC. Os resultados da revisão sistemática e meta-análise mostraram que a prevalência de espécies de difícil cultivo nas amostras pós-preparo foi baixa (<17%), sendo representadas principalmente por Firmicutes e Bacteroidetes. **Conclusão:** (1) a estratégia integrada de NGS baseada em DNA e rRNA foi particularmente importante para revelar a atividade de bactérias ainda não cultivadas; (2) *Bacteroidaceae* [G-1] bacterium HMT 272 permaneceu metabolicamente ativo após o PQC; (3) bactérias de difícil cultivo são encontradas em baixa prevalência em amostras pós-instrumentação.

Palavras-chave: Periodontite Apical. Infecção bacteriana. Tratamento endodôntico. Métodos moleculares. Revisão Sistemática.

ABSTRACT

Nardello LCL. Molecular analysis of the active bacterial community in endodontic infections. [thesis]: São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022; Revised Version.

Introduction: As active bacteria have a greater abundance of ribosomal RNA (rRNA) than DNA (rRNA genes), the rRNA/DNA ratio was used to investigate active bacteria in endodontic infections. In the 1st experiment, the rRNA/DNA ratio of Next Generation Sequencing (NGS) data was used to investigate the active endodontic community. In the 2nd experiment, the rRNA/DNA ratio of qPCR data was used to investigate the activity of specific bacteria, before and after chemomechanical preparation (CMP). Additionally, a systematic review and meta-analysis was performed to investigate the prevalence of bacteria as-yet-uncultivated/ difficult-to-culture bacteria in post-instrumentation samples. **Methods:** Endodontic samples collected before (S1) and after CMP (S2) were submitted to DNA and RNA extraction. For NGS analysis, DNA and RNA from 5 S1 samples were sequenced using MiSeq (Illumina, San Deigo, CA) and analyzed by the Mann Whitney test ($P < 0.05$). The metabolic activity of *Bacteroidaceae* [G-1] bacterium HMT 272 and *Selenomonas* spp. was determined by the rRNA/DNA ratio based on the qPCR of 20 paired S1-S2 samples. For the systematic review, molecular studies that identified bacterial species before and after PQC were included. The meta-analysis was performed with RStudio. **Results:** NGS data revealed that *Bacteroidaceae* [G-1] bacterium HMT 272, *Porphyromonas endodontalis*, *Tannerella forsythia*, *Alloprevotella tanneriae*, *Prevotella intermedia*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Olsenella* sp. HMT 809, *Olsenella* sp. HMT 939, *Olsenella uli* and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *animalis* were active members ($rRNA/DNA \geq 1$) in primary infections. qPCR assays revealed that the rRNA concentration of *Bacteroidaceae* [G-1] bacterium HMT 272 in S2 samples was higher than the corresponding DNA levels ($P < 0.05$). On the other hand, there was a reduction in the activity of *Selenomonas* spp. after CMP. The results of the systematic review and meta-analysis showed that the prevalence of as-yet-uncultivated/ difficult-to-culture bacteria in post-instrumentation samples was low (<17%), being represented mainly by Firmicutes and Bacteroidetes. **Conclusion:** (1) the integrated strategy of NGS based on DNA and rRNA was particularly important to reveal the activity of as-yet-uncultivated/ difficult-to-culture bacteria; (2) *Bacteroidaceae* [G-1] bacterium HMT 272 remained metabolically active after CMP; (3) difficult-to-culture bacteria are found in low prevalence in post-instrumentation samples.

Keywords: Apical Periodontitis. Bacterial infection. Endodontic treatment. Molecular methods. Systematic review.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

=	Igual
>	Maior
<	Menor
≥	Maior igual
≤	Menor igual
μL	Microlitro
CHX	Clorexedina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
mL	Mililitro
NaOCl	Hipoclorito de sódio
nM	nanoMol
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
TE	Tris + EDTA

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	NGS baseado em rRNA e DNA para análise da comunidade bacteriana ativa nas infecções endodônticas primárias	27
2.2	Ensaio de qPCR baseado em rRNA e DNA para análise de bactérias ativas após o preparo químico-cirúrgico	28
2.3	Natureza e prevalência de bactérias que persistem após o preparo químico-cirúrgico	30
3.1	Objetivos Gerais	33
3.2	Objetivos Específicos.....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	NGS baseado em rRNA e DNA para análise da comunidade bacteriana ativa nas infecções endodônticas primárias	35
4.1.1	Amostras microbiológicas dos canais radiculares	35
4.1.2	Extração de ácidos nucleicos e síntese de cDNA	36
4.1.3	Sequenciamento e análise dos dados	37
4.2	Ensaio de qPCR baseado em rRNA e DNA para análise de bactérias ativas após o preparo químico-cirúrgico	38
4.2.1	Amostras microbiológicas dos canais radiculares	38
4.2.2	Coletas microbiológicas dos canais radiculares antes e após o preparo químico-cirúrgico	39
4.2.3	Análise quantitativa e da atividade metabólica de bactérias específicas por meio de ensaios de qPCR baseado em DNA e rRNA	40
4.2.4	Análise estatística	41
4.3	Revisão sistemática e meta-análise.....	42
4.3.1	Fonte de informação	42
4.3.2	Critérios de inclusão e exclusão	44
4.3.3	Extração de dados	44
4.3.4	Avaliação do risco de viés	45
4.3.5	Análise estatística	45

5	RESULTADOS	47
5.1	NGS baseado em rRNA e DNA para análise da comunidade bacteriana ativa nas infecções endodônticas primárias	47
5.1.1	Discrepância em relação a abundância de filos em amostras de DNA e rRNA	48
5.1.2	Diferença na abundância relativa de gênero entre as amostras de DNA e rRNA	49
5.1.3	Variação relativa das espécies abundantes entre as amostras de DNA e rRNA	51
5.2	Ensaio de qPCR baseado em rRNA e DNA para análise de bactérias ativas após o preparo químico-cirúrgico	54
5.2.1	Comparação entre os ensaios de RT-qPCR baseado em rRNA e qPCR baseado em DNA	54
5.2.2	Contagem bacteriana	55
5.2.3	Atividade bacteriana	56
5.3	Natureza e prevalência de bactérias que persistem após o preparo químico-cirúrgico	56
5.3.1	Resisão Sistemática	56
5.3.2	Meta-análise	75
6.1	NGS baseado em rRNA e DNA para análise da comunidade bacteriana ativa nas infecções endodônticas primárias	79
6.2	Ensaio de qPCR baseado em rRNA e DNA para análise de bactérias ativas após o preparo químico-cirúrgico	81
6.3	Natureza e prevalência de bactérias que persistem após o preparo químico-cirúrgico: uma revisão sistemática e meta-análise	83
	REFERÊNCIAS	91
	ANEXO	113

1 INTRODUÇÃO

A periodontite apical é uma doença inflamatória dos tecidos perirradiculares causada por microrganismos presentes no interior dos canais radiculares (1). O tratamento endodôntico visa promover a máxima redução microbiana para que a homeostasia dos tecidos periapicais possa ser restabelecida (2–4). Entretanto, o tratamento endodôntico não é capaz de esterilizar o canal radicular. Isso ocorre porque os microrganismos se organizam em biofilme e infectam toda a complexidade anatômica do sistema de canais radiculares, tornando-se inacessíveis e/ou resistentes tanto aos instrumentos quanto aos irrigantes utilizados para a desinfecção dos canais radiculares (4).

Os microrganismos remanescentes após os procedimentos de desinfecção podem apresentar estratégias de sobrevivência nos canais radiculares. Por exemplo, eles podem resistir a escassez de nutrientes, assumindo um estágio de baixa atividade metabólica, e podem se tornar metabolicamente ativos novamente se as fontes de nutrientes forem restabelecidas. Esses microrganismos persistentes podem levar ao insucesso do tratamento endodôntico se houver um desequilíbrio entre a concentração de microrganismos e a defesa do hospedeiro, ou seja, se esses microrganismos tiverem acesso aos tecidos periapicais e alcançarem níveis suficientes para induzir o processo inflamatório (3).

As infecções endodônticas foram estudadas inicialmente pelo método de cultura, que revelou uma infecção polimicrobiana (10 a 20 espécies), composta predominantemente de bactérias anaeróbias estritas, com níveis de virulência diferentes entre as espécies e podendo variar de paciente para paciente (3). Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, que envolvem a detecção de macromoléculas como DNA ou RNA bacteriano, vem sendo possível aumentar o conhecimento da diversidade da comunidade bacteriana presente nas infecções endodônticas (5). Os métodos moleculares apresentam vantagens sobre os métodos dependentes de cultura, incluindo maior sensibilidade e detecção de microrganismos ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo. Considerando que a microbiota endodôntica é composta por um grande número de bactérias ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo, os métodos moleculares se tornam os métodos de escolha para o estudo da microbiota endodôntica (3,6,7). O estudo da composição da comunidade bacteriana é facilitado com

emprego de métodos moleculares de ampla abordagem, como o sequenciamento genético (8,9). Além disso, métodos quantitativos, como a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR, acrônimo de *Quantitative Polymerase Chain Reaction*), podem permitir a análise dos níveis de cada espécie/grupo na comunidade. A análise quantitativa das bactérias se torna importante principalmente para a avaliação da eficácia dos protocolos de desinfecção na redução de bactérias dos canais radiculares (5,10,11).

As técnicas de sequenciamento genético têm contribuído para uma melhor compreensão da diversidade da comunidade bacteriana nas infecções endodônticas. Essas técnicas evoluíram do método de Sanger para as novas técnicas de sequenciamento de alta performance, denominadas NGS (acrônimo de *Next Generation Sequence*) (12). Li et al.(13) revelaram uma drástica diferença entre esses dois métodos quando usados na análise de amostras endodônticas. Enquanto a análise de NGS resultou em 28.590 sequências por amostra, o método de Sanger resultou em apenas 47 sequências. Deste modo, o sequenciamento de alta performance pode revelar a complexidade das infecções endodônticas de uma forma mais fidedigna quando comparado ao método de Sanger (14).

Até o presente momento, a maioria dos estudos utilizou a molécula de DNA, mais especificamente o gene 16S rRNA (DNA), para análise da diversidade das infecções endodônticas por NGS (7,13,15–21). Por essa análise, os filos mais abundantes nos canais radiculares de dentes com periodontite apical assintomática foram Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria (15,17). Os gêneros *Prevotella*, *Propionibacterium* e *Pyramidobacter* foram encontrados em abundância em infecções endodônticas primárias (13). Espécies *Granulicatella adiacens*, *Eubacterium yurii*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella salivae*, *Streptococcus mitis* e *Atopobium rimae* foram associadas às infecções endodônticas primárias (18). Embora, os estudos utilizando NGS e DNA tenham contribuído para o conhecimento da complexidade das infecções endodônticas, estes apresentam uma limitação, que é a não distinção entre as células vivas e mortas na comunidade bacteriana (5,22,23).

Uma alternativa para o estudo das células ativas em uma comunidade é a utilização de métodos moleculares baseados no RNA ribossômico (rRNA), por ser este um indicador de viabilidade celular. Os ensaios moleculares utilizando o rRNA são muito sensíveis porque o rRNA se encontra em número elevado nas bactérias metabolicamente ativas. Portanto, considerando que a abundância de rRNA é maior do que a abundância dos seus respectivos genes em células ativas, a razão rRNA/DNA pode fornecer dados sobre a atividade metabólica de diferentes bactérias em uma mesma comunidade (11,24–26). Até o presente

momento, estudos moleculares investigando a atividade metabólica de patógenos endodônticos são escassos na literatura endodôntica (26–29).

Portanto, o objetivo primário do presente estudo foi investigar bactérias ativas em infecções endodônticas através de métodos moleculares baseados em rRNA e DNA. Na primeira parte do estudo, a razão rRNA/DNA dos dados de NGS foi empregada pela primeira vez para investigar bactérias potencialmente ativas nas infecções endodônticas primárias. Na segunda parte do estudo, a razão rRNA/DNA dos dados de qPCR foi utilizada para investigar a atividade metabólica de bactérias específicas, antes e após o preparo químico-cirúrgico (PQC) dos canais radiculares. Adicionalmente, foi realizada uma revisão sistemática e meta-análise para investigar a natureza e prevalência de bactérias em amostras pós-preparo de canais radiculares, especialmente de bactérias ainda não cultivadas/difíceis de cultivar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A abordagem integrada de métodos moleculares baseados em rRNA e DNA permite o estudo da atividade metabólica da microbiota endodôntica. Essa estratégia foi utilizada no presente trabalho para a avaliação da microbiota ativa nas infecções endodônticas primárias (tópico revisado no subitem 2.1) e para a avaliação do efeito do preparo químico-cirúrgico na atividade metabólica de bactérias persistentes (tópico revisado no subitem 2.2). Adicionalmente, o perfil de bactérias persistentes obtidos em estudos moleculares foi revisado no subitem 2.3.

2.1 NGS baseado em rRNA e DNA para análise da comunidade bacteriana ativa nas infecções endodônticas primárias

A periodontite apical é uma resposta inflamatória consequente de microrganismos no interior dos canais radiculares (1). Embora os fatores químicos e físicos possam induzir uma inflamação perirradicular, a maioria das evidências aponta que microrganismos são essenciais para a progressão e a persistência das diferentes formas de periodontite apical (1,30–32). A periodontite apical primária é causada por microrganismos que invadem e colonizam os canais radiculares após a necrose pulpar. A doença endodôntica não é causada por um patógeno específico, mas sim por uma comunidade bacteriana, com alta diversidade de espécies, onde as interações bacterianas desempenham um papel fundamental para a patogenicidade da comunidade (15).

A tecnologia do Sequenciamento de Nova Geração (NGS) tem aumentado o conhecimento do perfil da comunidade endodôntica (8,9). As técnicas de sequenciamento de alto rendimento fornecem uma grande quantidade de leituras, que permitem a identificação tanto de espécies abundantes quanto de espécies presentes em baixas proporções. Portanto, a análise de NGS tem revelado uma maior diversidade bacteriana no canal quando comparada a outros métodos moleculares (8,9).

Até o presente momento, estudos da microbiota endodôntica baseados em NGS têm focado na análise do gene 16S rRNA (7,13,15–20,33–40). Estudos utilizando NGS revelaram que 916 espécies/ filotipos distintos, pertencendo a 317 gêneros e 14 filos, foram identificadas em diferentes tipos de infecções endodônticas (8). Os 5 filos mais prevalentes nas amostras endodônticas foram: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Fusobacteria*. Mais especificamente, alguns gêneros foram altamente associados às infecções endodônticas, incluindo *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Parvimonas*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Porphyromonas* (8).

Embora estudos anteriores revelem a complexidade da infecção endodôntica, não são capazes de apresentar os membros ativos da comunidade porque tanto o DNA de células vivas quanto o de células mortas podem ter sido sequenciadas (23). Como uma alternativa, a análise NGS baseada em RNA ribossômico (rRNA) tem sido utilizada para apresentar uma visão mais compreensiva das bactérias que estão ativas e que podem contribuir para a patogênese de uma doença (41). Além disso, como as bactérias ativas apresentam uma maior abundância de rRNA do que DNA (42), a razão rRNA/DNA dos dados de NGS tem sido utilizada pra revelar a atividade bacteriana em diversos ecossistemas (24,43–46). No entanto, a comunidade bacteriana ativa das infecções endodônticas não foi desvendada até o momento.

2.2 Ensaios de qPCR baseados em rRNA e DNA para análise de bactérias ativas após o preparo químico-cirúrgico

O preparo químico-cirúrgico representa a principal estratégia para a desinfecção dos canais radiculares. No entanto, apesar da redução substancial de bactérias, muitos canais permanecem infectados após esse procedimento (3,47,48). Os níveis bacterianos e as espécies que resistem ao preparo químico-cirúrgico foram amplamente explorados por técnicas de cultura e técnicas moleculares (3). Estes últimos são considerados os métodos de escolha para avaliar bactérias endodônticas persistentes devido à sua alta sensibilidade e à capacidade de detectar bactérias ainda não cultivadas/difíceis de cultivar (6,7,47,49–53)

Até o momento, a maioria dos estudos moleculares tem focado no gene 16S rRNA (DNA). Especificamente, estudos utilizando métodos moleculares quantitativos (qPCR-reação de polimerase em cadeia quantitativa) baseados em DNA tem proporcionado informações importantes a respeito da redução bacteriana promovida pelo tratamento

endodôntico (6,10,11,54,55). Esses estudos mostraram que o preparo químico-cirúrgico promoveu uma redução de aproximadamente 98%-99% do total de bactérias dos canais radiculares, com bactérias persistentes na ordem de grandeza de 10^4 (6,10,48,52,53,56-58). Esses estudos também mostraram que independente do sistema de instrumentação mecanizada e da solução irrigadora utilizada, mais de 50% dos canais radiculares estudados ainda permaneceram infectados após o preparo químico-cirúrgico.

Embora os métodos moleculares baseados em DNA tenham contribuído para o conhecimento da microbiota persistente, um questionamento se mantém quanto aos níveis de DNA residual detectados nos canais radiculares após o preparo químico-cirúrgico, se esses são de bactérias viáveis ou não viáveis (23). Uma estratégia para a detecção das bactérias ativas é o uso combinado de qPCR baseados em rRNA e DNA. Como as células ativas apresentam uma abundância maior de rRNA do que DNA (42), a correlação entre os dados obtidos com qPCR baseada em rRNA e DNA é considerada uma estratégia útil para análise da atividade bacteriana (11,25,26,59).

A abordagem integrada de qPCR baseada em rRNA e DNA mostrou atividade de bactérias totais em canais radiculares após o preparo químico-cirúrgico (60) e após o uso de medicação de hidróxido de cálcio (23). Além disso, a razão rRNA/DNA demonstrou atividade metabólica de espécies-específicas após o preparo químico-cirúrgico, incluindo *Enterococcus faecalis* (26,29), *Cutibacterium acnes* (28) e *Bacteroidaceae* [G-1] *bacterium* HMT 272 (anteriormente *Bacteroidaceae* sp. HOT-272) (27). Esses estudos indicam que algumas espécies bacterianas podem permanecer ativas após o preparo químico-cirúrgico. Essas bactérias podem ser uma possível fonte para o estabelecimento de infecções persistentes. No entanto, a implicação de bactérias persistentes detectadas por métodos moleculares no resultado do tratamento ainda não foi determinada por estudos longitudinais.

Na comparação dos ensaios de qPCR, a reação baseada em DNA apresentou baixa sensibilidade e alta especificidade quando comparada à qPCR baseada em rRNA (60). Um outro estudo comparou o método de PCR baseado em DNA e rRNA para detecção de *Streptococcus* spp. e *Cutibacterium acnes* após procedimentos endodônticos de desinfecção em canais radiculares com infecções primárias (61). Os resultados mostraram que *Streptococcus* spp. foram detectados por DNA, mas não por rRNA nas amostras após tratamento; indicando que o DNA detectado era provavelmente de bactéria morta após os procedimentos antimicrobianos. Por outro lado, *Cutibacterium acnes* foi detectado por ambos os métodos, indicando sua viabilidade mesmo após o preparo dos canais radiculares e

medicação intracanal. Os resultados desse estudo sugerem que o método molecular baseado em DNA pode fornecer dados diferentes dos obtidos pela análise baseada na molécula de rRNA, sendo esta a molécula mais indicada para o estudo da microbiota ativa nas infecções endodônticas persistentes.

Até o presente momento, os estudos moleculares baseados em rRNA investigaram apenas algumas espécies-alvo da microbiota persistente, fornecendo dados limitados sobre a comunidade bacteriana metabolicamente ativa nas infecções endodônticas persistentes e indicando a necessidade de novos estudos (26–29,61).

2.3 Natureza e prevalência de bactérias que persistem após o preparo químico-cirúrgico

As bactérias estão organizadas na forma de biofilme no interior dos canais radiculares, que são comunidades microbianas complexas, compostas por uma grande variedade de bactérias com diversos potenciais patogênicos. O biofilme oferece proteção eficaz às bactérias, não apenas contra o sistema de defesa do hospedeiro, mas também as torna mais resistentes a uma variedade de agentes químicos, o que torna a desinfecção do sistema de canais radiculares extremamente desafiador (62). Além da organização em biofilme outro fator que favorece a persistência de bactérias no canal radicular após as etapas do tratamento endodôntico é a questão da anatomia. Esses microrganismos estão alojados em um complexo sistema de canais radiculares, como ramificações, istmos e o próprio interior de túbulos dentinários, que podem não ser atingidos nem pelos instrumentos, nem pelas substâncias auxiliares ou mesmo a medicação intracanal (2,63,64). Deste modo, o tratamento endodôntico não é capaz de esterilizar o canal radicular, deixando uma infecção residual pós procedimentos com uma implicação clínica que dependerá, entre outros fatores, do equilíbrio entre a defesa microbiana e do hospedeiro (4,34).

Por muito tempo, a cultura de microrganismos foi o teste diagnóstico padrão para doenças infecciosas. Essa metodologia foi extensamente usada para estudar doenças em diferentes locais no corpo humano. Em uma revisão prévia, que incluía principalmente estudos baseados em método de cultura, observou-se que a infecção endodôntica persistente era usualmente composta de *Streptococci*, *Parvimonas*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Pseudoramibacter*, *Lactobacilli*, *Enterococci* e *Olsenella*. Esse estudo ressaltou a resistência

de bactérias Gram-positivas ao preparo químico-cirúrgico e a sua habilidade de adaptar-se às mudanças ambientais impostas pelos procedimentos endodônticos (3). Entretanto, é possível que esses resultados pelo método da cultura tenham sido subestimados, pois para que os microrganismos cresçam em laboratório pressupõe-se que haja algum conhecimento sobre o que eles precisam pra crescer. Atualmente, sabe-se muito pouco sobre os fatores de crescimento específicos que são utilizados por diversos microrganismos para a sua sobrevivência (65). Trabalhos prévios relataram que dentes com culturas negativas antes do momento da obturação tinham um alto índice de sucesso da terapia endodôntica quando comparados aos casos com culturas positivas; mostrando, assim, a íntima relação entre a redução da carga bacteriana e o reestabelecimento da homeostase dos tecidos perirradiculares (66). Entretanto, a baixa sensibilidade dos métodos dependentes de cultura e a possibilidade de resultados falso-negativos de amostras após o preparo químico-cirúrgico podem ter prejudicado a análise precisa da diversidade de infecções persistentes (5,67–69).

Métodos moleculares confirmaram a associação de muitas espécies bacterianas cultiváveis com a periodontite apical e também revelaram novos patógenos endodônticos(5). A lista de patógenos aumentou, incluindo espécies de difícil cultura ou mesmo bactérias ainda não cultivadas, que nunca haviam sido encontradas em infecções endodônticas por abordagens de cultura. Dessa forma, melhorou-se o entendimento da comunidade bacteriana persistente devido à alta sensibilidade desses métodos e a sua habilidade de detectar bactérias não cultiváveis e de difícil cultivo (5). Muitas espécies foram reconhecidas como possível patógenos endodônticos após o advento dos métodos moleculares.

Uma análise prévia da comunidade bacteriana após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares usando o sequenciamento de Sanger mostrou que 42% a 50% dos táxons era de bactérias não cultiváveis/difícil cultivo (7,38). As espécies/ taxa mais prevalentes foram: *Streptococcus* spp., *Propionibacterium acnes*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella shahii*, *Neisseria* sp. oral clone BP2-72, *Rothia* oral clone BP1-65/71, *Veillonella parvula* e *Lautropia* sp. clone 2.15. Entre estas, espécies de *Streptococcus* foram detectadas em todas as amostras após os procedimentos de desinfecção, sendo as espécies dominantes dentro da comunidade persistente (6).

Estudos recentes usando NGS com amostras após o preparo químico-cirúrgico tem mostrado um espectro ainda mais amplo de taxa bacteriana (7,21). Na análise da microbiota por NGS, as espécies bacterianas mais detectadas após o preparo químico-cirúrgico foram: *Enterococcus faecalis*; *Streptococcus salivarius*; *Streptococcus gordonii*; *Parvimonas micra* e

Filifactor alocis. Muitos microrganismos não cultiváveis e de difícil cultivo foram detectados, entre eles: *Atopobium* sp. HMT 199; *Bacteroidaceae* [G-1] bacterium HMT 272; *Desulfobulbus* sp. HMT 041; *Erysipelotrichaceae* [G-1] bacterium HMT 905; *Fretibacterium* sp. HMT 360; *Parvimonas* sp. HMT 110; *Peptostreptococcaceae* [XI][G-1] bacterium HMT 383; *Peptostreptococcaceae* [XI][G-2] bacterium HMT 091; *Peptostreptococcaceae* [XI][G-4] bacterium HMT 369; *Peptostreptococcaceae* bacterium oral taxon 113 str. W5053; *Treponema* sp. HMT 256; *Treponema* sp. HMT 257; *Treponema* sp. HMT 258; *Veillonellaceae* [G-1] bacterium HMT 132 e *Veillonellaceae* [G-1] bacterium HMT 150.

Estudos investigando espécies específicas por métodos moleculares confirmaram a prevalência de espécies Gram-positivas em infecções endodônticas persistentes, especialmente *Streptococcus* spp., *Propionibacterium acnes*, *Parvimonas micra*, *Pseudoramibacter alactolyticus* e espécies do filo Actinobacteria (47,51,52,70). Estudo baseado em qPCR revelou que o DNA de bactérias ainda não-cultiváveis pode ser detectado em amostras após o preparo químico-cirúrgico, incluindo *Bacteroidaceae* sp. HOT-272 e *Fretibacterium fastidiosum* (*Synergistetes* oral clones W090/W028) (53).

Os resultados dos estudos moleculares revelaram que a complexidade da comunidade bacteriana persistente após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares é maior do que aquela inicialmente conhecida pelos métodos de cultura. Com o aumento do número de estudos moleculares na área de Endodontia nas duas últimas décadas, verificou-se a necessidade de investigar a natureza e prevalência de bactérias em amostras pós-preparo de canais radiculares, especialmente de bactérias ainda não cultivadas/difíceis de cultivar, por meio de uma revisão sistemática e meta-análise.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivos Gerais

- Apresentar uma abordagem integrada de NGS baseada em rRNA e DNA para a investigação de bactérias ativas em infecções endodônticas.
- Avaliar a atividade metabólica de bactérias específicas após o preparo químico-cirúrgico usando ensaios de qPCR baseados em rRNA e DNA.
- Revisar o perfil e a prevalência de bactérias em amostras pós-instrumentação de canais radiculares revelados por métodos moleculares independentes de cultura.

3.2 Objetivos Específicos

- Comparar o perfil da comunidade bacteriana nas análises baseadas em rRNA e DNA.
- Avaliar o número e a viabilidade de *Bacteroidaceae* [G-1] *bacterium* HMT 272 e *Selenomonas* spp. após o preparo químico-cirúrgico.
- Comparar a capacidade dos ensaios de qPCR baseados em rRNA e DNA em detectar *Bacteroidaceae* [G-1] *bacterium* HMT 272 e *Selenomonas* spp. nas amostras endodônticas.
- Investigar a prevalência de táxons ainda não cultivados/difíceis de cultivar em canais radiculares após o preparo químico-cirúrgico por meio de meta-análise.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo analisou a microbiota das infecções endodônticas por três metodologias distintas: **(1)** sequenciamento de próxima geração (NGS, acrônimo de *Next Generation Sequence*) baseado em rRNA e DNA; **(2)** reação de polimerase em cadeia quantitativa (qPCR, acrônimo de *Quantitative Polymerase Chain Reaction*) baseados em rRNA e DNA; **(3)** revisão sistemática e meta-análise. As amostras microbiológicas dos canais radiculares utilizadas nas análises de NGS e qPCR foram coletadas em ensaios clínicos anteriores (27,71–74). Esse estudo teve sua aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa nº 2.201.768 da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (ANEXO A).

4.1 NGS baseado em rRNA e DNA para análise da comunidade bacteriana ativa nas infecções endodônticas primárias

4.1.1 Amostras microbiológicas dos canais radiculares

Amostras dos canais radiculares de 5 pacientes coletadas em ensaio clínico anterior (11) foram usadas nessa etapa do estudo. A extração dos ácidos nucleicos e a síntese de DNA complementar (cDNA) foram realizadas dentro de 15 dias a partir das coletas dos canais radiculares. As alíquotas de DNA e cDNA foram armazenadas em -20°C até o momento de realizar a análise do sequenciamento de nova geração (NGS). Antes da análise do microbioma, DNA e cDNA foram usados para a análise quantitativa de qPCR usando iniciadores universais para o domínio Bacteria, mostrando resultados positivos na análise quantitativa.

Os critérios de inclusão foram dentes unirradiculares e periodontite apical assintomática. Os critérios de exclusão foram: pacientes que utilizaram antibióticos nos últimos 3 meses ou que tinha qualquer comprometimento sistêmico; dentes com perda de tecido dentário que impossibilite o isolamento absoluto; dentes com câmara pulpar aberta/ exposta ao meio bucal;

dentes com bolsa periodontal superior a 4 mm; dentes com evidência radiográfica de tratamento endodôntico prévio, ápice aberto, fratura, reabsorção ou calcificação. Além disso, dentes com uma curvatura maior que 20°(75) e raízes mais curtas que 15 mm ou maiores que 25 mm foram excluídos. Três pacientes do sexo feminino e dois do sexo masculino, com idade entre 35 e 50 anos foram incluídos nesse estudo. As amostras endodônticas foram coletadas dos dentes 31, 41, 15, 13 e 41, com radiolucência periapical de diâmetros variados: >5mm (3 casos) e <5mm (2 casos).

As coletas microbiológicas foram realizadas de acordo com estudos prévios (10,11,72–74) e estão descritos detalhadamente no APÊNDICE A. Resumidamente, após o dente estar isolado e desinfetado (30% H₂O₂ seguido de 2,5% NaOCl e 5% de tiosulfato de sódio), a cirurgia de acesso foi iniciada com brocas diamantadas e irrigação com soro fisiológico estéril. Após o acesso da câmara pulpar, a desinfecção da cavidade de acesso foi repetida e uma amostra foi coletada para o controle de desinfecção. Após o acesso, o canal foi preenchido com solução salina estéril e o comprimento real de trabalho (CRT) foi determinado em 0,5 mm aquém do limite zero observado no localizador apical eletrônico (J Morita Brasil, São Paulo, SP, Brazil). A seguir, uma lima Hedtröem #15 foi introduzida no canal radicular e utilizada em movimento de limagem para criar raspas de dentina e suspender bactérias na solução. Cinco cones de papel número 15 esterilizados foram introduzidos individualmente no canal radicular para coletar o conteúdo inicial de bactérias (S1), sendo mantidos em posição por 1 minuto cada. A parte ativa da lima utilizada e os demais cones foram depositados em microtubos de 1,5 mL esterilizados contendo 300 µl de solução RNA later (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estado Unidos da América), os quais foram armazenadas a -80°C. A ausência de bactérias no campo operatório foi verificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) e transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR) usando primers universais para domínio Bacteria. Se bactérias fossem detectadas no controle de desinfecção, o dente era excluído do estudo.

4.1.2 Extração de ácidos nucleicos e síntese de cDNA

As amostras endodônticas foram descongeladas e homogeneizadas por agitação durante 1 minuto. A extração de DNA e RNA foi realizada com o kit “MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit” (Epicentre Technologies, Madison, WI, EUA) como descrito

previamente (11,27,61,72,73). Esse processo está descrito detalhadamente no APÊNDICE B. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram suspensos em solução contendo 300 µL de “Tissue and Cell Lysis Solution” e 2 µL de Proteinase K, e incubados por 15 minutos a 65 °C. As amostras foram resfriadas em gelo por 5 minutos e foram adicionados 150 µL da solução “MPC Protein Precipitation Reagent” para a precipitação proteica. Após nova centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e submetidos à precipitação com isopropanol. Os ácidos nucleicos totais foram suspensos em 35 µL do tampão TE, que foram divididos em duas partes iguais. A primeira alíquota foi para análise de DNA; enquanto a segunda alíquota sofreu um processo de purificação de RNA de acordo com as recomendações do fabricante (Epicentre Technologies, Madison, WI, EUA). Após esses processos, foram realizados novo tratamento com DNase I (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e uma reação de PCR para confirmar a ausência de DNA nas amostras de RNA. Para isso, foram utilizados iniciadores universais para região do gene 16S rRNA. A quantificação dos ácidos nucleicos em cada amostra foi realizada no aparelho do NanoDrop e analisada pelo software ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). As alíquotas de DNA foram armazenadas em freezer -20 °C até o momento do uso. Para as amostras de RNA, foi realizada a Reação de Transcriptase Reversa (RT) para sintetizar o cDNA (DNA complementar), utilizando o kit 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. A qualidade das amostras foi avaliada usando o fluorômetro Qubit 2.0 (Life Technologies).

4.1.3 Sequenciamento e análise dos dados

As amostras pareadas de cDNA e DNA de 5 canais radiculares foram submetidas a PCR com iniciadores codificados (“barcoded primers”) (Bakt_341F CC TAC GGG NGG CWG CAG and Bakt_805R GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC), os quais amplificam região hipervariável V4-V5 do gene 16S rRNA (76). O sequenciamento de alto rendimento foi realizado usando MiSeq (Illumina, San Diego, CA) em estabelecimento comercial (Macrogen, Seoul, Republic of Korea) de acordo com os protocolos do fabricante.

As sequências foram filtradas usando a ferramenta USEARCH (<http://www.drive5.com/usearch/>). As sequências de baixa qualidade (score, 30) e as leituras menores que 440 pares de bases (pb) foram excluídas. Sequências não bacterianas, quimeras e leituras únicas também foram excluídas. As sequências foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) com 97% de similaridade usando “Quantitative Insights Into Microbial Ecology” (QIIME) 1.8.0 pipeline (<http://qiime.org/1.8.0/>) (77). A fim de evitar um possível viés na comparação entre cDNA e DNA, ambas bibliotecas foram ajustadas para obter o mesmo número de leituras (26,41). A análise taxonômica foi realizada usando Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) contra o Human Oral Microbiome Database Version 15.1 (<http://www.homd.org>).

A análise estatística foi realizada usando o QIIME 1.8.0 pipeline (<http://qiime.org/1.8.0/>) (77). A abundância relativa de bactérias foi medida e as diferenças entre os dados de sequenciamento de rRNA e DNA foram avaliadas usando o teste de Mann Whitney. A alfa diversidade foi determinada usando os índices Chao1 (estima riqueza), Shannon (estima diversidade), e Simpson (estima uniformidade). O teste não paramétrico para 2 amostras usando o método de Monte Carlo foi aplicado para comparar a alfa diversidade das amostras de DNA e cDNA. Essas comparações foram realizadas usando o QIIME (“compare_alpha_diversity.py”) (77). A diferença estatística foi considerada significativa com $P < 0,05$.

Para cada táxon bacteriano detectado nos dois ensaios, a razão RNA/DNA foi calculada dividindo a abundância média de nas respectivas análises. A bactéria foi considerada ativa quando a razão rRNA/ DNA foi maior ou igual a 1 (24).

4.2 Ensaios de qPCR baseados em rRNA e DNA para análise de bactérias ativas após o preparo químico-cirúrgico

4.2.1 Amostras microbiológicas dos canais radiculares

Os critérios de seleção dos pacientes e os procedimentos para as coletas das amostras microbiológicas dos canais radiculares estão descritos no **item 4.1.1**. Para a análise da atividade bacteriana por qPCR, foram utilizadas amostras microbiológicas de infecções

endodônticas primárias realizadas após a cirurgia de acesso (S1) e após o preparo químico-cirúrgico (S2). A atividade metabólica de *Bacteroidaceae* [G-1] *bacterium* HMT 272 e *Selenomonas* spp. foi determinada pelos dados de qPCR baseados em rRNA e DNA. Para cada bactéria alvo, foram realizados ensaios de qPCR em 20 amostras pareadas S1 e S2.

4.2.2. Coletas microbiológicas dos canais radiculares antes e após o preparo químico-cirúrgico

A cirurgia de acesso, a odontometria e a coleta inicial (S1) dos canais radiculares estão descritos no **item 4.1.1**. Após S1, a câmara pulpar foi preenchida com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5%, que foi agitada e carregada progressivamente no sentido coroa-ápice com o auxílio de instrumentos tipo K até atingir o CRT. Após o esvaziamento inicial do canal, instrumentos manuais do tipo K foram levados sem pressão até comprimento real de trabalho, em ordem crescente de diâmetro, do instrumento número 10 ao número 40 (DentsplyMaillefer, Baillagues, Suíça). O primeiro instrumento que demonstrasse travamento no CRT foi utilizado como base para a escolha do instrumento Reciproc (VDW GmbH, Munique, Alemanha) a ser utilizado no preparo químico-cirúrgico, conforme recomendações do fabricante. Dentes com canais estreitos (compatíveis com instrumentos 10 ou 15) foram excluídos da pesquisa, pela dificuldade da realização da coleta inicial.

Os instrumentos reciprocantes foram acionados por motor VDW-silver (VDW GmbH, Munique, Alemanha) ajustado à cinemática preconizada para cada instrumento, sempre na presença de NaOCl 2,5%. O instrumento Reciproc foi levado ao interior do conduto em movimento reciprocante, 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 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 30 mL durante a instrumentação e mais 10 mL ao final do preparo, com as pontas irrigadoras posicionadas a aproximadamente 2 mm aquém do comprimento real de trabalho, utilizadas em movimentos de vai e vem com pequena amplitude. A irrigação durante o preparo químico-cirúrgico foi realizada com seringas plásticas esterilizadas e apirogênicas de 10 mL e pontas

endodônticas de irrigação Endo-EZE (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) com diâmetro de 30G e saída lateral meia canal, ao passo que a aspiração da substância irrigadora foi realizada através de cânulas de aspiração SurgiTip (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) acopladas à bomba a vácuo odontológica. Ao final, o canal foi aspirado com pontas endodônticas Capillary Tips 0,014' e 0,019'' (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) e novamente irrigada com 5ml de tiosulfato de sódio 5% por 1 minuto. O canal foi novamente aspirado, seco com cones de papel absorvente, e preenchido com soro fisiológico apirogênico. Assim, realizando uma nova coleta microbiológica (S2), como descrito anteriormente.

Todas as amostras foram armazenadas em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise microbiológica.

4.2.3. Análise quantitativa e da atividade metabólica de bactérias específicas por meio de ensaios de qPCR baseados em DNA e rRNA

As amostras dos canais radiculares foram submetidas à extração de DNA e RNA, seguida da síntese de cDNA, como descrito no **item 4.1.2**.

Ensaio de qPCR independentes foram realizados para *Bacteroidaceae* [G-1] bacterium HMT 272 e *Selenomonas* spp. A seleção dessas bactérias foi baseada em estudos moleculares prévios (47,50,51,53), que relataram essas espécies entre as mais prevalentes nos canais radiculares após procedimentos endodônticos.

Ensaio de qPCR foram realizados utilizando 2 μL de amostras de cDNA e 2 μL de amostras de DNA como moldes. Foram utilizadas placas de 96 poços com um volume total de 20 μL : 10 μL Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems Foster City, CA) e 100 nM/L de cada primer. Água deionizada substituiu o DNA no controle negativo. Foram utilizados iniciadores específicos para *Bacteroidaceae* [G-1] bacterium HMT 272 (F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; R: ACT TGA GTG GAG GGT AGG) (53) e *Selenomonas* spp. (F: TGGCATCATCCCCGGATA, R: GCCCATCGACAGGCGATA). As condições de ciclagem para reações de qPCR foram: 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 1 minuto e 55°C por 1 minuto. As reações de qPCR foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, utilizando o StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Para padronização da curva padrão, foram realizadas reações de PCR específicas para para *Bacteroidaceae* [G-1] *bacterium* HMT 272 e *Selenomonas* spp. O produto de PCR foi visualizado e purificado do gel de agarose utilizando o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) e submetido ao sequenciamento do gene 16S rRNA para confirmar a identificação dessas espécies bacterianas. Em seguida, foi realizada a clonagem desses amplicons em células de *Escherichia coli* DH5 α utilizando-se o kit comercial TOPO TA Cloning® – Version U (Invitrogen, Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os plasmídeos foram extraídos usando o kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen, Carlsbad) e sequenciados. Após a clonagem, foi realizada a extração do vetor, que foi utilizado para confecção de diluições seriadas de 10^8 a 10^1 para a realização da curva padrão nas reações de qPCR espécie-específica (38). Para todos os ensaios qPCR, o limite de quantificação foi de 10^2 cópias de DNA ou cDNA; amostras abaixo do limite de quantificação da qPCR foram consideradas negativas.

Os dados de DNA foram usados para quantificação bacteriana, enquanto os dados de rRNA foram usados para estimar a atividade bacteriana em amostras positivas para DNA. As razões entre os níveis de rRNA e DNA foram calculadas para procurar bactérias ativas ($rRNA/DNA \geq 1$) em amostras de canal radicular antes e após o preparo químico-cirúrgico.

4.2.4. Análise estatística

Os dados foram analisados por testes estatísticos e o nível de significância de todos os testes foi 5%. A análise entre as amostras S1 e S2 foi realizada utilizando o teste de Wilcoxon para amostras relacionadas. A comparação entre as reações de qPCR baseada em DNA e rRNA foi realizada utilizando o teste de Wilcoxon para análise quantitativa e teste de McNemar para comparação da taxa de detecção dos métodos. Os testes de sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo (VPP) dos métodos também foram calculados (39). As bactérias foram consideradas metabolicamente ativas se a razão rRNA/DNA for maior ou igual 1, conforme descrito por (24). O teste de Wilcoxon foi utilizado para avaliar as diferenças nas razões rRNA/DNA das bactérias entre as amostras S1 e S2.

4.3. Revisão sistemática e meta-análise.

A revisão sistemática da literatura é um estudo secundário, que consiste em encontrar estudos semelhantes, publicados ou não, avaliando-os criticamente em sua metodologia e reunindo-os numa análise estatística, a meta-análise.

4.3.1 Fonte de informação

Esta revisão sistemática foi elaborada de acordo com o Manual do Revisor do Instituto Joanna Briggs (78) e registrado na base de dados Registro Prospectivo Internacional de Revisões Sistemáticas (PROSPERO) (2017: CRD42017071752, https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?RecordID=71752). A pesquisa foi realizada nas seguintes bases de dados: Embase, Web of Science, PubMed e Cochrane, no período de 2007 (última revisão sobre o tema) até janeiro de 2021. Para a busca da literatura cinza foram utilizadas as seguintes bases de dados: DANS (Data Archiving and Networked Services), OAIster e “New York Academy of Medicine Gray Literature Report”. As equações de busca estão representadas na **Tabela 4.1**

Tabela 4.1. Tabela da equação de busca separado por base de dados

	BASE DE DADOS	EQUAÇÃO DE BUSCA	NÚMERO DE ARTIGOS RESGATADOS
LITERATURA BRANCA	Cochrane	endodontics in All Text AND microbiology in All Text - with Cochrane Library publication date Between Jan 2007 and Jan 2021	161
	Embase	endodontics AND microbiology AND [2007-2021]/py	1183
	PubMed	((("endodontal"[All Fields] OR "endodontic"[All Fields] OR "endodontical"[All Fields] OR "endodontically"[All Fields] OR "endodontics"[MeSH Terms] OR "endodontics"[All Fields]) AND ("microbiology"[MeSH Subheading] OR "microbiology"[All Fields] OR "microbiology"[MeSH Terms] OR "microbiology s"[All Fields])) AND (2007/1/1:2021/1/31[pdat])	2117
	Web of Science	https://www.webofscience.com/wos/woscc/summary/37b8444f-503e-4a7e-9121-ec253841cgb251-17b81864/relevance/5 endodontic (Todos os campos) and microbiology (Todos os campos) Tempo estipulado: 2007-01-01 to 2021-01-31 (Data de publicação)	245
LITERATURA CINZA	DANS EASY Archive	Endodontic	15
	OAIster	'kw:endodontics kw:bacteria' > '2007..2021	59
	New York Academy of Medicine's Grey Literature Report	Endodontic	1

Fonte: A autora

4.3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Os artigos foram selecionados por título e resumo de acordo com os critérios de inclusão e exclusão utilizando o Software Rayyan (79). Os critérios de inclusão foram os seguintes: estudos a partir de 2007; estudos clínicos com amostras microbiológicas coletadas antes e após o preparo químico-cirúrgico e bactérias identificadas no nível de espécie utilizando métodos moleculares independentes de cultura. Os estudos foram excluídos baseados nos critérios: (1) tipo errado de publicação (estudo não-clínico, estudo não-microbiológico, estudo não-endodôntico, estudo incluindo dentes decíduos, estudo dependente de cultura, relato de caso, protocolo de ensaio clínico e relatórios de reuniões); (2) estudo sem coleta inicial ou apenas com coleta inicial; (3) estudos que não apresentavam bactérias identificadas no nível de espécie; e (4) resumos não encontrados.

4.3.3 Extração de dados

Uma avaliação do texto completo foi realizada em estudos que apresentavam os critérios de inclusão. Apenas os dados das análises independentes de cultura foram extraídas dos estudos que apresentavam dados de métodos dependentes e independentes de cultura (7,80,81) Além disso, apenas bactérias identificadas no nível de espécie foram utilizadas nos estudos que também apresentavam outras classificações taxonômicas (*e.g.*, gênero, família, ordem, classe e filo). Nos estudos que também incluíam amostras de outros sítios além do canal radicular, somente amostras do interior do canal radicular foram incluídas (7). Os dados dos estudos foram extraídos e tabulados em uma planilha em Microsoft Excel, incluindo os nomes dos autores, nome do estudo, ano, número total de casos, tipo de infecção (infecção primária e secundária), método de identificação das bactérias e prevalência de cada espécie bacteriana (número de casos positivos antes e após o preparo químico-cirúrgico).

4.3.4 Avaliação do risco de viés

Uma versão modificada dos critérios do “Joanna Briggs Institute Prevalence Critical Appraisal” foi usada para avaliação crítica dos estudos selecionados (82,83). Embora os critérios tenham sido desenvolvidos para análise do risco de viés de estudos observacionais, eles também têm sido usados para avaliar estudos clínicos dos quais apenas dados de prevalência são considerados. Três revisores avaliaram individualmente a qualidade dos estudos e preencheram o arquivo de avaliação crítica. Os resultados em conflito foram discutidos até a obtenção de um acordo. A qualidade da evidência dos estudos incluídos foi avaliada usando a ferramenta “Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation” (GRADE) (84).

4.3.5 Análise estatística

A análise descritiva das taxas bacterianas (classificada por nível de espécie) foi realizada, antes (S1) e após o preparo químico-cirúrgico (S2). A frequência (número de casos positivos) foi calculada para todas as espécies bacterianas/ filos. A meta-análise foi realizada sobre a prevalência de patógenos endodônticos reconhecidos após o advento de métodos moleculares (taxa ainda não cultivada/ difícil de cultivar detectada em mais de dois estudos) usando RStudio versão 3.5.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; usando os pacotes Meta e Metafor). O modelo de efeito randômico foi usado para analisar a heterogeneidade entre os estudos e a estatística do I-quadrado (I^2) foi usada para estimar a inconsistência (considerando até 50%). O gráfico de funil também foi aplicado para mostrar a heterogeneidade dos estudos.

5 RESULTADOS

Para melhor compreensão e visualização dos resultados obtidos, os dados foram organizados em tópicos.

5.1 NGS baseado em rRNA e DNA para análise da comunidade bacteriana ativa nas infecções endodônticas primárias

Todos os casos foram incluídos para a análise de sequenciamento de nova geração (NGS) porque todas as amostras de controle de esterilidade do campo operatório deram resultados negativos nas reações de PCR utilizando iniciadores universais para o domínio *Bacteria*. Um total de 3.054.987 (mediana = 323.222; valores mínimo e máximo = 157.801 – 407.210) sequências foram obtidas de 10 amostras de DNA e rRNA de 5 dentes com periodontite apical. Após a reamostragem, o número de sequências foi reduzido para 157.801 leituras por amostra (a menor biblioteca), e um total de 438 unidades taxonômicas distintas (OTUs) foram observadas. Não houve diferença estatística significativa entre os índices de riqueza e diversidade das duas bibliotecas (**Tabela 5.1**).

Tabela 5.1. Média dos valores e desvio padrão (DP) dos índices alfa diversidade de DNA e RNA ribossômico (rRNA) dos dados sequenciados de cinco amostras do canal radicular

	Riqueza Chao 1	Diversidade Shannon	Evennes Simpson
Média de DNA (± DP)	92,44 (± 33,87)	3,72 (± 0,83)	0,85 (± 0,10)
Média de rRNA (± DP)	111 (± 27,87)	3,30 (± 0,47)	0,82 (± 0,05)
P valor*	0,40	0,39	0,67

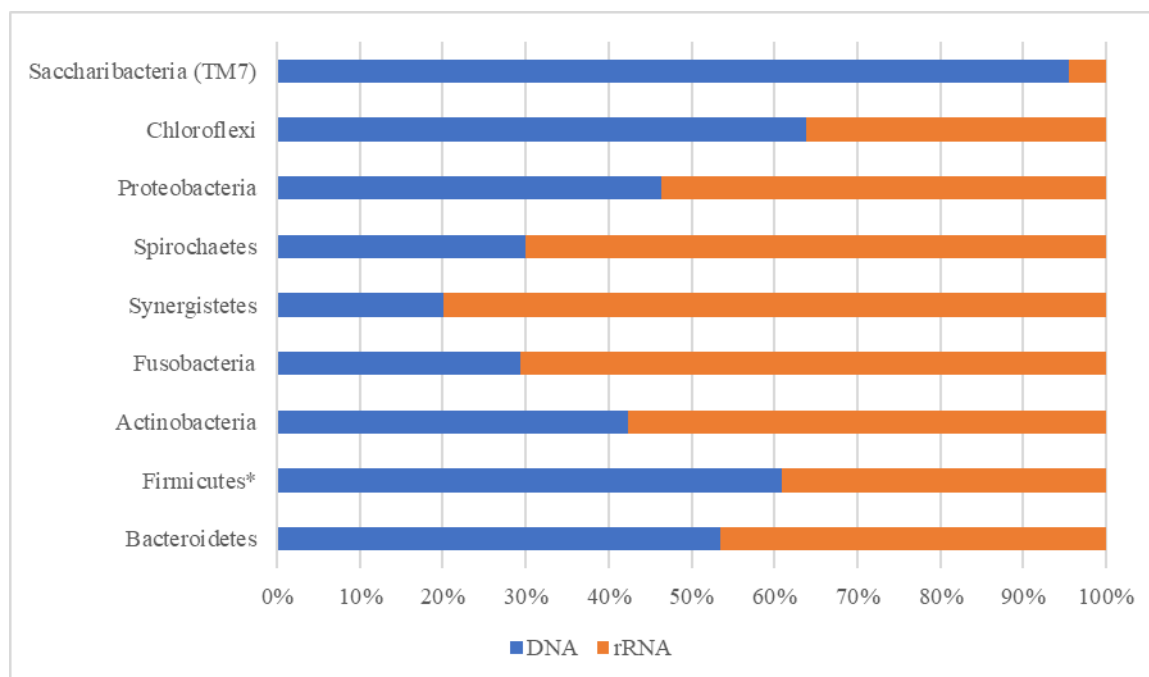
*Teste T não paramétrico de 2 amostras usando permutações de Monte Carlo foi aplicado para comparar a alfa diversidade das amostras de DNA e rRNA ($P < 0,05$ indica diferenças estatisticamente significativas).

Fonte: A autora

5.1.1 Discrepância em relação à abundância de filos em amostras de DNA e rRNA

O **gráfico 5.1.** mostra a distribuição total de filos (%) em todas as amostras de DNA e rRNA (n=10). Cinco filos estavam presentes em todas as amostras de DNA e rRNA: Bacteroidetes (DNA, 29,5%–72,6 %; rRNA, 25,3% –57,0%), Firmicutes (DNA, 16,9%–43,0 %; rRNA, 9,5%–32,5 %), Actinobacteria (DNA, 0,8% – 21,7 %; rRNA, 1,0%–38,7%), Fusobacteria (DNA, 0,3%–8,5%; rRNA, 1,8%–32,2%) e Proteobacteria (DNA, 0,02%–3,5%; rRNA, <0,01%–3,8%).

Gráfico 5.1 - Abundância relativa (%) dos filos bacterianos em todas as amostras de DNA e rRNA (n=5 cada) coletadas de canais radiculares de dentes com periodontite apical.



*Diferença estatística significativa entre DNA e rRNA na abundância relativa de Firmicutes (Teste Mann-Whitney, $P < 0,05$)

Fonte: A autora

Os filos mais abundantes em todas as amostras de DNA e rRNA foram Bacteroidetes (DNA, 48,1%; rRNA, 40,9%), Firmicutes (DNA, 35,2%; rRNA, 21,1%), Actinobacteria (DNA, 10,4%; rRNA, 15,4%) e Fusobacteria (DNA, 4,1%; rRNA, 13,8%). Outros filos foram menos abundantes: Proteobacteria (DNA, 0,8%; rRNA, 0,9%), Synergistetes (DNA, 0,7%; rRNA, 6,3%), Spirochaetes (DNA, 0,5%; rRNA, 1,5%), Chloroflexi (DNA, 0,2%; rRNA, 0,1%) e Saccharibacteria (TM7; DNA, <0,01%; rRNA, <0,01%) (**Gráfico 5.2**).

Comparando a abundância relativa (%) entre as amostras de rRNA e DNA, houve uma redução significativa na abundância relativa de Firmicutes ($P= 0,02$). Nos níveis de classe e ordem, Veillonellales (DNA, 6,0%; rRNA, 2,5%) e Erysipelotrichales (DNA, 4,4%; rRNA, 1%) foram encontrados com uma abundância menor ($P= 0,04$) no sequenciamento baseado em rRNA do que no de DNA.

5.1.2 Diferença na abundância relativa de gênero entre as amostras de DNA e rRNA

A **tabela 5.2** mostra a abundância relativa (%) no nível de gênero (>0,1%) em DNA e rRNA. Em geral, foram encontrados 123 gêneros diferentes; entretanto, apenas 65,9% (81/123) dos gêneros foram encontrados nas duas análises. Os gêneros mais abundantes identificados foram: *Prevotella* (DNA, 16,6%; rRNA, 10,8%), *Porphyromonas* (DNA, 15,5%; rRNA, 13,8%), *Bacteroidales* [G-2] (DNA, 7,7%; rRNA, 8,1%), *Olsenella* (DNA, 7,0 %; rRNA, 14,1 %), *Mycoplasma* (DNA, 4,8%; rRNA, 1,9%), *Pseudoramibacter* (DNA, 4,4%; rRNA, 8,3%) e *Fusobacterium* (DNA, 4,1%; rRNA, 13,8%).

Tabela 5.2 - Abundância relativa (%) dos gêneros bacterianos (>0,1%) nas análises de NGS baseados em DNA e rRNA em amostras dos canais radiculares

Gênero	DNA	rRNA
<i>Prevotella</i>	16,61%	10,76%
<i>Porphyromonas</i>	15,51%	13,77%
<i>Olsenella</i>	7,03%	14,09%
<i>Fusobacterium</i>	4,11%	13,83%
<i>Bacteroidaceae</i> [G-1]	3,46%	0,20%
<i>Fretibacterium</i>	0,60%	6,33%
<i>Bacteroidales</i> [G-2]	7,72%	8,08%
<i>Pseudoramibacter</i>	4,40%	8,29%
<i>Alloprevotella</i>	2,72%	3,83%
<i>Mycoplasma</i>	4,82%	1,86%
<i>Dialister</i>	3,55%	1,10%
<i>Tannerella</i>	1,25%	3,12%
<i>Megasphaera</i>	0,97%	0,70%
<i>Oribacterium</i>	2,69%	0,80%
<i>Atopobium</i>	1,78%	0,69%
<i>Lachnospiraceae</i> [G-2]	3,12%	0,05%
<i>Solobacterium</i>	2,21%	0,69%
<i>Filifactor</i>	1,37%	0,57%
<i>Bacteroidetes</i> [G-3]	0,86%	1,05%
<i>Stomatobaculum</i>	1,41%	0,28%
<i>Treponema</i>	0,47%	1,51%
<i>Peptococcus</i>	0,25%	1,72%
<i>Erysipelotrichaceae</i> [G-1]	1,70%	0,14%
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-6]	1,50%	0,15%
<i>Anaeroglobus</i>	1,03%	0,50%
<i>Streptococcus</i>	0,81%	0,40%
<i>Slackia</i>	1,43%	0,28%
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-1]	0,97%	0,33%
<i>Lactobacillus</i>	0,23%	1,00%

Fonte: a autora

5.1.3 Variação relativa das espécies abundantes entre as amostras de DNA e rRNA

A **tabela 5.3** mostra uma visão geral da abundância relativa (%) das bactérias detectadas nas amostras de DNA e rRNA. No nível de espécie, 57,8% (141/244) foram comuns nas análises de DNA e rRNA. A atividade das espécies bacterianas (a razão rRNA/DNA ≥ 1) estão em destaque na **tabela 5.3**. *Bacteroidales* [G-2] bacterium HMT 274 (DNA, 7,72%; rRNA 8,08%), *Porphyromonas endodontalis* (DNA, 15,45%; rRNA, 13,73%), *Tannerella forsythia* (DNA, 1,25%; rRNA, 3,12%), *Alloprevotella tanneriae* (DNA, 2,65%; rRNA, 3,77%), *Prevotella intermedia* (DNA, 4,13%; rRNA, 5,25%), *Pseudoramibacter alactolyticus* (DNA, 4,40%; rRNA, 8,29%), *Olsenella* sp. HMT 809 (DNA, 2,03%; rRNA, 2,04%), *Olsenella* sp. HMT 939 (DNA, 2,82%; rRNA, 6,34%), *Olsenella uli* (DNA, 0,10%; rRNA, 0,09%) e *Fusobacterium nucleatum subsp. animalis* (DNA, 4,11%; rRNA, 13,83%) foram membros ativos e dominantes na comunidade. Por sua vez, a alta abundância de rRNA de táxons pouco abundantes (DNA < 1%) sugere que eles também podem desempenhar um papel ativo na infecção.

Tabela 5.3 - Análise de mapa de calor de táxons bacterianos detectados em dados de NGS baseados em DNA e rRNA (abundância > 0,01%). A abundância relativa (%) é a média de cada espécie nas análises de DNA e rRNA. As espécies bacterianas destacadas com um asterisco representam táxons ativos (rRNA/DNA razão ≥ 1).

Filo	Espécies	DNA	rRNA
	<i>Bacteroidaceae</i> [G-1] bacterium HMT 272	3,46	0,20
	<i>Bacteroidales</i> [G-2] bacterium HMT 274	7,72	8,08
	<i>Bacteroidetes</i> [G-3] bacterium HMT 281	0,86	1,05
	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	15,45	13,73
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0,05	0,04
	<i>Tannerella forsythia</i>	1,25	3,12
	<i>Alloprevotella rava</i>	0,05	0,04
	<i>Alloprevotella tannerae</i>	2,65	3,77
	<i>Prevotella baroniae</i>	1,49	0,45
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Prevotella buccae</i>	0,06	0,04
	<i>Prevotella dentalis</i>	0,10	0,07
	<i>Prevotella intermedia</i>	4,13	5,25
	<i>Prevotella nigrescens</i>	0,72	1,02
	<i>Prevotella oralis</i>	0,66	0,87
	<i>Prevotella oris</i>	5,41	1,78
	<i>Prevotella pleuritidis</i>	0,62	0,78
	<i>Prevotella</i> sp. HMT 292	0,06	0,01
	<i>Prevotella</i> sp. HMT 376	1,66	0,17
	<i>Prevotella</i> sp. HMT 515	0,54	0,19
	<i>Prevotella</i> sp. HMT 526	0,61	0,12
	<i>Abiotrophia defectiva</i>	0,08	0,01
	<i>Clostridiales</i> [F-1][G-1] bacterium HMT 093	0,11	0,03
	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,15	0,15
	<i>Bulleidia extracta</i>	0,35	0,12
	<i>Eggerthia cateniformis</i>	0,12	0,04
	<i>Erysipelotrichaceae</i> [G-1] bacterium HMT 904	1,55	0,09
	<i>Erysipelotrichaceae</i> [G-1] bacterium HMT 905	0,15	0,05
	<i>Solobacterium moorei</i>	2,21	0,69
	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	4,40	8,29
<i>Firmicutes</i>	<i>Catonella morbi</i>	0,52	0,58
	<i>Lachnospiraceae</i> [G-2] bacterium HMT 096	3,11	0,05
	<i>Lachnospiraceae</i> [G-7] bacterium HMT 086	0,06	0,01
	<i>Oribacterium</i> sp. HMT 078	0,37	0,27
	<i>Oribacterium</i> sp. HMT 102	2,31	0,53
	<i>Shuttleworthia satelles</i>	0,82	0,04
	<i>Stomatobaculum</i> sp. HMT 373	1,41	0,28
	<i>Lactobacillus crispatus</i>	0,06	0,77
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	0,12	0,19
	<i>Mycoplasma salivarium</i>	4,82	1,85

	<i>Peptococcus</i> sp. HMT 167	0,25	1,72
	<i>Parvimonas micra</i>	0,07	0,17
	<i>Filifactor alocis</i>	1,37	0,57
	<i>Mogibacterium timidum</i>	0,56	0,41
	<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-1] bacterium HMT 383	0,19	0,01
	<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-1] <i>infirmum</i>	0,79	0,32
	<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-2] bacterium HMT 091	0,08	0,05
	<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-5] <i>saphenum</i>	0,17	0,06
	<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-6] <i>minutum</i>	1,38	0,10
	<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-6] <i>nodatum</i>	0,13	0,05
	<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-7] <i>yurii</i> subsp. <i>yurii</i> & <i>margaretiae</i>	0,03	0,17
	<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	0,07	0,23
	<i>Ruminococcaceae</i> [G-3] bacterium HMT 381	0,13	0,01
	<i>Selenomonas</i> sp. HMT 134	0,08	0,17
	<i>Streptococcus intermedius</i>	0,31	0,12
	<i>Streptococcus mutans</i>	0,08	0,08
	<i>Streptococcus oralis</i> subsp. <i>dentisani</i> clade 058	0,28	0,15
	<i>Streptococcus salivarius</i>	0,08	0,02
	<i>Anaeroglobus geminatus</i>	1,03	0,50
	<i>Dialister invisus</i>	1,74	0,42
	<i>Dialister pneumosintes</i>	1,81	0,69
	<i>Megasphaera</i> sp. HMT 841	0,97	0,68
	<i>Veillonella dispar</i>	0,31	0,16
	<i>Veillonellaceae</i> [G-1] bacterium HMT 150	0,11	0,01
	<i>Olsenella</i> sp. HMT 809	2,03	2,04
	<i>Olsenella</i> sp. HMT 939	2,82	6,34
Actinobacteria	<i>Olsenella uli</i>	2,13	5,66
	<i>Bifidobacterium dentium</i>	0,10	0,09
	<i>Atopobium rimae</i>	1,75	0,66
	<i>Slackia exigua</i>	1,43	0,28
Fusobacteria	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i>	4,11	13,83
	<i>Campylobacter curvus</i>	0,07	0,48
Proteobacteria	<i>Campylobacter rectus</i>	0,30	0,26
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,09	0,01
	<i>Sphingomonas</i> sp. HMT 004	0,08	0,01
Synergistetes	<i>Fretibacterium fastidiosum</i>	0,41	3,77
	<i>Fretibacterium</i> sp. HMT 358	0,19	2,56
	<i>Treponema denticola</i>	0,11	1,17
Spirochaetes	<i>Treponema maltophilum</i>	0,14	0,24
	<i>Treponema socranskii</i>	0,20	0,09
Chloroflexi	<i>Anaerolineae</i> [G-1] bacterium HMT 439	0,17	0,09

Min. (0%) Max. (15.4%)

5.2 Ensaios de qPCR baseados em rRNA e DNA para análise de bactérias ativas após o preparo químico-cirúrgico

Nesta etapa foram incluídas 20 amostras pareadas para a avaliação da atividade metabólica de *Bacteroidaceae* [G-1] *bacterium* HMT 272 e *Selenomonas* spp.

5.2.1. Comparação entre os ensaios de qPCR baseados em rRNA e DNA.

Como as amostras para controle da esterilidade do campo operatório foram negativas, todas as amostras endodônticas foram incluídas na análise. As taxas de detecção das bactérias estudadas usando os ensaios baseados em rRNA e DNA estão apresentadas na **tabela 5.4**. Os métodos baseados em rRNA não aumentaram a frequência da detecção dessas bactérias específicas ($P > 0,05$) nas amostras pós preparo químico-cirúrgico. Quando comparado com o ensaio de qPCR baseado em rRNA, o ensaio baseado em DNA apresenta uma baixa sensibilidade e uma alta especificidade (**Tabela 5.5**) Além disso, o maior valor preditivo positivo (VPP) indica um menor risco de amostras falso-positivas em ensaios baseado em DNA de *Bacteroidaceae* sp. [G-1] *bacterium* HMT-272 (**Tabela 5.5**).

Tabela 5.4 - Taxa de detecção de bactérias totais de ensaios baseados em RNA ribossômico (rRNA) e DNA

Ensaio de qPCR		S1			S2		
		DNA	Valor de <i>P</i>		DNA	Valor de <i>P</i>	
		+	-		+	-	
<i>Bacteroidaceae</i> [G-1] <i>bacterium</i> HMT 272 (n= 20)	rRNA	8	2	0,47	8	2	0,47
	DNA	0	10		0	10	
<i>Selenomonas</i> spp. (n= 20)	rRNA	9	3	1,00	1	2	0,61
	DNA	2	6		2	15	

+, amostras com resultados positivos em qPCR; -, amostras com resultados negativos em qPCR; S1 e S2, amostras coletadas antes e após o preparo químico-cirúrgico, respectivamente. O símbolo (*) indica que houve diferença entre os valores de mediana entre os grupos DNA e rRNA (teste de McNemar, $P < 0,05$)

Fonte: a autora.

Tabela 5.5 - Sensibilidade, especificidade e VPP para os ensaios de qPCR baseados DNA quando comparado com os ensaios de RT-qPCR baseado rRNA.

Ensaio de qPCR	S1			S2		
	Sensibilidade	Especificidade	VPP	Sensibilidade	Especificidade	VPP
<i>Bacteroidaceae</i>						
[G-1] bacterium HMT 272 (n= 20)	80%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Selenomonas</i> spp. (n= 20)	75%	75%	81%	33%	88%	33%

VPP é probabilidade de bactérias viáveis estão presentes quando o teste baseado em DNA é positivo; sensibilidade, probabilidade de que ensaios de qPCR base em DNA seja positivo quando o rRNA estiver presente; especificidade, probabilidade de qPCR baseada em DNA ser negativo quando o rRNA é ausente; S1, amostras coletadas antes do PQC; S2, amostras coletadas após PQC.

Fonte: a autora.

5.2.2. Contagem bacteriana

A **tabela 5.6.** apresenta uma visão geral dos dados de qPCR baseados em DNA. Aparentemente, a análise baseada em DNA revelou uma significativa redução de *Selenomonas* spp. em S2 ($P = 0,004$). Em contraste, não houve diferença entre as amostras S1 e S2 de *Bacteroidaceae* [G-1] *bacterium* HMT 272 ($P > 0,05$).

Tabela 5.6 - Níveis bacterianos nas amostras endodônticas coletadas antes (S1) e depois (S2) determinado pelo qPCR usando DNA (16S rRNA) como template

Quantidade de DNA	S1	S2
<i>Bacteroidaceae</i> [G-1] <i>bacterium</i> HMT 272		
Mediana	0 ^a	0 ^a
Mínima – Máxima	0 – 3,20 x 10 ⁵	0 – 1,23 x 10 ⁴
Média	2,56 x 10 ⁴	2,17 x 10 ³
Total de amostras (n)	20	20
Amostras positivas de DNA (%)	8 (40%)	8 (40%)
<i>Selenomonas</i> spp.		
Mediana	4,09 x 10 ^{3 a}	0 ^b
Mínima – Máxima	0 – 3,47 x 10 ⁵	0 – 3,98 x 10 ³
Média	6,06 x 10 ⁴	4,61 x 10 ²
Total de amostras (n)	20	20
Amostras positivas de DNA	11 (55)	3 (15)

Letras diferentes nas linhas (a, b) mostram diferenças significativas nos valores da mediana de DNA em amostras endodônticas tomadas antes e após PQC (teste não paramétrico de postos sinalizados de Wilcoxon, $P < 0,05$).

Fonte: a autora

5.2.3. Atividade bacteriana

Para amostras positivas usando ensaios de qPCR baseados em DNA e rRNA, a comparação entre DNA e rRNA sugere que *Bacteroidaceae* [G-1] *bacterium* HMT 272 está ativo após o PQC (Tabela 5.7).

Tabela 5.7 - Valores da mediana (mínima - máxima) do número cópias de DNA e rRNA em amostras dos canais radiculares, antes (S1) e após (S2) o preparo químico-cirúrgico

Ensaio qPCR	de	S1			S2				
		n	rRNA	DNA	Valor de P	n	rRNA	DNA	Valor de P
<i>Bacteroidaceae</i> [G-1] <i>bacterium</i> HMT 272									
Mediana	8		$8,27 \times 10^3$	$4,41 \times 10^3$	0,12		$8,11 \times 10^3$	$5,41 \times 10^3$	0,01*
Min – Max			$1,28 \times 10^3 - 6,09 \times 10^6$	$3,38 \times 10^2 - 3,20 \times 10^5$			$5,30 \times 10^3 - 7,84 \times 10^4$	$1,51 \times 10^3 - 1,23 \times 10^4$	
<i>Selenomonas</i> spp.									
Mediana	9		$1,05 \times 10^5$	$9,71 \times 10^4$	0,04*	1	$3,98 \times 10^3$	$3,81 \times 10^3$	NA
Min – Max			$1,89 \times 10^4 - 9,69 \times 10^6$	$7,87 \times 10^3 - 3,47 \times 10^5$			–	–	

Min – Max significa os valores mínimos e máximos entre as amostras. O símbolo (*) indica que houve diferença dos valores de mediana entre os grupos DNA e rRNA (teste de Wilcoxon signed rank, $P < 0,05$)

Fonte: a autora

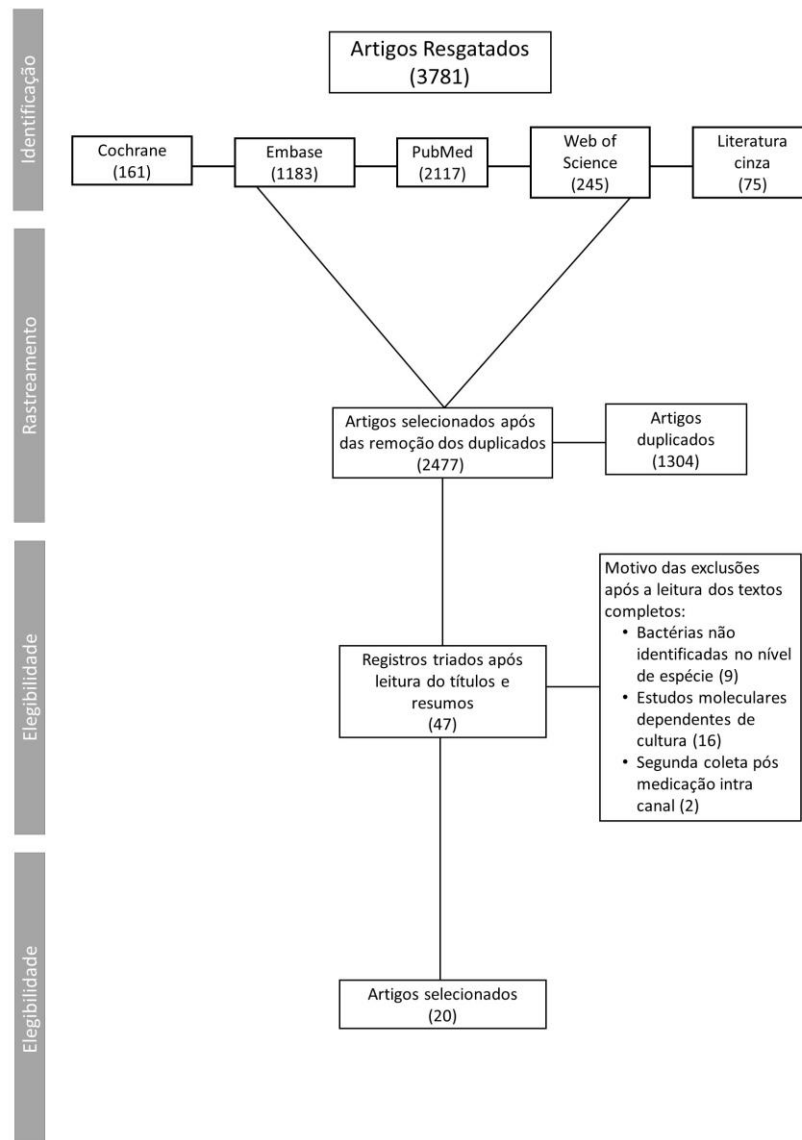
5.3 Natureza e prevalência de bactérias que persistem após o preparo químico-cirúrgico

5.3.1 Resisão Sistemática

Um fluxograma para ilustrar a seleção dos estudos está representado na **Figura 5.1**. Um total de 21 estudos que analisaram amostras de canais radiculares utilizando métodos moleculares independentes de cultura para a identificação bactérias no nível de espécie (antes e após preparo químico-cirúrgico) foram incluídos nessa revisão (Tabela 5.8). Alguns estudos foram excluídos pelos seguintes motivos: bactérias não identificadas no nível de espécie

(64,85–91), estudos dependentes de cultura (92–107) e amostras coletadas somente após medicação intracanal (35,108). A análise do risco de viés dos estudos incluídos foi avaliada por meio do “Joanna Briggs Institute Checklist” para estudos de prevalência e está apresentada na **figura 5.2**. A qualidade das evidências, avaliada utilizando o GRADE, está apresentada na **tabela 5.9**.

Figura 5.1 - Fluxograma do processo da Revisão Sistemática



Fonte: A autora

Tabela 5.8 - Principais características dos estudos incluídos

Estudo	N	Infecção	Métodos de identificação	Taxa bacteriana	S1	S2
Sakamoto et al. (6)	18	Infecção primária	Análise da biblioteca de clones do gene 16S rRNA	<i>Acinetobacter junii</i>	0	1
				<i>Anaeroglobus geminatus</i> (anteriormente <i>Megasphaera sp. oral clone BB166</i>)	1	0
				<i>Atopobium sp. HMT 199</i> (anteriormente <i>Atopobium sp. oral clone C019</i>)	1	0
				<i>Bacteroidaceae [G-1] bacterium HMT 272</i> (anteriormente <i>Bacteroides-like sp. oral clone X083</i>)	3	0
				<i>Bergeyella sp. HMT 422</i> (anteriormente <i>Flavobacteriaceae genomosp. C1</i>)	0	1
				<i>Dialister invisus</i>	1	0
				<i>Dialister invisus</i> (anteriormente <i>Dialister sp. oral clone 9N-1</i>)	2	0
				<i>Erysipelotrichaceae [G-1] bacterium HMT 904</i> (anteriormente <i>Solobacterium sp. oral clone 6Ta-2</i>)	1	0
				<i>Filifactor alocis</i>	1	0
				<i>Fusobacterium nucleatum</i>	2	0
				<i>Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii</i> (anteriormente <i>Fusobacterium sp. oral clone CZ006</i>)	1	0
				<i>Lautropia mirabilis</i> (anteriormente <i>uncultured Lautropia sp. clone 2.15</i>)	0	1
				<i>Mogibacterium timidum</i> (anteriormente <i>Mogibacterium sp. oral clone BP1-36</i>)	2	0
				<i>Oribacterium sp. HMT 078</i> (anteriormente <i>Lachnospiraceae oral clone MCE9_31</i>)	1	0
				<i>Parvimonas sp. HMT 110</i> (anteriormente <i>Peptostreptococcus sp. oral clone BP1-72</i>)	1	0
				<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	1	0
				<i>Peptostreptococcaceae [XI][G-</i>	1	0

1] <i>[Eubacterium] infirmum</i>		
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-1] <i>bacterium</i> HMT 383(antiormente	1	0
<i>Eubacteriaceae</i> oral clone P2PB_46 P3)		
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-3] <i>bacterium</i> HMT 495 (antiormente <i>Eubacterium</i> sp. oral clone JS001)	1	0
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-4] <i>bacterium</i> HMT 369 (antiormente <i>Eubacteriaceae</i> oral clone MCE10_174)	1	0
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-5] <i>[Eubacterium] saphenum</i> (antiormente <i>Eubacterium</i> sp. oral clone BP1-93)	1	0
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-6] <i>[Eubacterium] minutum</i> <i>Peptostreptococcus stomatis</i> (antiormente	1	0
<i>Peptostreptococcus</i> sp. oral clone CK035)		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1	0
<i>Prevotella baroniae</i>	1	0
<i>Prevotella</i> sp. HMT 472 (antiormente <i>Prevotella</i> sp. oral clone GU027)	0	1
<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	3	0
<i>Pyramidobacter pisolens</i> (antiormente <i>Synergistes</i> sp. oral clone BA121)	1	0
<i>Solobacterium moorei</i> (antiormente <i>Solobacterium</i> sp. oral clone K010)	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	1
<i>Stomatobaculum</i> sp. HMT 373 (antiormente <i>Lachnospiraceae</i> oral clone MCE9_173)	1	0
<i>Streptococcus mitis</i>	0	1
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	0	1
<i>Streptococcus parasanguinis</i> clade 411 (antiormente		
<i>Streptococcus</i> sp. oral clone ASCF07)	0	1

				<i>Streptococcus salivarius</i>	0	1
				<i>Veillonella parvula</i>	0	1
Schirrmeister et al. (81)	20	Infecção secundária	Ensaio de PCR baseado em DNA	<i>Enterococcus faecalis</i>	4	0
Blome et al. (109)	40	Infecção primária/ Infecção secundária	Ensaio de PCR baseado em DNA	<i>Enterococcus faecalis</i>	8	6
				<i>Fusobacterium nucleatum</i>	15	2
				<i>Parvimonas micra</i>	31	8
				<i>Porphyromonas endodontalis</i>	18	8
				<i>Porphyromonas gingivalis</i>	8	2
				<i>Prevotella intermedia</i>	3	2
				<i>Tannerella forsythia</i>	16	6
				<i>Treponema denticola</i>	11	2
Rôças, Siqueira, (50)*‡	15	Infecção primária/ Infecção secundária	RT - PCR Reação de Hibridização DNA-DNA de Captura Reversa	<i>Actinomyces israelii</i>	7	2
				<i>Bacteroidaceae [G-1] bacterium</i>		
				HMT 272 (anteriormente <i>Bacteroidetes clone X083</i>)	8	1
				<i>Campylobacter rectus</i>	4	3
				<i>Cutibacterium acnes</i> (anteriormente <i>Propionibacterium acnes</i>)	3	4
				<i>Dialister invisus</i>	5	2
				<i>Dialister pneumosintes</i>	3	3
				<i>Dialister sp. HMT 119</i> (anteriormente <i>Dialister clone BS016</i>)	3	2
				<i>Enterococcus faecalis</i>	3	3
				<i>Filifactor alocis</i>	2	1
				<i>Fusobacterium nucleatum</i>	6	6
				<i>Olsenella uli</i>	10	5
				<i>Parvimonas micra</i>	6	3
				<i>Peptostreptococcaceae [XI][G-1] [Eubacterium] sulci</i>	7	3
				<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	6	4
				<i>Porphyromonas endodontalis</i>	5	4
				<i>Porphyromonas gingivalis</i>	2	3
				<i>Prevotella baroniae</i>	4	0
				<i>Prevotella multisaccharivorax</i>	1	0
				<i>Prevotella nigrescens</i>	1	0
				<i>Propionibacterium acidifaciens</i>	1	1
				<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	4	3
				<i>Pyramidobacter piscolens</i>	9	2
				<i>Selenomonas sputigena</i>	6	3
				<i>Solobacterium moorei</i>	3	3
				<i>Tannerella forsythia</i>	7	2
				<i>Treponema denticola</i>	4	2
				<i>Treponema socranskii</i>	4	2

Rôças, Siqueira, (47)‡	47	Infecção primária	Reação de Hibridização DNA-DNA de Captura Reversa	<i>Actinomyces israelii</i>	29	9
				<i>Atopobium rimae</i>	9	5
				<i>Atopobium sp.</i> HMT 416 (anteriormente <i>Olsenella</i> <i>genomospecies C1</i>)	12	2
				<i>Bacteroidaceae</i> [G-1] <i>bacterium</i> HMT 272 (anteriormente <i>Bacteroidetes</i> clone X083)	32	8
				<i>Campylobacter rectus</i>	17	8
				<i>Cutibacterium acnes</i> (anteriormente	29	16
				<i>Propionibacterium acnes</i>)		
				<i>Dialister invisus</i>	27	10
				<i>Dialister pneumosintes</i>	10	6
				<i>Eikenella corrodens</i>	3	1
				<i>Enterococcus faecalis</i>	18	9
				<i>Filifactor alocis</i>	17	6
				<i>Fusobacterium nucleatum</i>	14	5
				<i>Olsenella uli</i>	9	5
				<i>Parvimonas micra</i>	22	8
				<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	13	8
				<i>Porphyromonas endodontalis</i>	26	12
				<i>Porphyromonas gingivalis</i>	8	5
				<i>Prevotella baroniae</i>	22	7
				<i>Propionibacterium acidifaciens</i>	24	10
				<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	9	5
				<i>Pyramidobacter piscoleus</i>	16	4
				<i>Selenomonas sputigena</i>	31	10
				<i>Solobacterium moorei</i>	11	8
				<i>Tannerella forsythia</i>	19	5
				<i>Treponema denticola</i>	8	4
<i>Treponema socranskii</i>	10	3				
Rôças Siqueira, (51)‡	24	Infecção primária	Reação de Hibridização DNA-DNA de Captura Reversa	<i>Actinomyces israelii</i>	9	2
				<i>Atopobium rimae</i>	1	0
				<i>Atopobium sp.</i> HMT 416 (anteriormente <i>Olsenella</i> <i>genomospecies C1</i>)	1	0
				<i>Bacteroidaceae</i> [G-1] <i>bacterium</i> HMT 272 (anteriormente <i>Bacteroidetes</i> clone X083)	8	2
				<i>Campylobacter rectus</i>	2	0
				<i>Cutibacterium acnes</i> (anteriormente	8	4
				<i>Propionibacterium acnes</i>)		
				<i>Dialister invisus</i>	7	2

				<i>Eikenella corrodens</i>	1	1
				<i>Enterococcus faecalis</i>	5	2
				<i>Filifactor alocis</i>	7	2
				<i>Fusobacterium nucleatum</i>	3	0
				<i>Parvimonas micra</i>	6	1
				<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	3	1
				<i>Porphyromonas endodontalis</i>	9	3
				<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1	1
				<i>Prevotella baroniae</i>	3	1
				<i>Propionibacterium acidifaciens</i>	9	3
				<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	1	0
				<i>Pyramidobacter piscolens</i>	4	0
				<i>Selenomonas sputigena</i>	10	3
				<i>Solobacterium moorei</i>	2	1
				<i>Tannerella forsythia</i>	3	0
				<i>Treponema socranskii</i>	4	1
Neves et al. (52)‡	22	Infecção primária	Reação de Hibridização DNA-DNA de Captura Reversa	<i>Arachnia propionica</i> (anteriormente <i>Propionibacterium propionicum</i>)	1	0
				<i>Atopobium rimae</i>	2	0
				<i>Atopobium sp.</i> HMT 416 (anteriormente <i>Atopobium genomospecies C1</i>)	1	0
				<i>Bacteroidaceae [G-1] bacterium</i> HMT 272 (anteriormente <i>Bacteroidetes clone X083</i>)	9	6
				<i>Cutibacterium acnes</i> (anteriormente <i>Propionibacterium acnes</i>)	2	0
				<i>Dialister invisus</i>	5	4
				<i>Dialister pneumosintes</i>	3	2
				<i>Filifactor alocis</i>	6	2
				<i>Fusobacterium nucleatum</i>	3	0
				<i>Parvimonas micra</i>	7	2
				<i>Porphyromonas endodontalis</i>	3	0
				<i>Prevotella baroniae</i>	1	0
				<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	1	0
				<i>Pyramidobacter piscolens</i>	2	0
				<i>Tannerella forsythia</i>	5	3
				<i>Treponema socranskii</i>	2	0
Rôças et al. (53)	28	Infecção primária	Ensaio de PCR baseado em DNA	<i>Atopobium sp.</i> HMT 416 (anteriormente <i>Atopobium sp.</i> HOT 416)	1	0
				<i>Bacteroidaceae [G-1] bacterium</i> HMT 272 (anteriormente <i>Bacteroidaceae sp.</i> HOT-272)	6	1

				<i>Fretibacterium fastidiosum</i> (anteriormente <i>Fretibacterium fastidiosum</i> HOT-363)	5	1
				<i>Megasphaera sp.</i> HMT 123 (anteriormente <i>Megasphaera sp.</i> HOT-123)	1	0
				<i>Oribacterium sp.</i> HMT 102 (anteriormente <i>Oribacterium sp.</i> HOT-102)	2	0
				<i>Saccharibacteria (TM7) [G-1] bacterium</i> HMT 346 (anteriormente <i>TM7 sp.</i> HOT-346)	1	0
Stojanović et al. (110)	51	Infecção primária	Ensaio de PCR baseado em DNA	<i>Enterococcus faecalis</i>	25	9
				<i>Porphyromonas gingivalis</i>	9	0
Ferreira et al. (80)	20	Infecção primária	Reação de Hibridização DNA-DNA de Captura Reversa	<i>Actinomyces israelii</i>	3	2
				<i>Actinomyces oris</i>	7	4
				<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	8	5
				<i>Campylobacter gracilis</i>	7	6
				<i>Campylobacter rectus</i>	5	6
				<i>Campylobacter showae</i>	7	6
				<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	1	4
				<i>Capnocytophaga ochracea</i>	14	11
				<i>Capnocytophaga sputigena</i>	7	5
				<i>Cutibacterium acnes</i> (anteriormente <i>Propionibacterium acnes</i>)	6	6
				<i>Eikenella corrodens</i>	6	7
				<i>Enterococcus faecalis</i>	11	8
				<i>Enterococcus faecium</i>	12	12
				<i>Eubacterium nodatum</i>)	5	2
				<i>Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum</i>	5	1
				<i>Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum</i>	2	2
				<i>Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii</i>	14	9
				<i>Fusobacterium periodonticum</i>	3	2
				<i>Gemella morbillorum</i>	12	7
				<i>Lachnoanaerobaculum saburreum</i> (anteriormente <i>Eubacterium saburreum</i>)	13	4
				<i>Leptotrichia buccalis</i>	13	8
				<i>Neisseria mucosa</i>	5	2

				<i>Parvimonas micra</i>	13	9
				<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-6] [<i>Eubacterium</i>] <i>nodatum</i>		
				<i>Porphyromonas endodontalis</i>	7	5
				<i>Porphyromonas gingivalis</i>	10	8
				<i>Prevotella intermedia</i>	9	6
				<i>Prevotella melaninogenica</i>	8	5
				<i>Prevotella nigrescens</i>	10	5
				<i>Schaalia odontolytica</i>		
				(anteriormente <i>Actinomyces odontolyticus</i>)	3	2
				<i>Selenomonas noxia</i>	3	5
				<i>Streptococcus anginosus</i>	13	9
				<i>Streptococcus constellatus</i>	7	5
				<i>Streptococcus gordonii</i>	7	6
				<i>Streptococcus intermedius</i>	9	7
				<i>Streptococcus mitis</i>	10	6
				<i>Streptococcus sanguinis</i>	7	8
				<i>Tannerella forsythia</i>	3	2
				<i>Treponema denticola</i>	5	3
				<i>Treponema socranskii</i>	8	4
				<i>Veillonella parvula</i>	13	11
mes et al. (7)	15	Infecção primária	Sequenciamento de Nova Geração (NGS)	<i>Atopobium</i> sp. HMT 199 (anteriormente <i>Atopobium</i> sp oral taxon 199)	3	1
				<i>Bacteroidaceae</i> [G-1] <i>bacterium</i> HMT 272 (anteriormente <i>Bacteroidaceae</i> [G-1] sp oral taxon 272)	7	3
				<i>Desulfobulbus</i> sp. HMT 041 (anteriormente <i>Desulfobulbus</i> sp oral taxon 041)	10	0
				<i>Dialister invisus</i>	7	7
				<i>Dialister pneumosintes</i>	3	1
				<i>Enterococcus faecalis</i>	15	15
				<i>Erysipelotrichaceae</i> [G-1] <i>bacterium</i> HMT 905 (anteriormente	3	1
				<i>Erysipelothrichaceae</i> [G-1] sp oral taxon 905)		
				<i>Eubacterium</i> [11] [G-6] <i>nodatum</i>)	2	1
				<i>Filifactor alocis</i>	9	8
				<i>Fretibacterium fastidiosum</i>	6	6
				<i>Fretibacterium</i> sp. HMT 360 (anteriormente <i>Fretibacterium</i> sp oral taxon 360)	1	3

<i>Mogibacterium timidum</i>	11	2
<i>Parvimonas micra</i>	9	9
<i>Parvimonas sp.</i> HMT 110 (anteriormente <i>Parvimonas sp.</i> <i>oral taxon 110</i>)	3	8
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-1] [<i>Eubacterium</i>] <i>infirmum</i>	3	0
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-1] <i>bacterium</i> HMT 383	7	3
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-2] <i>bacterium</i> HMT 091	4	1
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-4] <i>bacterium</i> HMT 369	3	5
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-5] [<i>Eubacterium</i>] <i>saphenum</i>	11	6
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-6] [<i>Eubacterium</i>] <i>minutum</i>	5	0
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-6] [<i>Eubacterium</i>] <i>nodatum</i>	2	1
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-9] [<i>Eubacterium</i>] <i>brachy</i>	12	8
<i>Peptostreptococcaceae</i> <i>bacterium oral taxon 113 str.</i> W5053	3	2
<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	7	4
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	2	0
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1	6
<i>Prevotella nigrescens</i>	0	3
<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	9	3
<i>Rothia dentocariosa</i>	2	2
<i>Rothia mucilaginosa</i>	5	7
<i>Stomatobaculum longum</i>	2	0
<i>Streptococcus anginosus</i>	0	5
<i>Streptococcus constellatus</i>	4	7
<i>Streptococcus gordonii</i>	5	12
<i>Streptococcus salivarius</i>	8	14
<i>Streptococcus sanguinis</i>	2	4
<i>Tannerella forsythia</i>	3	2
<i>Treponema denticola</i>	0	4
<i>Treponema maltophilum</i>	1	0
<i>Treponema socranskii</i>	1	4
<i>Treponema sp.</i> HMT 256	0	1
<i>Treponema sp.</i> HMT 257	0	1
<i>Treponema sp.</i> HMT 258	0	1
<i>Veillonella rogosae</i>	1	2
<i>Veillonellaceae</i> [G-1] <i>bacterium</i>	2	0

HMT 132 &
bacterium HMT 150

Pinheiro et al. (26)	20	Infecção secundária	Ensaio de PCR baseado em DNA	<i>Enterococcus faecalis</i>	13	6
Provenzano et al. (70)‡	18	Infecção primária	Ensaio de PCR baseado em DNA	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	13	5
				<i>Parvimonas micra</i>	9	5
				<i>Porphyromonas endodontalis</i>	8	1
				<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	8	4
Rodrigues et al. (111)	58	Infecção secundária	Ensaio de PCR baseado em DNA	<i>Enterococcus faecalis</i>	19	0
Zandi et al.(55)‡	49	Infecção secundária	Ensaio de PCR baseado em DNA	<i>Enterococcus faecalis</i>	3	1
Cavalli et al. (112)	30	Infecção primária	Reação de Hibridização DNA-DNA de Captura Reversa	<i>Actinomyces israelii</i>	2	0
				<i>Actinomyces oris</i>	4	1
				<i>Aggregatibacter</i>	8	10
				<i>Actinomycetemcomitans</i>	10	9
				<i>Campylobacter gracilis</i>	8	11
				<i>Campylobacter rectus</i>	6	2
				<i>Campylobacter showae</i>	3	4
				<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	16	13
				<i>Capnocytophaga ochracea</i>	8	8
				<i>Cutibacterium acnes</i>		
				(anteriormente	9	11
				<i>Propionibacterium acnes</i>)		
				<i>Eikenella corrodens</i>	6	9
				<i>Enterococcus faecalis</i>	14	10
				<i>Enterococcus faecium</i>	8	9
				<i>Eubacterium nodatum</i>)	8	5
				<i>Fusobacterium nucleatum</i>		
				subsp. <i>nucleatum</i>	6	4
				<i>Fusobacterium nucleatum</i>		
				subsp. <i>polymorphum</i>	3	2
				<i>Fusobacterium nucleatum</i>		
				subsp. <i>vincentii</i>	16	16
				<i>Fusobacterium periodonticum</i>	6	6
				<i>Gemella morbillorum</i>	12	10
				<i>Lachnoanaerobaculum</i>		
				<i>saburreum</i> (anteriormente	7	4
				<i>Eubacterium saburreum</i>)		
				<i>Leptotrichia buccalis</i>	14	15
				<i>Neisseria mucosa</i>	4	2
				<i>Parvimonas micra</i>	8	6
				<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-	8	5
				6] [<i>Eubacterium</i>] <i>nodatum</i>		
				<i>Porphyromonas endodontalis</i>	8	3
				<i>Porphyromonas gingivalis</i>	14	14

				<i>Prevotella intermedia</i>	9	7
				<i>Prevotella melaninogenica</i>	13	11
				<i>Prevotella nigrescens</i>	6	2
				<i>Schaalia odontolytica</i> (anteriormente <i>Actinomyces</i> <i>odontolyticus</i>)	3	1
				<i>Selenomonas noxia</i>	6	8
				<i>Streptococcus anginosus</i>	12	12
				<i>Streptococcus constellatus</i>	10	12
				<i>Streptococcus gordonii</i>	8	10
				<i>Streptococcus intermedius</i>	12	10
				<i>Streptococcus mitis</i>	12	13
				<i>Streptococcus sanguinis</i>	7	12
				<i>Tannerella forsythia</i>	8	7
				<i>Treponema denticola</i>	7	3
				<i>Treponema socranskii</i>	10	5
				<i>Veillonella parvula</i>	9	7
Da Silva et al. (113)‡	10	Infecção primária	Ensaio de PCR baseado em DNA	<i>Enterococcus faecalis</i>	4	2
Zandi et al. (21)‡	10	Infecção secundária	Sequenciamento de Nova Geração (NGS)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	1
				<i>Actinomyces gerencseriae</i>	2	0
				<i>Actinomyces johnsonii</i>	2	0
				<i>Actinomyces massiliensis</i>	1	0
				<i>Actinomyces naeslundii</i>	4	1
				<i>Actinomyces oris</i>	2	0
				<i>Alloprevotella tanneriae</i>	2	3
				<i>Arachnia propionica</i> (anteriormente <i>Propionibacterium</i> <i>propionicum</i>)	1	1
				<i>Campylobacter gracilis</i>	2	0
				<i>Campylobacter rectus</i>	2	1
				<i>Cutibacterium acnes</i> (anteriormente <i>Propionibacterium acnes</i>)	0	3
				<i>Dialister invisus</i>	5	3
				<i>Dialister pneumosintes</i>	1	0
				<i>Enterobacter hormaechei</i>	3	1
				<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1	0
				<i>Enterococcus faecalis</i>	2	0
				<i>Filifactor alocis</i>	0	1
				<i>Fusobacterium naviforme</i>	5	2
				<i>Fusobacterium nucleatum</i>	7	5
				<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	2	1
				<i>Neisseria elongata</i>	2	0

<i>Olsenella profusa</i>	1	0
<i>Olsenella uli</i>	2	0
<i>Parvimonas micra</i>	4	3
<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	1	1
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	1	2
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1	0
<i>Prevotella buccae</i>	1	0
<i>Prevotella denticola</i>	2	1
<i>Prevotella histicola</i>	1	0
<i>Prevotella intermedia</i>	1	0
<i>Prevotella maculosa</i>	1	0
<i>Prevotella nigrescens</i>	3	0
<i>Prevotella oralis</i>	1	1
<i>Prevotella oris</i>	3	0
<i>Prevotella oulorum</i>	1	0
<i>Prevotella pallens</i>	1	0
<i>Propionibacterium acidifaciens</i>	2	1
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	1
<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	2	1
<i>Rothia aeria</i>	1	0
<i>Rothia dentocariosa</i>	2	0
<i>Rothia mucilaginosa</i>	1	0
<i>Selenomonas sputigena</i>	3	0
<i>Slackia exigua</i>	0	3
<i>Solobacterium moorei</i>	0	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	1
<i>Streptococcus anginosus</i>	3	0
<i>Streptococcus australis</i>	1	1
<i>Streptococcus constellatus</i>	3	2
<i>Streptococcus cristatus clade</i>		
578 (<i>anteriormente</i>	1	0
<i>Streptococcus oligofermentans</i>)		
<i>Streptococcus gordonii</i>	4	4
<i>Streptococcus infantis</i>	0	2
<i>Streptococcus infelix</i>	1	0
<i>Streptococcus intermedius</i>	4	4
<i>Streptococcus mutans</i>	1	0
<i>Streptococcus oralis/mitis</i>	6	3
<i>Streptococcus peroris</i>	3	1
<i>Streptococcus sanguinis</i>	2	0
<i>Tannerella forsythia</i>	2	0
<i>Treponema denticola</i>	4	1
<i>Treponema lecithinolyticum</i>	1	0
<i>Treponema maltophilum</i>	3	0
<i>Treponema socranskii</i>	2	2
<i>Treponema socranskiiss buccale</i>	1	1

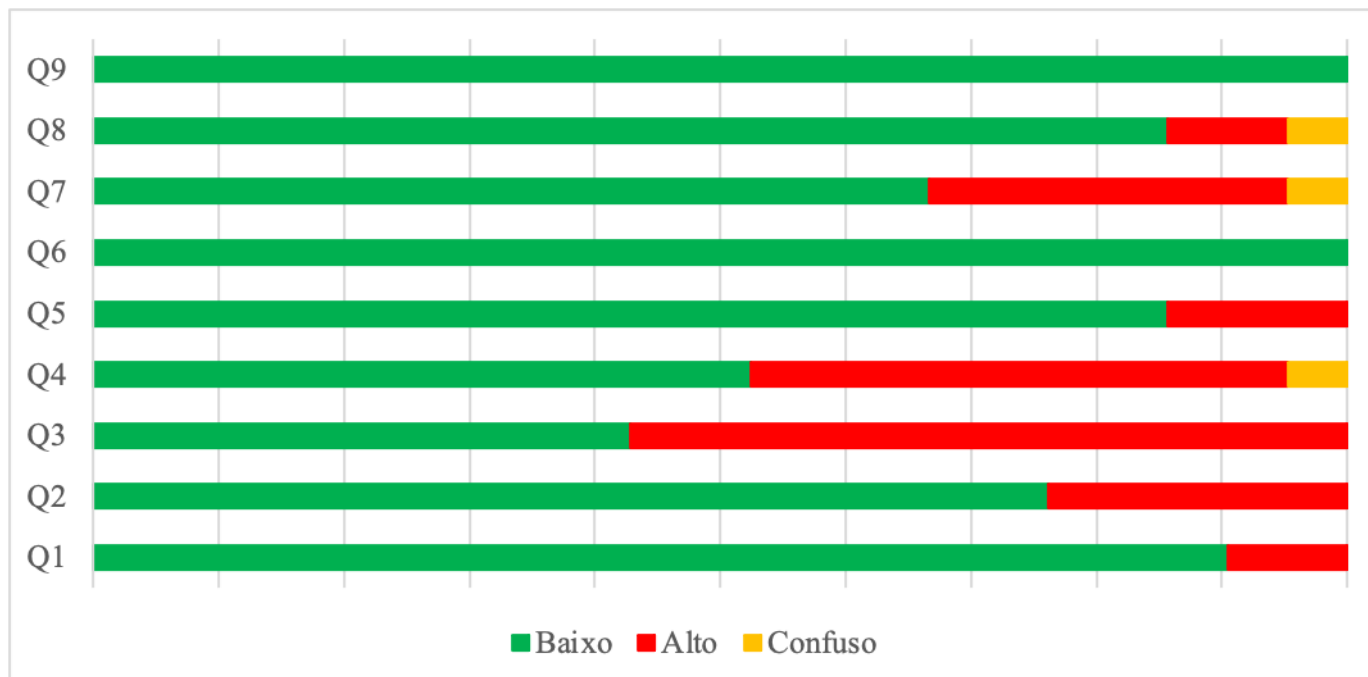
				<i>Veillonella dispar</i>	3	1
				<i>Veillonella parvula</i>	2	1
Orozco et al. (114)	20	Infecção primária	Reação de Hibridização DNA-DNA de Captura Reversa	<i>Actinomyces israelii</i>	2	1
				<i>Actinomyces oris</i>	1	2
				<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	8	9
				<i>Campylobacter gracilis</i>	8	2
				<i>Campylobacter rectus</i>	6	6
				<i>Campylobacter showae</i>	4	2
				<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	1	3
				<i>Capnocytophaga ochracea</i>	5	3
				<i>Capnocytophaga sputigena</i>	7	5
				<i>Cutibacterium acnes</i> (anteriormente <i>Propionibacterium acnes</i>)	7	9
				<i>Eikenella corrodens</i>	5	4
				<i>Enterococcus faecalis</i>	9	11
				<i>Enterococcus faecium</i>	1	1
				<i>Eubacterium nodatum</i>	7	7
				<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>subsp. nucleatum</i>	2	5
				<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>subsp. polymorphum</i>	3	3
				<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>subsp. vincentii</i>	9	7
				<i>Fusobacterium periodonticum</i>	6	5
				<i>Gemella morbillorum</i>	7	6
				<i>Lachnoanaerobaculum saburreum</i> (anteriormente <i>Eubacterium saburreum</i>)	2	1
				<i>Leptotrichia buccalis</i>	7	10
				<i>Neisseria mucosa</i>	2	3
				<i>Parvimonas micra</i>	1	1
				<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-6] [<i>Eubacterium</i>] <i>nodatum</i>	7	7
				<i>Porphyromonas endodontalis</i>	4	1
				<i>Porphyromonas gingivalis</i>	9	10
				<i>Prevotella intermedia</i>	4	6
				<i>Prevotella melaninogenica</i>	9	8
				<i>Prevotella nigrescens</i>	1	2
				<i>Schaalia odontolytica</i> (anteriormente <i>Actinomyces odontolyticus</i>)	2	3
				<i>Selenomonas noxia</i>	2	6
				<i>Streptococcus anginosus</i>	3	5
				<i>Streptococcus constellatus</i>	10	9

				<i>Streptococcus gordonii</i>	2	5
				<i>Streptococcus intermedius</i>	9	6
				<i>Streptococcus mitis</i>	6	7
				<i>Streptococcus sanguinis</i>	6	5
				<i>Tannerella forsythia</i>	5	5
				<i>Treponema denticola</i>	5	3
				<i>Treponema socranskii</i>	3	4
				<i>Veillonella parvula</i>	1	1
Karataş et al. (115)	45	Infecção primária	Ensaio de PCR baseado em DNA	<i>Enterococcus faecalis</i>	22	7
Nardello et al. (116)‡	20	Infecção primária	Ensaio de PCR baseado em RNA	<i>Bacteroidaceae [G-1] bacterium</i>	8	8
				HMT 272		
				<i>Cutibacterium acnes</i>	8	8
				<i>Enterococcus faecalis</i>	5	5

Amostras coletadas antes (S1) e após (S2) o preparo químico-cirúrgico *Estudo baseado em RNA ribossomal (rRNA). ‡ Alguns achados dos seguintes estudos não foram incluídos porque não tinham sido identificados a nível de espécie: Da Silva et al., 2017 (*Candida* spp.), Nardello et al., 2020 (*Selenomonas* spp.), Neves et al., 2014 (*Streptococcus* spp.), Provenzano et al., 2015 (*Actinobacteria*, *Dialister* spp. and *Streptococcus* spp.), Rôças & Siqueira, 2010 (*Streptococcus* spp.), Rôças & Siqueira, 2011a (*Streptococcus* spp.), Rôças & Siqueira, 2011b (*Streptococcus* spp.), Rodrigues et al., 2015 (*Streptococcus* spp.), Zandi et al., 2016 (*Streptococcus* spp.) e Zandi et al., 2018 (*Saccharibacteria*).

Fonte: a Autora

Figura 5.2. Risco de viés dos estudos incluídos



Baseado no Checklist de Prevalência do Instituto Joanna Briggs, o risco de viés foi considerado Baixo quando os pacientes foram recrutados por clínicas odontológicas regulares e de referência (Q1); os critérios de inclusão e exclusão foram explícitos no textos (Q2); o

cálculo amostral foi descrito (Q3); as amostras foram descritas com detalhes suficientes, fornecendo as informações como sexo, idade, dente e tipo de infecção (Q4); Se a população estudada estava hiper ou hipo representada nos subgrupos (Q5); A técnica para identificação/detecção bacteriana foi adequada (Q6); os procedimentos foram realizados para evitar a contaminação da amostra e as coletas do canal radicular foram realizadas pelo mesmo operador (Q7); e poucas amostras (menos de 10%) foram descartadas devido a falha do controle do esterilidade do campo operatório(Q7); Análise estatística apropriada (Q8); Os critérios para a criação de subgrupos foram objetivos (Q9).

Fonte: a Autora

Tabela 5.9 - Tabela da qualidade de evidência usando GRADE

Certainty assessment							N ^o de pacientes		Efeito		Certainty	Importância
N ^o dos estudos	Delimitação do estudo	Risco de viés	Inconsistência	Evidência indireta	Imprecisão	Outras considerações	[Intervenção]	[comparação]	Relativo (95% CI)	Absoluto (95% CI)		
Análise da prevalência de <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> em amostras iniciais (avaliado com: número de casos positivos)												
8	non-randomised studies	grave ^e	grave ^a	não grave	grave ^{bc}	forte associação	169 participantes	37 participantes	-	Ver comentário	⊕⊕○○ Baixa	IMPORTANTE
							-	22.0%		não combinado		
Análise da prevalência de <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> em amostras pós PQC (avaliado com: número de casos positivos)												
8	non-randomised studies	grave ^e	grave ^a	não grave	grave ^{bc}	forte associação	169 participantes	16 participantes	-	Ver comentário	⊕⊕○○ Baixa	IMPORTANTE
							-	9.0%		não combinado		
Análise da prevalência de <i>Olsenella uli</i> em amostras iniciais (avaliado com: número de casos positivos)												
4	non-randomised studies	grave ^e	muito grave ^f	não grave	grave ^{bc}	viés de publicação altamente suspeito forte associação todos os potenciais fatores de confusão sugeririam um efeito espúrio e, mesmo assim, nenhum efeito foi observado. ^d	96 participantes	23 participantes	-	Ver comentário	⊕○○○ Muito baixa	IMPORTANTE
							-	24.0%		não combinado		
Análise da prevalência de <i>Olsenella uli</i> em amostras pós PQC (avaliado com: número de casos positivos)												
4	non-randomised studies	grave ^e	grave ^a	não grave	grave ^{bc}	forte associação todos os potenciais fatores de confusão sugeririam um efeito espúrio e, mesmo assim, nenhum efeito foi observado.	96 participantes	10 participantes	-	Ver comentário	⊕⊕⊕⊕ Moderada	CRÍTICO
							-	10.0%		não combinado		
Análise da prevalência de <i>Pyramidobacter piscolens</i> em amostras iniciais (avaliado com: número de casos positivos)												
5	non-randomised studies	não grave	muito grave ^f	não grave	grave ^c	associação muito forte todos os potenciais fatores de confusão sugeririam um efeito espúrio e, mesmo assim, nenhum efeito foi observado.	126 participantes	32 participantes	-	Ver comentário	⊕⊕⊕⊕ Alta	CRÍTICO
							-	25.0%		não combinado		
Análise da prevalência de <i>Pyramidobacter piscolens</i> em amostras pós PQC (avaliado com: número de casos positivos)												
5	non-randomised studies	não grave	grave ^a	não grave	grave ^{c,d}	todos os potenciais fatores de confusão sugeririam um efeito espúrio e, mesmo assim, nenhum efeito foi observado.	126 participantes	6 participantes	-	Ver comentário	⊕⊕⊕⊕ Moderada	CRÍTICO
							-	5.0%		não combinado		

CI: Confidence Interval

Explanations

- Foi observado uma alta heterogeneidade (25% > I² < 75%)
- Intervalo de confiança amplo
- Estudo com pequeno número de eventos
- Gráfico de funil assimétrico
- Risco de viés moderado de acordo com a ferramenta do Joanna Briggs Institute Appraisal
- Foi observado uma alta heterogeneidade (I² > 75%)

Certainty assessment							N.º de pacientes		Efeito		Certainty	Importância
N.º dos estudos	Delimitação do estudo	Risco de viés	Inconsistência	Evidência indireta	Imprecisão	Outras considerações	[intervenção]	[comparação]	Relativo (95% CI)	Absoluto (95% CI)		
Análise da prevalência de Bacteroidaceae [G-1] bacterium HMT 272 em amostras iniciais (avaliado com: número de casos positivos)												
8	non-randomised studies	não grave	grave ^a	não grave	grave ^{b,c}	forte associação todos os potenciais fatores de confusão sugeririam um efeito espúrio e, mesmo assim, nenhum efeito foi observado.	189 participantes	81 participantes	-	Ver comentário	⊕⊕⊕⊕ Alta	CRÍTICO
							-	43.0%		não combinado		
Análise da prevalência de Bacteroidaceae [G-1] bacterium HMT 272 em amostras pós PQC (avaliado com: número de casos positivos)												
8	non-randomised studies	não grave	grave ^a	não grave	grave ^{b,c}	forte associação todos os potenciais fatores de confusão sugeririam um efeito espúrio e, mesmo assim, nenhum efeito foi observado.	189 participantes	29 participantes	-	Ver comentário	⊕⊕⊕⊕ Alta	CRÍTICO
							-	15.0%		não combinado		
Análise da prevalência de Filifactor aloclis em amostras iniciais (avaliado com: número de casos positivos)												
7	non-randomised studies	não grave	muito grave ^e	não grave	grave ^{b,c}	viés de publicação altamente suspeito forte associação todos os potenciais fatores de confusão sugeririam um efeito espúrio e, mesmo assim, nenhum efeito foi observado. ^d	151 participantes	42 participantes	-	Ver comentário	⊕⊕⊕○ Baixa	IMPORTANTE
							-	28.0%		não combinado		
Análise da prevalência de Filifactor aloclis em amostras pós PQC (avaliado com: número de casos positivos)												
7	non-randomised studies	não grave	grave ^a	não grave	grave ^{b,c}	viés de publicação altamente suspeito forte associação todos os potenciais fatores de confusão sugeririam um efeito espúrio e, mesmo assim, nenhum efeito foi observado. ^d	151 participantes	20 participantes	-	Ver comentário	⊕⊕⊕○ Moderada	CRÍTICO
							-	13.0%		não combinado		
Análise da prevalência de Dialister pneumosintes em amostras iniciais (avaliado com: número de casos positivos)												
5	non-randomised studies	não grave	não grave	não grave	grave ^{b,c}	forte associação todos os potenciais fatores de confusão sugeririam um efeito espúrio e, mesmo assim, nenhum efeito foi observado.	109 participantes	20 participantes	-	Ver comentário	⊕⊕⊕⊕ Alta	CRÍTICO
							-	18.0%		não combinado		
Análise da prevalência de Dialister pneumosintes em amostras pós PQC (avaliado com: número de casos positivos)												
5	non-randomised studies	não grave	não grave	não grave	grave ^{b,c}	forte associação todos os potenciais fatores de confusão sugeririam um efeito espúrio e, mesmo assim, nenhum efeito foi observado.	109 participantes	12 participantes	-	Ver comentário	⊕⊕⊕⊕ Alta	CRÍTICO
							-	11.0%		não combinado		

CI: Confidence interval

Explanations

- a. Foi observado uma alta heterogeneidade (25% > I² < 75%)
b. Intervalo de confiança amplo
c. Estudo com pequeno número de eventos
d. Gráfico de funil assimétrico
e. Foi observado uma alta heterogeneidade (I² > 75%)

Certainty assessment							N: de pacientes		Efeito		Certainty	Importância
N: dos estudos	Delimitação do estudo	Risco de viés	Inconsistência	Evidência Indireta	Imprecisão	Outras considerações	[intervenção]	[comparação]	Relativo (95% CI)	Absoluto (95% CI)		
Análise da prevalência de Atopobium sp. HMT 416 em amostras iniciais (avaliado com: número de casos positivos)												
4	non-randomised studies	não grave	muito grave ^b	não grave	grave ^a	forte associação todos os potenciais fatores de confusão sugeririam um efeito espúrio e, mesmo assim, nenhum efeito foi observado.	121 participantes	15 participantes	-	Ver comentário	⊕⊕⊕⊖ Moderada	CRÍTICO
							-	12.0%		não combinado		
Análise da prevalência de Atopobium sp. HMT 416 em amostras pós PQC												
4	non-randomised studies	não grave	não grave	não grave	não grave	todos os potenciais fatores de confusão sugeririam um efeito espúrio e, mesmo assim, nenhum efeito foi observado.	121 participantes	2 participantes	-	Ver comentário	⊕⊕⊕⊕ Alta	CRÍTICO
							-	2.0%		não combinado		

CI: Confidence interval

Explanations

a. Gráfico de funil assimétrico

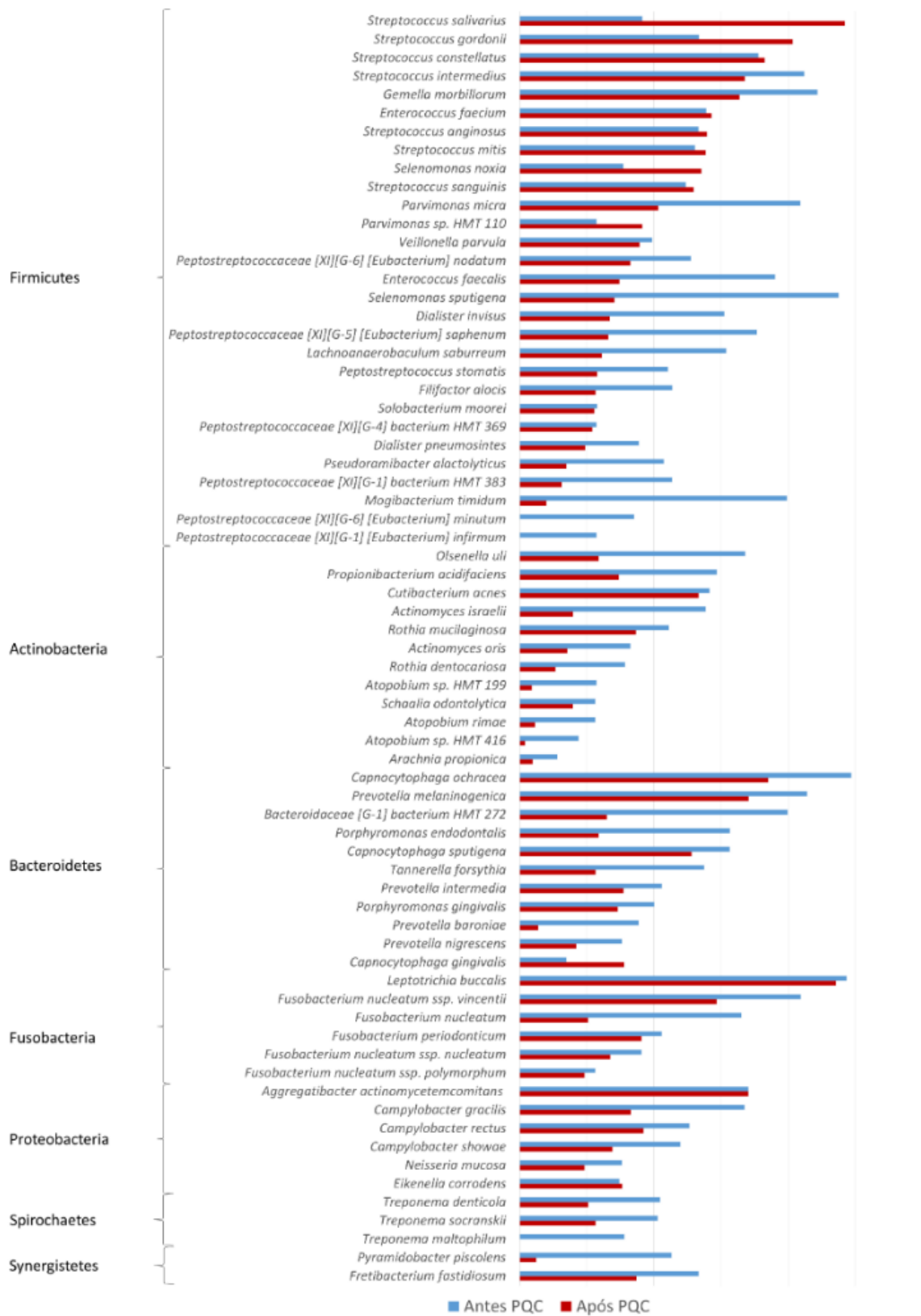
b. Foi observado uma alta heterogeneidade ($I^2 > 75\%$)

IC- Intervalo de confiança; Explicações: a. Foi observado uma alta heterogeneidade ($25\% > I^2 < 75\%$); b. A maioria dos estudos não tinham como objetivo principal identificar bactérias antes e após PQC; c. Intervalo de confiança amplo; d. Estudo com pequeno número de eventos; e. Gráfico de funil assimétrico; f. Risco de viés moderado de acordo com a ferramenta do Joanna Brigs Institute Appraisal; g. Foi observado uma alta heterogeneidade ($I^2 > 75\%$).

Fonte: a autora

A **Figura 5.3** apresenta a frequência de táxons bacterianos das amostras antes e após o preparo químico-cirúrgico (PQC). Em geral, após o PQC observou-se uma redução dos casos positivos para a maioria dos táxons bacterianos. Em contrapartida, algumas espécies apresentaram um aumento após o PQC, incluindo *Streptococcus constellatus*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Selenomonas noxia*, *Eikenella corrodens*, *Parvimonas* sp. HMT 110 e *Capnocytophaga gingivalis*.

Figura 5.3 - Táxons bacterianos detectados em amostras de canais radiculares colhidas antes e após o preparo químico-cirúrgico (PQC).



Fonte: a autora

5.1.2 Meta-análise

As figuras 5.4 a 5.12 apresentam os gráficos da meta-análise e do funil dos seguintes táxons bacterianos: *Atopobium* sp. HMT-416 (figura 5.4), *Bacteroidaceae* [G-1] bacterium HMT 272 (figura 5.5), *Dialister invisus* (figura 5.6), *Dialister pneumosintes* (figura 5.7), *Filifactor alocis* (figura 5.8), *Olsenella uli* (figura 5.9), *Pseudoramibacter alactolyticus* (figura 5.10), *Pyramidobacter piscolens* (figura 5.11) e *Solobacterium moorei* (figura 5.12). Bactérias não cultiváveis ou de difícil cultivo detectadas apenas uma ou duas vezes não foram incluídas na meta-análise (ex. *Fretibacterium fastidiosum*).

Figura 5.4 - Meta-análise de prevalência de *Atopobium* sp. HMT-416 detectado antes (S1) e após(S2) o preparo químico-cirúrgico



O gráfico de funil à esquerda representa a heterogeneidade entre os estudos em S1 e o da direita a de S2. Os quadrados e as linhas horizontais representam a prevalência estimada do estudo e intervalo de confiança (IC) de 95%, respectivamente. O tamanho das caixas quadradas é proporcional ao peso de cada estudo na meta-análise. O diamante representa a prevalência combinada e os ICs de 95% correspondentes. A alta heterogeneidade ($I^2 > 50\%$) fica claro pela disposição espalhada das caixas quadradas.

Fonte: A autora

Figura 5.5 - Meta-análise de prevalência de *Bacteroidaceae* [G-1] bacterium HMT 272 detectado antes (S1) e após (S2) o preparo químico-cirúrgico



O gráfico de funil à esquerda representa a heterogeneidade entre os estudos em S1 e o da direita a de S2. Os quadrados e as linhas horizontais representam a prevalência estimada do estudo e intervalo de confiança (IC) de 95%, respectivamente. O tamanho das caixas quadradas é proporcional ao peso de cada estudo na meta-análise. O diamante representa a prevalência combinada e os ICs de 95% correspondentes. A alta heterogeneidade ($I^2 > 50\%$) fica claro pela disposição espalhada das caixas quadradas.

Fonte: A autora

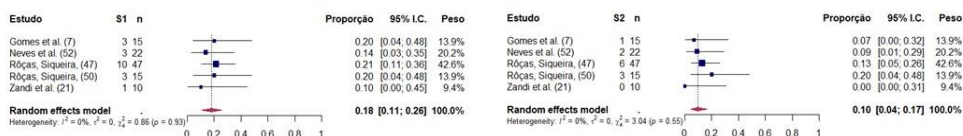
Figura 5.6 - Meta-análise de prevalência de *Dialister invisus* detectado antes (S1) e após (S2) o preparo químico-cirúrgico



O gráfico de funil à esquerda representa a heterogeneidade entre os estudos em S1 e o da direita a de S2. Os quadrados e as linhas horizontais representam a prevalência estimada do estudo e intervalo de confiança (IC) de 95%, respectivamente. O tamanho das caixas quadradas é proporcional ao peso de cada estudo na meta-análise. O diamante representa a prevalência combinada e os ICs de 95% correspondentes. A alta heterogeneidade ($I^2 > 50\%$) fica claro pela disposição espalhada das caixas quadradas.

Fonte: A autora

Figura 5.7 - Meta-análise de prevalência de *Dialister pneumosintes* detectado antes (S1) e após (S2) o preparo químico-cirúrgico



O gráfico de funil à esquerda representa a heterogeneidade entre os estudos em S1 e o da direita a de S2. Os quadrados e as linhas horizontais representam a prevalência estimada do estudo e intervalo de confiança (IC) de 95%, respectivamente. O tamanho das caixas quadradas é proporcional ao peso de cada estudo na meta-análise. O diamante representa a prevalência combinada e os ICs de 95% correspondentes. A alta heterogeneidade ($I^2 > 50\%$) fica claro pela disposição espalhada das caixas quadradas.

Fonte: A autora

Figura 5.8 - Meta-análise de prevalência de *Filifactor alocis* detectado antes (S1) e após (S2) o preparo químico-cirúrgico



O gráfico de funil à esquerda representa a heterogeneidade entre os estudos em S1 e o da direita a de S2. Os quadrados e as linhas horizontais representam a prevalência estimada do estudo e intervalo de confiança (IC) de 95%, respectivamente. O tamanho das caixas quadradas é proporcional ao peso de cada estudo na meta-análise. O diamante representa a prevalência combinada e os ICs de 95% correspondentes. A alta heterogeneidade ($I^2 > 50\%$) fica claro pela disposição espalhada das caixas quadradas.

Fonte: A autora

Figura 5.9 - Meta-análise de prevalência de *Olsenella uli* detectado antes (S1) e após (S2) o preparo químico-cirúrgico



O gráfico de funil à esquerda representa a heterogeneidade entre os estudos em S1 e o da direita a de S2. Os quadrados e as linhas horizontais representam a prevalência estimada do estudo e intervalo de confiança (IC) de 95%, respectivamente. O tamanho das caixas quadradas é proporcional ao peso de cada estudo na meta-análise. O diamante representa a prevalência combinada e os ICs de 95% correspondentes. A alta heterogeneidade ($I^2 > 50\%$) fica claro pela disposição espalhada das caixas quadradas.

Fonte: A autora

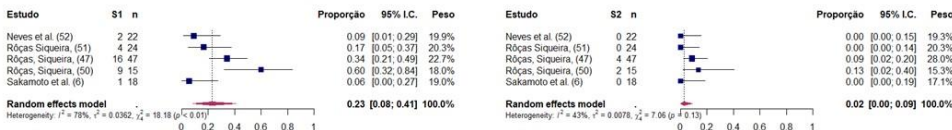
Figura 5.10 - Meta-análise de prevalência de *Pseudoramibacter alactolyticus* detectado antes (S1) e após (S2) o preparo químico-cirúrgico



O gráfico de funil à esquerda representa a heterogeneidade entre os estudos em S1 e o da direita a de S2. Os quadrados e as linhas horizontais representam a prevalência estimada do estudo e intervalo de confiança (IC) de 95%, respectivamente. O tamanho das caixas quadradas é proporcional ao peso de cada estudo na meta-análise. O diamante representa a prevalência combinada e os ICs de 95% correspondentes. A alta heterogeneidade ($I^2 > 50\%$) fica claro pela disposição espalhada das caixas quadradas.

Fonte: A autora

Figura 5.10 - Meta-análise de prevalência de *Pyramidobacter piscoleus* detectado antes (S1) e após (S2) o preparo químico-cirúrgico



O gráfico de funil à esquerda representa a heterogeneidade entre os estudos em S1 e o da direita a de S2. Os quadrados e as linhas horizontais representam a prevalência estimada do estudo e intervalo de confiança (IC) de 95%, respectivamente. O tamanho das caixas quadradas é proporcional ao peso de cada estudo na meta-análise. O diamante representa a prevalência combinada e os ICs de 95% correspondentes. A alta heterogeneidade ($I^2 > 50\%$) fica claro pela disposição espalhada das caixas quadradas.

Fonte: A autora

Figura 5.11 - Meta-análise de prevalência de *Solobacterium moorei* detectado antes (S1) e após (S2) o preparo químico-cirúrgico



O gráfico de funil à esquerda representa a heterogeneidade entre os estudos em S1 e o da direita a de S2. Os quadrados e as linhas horizontais representam a prevalência estimada do estudo e intervalo de confiança (IC) de 95%, respectivamente. O tamanho das caixas quadradas é proporcional ao peso de cada estudo na meta-análise. O diamante representa a prevalência combinada e os ICs de 95% correspondentes. A alta heterogeneidade ($I^2 > 50%$) fica claro pela disposição espalhada das caixas quadradas.

Fonte: A autora

6 DISCUSSÃO

O presente estudo aplicou pela primeira vez o método de NGS baseado em rRNA e DNA para a análise de bactérias potencialmente ativas nas infecções endodônticas; avaliou o metabolismo de bactérias específicas após o PQC pela razão rRNA/DNA dos ensaios de qPCR; e revisou sistematicamente as bactérias persistentes após o PQC. Para melhor organização e entendimento dessa sessão, optou-se por dividi-la em tópicos.

6.1 NGS baseado em rRNA e DNA para análise da comunidade bacteriana ativa nas infecções endodônticas primárias

O presente estudo usou o método de NGS baseado em rRNA e DNA para pesquisar bactérias ativas em infecções endodônticas. Embora a razão rRNA/DNA dos dados de NGS tenha sido amplamente aplicada em amostras ambientais (24,44,45), este foi o primeiro estudo a usar essa abordagem para explorar comunidades bacterianas ativas em canais radiculares de dentes com periodontite apical. Apesar do número limitado de amostras, o presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto dessa estratégia na busca de bactérias potencialmente patogênicas em infecções endodônticas, examinando, assim, amostras de rRNA e DNA.

No geral, a composição bacteriana dos canais radiculares foi semelhante no sequenciamento de DNA e rRNA. No entanto, alguns táxons foram encontrados apenas na análise baseada em DNA, sugerindo que DNA residual de células não viáveis foi amplificado. Estudos anteriores também mostraram que o DNA de bactérias mortas pode persistir nos canais radiculares e pode levar a uma superestimativa do número de táxons detectados (23). Da mesma forma, a presença de DNA contaminante em pontas de papel estéril pode fornecer resultados falso-positivos na análise do microbioma de amostras clínicas (117). Portanto, uma estratégia integrada de rRNA e DNA foi proposta como um método mais preciso para avaliar a atividade bacteriana e, assim, destacar a presença de células ativas em uma comunidade bacteriana (24,44–46).

Em geral, apenas parte das bactérias detectadas pelo DNA parecia estar metabolicamente ativa após a investigação das respectivas amostras de rRNA e cálculo da razão rRNA/DNA. Particularmente, a abundância de rRNA de Firmicutes não seguiu a respectiva abundância relativa na análise de DNA. Esse achado sugere que alguns membros desse filo podem não estar participando ativamente da infecção endodôntica, o que pode ser explicado pelo efeito de diversos fatores ecológicos nos canais radiculares infectados (118). Em dentes com necrose pulpar, é esperada uma diminuição da atividade dos colonizadores precoces do biofilme com um aumento concomitante de organismos anaeróbios (118). De fato, *Pseudoramibacter*, um gênero bacteriano anaeróbio estrito Gram-positivo, foi o membro mais dominante e ativo de Firmicutes, o que está de acordo com estudos anteriores de NGS baseados em DNA (15,16,36,119)

Da mesma forma, os gêneros mais abundantes e ativos nas amostras de canais radiculares incluíam organismos anaeróbios estritos Gram-negativos, como *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Bacteroidales* [G-2] e *Fusobacterium*. Estudos anteriores de NGS relataram *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium* entre os 5 gêneros mais abundantes em amostras endodônticas (8,13,15,17–19,34,36). No nível de espécie, *P. intermedia*, *P. endodontalis* e *F. nucleatum* foram considerados membros ativos nos canais radiculares de dentes com periodontite apical, o que é semelhante aos resultados de culturas anteriores ou análises moleculares.

A comparação entre a abundância bacteriana no nível de filo também revelou um ligeiro aumento de Actinobacteria, Sinergistetes e Spirochaetes nos dados de sequenciamento de rRNA. *Olsenella*, *Fretibacterium* e *Treponema* foram os gêneros representativos dos filios acima citados, respectivamente. Os táxons dominantes dentro desses gêneros incluem *Olsenella uli*, *Olsenella* sp. HMT 939 e *Olsenella* sp. HMT 809. Alguns táxons de baixa abundância também estavam ativos, incluindo *Fretibacterium fastidiosum*, *Fretibacterium* sp. HMT 358, *Treponema denticola* e *Treponema maltophilum*. Mais importante, a estratégia integrada de rRNA e DNA usada no presente estudo revelou a atividade de algumas espécies não cultivadas ou difíceis de cultivar.

Proteobacteria foi encontrada em abundância relativa baixa (< 1%) por ambas as análises de DNA e rRNA; *Campylobacter* foi um membro ativo representativo desse filo. Nossos dados contrastam com os de estudos anteriores que relataram o filo Proteobacteria como o mais abundante em infecções endodônticas (16,19,39,119). Essas discrepâncias

podem estar relacionadas a diferenças nos protocolos usados para coleta microbiológica do canal radicular, sequenciamento e análise de bioinformática, entre outros fatores (8,9).

No geral, a comunidade bacteriana ativa nos casos coletados era composta principalmente de membros de Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Synergistetes e Spirochaetes. Mais especificamente, a razão rRNA/DNA dos dados de NGS revelou a atividade de membros cultivados e não cultivados desses filos, sugerindo seu possível papel ativo na infecção no momento da coleta do canal radicular. No entanto, como a atividade bacteriana nos canais radiculares pode variar ao longo do tempo e sob mudanças ecológicas, estudos que incluam dentes com diferentes condições endodônticas devem ser realizados para encontrar achados mais conclusivos sobre o perfil das bactérias funcionais nas infecções endodônticas. Em conclusão, a abordagem integrada de NGS baseada em DNA e rRNA usada no presente estudo foi particularmente importante para o estudo da atividade de bactérias ainda não cultivadas ou de difícil cultura em infecções endodônticas.

6.2 Ensaio de qPCR baseados em rRNA e DNA para análise de bactérias ativas após o preparo químico-cirúrgico

Este estudo avaliou a atividade metabólica de bactérias específicas que persistiram após o preparo químico-cirúrgico. Um ponto forte deste estudo foi o método de análise bacteriana, que usou uma abordagem integrada de DNA e rRNA. Os genes 16S rRNA (DNA) foram usados como moldes para qPCR para estimar o número de bactérias, enquanto o rRNA (cDNA) foi usado como um indicador de viabilidade bacteriana. A correlação entre os dados de ambos os ensaios qPCR deu uma estimativa da atividade metabólica das bactérias nas amostras dos canais radiculares. No entanto, é importante notar que abordagens diferentes das mencionadas acima, como estratégias proteômicas para sequenciamento de peptídeos e identificação de proteínas, podem fornecer informações mais precisas sobre as respostas comportamentais das bactérias ao estresse imposto pelo preparo químico-cirúrgico. Os pontos fracos deste estudo incluem a análise de poucas espécies bacterianas em um tamanho de

amostra limitado, compreendendo apenas dentes unirradiculares. Os canais unirradiculares médios/ largos foram incluídos neste estudo por apresentarem as melhores condições para a coleta de amostras de canais radiculares, pois as pontas de papel podem atingir facilmente o comprimento de trabalho com melhor controle da assepsia. Além disso, o número limitado de espécies estudadas deveu-se ao pequeno volume de suspensão de ácidos nucleicos disponível após a extração. Recentemente, uma estratégia integrada de sequenciamento de última geração baseada em rRNA e DNA foi apresentada como uma abordagem mais sofisticada para a análise da atividade de diferentes táxons bacterianos em amostras de canais radiculares (120). No presente estudo, a comparação direta do ensaio de qPCR baseado em rRNA e a análise baseada em DNA de amostras de canal radicular revelou que *Bacteroidaceae* [G-1] *bacterium* HMT 272 persistiu ativo após o preparo químico-cirúrgico.

Os conceitos de sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo (VPP) costumam ser usados como medidas de desempenho para testes diagnósticos (121). No presente estudo, essas medidas foram dependentes do ensaio e da amostra. No geral, o qPCR baseado em DNA foi menos sensível do que o baseado em rRNA para a detecção de bactérias em infecções endodônticas. Esse achado pode ser explicado pelo fato de que bactérias ativas apresentam maior número de cópias de rRNA do que os respectivos genes 16S rRNA (DNA) (42). Um alto valor preditivo positivo (100%) foi encontrado para os ensaios de qPCR baseados em DNA específicos para *Bacteroidaceae* [G-1] *bacterium* HMT 272. No entanto, um baixo VPP (33%) foi encontrado para o ensaio específico para *Selenomonas* spp., indicando o risco de resultados falso-positivos ao pesquisar o DNA dessas espécies em amostras pós-instrumentação. Para este ensaio específico, 2 de 3 casos positivos para DNA foram negativos para rRNA, sugerindo que o qPCR baseado em DNA pode ter detectado células mortas após PQC. Esses achados estão de acordo com um estudo anterior comparando a capacidade da PCR baseada em rRNA e DNA na detecção de *Streptococcus* em canais radiculares (88). Esses dados sugerem que o uso de qPCR baseado somente em DNA pode prejudicar a análise precisa da suscetibilidade de espécies bacterianas específicas aos procedimentos endodônticos. Futuros estudos, incluindo um tamanho maior de amostra e diferentes táxons bacterianos, devem ser realizados para comparar a capacidade dos métodos baseados em rRNA e DNA em detectar patógenos endodônticos.

A abordagem integrada de qPCR baseada em rRNA e DNA foi particularmente importante para revelar a atividade de *Bacteroidaceae* [G-1] *bacterium* HMT 272, que é um

dos táxons não cultivados mais prevalentes em infecções endodônticas (32,50,52,53,122). Os ensaios de rRNA e DNA detectaram esse táxon em 50% e 40% das amostras iniciais, respectivamente, confirmando achados anteriores (50,53,122). Todas as amostras S1 positivas para *Bacteroidaceae* [G-1] *bacterium* HMT 272 ainda mostrou níveis detectáveis de DNA e rRNA em amostras S2. Os dados sobre a prevalência desse táxon em amostras pós-PQC são conflitantes (50,51,53). Essas discrepâncias podem estar relacionadas a diferenças nos protocolos utilizados para o preparo de canais radiculares e análises microbiológicas, entre outros fatores.

Em resumo, os ensaios de qPCR revelaram que *Bacteroidaceae* [G-1] *bacterium* HMT 272 persistiu metabolicamente ativo em canais radiculares após o preparo químico-cirúrgico. Todas as amostras DNA-positivas também foram rRNA-positivas para ensaios de qPCR de *Bacteroidaceae* [G-1] *bacterium* HMT 272. No entanto, qPCR baseado em DNA foi menos sensível do que o ensaio baseado em rRNA para detectar bactérias em amostras pós-instrumentação. Novos estudos devem avaliar se a carga bacteriana viável que persiste após procedimentos endodônticos teria impacto na taxa de sucesso clínico. Além disso, esse achado reforça a necessidade de se buscar estratégias mais eficazes para melhorar a desinfecção dos canais radiculares.

6.3 Natureza e prevalência de bactérias que persistem após o preparo químico-cirúrgico: uma revisão sistemática e meta-análise

A presente revisão sistemática explorou a natureza e prevalência das bactérias após o preparo químico-cirúrgico. Oito filos bacterianos foram encontrados nas amostras pós-preparo (em ordem decrescente de riqueza): Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Spirochaetes, Synergistetes e Saccharibacteria. Os pontos fortes desta revisão sistemática são os rigorosos critérios de inclusão e exclusão dos estudos. Além disso, a inclusão dos estudos com amostras iniciais e pós-instrumentação também foi importante para caracterizar a persistência bacteriana e descartar a possibilidade de contaminantes.

A análise molecular independente de cultura das amostras pós-instrumentação revelou uma alta riqueza dentro dos filos bacterianos, que incluiu espécies cultiváveis e muitos táxons bacterianos ainda não cultivados/difíceis de cultivar. Em geral, as taxas bacterianas presentes nas amostras iniciais foram reduzidas, mas não eliminada após o preparo químico-cirúrgico. Portanto, um amplo espectro de táxons bacterianos foi observado nas amostras pós-instrumentação. Curiosamente, a prevalência de algumas espécies aumentou após os procedimentos de desinfecção (*e.x.*, estreptococos, *Enterococcus faecium*, *Selenomonas noxia*, *Solobacterium moorei*, *Capnocytophaga gingivalis* e *Peptostreptococcaceae* [XI][G-4] HMT 369). Esses achados sugerem uma resistência desses taxóons aos procedimentos antimicrobianos atuais usados durante o preparo químico-cirúrgico. Portanto, futuros estudos devem investigar o papel dessas espécies nas infecções endodônticas persistentes e também sua susceptibilidade a novas estratégias antimicrobianas. O conhecimento da natureza das bactérias persistentes após as diferentes etapas do tratamento endodôntico é muito importante, pois elas têm o potencial para estabelecer uma infecção persistente no canal radicular e afetar o prognóstico do tratamento.

O número limitado de estudos incluídos representa um dos pontos fracos desta revisão. Além disso, os estudos apresentaram um tamanho de amostra relativamente pequeno e diferenças nos tipos de infecções endodônticas (primárias e secundárias), nos protocolos de coletas das amostras microbiológicas e nos métodos de análise bacteriana. Os estudos usaram diferentes métodos moleculares, com diferentes sensibilidades e especificidades, o que pode ter contribuído para a alta heterogeneidade encontrada nas meta-análises. Outro fator que pode ter contribuído para disparidade dos estudos foi o tipo da infecção endodôntica: infecção primária (14 estudos), infecção secundária (5 estudos) e os dois tipos de infecção (2 estudos). No entanto, devido ao número limitado de estudos incluídos nesta revisão sistemática, uma comparação direta entre os tipos de infecções ou técnicas moleculares não pode ser realizada. É importante ressaltar também as limitações inerentes aos métodos moleculares utilizados nos estudos. Como a maioria dos estudos usou o DNA bacteriano como alvo (usualmente o gene 16S rRNA), eles podem fornecer resultados falso-positivos na presença de DNA de células mortas (20). Para contornar essa limitação, alguns estudos têm usado estratégias moleculares baseadas no RNA ribossômico (rRNA) para detectar células viáveis (24,25,42).

O risco de viés da prevalência de bactérias persistentes após o preparo químico-cirúrgico foi conduzido por meio do “Joanna Briggs Institute Prevalence Critical Appraisal

Checklist”. Entre os 21 estudos, 13 foram avaliados com “baixo risco” (7,26,51–53,55,80,109,111,113–116) e 8 apresentaram risco moderado (6,21,47,50,70,81,110,112). A maioria dos estudos não descreveu o cálculo amostral (7,8,18,31,32,42–44,51,53,54), o que pode ter influenciado nos seus resultados (123). Os critérios de inclusão e exclusão foram detalhados na maioria dos estudos (7,21,26,47,51–53,55,70,80,111–114,116), enquanto outros descreveram apenas os critérios de inclusão (6,50,81,109,110). Além disso, alguns autores não descreveram detalhadamente as características de suas amostras (*e.g.*, idade, gênero e tipo de dente) (6,26,47,51–53,110,112). Outro ponto importante a ser observado nos estudos moleculares é o procedimento de desinfecção do campo operatório, para evitar a contaminação da amostra do canal radicular. Nesse contexto, seis estudos foram considerados de "alto risco" porque não realizaram/descreveram as amostras de controle negativo antes das coletas dos canais radiculares (50,81,112–115).

Para a avaliação da qualidade da evidência usamos o Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation (GRADE). O objetivo desta ferramenta é a avaliação da qualidade de todo o corpo de evidências, considerando outros fatores além da metodologia, o que pode impactar nas recomendações extraídas da revisão sistemática (124). A abordagem GRADE foi desenvolvida para avaliar questões relacionadas a intervenções (usando evidências de estudos de intervenção ou observacionais) e para testes diagnósticos. No entanto, existem várias extensões para a aplicação da metodologia GRADE. Embora não haja orientação formal para o GRADE em revisões sistemáticas de prevalência, há alguma orientação sobre o uso do GRADE para risco basal ou prognóstico geral (125). A falta dessa informação acaba prejudicando a avaliação da qualidade das evidências porque os autores que desenvolvem revisões sistemáticas de relevância não fazem essa avaliação, deixando os seus leitores sem saber a confiabilidade das evidências encontradas (126). Embora o número de estudos identificados que utilizaram o GRADE em particular seja pequeno, é recomendado que se faça a adoção desses métodos em revisões sistemáticas de dados de prevalência, pois esses exemplos ajudarão a contribuir para o design de orientações formais para esse tipo de dados no futuro (126).

Os dados moleculares do presente estudo confirmaram amplamente a alta abundância de Firmicutes em amostras de canais radiculares coletadas após o preparo químico-cirúrgico (3) . Além disso, a riqueza dentro desse filo foi destacada à medida que foram revelados os

membros difíceis de cultivar. Por exemplo, *Dialister* spp., *Solobacterium moorei*, *Pseudoramibacter alactolyticus* e *Filifactor alocis* só foram reconhecidos como possíveis patógenos endodônticos após o advento dos métodos moleculares (54). Dificuldades no cultivo podem ter subestimado a prevalência dessas espécies em estudos anteriores baseados em cultura. A prevalência das espécies acima mencionadas foi geralmente menor nas amostras pós-instrumentação quando comparada às amostras iniciais. Em contrapartida, a prevalência do *Solobacterium moorei* aumentou após o preparo químico-cirúrgico, sugerindo que esta espécie pode ser resistente às medidas antimicrobianas utilizadas durante o preparo dos canais radiculares. Esse fato pode também estar associado com a mudança do equilíbrio da microbiota em resposta aos desafios ambientais impostos pelo preparo químico-cirúrgico. Achados similares foram encontrados por outros membros do filo Firmicutes, incluindo principalmente estreptococos. As bactérias persistentes podem ter a habilidade de formar biofilmes aderidos à dentina, o que pode aumentar sua resistência à ação mecânica da irrigação e também à ação antimicrobiana dos irrigantes nas áreas não instrumentadas dos canais radiculares (3). Além disso, a habilidade dos estreptococos de invadir os túbulos dentinários e a exposição desses túbulos pelo preparo podem ter contribuído para a alta taxa de detecção dessas espécies nas amostras pós-instrumentação,

Um achado interessante nessa revisão foi a alta prevalência do grupo de *Streptococcus anginosus* (SAG), que inclui *S. anginosus*, *S. constellatus* e *S. intermedius*. Métodos moleculares foram úteis para a análise precisa dos membros do SAG, uma vez que os testes fenotípicos apresentam baixa sensibilidade para diferenciar essas espécies (127). As espécies do grupo SAG são os estreptococos mais predominantes em abscessos apicais agudos (128) e também são associados com a presença de abscessos em outros lugares do corpo (127). Embora as espécies SAG sejam cada vez mais reconhecidas como patógenos emergentes, seus fatores de patogenicidade ainda são mal compreendidos (128). Portanto, estudos futuros devem investigar o possível papel dessas espécies nas infecções endodônticas e também a sua suscetibilidade aos procedimentos antimicrobianos.

Bacteroidetes foi o segundo filo com maior número de espécies, com a presença de bactérias cultiváveis e não cultiváveis/difícil cultivo. *Bacteroidaceae* [G-1] *bacterium* HMT 272 foi comumente identificado nos canais radiculares antes do tratamento. A prevalência dessa espécie caiu drasticamente nas amostras pós-instrumentação, sugerindo que *Bacteroidaceae* [G-1] *bacterium* HMT 272 é altamente suscetível ao preparo químico-

cirúrgico. A presença de outras espécies anaeróbias previamente conhecidas por estudos baseados em cultura (e.g., *Capnocytophaga ochracea*, *Prevotella melaninogenica* e *Porphyromonas gingivalis*) também foi confirmada por métodos baseados em moléculas. Membros de Bacteroidetes (e.g., *P. gingivalis*) podem desempenhar um papel crítico nas infecções, pois podem modular a atividade de outras espécies e contribuir para a patogenicidade de toda a comunidade microbiana (129).

Dezenove espécies bacterianas pertenciam ao filo Actinobacteria, o terceiro filo em riqueza. Membros ainda não cultivados/difíceis de cultivar incluíam principalmente *Olsenella uli* e *Atopobium* sp. HMT-416. Embora a espécie *O. uli* tenha sido cultivada, esta foi incluída na meta-análise devido às dificuldades de isolamento direto de amostras de canais radiculares e de identificação fenotípica. A prevalência dos táxons acima mencionados após preparo químico-cirúrgico foi muito baixa. Em contraste, *Cutibacterium acnes* (anteriormente conhecido como *Propionibacterium acnes*) foi uma das espécies mais prevalentes em amostras pós-instrumentação. Recentemente, uma revisão sistemática mostrou que esta espécie estava associada a infecções persistentes/ secundárias (130). De fato, um estudo utilizando um ensaio de qPCR baseado em rRNA revelou que *C. acnes* persistiu ativo após o preparo dos canais radiculares, sendo uma possível fonte para o estabelecimento de infecções persistentes (116). No entanto, é importante notar que a implicação da persistência de bactérias após o preparo no prognóstico do tratamento ainda não foi determinada por estudos longitudinais.

Leptotrichia buccalis e *Fusobacterium nucleatum*, os principais membros do filo Fusobacteria, também foram encontradas entre as espécies mais prevalentes nas amostras pós-instrumentação. Essas espécies são consideradas cruciais para a formação de biofilme, pois atuam como “pontes” entre os colonizadores precoces e tardios, como estreptococos e espécies anaeróbias estritas (131). Os colonizadores tardios de um biofilme são geralmente membros de Bacteroidetes, Spirochaetes e Synergistetes. Nesse contexto, os métodos moleculares foram particularmente importantes para divulgar a prevalência das espécies de Spirochaetes e Synergistetes em amostras pós-instrumentação (70,120). *Fretibacterium fastidiosum* e *Pyramidobacter piscolens* foram os principais membros do filo Synergistetes. Embora recentemente cultivadas, as espécies de Synergistetes requerem condições muito especiais para o crescimento e geralmente são detectadas por métodos moleculares

independentes de cultura (127). Os presentes dados de estudos moleculares revelaram que a prevalência de *P. piscolens* em amostras pós-instrumentação foi muito baixa (2%), indicando a suscetibilidade desta espécie ao PQC. *F. fastidiosum* não foi incluído na meta-análise porque foi relatado em apenas dois estudos.

Estudos de sequenciamento mostraram que a comunidade bacteriana nos canais radiculares após o preparo químico-cirúrgico era diversa e incluía os componentes estruturais de um biofilme. Portanto, pode-se sugerir que a persistência de espécies bacterianas em canais radiculares pode estar relacionada à sua capacidade de interagir umas com as outras em uma comunidade, o que, por sua vez, pode aumentar sua capacidade de adaptação aos desafios impostos pelo preparo químico-cirúrgico. No entanto, apenas alguns estudos investigaram a composição de toda a comunidade que persistiu após a preparo químico-cirúrgico até o presente momento (6,7,21). Novos estudos usando sequenciamento de alto rendimento podem fornecer uma análise mais precisa dessa comunidade. Além disso, técnicas de sequenciamento de alto rendimento baseadas em RNA (transcriptômica) podem fornecer informações importantes não apenas sobre a composição da comunidade bacteriana, mas também sobre sua atividade, interações e patogenicidade.

No geral, os dados de métodos moleculares independentes de cultura confirmaram a presença de espécies cultiváveis em amostras pós-instrumentação, representadas principalmente por estreptococos, *L. buccalis*, *F. nucleatum* e *C. ochracea*. Mais especificamente, a meta-análise mostrou que a prevalência de táxons ainda não cultivados/difíceis de cultivar em amostras pós-instrumentação foi baixa ($\leq 17\%$), representados principalmente por *D. invisus*, *S. moorei*, *Bacteroidaceae* [G-1] *bacterium* HMT 272, *F. alocis* e *D. pneumosintes*. A prevalência da maioria dos táxons foi geralmente menor nas amostras pós-instrumentação do que nas amostras iniciais. Em contraste, a prevalência de alguns membros de Firmicutes, principalmente estreptococos, foi ligeiramente maior em amostras pos-instrumentação, sugerindo que essas espécies podem resistir a procedimentos de desinfecção endodôntica. No entanto, o significado clínico de bactérias que persistem após procedimentos endodônticos deve ser determinado por estudos clínicos longitudinais.

7 CONCLUSÃO

Diante das metodologias utilizadas e dos resultados obtidos, concluiu-se que:

- A comparação dos dados de NGS baseados em rRNA e DNA revelou que apenas parte das bactérias detectadas pelo DNA estava metabolicamente ativa nas infecções endodônticas primárias. A abordagem integrada de NGS baseada em rRNA e DNA foi particularmente importante para revelar a atividade de bactérias ainda não cultivadas ou difíceis de cultivar.
- Os ensaios de qPCR baseados em rRNA e DNA revelaram que *Bacteroidaceae* [G-1] *bacterium* HMT 272 permaneceu metabolicamente ativo nos canais radiculares, enquanto espécies do gênero *Selenomonas* sofreram uma redução do seu metabolismo após o preparo químico-cirúrgico.
- Os ensaios de qPCR baseados em DNA foram menos sensíveis do que os ensaios baseados em rRNA na análise microbiológica das amostras endodônticas.
- O ensaio de qPCR baseado em DNA teve um baixo risco de fornecer resultados falso-positivos na análise de *Bacteroidaceae* [G-1] *bacterium* HMT 272. Por outro lado, o ensaio de qPCR específico para *Selenomonas* spp. indicou um risco elevado de resultados falso-positivos em amostras pós-instrumentação.
- Bactérias ainda não cultivadas/difíceis de cultivar são geralmente encontradas em baixa prevalência em amostras pós-instrumentação, sendo representadas principalmente por membros dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. Futuros estudos clínicos ainda são necessários para uma melhor compreensão sobre a composição/ interação da comunidade bacteriana que persiste após o PQC e do seu significado clínico no prognóstico do tratamento.

REFERÊNCIAS¹

1. 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.
2. Ramachandran Nair PN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod.* 1987 Jan;13(1):29-39. doi: 10.1016/S0099-2399(87)80089-4.
3. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* 2008 Nov;34(11):1291-1301.e3. doi: 10.1016/j.joen.2008.07.028.
4. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 2010 Aug;36(8):1277-88. doi: 10.1016/j.joen.2010.04.007.
5. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota. *J Endod.* 2005 Jul;31(7):488-98. doi: 10.1097/01.don.0000157990.86638.49.
6. 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.
7. Gomes BP, Berber VB, Kokaras AS, Chen T, Paster BJ. Microbiomes of Endodontic-Periodontal Lesions before and after Chemomechanical Preparation. *J Endod.* 2015 Dec;41(12):1975-84. doi: 10.1016/j.joen.2015.08.022
8. Shin JM, Luo T, Lee KH, Guerreiro D, Botero TM, McDonald NJ, Rickard AH. Deciphering Endodontic Microbial Communities by Next-generation Sequencing. *J Endod.* 2018 Jul;44(7):1080-1087. doi: 10.1016/j.joen.2018.04.003.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

9. Manoil D, Al-Manei K, Belibasakis GN. A Systematic Review of the Root Canal Microbiota Associated with Apical Periodontitis: Lessons from Next-Generation Sequencing. *Proteomics Clin Appl*. 2020 May;14(3):e1900060. doi: 10.1002/prca.201900060.

10. Nakamura VC, Pinheiro ET, Prado LC, Silveira AC, Carvalho APL, Mayer MPA, Gavini G. Effect of ultrasonic activation on the reduction of bacteria and endotoxins in root canals: a randomized clinical trial. *Int Endod J*. 2018 Jan;51 Suppl 1:e12-e22. doi: 10.1111/iej.12783.

11. Carvalho APL, Nardello LCL, Fernandes FS, Bruno FP, Paz LR, Iglecias EF, Honório HM, Mayer MPA, Gavini G, Pinheiro ET. 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.

12. Harrington CT, Lin EI, Olson MT, Eshleman JR. Fundamentals of pyrosequencing. *Arch Pathol Lab Med*. 2013 Sep;137(9):1296-303. doi: 10.5858/arpa.2012-0463-RA.

13. Li L, Hsiao WW, Nandakumar R, Barbuto SM, Mongodin EF, Paster BJ, Fraser-Liggett CM, Fouad AF. Analyzing endodontic infections by deep coverage pyrosequencing. *J Dent Res*. 2010 Sep;89(9):980-4. doi: 10.1177/0022034510370026.

14. Siqueira JF Jr, Fouad AF, Rôças IN. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *J Oral Microbiol*. 2012;4. doi: 10.3402/jom.v4i0.10743.

15. Santos AL, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Jesus EC, Rosado AS, Tiedje JM. Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections. *PLoS One*. 2011;6(11):e28088. doi: 10.1371/journal.pone.0028088.

16. Siqueira JF Jr, Alves FR, Rôças IN. Pyrosequencing analysis of the apical root canal microbiota. *J Endod*. 2011 Nov;37(11):1499-503. doi: 10.1016/j.joen.2011.08.012.

17. Anderson AC, Al-Ahmad A, Elamin F, Jonas D, Mirghani Y, Schilhabel M, Karygianni L, Hellwig E, Rehman A. Comparison of the bacterial composition and structure in symptomatic and asymptomatic endodontic infections associated with root-filled teeth using pyrosequencing. *PLoS One*. 2013 Dec 30;8(12):e84960. doi: 10.1371/journal.pone.0084960.

18. Hong BY, Lee TK, Lim SM, Chang SW, Park J, Han SH, Zhu Q, Safavi KE, Fouad AF, Kum KY. Microbial analysis in primary and persistent endodontic infections by using pyrosequencing. *J Endod.* 2013 Sep;39(9):1136-40. doi: 10.1016/j.joen.2013.05.001.

19. Keskin C, Demiryürek EÖ, Onuk EE. Pyrosequencing Analysis of Cryogenically Ground Samples from Primary and Secondary/Persistent Endodontic Infections. *J Endod.* 2017 Aug;43(8):1309-1316. doi: 10.1016/j.joen.2017.03.019.

20. Tzanetakakis GN, Azcarate-Peril MA, Zachaki S, Panopoulos P, Kontakiotis EG, Madianos PN, Divaris K. Comparison of Bacterial Community Composition of Primary and Persistent Endodontic Infections Using Pyrosequencing. *J Endod.* 2015 Aug;41(8):1226-33. doi: 10.1016/j.joen.2015.03.010.

21. Zandi H, Kristoffersen AK, Ørstavik D, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Enersen M. Microbial Analysis of Endodontic Infections in Root-filled Teeth with Apical Periodontitis before and after Irrigation Using Pyrosequencing. *J Endod.* 2018 Mar;44(3):372-378. doi: 10.1016/j.joen.2017.11.019.

22. Loozen G, Boon N, Pauwels M, Quiryneen M, Teughels W. Live/dead real-time polymerase chain reaction to assess new therapies against dental plaque-related pathologies. *Mol Oral Microbiol.* 2011 Aug;26(4):253-61. doi: 10.1111/j.2041-1014.2011.00615.x.

23. Brundin M, Figdor D, Sundqvist G, Sjögren U. DNA binding to hydroxyapatite: A potential mechanism for preservation of microbial DNA. *Journal of Endodontics.* 2013;39(2):211-6.

24. Campbell BJ, Yu L, Heidelberg JF, Kirchman DL. Activity of abundant and rare bacteria in a coastal ocean. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Aug 2;108(31):12776-81. doi: 10.1073/pnas.1101405108. Epub 2011 Jul 18. PMID: 21768380; PMCID: PMC3150899.

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

26. Pinheiro ET, Candeiro GT, Teixeira SR, Shin RC, Prado LC, Gavini G, Mayer MP. RNA-based Assay Demonstrated *Enterococcus faecalis* Metabolic Activity after Chemomechanical Procedures. *J Endod.* 2015 Sep;41(9):1441-4. doi: 10.1016/j.joen.2015.04.020.
27. Nardello LCL. Análise da atividade metabólica de bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção: estudo molecular baseado em RNA e DNA. [dissertação] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. [citado 30 jan. 2022]. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23156/tde-12062018-094527/pt-br.php>
28. Bruno FP. Prevalência, quantificação e viabilidade de *Propionibacterium acnes* nos canais radiculares de dentes com periodontite apical antes e após os procedimentos endodônticos de desinfecção: estudo molecular baseado em RNA e DNA. [dissertação] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. [citado 30 jan. 2022]. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23156/tde-06112018-085241/pt-br.php>
29. Fernandes FS. *Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas primárias: prevalência, fatores de virulência e suscetibilidade aos procedimentos endodônticos. [dissertação] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Baura; 2019. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25147/tde-20112019-203848/pt-br.php>
30. Sundqvist, G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Umeå, Sweden: Dept. of Oral Microbiology, University of Umeå, 1976.
31. Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res.* 1981 Dec;89(6):475-84. doi: 10.1111/j.1600-0722.1981.tb01711.x.
32. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 2009 Nov;88(11):969-81. doi: 10.1177/0022034509346549.
33. Bouillaguet S, Manoil D, Girard M, Louis J, Gaia N, Leo S, Schrenzel J, Lazarevic V. Root Microbiota in Primary and Secondary Apical Periodontitis. *Front Microbiol.* 2018 Oct 9;9:2374. doi: 10.3389/fmicb.2018.02374.
34. Hsiao WW, Li KL, Liu Z, Jones C, Fraser-Liggett CM, Fouad AF. Microbial transformation from normal oral microbiota to acute endodontic infections. *BMC Genomics.* 2012 Jul 28;13:345. doi: 10.1186/1471-2164-13-345.

35. İriboz E, Arıcan Öztürk B, Kolukırcık M, Karacan I, Sazak Öveçoğlu H. Detection of the unknown components of the oral microflora of teeth with periapical radiolucencies in a Turkish population using next-generation sequencing techniques. *Int Endod J.* 2018 Dec;51(12):1349-1357. doi: 10.1111/iej.12956.
36. Ozok AR, Persoon IF, Huse SM, Keijser BJ, Wesselink PR, Crielaard W, Zaura E. Ecology of the microbiome of the infected root canal system: a comparison between apical and coronal root segments. *Int Endod J.* 2012 Jun;45(6):530-41. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.02006.x. Epub 2012 Jan 17.
37. Persoon IF, Buijs MJ, Özok AR, Crielaard W, Krom BP, Zaura E, Brandt BW. The mycobiome of root canal infections is correlated to the bacteriome. *Clin Oral Investig.* 2017 Jun;21(5):1871-1881. doi: 10.1007/s00784-016-1980-3.
38. Qian W, Ma T, Ye M, Li Z, Liu Y, Hao P. Microbiota in the apical root canal system of tooth with apical periodontitis. *BMC Genomics.* 2019 Apr 4;20(Suppl 2):189. doi: 10.1186/s12864-019-5474-y.
39. Sánchez-Sanhueza G, Bello-Toledo H, González-Rocha G, Gonçalves AT, Valenzuela V, Gallardo-Escárate C. Metagenomic study of bacterial microbiota in persistent endodontic infections using Next-generation sequencing. *Int Endod J.* 2018 Dec;51(12):1336-1348. doi: 10.1111/iej.12953.
40. Vengerfeldt V, Špilka K, Saag M, Preem JK, Oopkaup K, Truu J, Mändar R. Highly diverse microbiota in dental root canals in cases of apical periodontitis (data of illumina sequencing). *J Endod.* 2014 Nov;40(11):1778-83. doi: 10.1016/j.joen.2014.06.017.
41. Simón-Soro A, Guillen-Navarro M, Mira A. Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *J Oral Microbiol.* 2014 Oct 24;6:25443. doi: 10.3402/jom.v6.25443.
42. 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.
43. Jones SE, Lennon JT. Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Mar 30;107(13):5881-6. doi: 10.1073/pnas.0912765107.

44. Campbell BJ, Kirchman DL. Bacterial diversity, community structure and potential growth rates along an estuarine salinity gradient. *ISME J.* 2013 Jan;7(1):210-20. doi: 10.1038/ismej.2012.93.
45. Gaidos E, Rusch A, Ilardo M. Ribosomal tag pyrosequencing of DNA and RNA from benthic coral reef microbiota: community spatial structure, rare members and nitrogen-cycling guilds. *Environ Microbiol.* 2011 May;13(5):1138-52. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02392.x.
46. Mira Miralles M, Maestre-Carballa L, Lluesma-Gomez M, Martinez-Garcia M. High-Throughput 16S rRNA Sequencing to Assess Potentially Active Bacteria and Foodborne Pathogens: A Case Example in Ready-to-Eat Food. *Foods.* 2019 Oct 11;8(10):480. doi: 10.3390/foods8100480.
47. 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.
48. 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.
49. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Prevalence of new candidate pathogens *Prevotella baroniae*, *Prevotella multisaccharivorax* and as-yet-uncultivated *Bacteroidetes* clone X083 in primary endodontic infections. *J Endod.* 2009 Oct;35(10):1359-62. doi: 10.1016/j.joen.2009.05.033.
50. 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.
51. Rôças IN, Siqueira JF Jr. In vivo antimicrobial effects of endodontic treatment procedures as assessed by molecular microbiologic techniques. *J Endod.* 2011 Mar;37(3):304-10. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.003.
52. Neves MA, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Clinical antibacterial effectiveness of the self-adjusting file system. *Int Endod J.* 2014 Apr;47(4):356-65. doi: 10.1111/iej.12151.

53. 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.
54. Siqueira JF Jr, Rôças IN. The Oral Microbiota in Health and Disease: An Overview of Molecular Findings. *Methods Mol Biol.* 2017;1537:127-138. doi: 10.1007/978-1-4939-6685-1_7.
55. Zandi H, Rodrigues RC, Kristoffersen AK, Enersen M, Mdala I, Ørstavik D, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Antibacterial Effectiveness of 2 Root Canal Irrigants in Root-filled Teeth with Infection: A Randomized Clinical Trial. *J Endod.* 2016 Sep;42(9):1307-13. doi: 10.1016/j.joen.2016.06.006.
56. 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.
57. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Optimising single-visit disinfection with supplementary approaches: a quest for predictability. *Aust Endod J.* 2011 Dec;37(3):92-8. doi: 10.1111/j.1747-4477.2011.00334.x.
58. 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.
59. Pega J, Rizzo S, Pérez CD, Rossetti L, Díaz G, Ruzal SM, Nanni M, Descalzo AM. Effect of the addition of phytosterols and tocopherols on *Streptococcus thermophilus* robustness during industrial manufacture and ripening of a functional cheese as evaluated by qPCR and RT-qPCR. *Int J Food Microbiol.* 2016 Sep 2;232:117-25. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.003.
60. 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] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. [citado 30 jan. 2022]. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23156/tde-26082021-105258/en.php>

61. PRADO LC. Estudo in vivo da susceptibilidade de bactérias Gram-positivas após procedimentos químico-cirúrgico e medicação intracanal pelo método de reação de cadeia de polimerase baseado em DNA e RNA. [dissertação] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. [citado 30 jan. 2022]. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23145/tde-17062015-123158/pt-br.php>
62. Stewart PS, Rayner J, Roe F, Rees WM. Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *J Appl Microbiol.* 2001 Sep;91(3):525-32. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01413.x.
63. Peters OA, Schönenberger K, Laib A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int Endod J.* 2001 Apr;34(3):221-30. doi: 10.1046/j.1365-2591.2001.00373.x.
64. Paiva SS, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC, Rachid CT, Rosado AS. Molecular microbiological evaluation of passive ultrasonic activation as a supplementary disinfecting step: a clinical study. *J Endod.* 2013 Feb;39(2):190-4. doi: 10.1016/j.joen.2012.09.014.
65. Relman DA, Falkow S. Identification of uncultured microorganisms: expanding the spectrum of characterized microbial pathogens. *Infect Agents Dis.* 1992 Oct;1(5):245-53.
66. 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.
67. Relman DA. Emerging infections and newly-recognised pathogens. *Neth J Med.* 1997 May;50(5):216-20. doi: 10.1016/s0300-2977(97)00016-8.
68. Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L, Bagg J. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol.* 2001 Sep;39(9):3282-9. doi: 10.1128/JCM.39.9.3282-3289.2001.
69. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod.* 2005 Jun;31(6):411-23. doi: 10.1097/01.don.0000157989.44949.26.

70. 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.
71. Carvalho APL. Avaliação microbiológica de um protocolo de tratamento endodôntico utilizando procedimentos complementares de desinfecção após o preparo químico-cirúrgico em dentes com periodontite apical. [tese] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. [citado 30 jan. 2022]. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23156/tde-30042019-150222/pt-br.php>.
72. Cazares R XR. Efeito da ativação ultrassônica da pasta de hidróxido de cálcio na atividade metabólica de bactérias em canais radiculares: Estudo clínico randomizado. [tese] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. [citado 30 jan. 2022]. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23134/tde-08042019-162304/pt-br.php>
73. 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] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. [citado 30 jan. 2022]. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23156/tde-08072020-132221/pt-br.php>.
74. Carvalho APL. Avaliação microbiológica de um protocolo de tratamento endodôntico utilizando procedimentos complementares de desinfecção após o preparo químico-cirúrgico em dentes com periodontite apical. [tese] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. [citado 30 jan. 2022]. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23156/tde-30042019-150222/pt-br.php>.
75. Schneider SW. A comparison of canal preparations in straight and curved root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1971 Aug;32(2):271-5. doi: 10.1016/0030-4220(71)90230-1.
76. Herlemann DP, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* 2011 Oct;5(10):1571-9. doi: 10.1038/ismej.2011.41.

77. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010 May;7(5):335-6. doi: 10.1038/nmeth.f.303.
78. Munn Z, Moola S, Riitano D, Lisy K. The development of a critical appraisal tool for use in systematic reviews addressing questions of prevalence. *Int J Health Policy Manag*. 2014 Aug 13;3(3):123-8. doi: 10.15171/ijhpm.2014.71.
79. Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev*. 2016 Dec 5;5(1):210. doi: 10.1186/s13643-016-0384-4.
80. Ferreira NS, Martinho FC, Cardoso FG, Nascimento GG, Carvalho CA, Valera MC. Microbiological profile resistant to different intracanal medications in primary endodontic infections. *J Endod*. 2015 Jun;41(6):824-30. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.031.
81. Schirmer JF, Liebenow AL, Braun G, Wittmer A, Hellwig E, Al-Ahmad A. Detection and eradication of microorganisms in root-filled teeth associated with periradicular lesions: an in vivo study. *J Endod*. 2007 May;33(5):536-40. doi: 10.1016/j.joen.2007.01.012.
82. Munn Z, Tufanaru C, Aromataris E. JBI's systematic reviews: data extraction and synthesis. *Am J Nurs*. 2014 Jul;114(7):49-54. doi: 10.1097/01.NAJ.0000451683.66447.89. PMID: 25742352.
83. Dutra KL, Haas LF, Zimmermann GS, Melo G, Minamisako MC, Flores-Mir C, Corrêa M. Prevalence of radiographic findings on jaws exposed to antiresorptive therapy: a meta-analysis. *Dentomaxillofac Radiol*. 2019 Mar;48(3):20180112. doi: 10.1259/dmfr.20180112.
84. Guyatt G, Oxman AD, Akl EA, Kunz R, Vist G, Brozek J, Norris S, Falck-Ytter Y, Glasziou P, DeBeer H, Jaeschke R, Rind D, Meerpohl J, Dahm P, Schünemann HJ. GRADE guidelines: 1. Introduction-GRADE evidence profiles and summary of findings tables. *J Clin Epidemiol*. 2011 Apr;64(4):383-94. doi: 10.1016/j.jclinepi.2010.04.026.

85. Paiva SS, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC, Rachid CT, Rosado AS. Clinical antimicrobial efficacy of NiTi rotary instrumentation with NaOCl irrigation, final rinse with chlorhexidine and interappointment medication: a molecular study. *Int Endod J*. 2013 Mar;46(3):225-33. doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02111.x.
86. Rodrigues RCV, Zandi H, Kristoffersen AK, Enersen M, Mdala I, Ørstavik D, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Influence of the Apical Preparation Size and the Irrigant Type on Bacterial Reduction in Root Canal-treated Teeth with Apical Periodontitis. *J Endod*. 2017 Jul;43(7):1058-1063. doi: 10.1016/j.joen.2017.02.004.
87. Neves MA, Provenzano JC, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Clinical Antibacterial Effectiveness of Root Canal Preparation with Reciprocating Single-instrument or Continuously Rotating Multi-instrument Systems. *J Endod*. 2016 Jan;42(1):25-9. doi: 10.1016/j.joen.2015.09.019.
88. 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.
89. Kim SY, Shin Y, Lee CY, Jung IY. In vivo quantitative evaluation of live and dead bacteria in root canal infection by using propidium monoazide with real-time PCR. *J Endod*. 2013 Nov;39(11):1359-63. doi: 10.1016/j.joen.2013.05.004.
90. Zandi H, Petronijevic N, Mdala I, Kristoffersen AK, Enersen M, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Ørstavik D. Outcome of Endodontic Retreatment Using 2 Root Canal Irrigants and Influence of Infection on Healing as Determined by a Molecular Method: A Randomized Clinical Trial. *J Endod*. 2019 Sep;45(9):1089-1098.e5. doi: 10.1016/j.joen.2019.05.021.
91. Karataş E, Ayaz N, Uluköylü E, Baltacı MÖ, Adigüzel A. Effect of final irrigation with sodium hypochlorite at different temperatures on postoperative pain level and antibacterial activity: a randomized controlled clinical study. *J Appl Oral Sci*. 2021 Feb 10;29:e20200502. doi: 10.1590/1678-7757-2020-0502.
92. Asnaashari M, Ashraf H, Rahmati A, Amini N. A comparison between effect of photodynamic therapy by LED and calcium hydroxide therapy for root canal disinfection against *Enterococcus faecalis*: A randomized controlled trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017 Mar;17:226-232. doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.12.009.

93. Donyavi Z, Ghahari P, Esmaeilzadeh M, Kharazifard M, Yousefi-Mashouf R. Antibacterial Efficacy of Calcium Hydroxide and Chlorhexidine Mixture for Treatment of Teeth with Primary Endodontic Lesions: A Randomized Clinical Trial. *Iran Endod J*. 2016 Fall;11(4):255-260. doi: 10.22037/iej.2016.1.
94. Garcez AS, Nuñez SC, Hamblim MR, Suzuki H, Ribeiro MS. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. *J Endod*. 2010 Sep;36(9):1463-6. doi: 10.1016/j.joen.2010.06.001.
95. Pourhajibagher M, Ghorbanzadeh R, Parker S, Chiniforush N, Bahador A. The evaluation of cultivable microbiota profile in patients with secondary endodontic infection before and after photo-activated disinfection. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017 Jun;18:198-203. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.02.013.
96. 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*. 2007 Jul;104(1):122-30. doi: 10.1016/j.tripleo.2007.01.027
97. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BP. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Aug;23(4):282-90. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00425.x.
98. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Dec;22(6):411-8. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00379.x.
99. Rabello DGD, Corazza BJM, Ferreira LL, Santamaria MP, Gomes APM, Martinho FC. Does supplemental photodynamic therapy optimize the disinfection of bacteria and endotoxins in one-visit and two-visit root canal therapy? A randomized clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017 Sep;19:205-211. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.06.005.
100. Pourhajibagher M, Bahador A. Diagnostic accuracy of multiplex real-time PCR approaches compared with cultivation -based detection methods: Monitoring the endopathogenic microbiota pre and post photo-activated disinfection. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018 Jun;22:140-146. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.03.003.

101. Kist S, Kollmuss M, Jung J, Schubert S, Hickel R, Huth KC. Comparison of ozone gas and sodium hypochlorite/chlorhexidine two-visit disinfection protocols in treating apical periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Investig*. 2017 May;21(4):995-1005. doi: 10.1007/s00784-016-1849-5.
102. Gueorgieva TG, Gergova RT. Investigation of antibacterial activity of ND: YAG - laser and standard endodontic treatment. *J of IMAB*. 2021 Apr-Jun;27(2):3736-3740. DOI: 10.5272/jimab.2021272.3736
103. Gueorgieva T, Gergova R. Comparative study of antibacterial activity of photoactivated disinfection with fotosan and standard endodontic treatment. *J of IMAB*. 2021 Apr-Jun;27(2):3712-3717. DOI: 10.5272/jimab.2021272.3712
104. Bebek B, Bago I, Skaljic G, Plecko V, Miletić I, Anić I. Antimicrobial effect of 0.2% chlorhexidine in infected root canals. *Coll Antropol*. 2009 Dec;33(4):1159-63.
105. Ballal NV, Gandhi P, Shenoy PA, Shenoy Belle V, Bhat V, Rechenberg DK, Zehnder M. Safety assessment of an etidronate in a sodium hypochlorite solution: randomized double-blind trial. *Int Endod J*. 2019 Sep;52(9):1274-1282. doi: 10.1111/iej.13129.
106. Al-Ahmad A, Pelz K, Schirmmeister JF, Hellwig E, Pukall R. Characterization of the first oral vagococcus isolate from a root-filled tooth with periradicular lesions. *Curr Microbiol*. 2008 Sep;57(3):235-8. doi: 10.1007/s00284-008-9182-0.
107. Siqueira JF Jr, Paiva SS, Rôças IN. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *J Endod*. 2007 May;33(5):541-7. doi: 10.1016/j.joen.2007.01.008.
108. Ito Y, Sato T, Yamaki K, Mayanagi G, Hashimoto K, Shimauchi H, Takahashi N. Microflora profiling of infected root canal before and after treatment using culture-independent methods. *J Microbiol*. 2012 Feb;50(1):58-62. doi: 10.1007/s12275-012-0459-4.
109. Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Oct;23(5):384-90. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00440.x.
110. Stojanović N, Krunić J, Popović B, Stojičić S, Zivković S. Prevalence of *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis* in infected root canals and their susceptibility to endodontic treatment procedures: a molecular study. *Srp Arh Celok Lek*. 2014 Sep-Oct;142(9-10):535-41. doi: 10.2298/sarh1410535s.

111. Rodrigues RC, Antunes HS, Neves MA, Siqueira JF Jr, Rôças IN. Infection Control in Retreatment Cases: In Vivo Antibacterial Effects of 2 Instrumentation Systems. *J Endod.* 2015 Oct;41(10):1600-5. doi: 10.1016/j.joen.2015.06.005.
112. Cavalli D, Toia CC, Flores Orozco EI, Khoury RD, Cardoso FGDR, Alves MC, Carvalho CAT, Valera MC. Effectiveness in the Removal of Endotoxins and Microbiological Profile in Primary Endodontic Infections Using 3 Different Instrumentation Systems: A Randomized Clinical Study. *J Endod.* 2017 Aug;43(8):1237-1245. doi: 10.1016/j.joen.2017.03.032.
113. da Silva CC, Chaves Júnior SP, Pereira GLD, Fontes KBFDC, Antunes LAA, Póvoa HCC, Antunes LS, Iorio NLPP. Antimicrobial Photodynamic Therapy Associated with Conventional Endodontic Treatment: A Clinical and Molecular Microbiological Study. *Photochem Photobiol.* 2018 Mar;94(2):351-356. doi: 10.1111/php.12869.
114. Orozco EIF, Toia CC, Cavalli D, Khoury RD, Cardoso FGDR, Bresciani E, Valera MC. Effect of passive ultrasonic activation on microorganisms in primary root canal infection: a randomized clinical trial. *J Appl Oral Sci.* 2019 Nov 28;28:e20190100. doi: 10.1590/1678-7757-2019-0100.
115. Karataş E, Baltacı MÖ, Uluköylü E, Adıgüzel A. Antibacterial effectiveness of calcium hydroxide alone or in combination with Ibuprofen and Ciprofloxacin in teeth with asymptomatic apical periodontitis: a randomized controlled clinical study. *Int Endod J.* 2020 Jun;53(6):742-753. doi: 10.1111/iej.13277.
116. Nardello LCL, Vilela BG, Fernandes FS, Bruno FP, Carvalho APL, Cazares RXR, Nascimento LCP, Honório HM, Ando ES, Mayer MPA, Gavini G, Pinheiro ET. Analysis of Active Bacteria Persisting after Chemomechanical Procedures: An RNA- and DNA-based Molecular Study. *J Endod.* 2020 Nov;46(11):1570-1576. doi: 10.1016/j.joen.2020.08.004.
117. van der Horst J, Buijs MJ, Laine ML, Wismeijer D, Loos BG, Crielaard W, Zaura E. Sterile paper points as a bacterial DNA-contamination source in microbiome profiles of clinical samples. *J Dent.* 2013 Dec;41(12):1297-301. doi: 10.1016/j.jdent.2013.10.008.
118. Figdor D, Sundqvist G. A big role for the very small--understanding the endodontic microbial flora. *Aust Dent J.* 2007 Mar;52(1 Suppl):S38-51. doi: 10.1111/j.1834-7819.2007.tb00524.x.

119. Siqueira JF Jr, Antunes HS, Rôças IN, Rachid CT, Alves FR. Microbiome in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-Treatment Apical Periodontitis. *PLoS One*. 2016 Sep 30;11(9):e0162887. doi: 10.1371/journal.pone.0162887.
120. Nardello LC, Amado PP, Franco DC, Cazares RX, Nogales CG, Mayer MP, et al. Next Generation Sequencing to Assess Potentially Active Bacteria in Endodontic Infections. *Journal of Endodontics* [Internet]. 2020;46(8):1105–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.05.004>
121. 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.
122. Siqueira JF Jr, Rôças IN. The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent Res*. 2009 Jan;88(1):61-5. doi: 10.1177/0022034508328124.
123. Shahravan A, Haghdoust AA, Rad M, Hashemipoor M, Sharifi M. Sample size calculation of clinical trials published in two leading endodontic journals. *Iran Endod J*. 2014 Winter;9(1):56-60..
124. Guyatt GH, Oxman AD, Kunz R, Vist GE, Falck-Ytter Y, Schünemann HJ; GRADE Working Group. What is "quality of evidence" and why is it important to clinicians? *BMJ*. 2008 May 3;336(7651):995-8. doi: 10.1136/bmj.39490.551019.BE.
125. Guyatt GH, Oxman AD, Vist GE, Kunz R, Falck-Ytter Y, Alonso-Coello P, Schünemann HJ; GRADE Working Group. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ*. 2008 Apr 26;336(7650):924-6. doi: 10.1136/bmj.39489.470347.AD.
126. Borges Migliavaca C, Stein C, Colpani V, Barker TH, Munn Z, Falavigna M; Prevalence Estimates Reviews – Systematic Review Methodology Group (PERSyst). How are systematic reviews of prevalence conducted? A methodological study. *BMC Med Res Methodol*. 2020 Apr 26;20(1):96. doi: 10.1186/s12874-020-00975-3.
127. Asam D, Spellerberg B. Molecular pathogenicity of *Streptococcus anginosus*. *Mol Oral Microbiol*. 2014 Aug;29(4):145-55. doi: 10.1111/omi.12056.
128. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Microbiology and treatment of acute apical abscesses. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Apr;26(2):255-73. doi: 10.1128/CMR.00082-12.

129. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Oct;10(10):717-25. doi: 10.1038/nrmicro2873.
130. Dioguardi M, Alovise M, Crincoli V, Aiuto R, Malagnino G, Quarta C, Laneve E, Sovereto D, Lo Russo L, Troiano G, Lo Muzio L. Prevalence of the Genus *Propionibacterium* in Primary and Persistent Endodontic Lesions: A Systematic Review. *J Clin Med*. 2020 Mar 9;9(3):739. doi: 10.3390/jcm9030739.
131. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jul;8(7):471-80. doi: 10.1038/nrmicro2381.
132. Qian XB, Chen T, Xu YP, Chen L, Sun FX, Lu MP, Liu YX. A guide to human microbiome research: study design, sample collection, and bioinformatics analysis. *Chin Med J (Engl)*. 2020 Aug 5;133(15):1844-1855. doi: 10.1097/CM9.0000000000000871. PMID: 32604176; PMCID: PMC7469990.

APÊNDICE A – Coletas Microbiológicas dos Canais Radiculares

Para realização das coletas microbiológicas dos canais radiculares, é necessário realizar inicialmente um protocolo de desinfecção do campo operatório, seguindo os passos descritos abaixo:

1. Após a anestesia do dente, realizar o isolamento absoluto com lençol de borracha, grampo metálico e barreira gengival.
2. Com uma broca esférica diamantada, 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 estéril através de seringa descartável.
3. Com um swab estéril, realizar a desinfecção do campo operatório com água oxigenada 30% de forma excêntrica, iniciando pela coroa dentária em direção ao arco de isolamento.
4. Com outro swab estéril, proceder da mesma forma com a solução de NaOCl 2,5%.
5. Concluir a cirurgia de acesso com novas brocas esterilizadas e soro fisiológico.
6. Realizar nova desinfecção do campo com água oxigenada 30% e NaOCl 2,5%.
7. Neutralizar o NaOCl 2,5% com um swab embebido em tiosulfato de sódio 5% por 1 minuto.
8. Com um cone de papel estéril, coletar uma amostra do ângulo cavo-superficial da cavidade de acesso (controle de assepsia do campo operatório).

Após o protocolo de desinfecção do campo operatório, realiza-se a coleta microbiológica dos canais radiculares com os procedimentos descritos a seguir:

1. Com auxílio de seringa descartável e agulha endodôntica de 30G Endo-EZE (Ultradent Products Inc), preencher o canal radicular com soro fisiológico estéril.
2. Aspirar a solução da câmara pulpar, mantendo somente a solução no interior do canal radicular.
3. Introduzir uma lima 10 tipo K e realizar a odontometria com o localizador foraminal eletrônico. Introduzir uma lima 15 tipo H até o comprimento real de trabalho (CRT) e,

com movimentos suaves de limagem contra as paredes, suspender o conteúdo microbiano da dentina na solução.

4. Com auxílio de uma pinça hemostática, fraturar as limas K e H (entre a parte ativa e a porção intermediária) e depositar a parte ativa da lima em um microtubo de 1,5mL contendo solução de transporte RNA later.
5. Introduzir um cone de papel número 15 até o CRT, mantendo-o em posição por 1 minuto. Repetir o procedimento de coleta com 4 novos cones de papel, mantendo-os individualmente no CRT por 1 minuto cada.
6. Depositar estes cones no mesmo microtubo no qual foi depositada a parte ativa da lima.
7. Congelar as amostras em freezer -20°C até o término do tratamento endodôntico do dente, quando será realizada a extração de DNA/RNA de todas as amostras do dente em estudo.

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 B – Procedimentos Laboratoriais

1) EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

A extração dos ácidos nucleicos das amostras dos canais radiculares foi realizada com o kit comercial *MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit* (Epicentre Technologies, Madison, WI, EUA), de acordo com os passos descritos a seguir:

1. Manter os microtubos contendo as amostras dos canais radiculares no gelo até o completo descongelamento do meio de transporte.
2. Homogeneizar cada amostra em agitador de tubos (vortex) durante 1min.
3. Centrifugar as amostras em centrífuga refrigerada a 4°C e 13.000 RPM por 10min.
4. Em um tubo tipo Falcon de 15mL estéril, preparar uma mistura de 300µL de *Tissue and Cell Lysis Solution* e 2µL de Proteinase K (*MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit*), em volume necessário para a quantidade de amostras a serem analisadas (MIX-1).
5. Remover as amostras da centrífuga e descartar o sobrenadante mantendo o pellet.
6. Adicionar 300µL do MIX-1 aos tubos contendo as amostras.
7. Homogeneizar as amostras em agitador de tubos por 10s.
8. Aquecer as amostras em banho-maria a 65°C por 15 min, misturando-as em agitador de tubos (10s) a cada 5min.
9. Esfriar as amostras em gelo por 5min.
10. Adicionar 150µl de *MPC Protein precipitation reagent* (*MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit*) aos tubos contendo as amostras.
11. Homogeneizar as amostras em agitador de tubos por 10s.
12. Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 10min.
13. Transferir o sobrenadante para microtubos de 1,5mL, esterilizados e devidamente identificados, e descartar o microtubo contendo o pellet.
14. Adicionar mais 25µl de *MPC Protein precipitation reagent* a cada amostra.
15. Homogeneizar as amostras em agitador de tubos por 10s.
16. Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 10min.
17. Transferir o novo sobrenadante para novos microtubos de 1,5mL, esterilizados e devidamente identificados, e descartar o microtubo contendo o pellet.

18. Adicionar 500µL de isopropanol 100% a cada microtubo e invertê-los 30/40 vezes.
19. Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 10min.
20. Descartar o isopropanol, com pipetas e ponteiras de 1000µL, com o cuidado de não remover o pellet.
21. Acrescentar 500µL de etanol 70% ao pellet.
22. Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 10s.
23. Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 5min.
24. Retirar parte do etanol 70%, deixando apenas cerca de 50µL no fundo do microtubo.
25. Centrifugar novamente a 4°C e 13.000RPM por 5min.
26. Remover totalmente o etanol 70% com ponteiras de 200µL.
27. Manter os tubos abertos em temperatura ambiente para evaporar o remanescente de etanol.
28. Adicionar 35µL de *TE Buffer (MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit)* em cada amostra.
29. Hidratar as amostras por 10 minutos, mantendo-as no gelo ou no Thermomixer (Eppendorf, Hauppauge, NY, EUA) a 4°C.
30. Analisar a concentração de ácidos nucleicos no espectrofotômetro (NanoDrop 1000 – Thermo Fisher Scientific).

2) DIVISÃO DAS AMOSTRAS DE DNA E RNA

1. Dividir as amostras em 2 microtubos:
 - a. 17,5µL em um microtubo denominado com o número da amostra + RNA
 - b. 17,5µL em um microtubo que ficará destinado a portar o DNA.
2. Guardar o microtubo do DNA no freezer -20°C e prosseguir com a purificação do RNA.

3) PURIFICAÇÃO DO RNA

1. Em um microtubo limpo, misturar 2µL de DNase I e 2µL de 10X *DNase I Reaction Buffer (MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit)* para cada amostra de RNA.
2. Aguardar 30 min em temperatura ambiente para degradar o DNA.
3. Adicionar 200µL de 2x *T&C Lysis Solution (MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit)* e colocar no agitador de tubos por 5s.

4. Manter no gelo 5min.
 5. Adicionar 200 μ L de *MPC Protein precipitation reagent (MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit)* aos tubos contendo as amostras.
 6. Homogeneizar as amostras em agitador de tubos por 10s.
 7. Centrifugar (4°C, 13.000RPM) por 10min.
 8. Transferir o sobrenadante para microtubos limpos e devidamente identificados conforme a amostra e descartar o pellet.
 9. Adicionar 500 μ L de isopropanol e inverter as amostras 30-40 vezes.
 10. Centrifugar (4°C, 13.000RPM) por 10min.
 11. Retirar o isopropanol sem deslocar o pellet.
 12. Lavar o pellet com 500 μ L de etanol 70%.
 13. Centrifugar (4°C 13.000RPM) por 5min.
 14. Retirar o etanol 70% mantendo cerca de 50uL no fundo da microtubo.
 15. Centrifugar (4°C 13.000RPM) por 5 min.
 16. Secar o etanol 70% com uma ponteira de 200 μ L.

4) SEGUNDO PROCESSO DE LISE DO DNA

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

1. Acrescentar em cada tubo 1uL de DNase I, Amp Grade, 1 U/ μ L (Invitrogen) , 1uL10X DNase I Reaction Buffer (Invitrogen) e 10uL de DEPC – treated water (Invitrogen) .
2. Encubar as amostras por 15 min em temperatura ambiente.
3. Inativar a DNase com a adição de 1 μ L de EDTA 25mM (Invitrogen).
4. Levar ao banho-maria a 65° C por 10 minutos. As amostras estão prontas para serem utilizadas na reação de transcrição reversa. Antes da confecção do cDNA, foi realizado a reação de PCR convencional utilizando iniciadores universais para o domínio *Bacteria* para conferir se todo o DNA das amostras foi removido após o tratamento das amostras com DNase I.
5. Analisar a concentração de ácidos nucleicos no espectrofotômetro (NanoDrop 1000 – Thermo Fisher Scientific).

5) PCR CONVENCIONAL

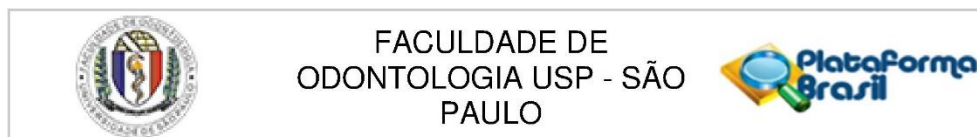
A reação descrita a seguir foi padronizada para detecção de DNA bacteriano com uso de iniciadores universais específicos para o domínio *Bacteria*: *forward*, 5'-GAG AGT TTG ATY MTG GCT CAG-3'; *reverse*: 5'- GAA GGA GGT GWT CCA RCC GCA-3' (Paster et al. 2001). O volume total de cada reação foi de 50µL, contendo: 1 µL de cada primer, 5µL de tampão para PCR (PCR Buffer, Life Technologies Corp), 1,5 µL de Mg₂ (Life Technologies Corp), 4µL de 2,5mM dNTP (Life Technologies Corp), 0,5µL de Taq DNA polimerase (Life Technologies Corp), 36 µL de água ultrapura (Ultrapure water, Life Technologies Corp) e 1 µL de DNA/RNA. A reação de PCR foi realizada no termociclador GeneAmp 2720 (Thermofisher), com o aquecimento inicial a 94°C por 4 min; seguidos de 30 ciclos de 94°C por 45 s, 60°C por 45 s e 72°C por 1,5 min; finalizados com 72°C por 15 min.

6) PCR DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR)

A reação de RT-PCR foi realizada com o kit comercial *Superscript III First-Strand* para confeccionar a fita dupla de cDNA a partir do RNA purificado da amostra. As reações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante, que serão descritas a seguir:

1. Misturar os seguintes reagentes, para cada amostra: 7 µL de RNA, 1µL de *Random Hexamer*, 1µL de dNTP e 1µL de água DPEC.
2. Incubar no banho-maria a 65°C por 5 min.
3. Incluir no gelo por 1 min.
4. Misturar os seguintes reagentes para preparar um MIX: 2µL de *Buffer*, 4µL de MgCl, 2µL de DTT, 1µL de RNase OUT e 1µL de *SuperScript III*.
5. Distribuir 10 µL do MIX nos microtubos contendo as amostras e agitar levemente.
6. Colocar as amostras no termociclador GeneAmp 2720 (Thermofisher), utilizando o ciclo: 25° por 10 min, 50° por 50 min e 85° por 5 min.
7. Adicionar 1µL de RNaseH e incubar por 20 minutos na estufa a 37°C

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Ericka Tavares Pinheiro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 71367517.0.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.201.768

Apresentação do Projeto:

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

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

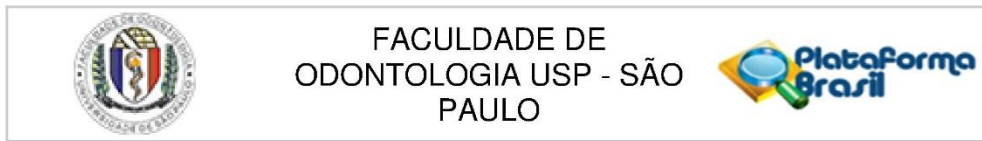
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br



Continuação do Parecer: 2.201.768

Objetivo da Pesquisa:

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são os inerentes ao tratamento endodôntico convencional e os benefícios diretos 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:

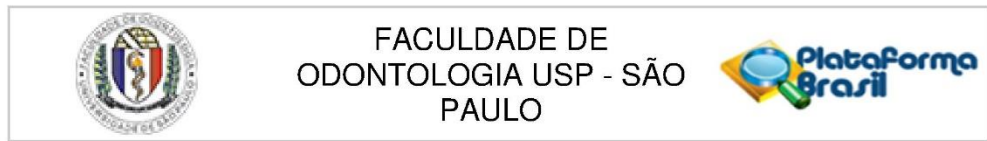
Não há pendências.

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

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



Continuação do Parecer: 2.201.768

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 04 de Agosto de 2017

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

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