LAURA CRISTINA LEITE NARDELLO

**Análise da atividade metabólica de bactérias persistentes após os procedimentos
endodônticos de desinfecção: estudo molecular baseado em RNA e DNA**

São Paulo

2018

LAURA CRISTINA LEITE NARDELLO

**Análise da atividade metabólica de bactérias persistentes após os procedimentos
endodônticos de desinfecção: estudo molecular baseado em RNA e DNA
Versão Corrigida**

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

Área de concentração: Endodontia
Orientador: Profa. Dra. Ericka Tavares Pinheiro

São Paulo
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

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

Nardello, Laura Cristina Leite.

Análise da atividade metabólica de bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção: estudo molecular baseado em RNA e DNA / Laura Cristina Leite Nardello; orientador Ericka Tavares Pinheiro. -- São Paulo, 2017.

111 p. : tab. ; 30 cm.

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

Versão corrigida

1. Periodontite periapical. 2. Infecções bacterianas. 3. Tratamento endodôntico. 4. PCR quantitativo. 5. RT-PCR quantitativo. I. Pinheiro, Ericka Tavares. II. Título.

Nardello LCL. Análise da atividade metabólica de bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção: estudo molecular baseado em RNA e DNA. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 08/02/2018

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. Márcia Pinto Alves Mayer

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

Prof. Dr. Giulio Gavini

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FO - USP). Julgamento: Aprovada.

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho primeiramente a Deus que
me carregou no colo nos momentos mais difíceis.*

*Dedico também aos meus pais que nunca
mediram esforços para que eu trilhasse este caminho e
verdadeiros amigos, pelo amor, carinho, compreensão,
força e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** pelo dom da vida, por me guiar, por me orientar em os todos os meus passos e por me carregar em seu colo e me amparado nos momentos mais difíceis.

Gostaria de agradecer especialmente a minha orientadora, **Profa. Dra. Ericka Tavares Pinheiro**, por me dar a oportunidade de desenvolver pesquisa ao seu lado. Agradeço por todos os conselhos, as dicas, as correções, e até mesmo alguns entreveros que passaram por esta relação entre orientador-orientando. Tudo isto compôs uma somatória fundamental não só para a construção de pensamento crítico e ciência, mas também ao desenvolvimento deste estudo que hoje se traduz nas páginas deste longo texto hoje entregue. Também agradeço pela maturidade de toda uma vida a seguir: antes de tudo, este momento se dedica a esta grande mestra com carinho.

Agradeço a **Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer** que abriu as portas do Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para que esse trabalho fosse realizado. E a todos os professores, funcionários e alunos por sempre estarem disponíveis para me ajudar sempre que eu precisava.

Agradeço aos colegas **Alexandre Pinheiro Lima Carvalho, Carlos Nogales, Fernanda Bruno, Fernanda Fernandes, Lais C. Prado, Luiza Paz, Roberto Romero e Yeska Braga** que compuseram essa equipe de pesquisa clínica maravilhosa... Sem eles, definitivamente, esta pesquisa não poderia ser realizada.

Agradeço também aos professores da disciplina de Endodontia da FOUSP, **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, Profa. Dra. Mary Caroline Skelton Macedo, Profa. Dra. Carla Renata Sipert**, por todo o conhecimento compartilhado.

Agradeço aos meus aos colegas de pós-graduação, **Alessandra Gambini, Alexandre Pinheiro Lima Carvalho, Breno Nappi Ventura, Carlos Nogales, Claudia Caroline Bosio**

Meneses, Ellen Binoto, Fernanda Pinheiro Bruno, Hector Caballero Flores, Hermano Paiva, J. Edgar Valdivia C., Juliana Marques, Lais C. Prado, Laís Pizzatto, Leonardo Medina Poveda, Luiza Paz, Marco André Craveiro, Priscilla Fernandes, Roberto Romero, Sandra Kuhne e Yeska Braga Hori por todos os momentos compartilhados e por todo apoio.

Agradeço em especial aos meus colegas **Lais C. Prado, Yeska Braga Hori, J. Edgar Valdivia C., Roberto Romero e Pablo Garrido** por toda a parceria e por todos os momentos compartilhados, tornando essa jornada um pouco mais fácil!

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

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

Agradeço a **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.

Agradeço aos meus pais, **Antonio Elias Nardello e Helena Aparecida Leite Nardello**, pela educação que me proporcionaram em toda a minha vida e pelo incentivo, pela força e por serem o meu exemplo. Por estarem ao meu lado me apoiando e me ajudando. Do imenso carinho, dedicação, proteção, compreensão e amor incomensurável e incondicional... E eu tenho certeza que tudo isso é o que me faz estar hoje aqui. Obrigado pelo melhor e maior presente que eu recebi em toda minha vida é viver. Também agradeço por me olharem com orgulho, sendo isso muito importante na minha vida. Outro grande presente que vocês me deram foi ver os meus sonhos também tornarem o sonho de vocês. Sou muito grata também a toda minha família por ter acompanhado e apoiado toda a minha jornada.

Dizer obrigada, às vezes, não é suficiente para agradecer a **Maria da Graça Barbosa Lopes Câmara** por ser tão amável e gentil pessoa que esteve sempre presente próxima ou distante nos melhores momentos e nos momentos mais difíceis da minha vida, por me estender a mão amiga e nos oferece amparo. Sou e serei eternamente grata por todas a

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, mas é claro que encontrarei uma maneira de fazê-lo.

EPÍGRAFE

“Invente -se e depois reinvente-se,
Não nade na mesma correnteza.
Invente-se e depois reinvente-se e
Fique longe das margens da mediocridade.

Invente-se e depois reinvente-se,
Mude seu tom e o seu formato tão frequentemente
que ninguém possa categoriza-lo.

Revigore-se e
Aceite o que é
Mas somente nos termos que você tenha inventado
E reinventou

Seja autodidata

E reinvente sua vida porque você deve;
Essa é a sua vida e
Sua história
E seu presente
pertencem apenas a você.”

~ **Charles Bukowski, Os prazeres do condenado**

RESUMO

Nardello LCL. Análise da atividade metabólica de bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção: estudo molecular baseado em RNA e DNA. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida

Micro-organismos persistentes que permanecem viáveis e em níveis elevados nos canais radiculares após os procedimentos endodônticos podem influenciar no sucesso do tratamento endodôntico. O objetivo deste estudo foi avaliar a quantidade e a atividade metabólica de bactérias persistentes utilizando métodos moleculares baseados em rDNA e rRNA. Foram selecionados 15 pacientes com infecções endodônticas primárias assintomáticas. Amostras microbiológicas foram coletadas dos canais radiculares após a cirurgia de acesso (S1), após o preparo químico-cirúrgico realizado com Sistema Reciproc e NaOCl 2.5% (S2) e após medicação intracanal com Ca(OH)_2 por 14 dias (S3). As amostras dos canais radiculares foram submetidas à extração de DNA e RNA. O RNA foi submetido à reação de transcrição reversa para confecção de DNA complementar (cDNA). O efeito dos procedimentos endodônticos na redução bacteriana foi determinado por qPCR baseada em rDNA, utilizando iniciadores universais para a região 16S *rRNA* do domínio *Bacteria* e iniciadores espécie-específicos para *Bacteroidaceae* [G-1] sp oral taxon 272. A atividade metabólica de bactérias totais e *Bacteroidaceae* [G-1] sp oral taxon 272 foi calculada pela razão rRNA/rDNA baseados nos dados dos ensaios de qPCR. Os dados foram analisados pelo teste de Wilcoxon para análise quantitativa e teste de McNemar para comparação da taxa de detecção dos métodos, com nível de significância de 5%. Todas as amostras S1 foram positivas para bactérias totais, com uma mediana de $1,87 \times 10^5$ cópias de rDNA por amostra. Após o preparo químico-cirúrgico houve uma redução significativa de rDNA de bactérias totais (mediana $7,86 \times 10^4$, $P = 0,01$). Entretanto, não houve redução de rDNA bacteriano após a medicação intracanal quando comparada à etapa anterior (mediana $7,97 \times 10^4$, $P > 0,05$). Os resultados da razão rRNA/rDNA revelaram que houve uma redução do metabolismo de bactérias totais em S2 (mediana 1, $P = 0,04$) e um aumento do metabolismo bacteriano em S3 (mediana 2, $P = 0,04$). Na análise de *Bacteroidaceae* [G-1] sp oral taxon 272, o tratamento endodôntico não influenciou na redução nem no metabolismo bacteriano. Concluiu-se que o número total de bactérias foi drasticamente reduzido após o preparo químico-cirúrgico, assim como seu metabolismo. Entretanto, o metabolismo bacteriano aumentou após o uso da medicação intracanal com Ca(OH)_2 . *Bacteroidaceae* [G-1] sp. oral taxon 272 permaneceu

metabolicamente ativo após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal, participando, assim, da composição da microbiota persistente.

Palavras-chave: Periodontite Apical. Infecção bacteriana. Tratamento endodôntico. PCR quantitativo. RT-PCR quantitativo.

ABSTRACT

Nardello LCL. Metabolic activity analysis of persistent bacteria after endodontic disinfection procedures: RNA- and DNA-based molecular study. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Revised Version

High levels of microorganisms that persist viable in root canals after endodontic procedures may influence endodontic treatment outcome. This study aimed to evaluate the amount and the metabolic activity of persistent bacteria using rRNA- and rDNA-based molecular methods. Fifteen patients with primary endodontic infections were selected. Microbiological samples were taken from root canals after access cavity (S1), after chemomechanical preparation with Reciproc System and 2.5% NaOCl (S2) and after intracanal medication with calcium hydroxide for 14 days (S3). DNA and RNA were extracted from root canal samples, and cDNA was synthesized using reverse transcription reaction. The effect of endodontic procedures on bacterial reduction was determined by rDNA-based qPCR using universal primers for 16S *rRNA Bacteria* domain and species-specific primers to *Bacteroidaceae [G-1]* sp oral taxon 272. The metabolic activity of total bacteria and *Bacteroidaceae [G-1]* sp oral taxon 272 was calculated by rRNA/ rDNA ratio estimated by qPCR. The data was analyzed by the Wilcoxon test for quantitative analysis and McNemar test for comparison of the detection rate of the methods, with 5% significance level. All S1 samples were positive for total bacteria, with a median value of 1.87×10^5 bacterial cells. After chemomechanical preparation a significant reduction of bacterial rDNA was observed (median 7.86×10^4 , $P = 0.01$). Nevertheless, there was no bacterial rDNA reduction after intracanal medication when compared to S2 samples (median 7.97×10^4 , $P > 0.05$). The rRNA/ rDNA ratio showed a reduction of total bacteria metabolism in S2 (median 1, $P = 0.04$), and an increase of bacterial metabolism in S3 (median 2, $P = 0.04$). *Bacteroidaceae [G-1]* sp oral taxon 272 analysis showed that endodontic treatment did not impact the amount and the metabolic activity of this taxon. In conclusion, the number and metabolism of total bacteria were severely reduced after chemomechanical preparation. On the other hand, the bacterial metabolism increased after intracanal dressing with Ca(OH)_2 . *Bacteroidaceae [G-1]* sp. oral taxon 272 remained metabolically active after chemomechanical preparation and intracanal dressing thus participating in the composition of the persistent microbiota.

Keywords: Apical periodontitis. Bacterial infection. Endodontic treatment. Quantitative PCR. Quantitative RT-PCR.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

=	Igual
>	Maior
<	Menor
μL	Microlitro
Ca(OH)_2	Hidróxido de cálcio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
h	Hora
MgCl_2	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NiTi	Níquel-Titânio
nM	nanoMol
pb	pares de base
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PUI	Irrigação ultrassônica passiva
qPCR	Reação de polimerase em cadeia quantitativa
rDNA	Gene 16S rRNA
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
TE	Tris + EDTA

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	33
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	37
2.1.	Bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção: estudos clínicos analisados por métodos dependentes de cultura	37
2.2.	Bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção: estudos clínicos analisados por métodos moleculares independentes de cultura	60
2.2.1	Métodos moleculares baseados em rDNA (gene 16S rRNA)	60
2.2.2	Métodos moleculares baseados em rRNA (RNA ribossômico)	69
3	PROPOSIÇÃO	73
4	MATERIAL E MÉTODOS	75
4.1	Aspectos éticos.....	75
4.2	Procedimentos e coletas clínicas	75
4.2.1.	Seleção de pacientes	75
4.2.2.	Coletas microbiológicas e procedimentos clínicos	76
4.3.	Análise microbiológica	79
4.3.1	Extração de DNA/RNA e síntese do cDNA	79
4.3.2	Análise quantitativa e da atividade metabólica de bactérias totais através de qPCR baseado em rDNA e rRNA	80
4.3.3	Análise quantitativa e da atividade metabólica de Bacteroidaceae [G-1] sp oral taxon 272	81
4.4	Análise estatística	82
5	RESULTADOS	83
5.1	Análise de bactérias totais após os procedimentos endodônticos utilizando ensaios de qPCR baseados em rDNA e rRNA	83
5.2	Atividade metabólica de bactérias totais antes e após os procedimentos endodônticos.....	85
5.3	Análise de Bacteroidaceae [G-1] sp. oral taxon 272 após os procedimentos endodônticos utilizando ensaios de qPCR baseados em rDNA e rRNA	85
5.4.	Atividade metabólica de Bacteroidaceae [G-1] sp. oral taxon 272 antes e após os procedimentos endodônticos.....	86

6	DISCUSSÃO	89
7	CONCLUSÕES	95
	REFERÊNCIAS	97
	APÊNDICE	107
	ANEXOS	117

1 INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico não é capaz de eliminar todas as bactérias do sistema de canais radiculares de dentes com necrose pulpar. Isto ocorre devido à complexidade anatômica dos canais radiculares e à organização das bactérias em biofilmes, que, conseqüentemente, as tornam inacessíveis e/ou resistentes aos procedimentos de desinfecção (Ramachandran Nair, 1987; Ricucci; Siqueira, 2010). Essas bactérias persistentes podem apresentar estratégias de sobrevivência nos canais radiculares, incluindo a capacidade de resistir à escassez de nutrientes, assumindo um estágio de baixa atividade metabólica e tornando-se metabolicamente ativas se as fontes de nutrientes forem restabelecidas. Portanto, se as bactérias persistentes tiverem acesso aos tecidos periapicais e se alcançarem concentrações suficientes para induzir o processo inflamatório desses tecidos, poderão ser a causa do insucesso do tratamento endodôntico (Siqueira; Rôças, 2008).

A microbiota persistente aos procedimentos endodônticos de desinfecção foi amplamente estudada por métodos dependentes de cultura. Siqueira e Rôças (2008) em uma revisão da literatura sobre bactérias persistentes revelaram que as espécies cultiváveis mais prevalentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção foram: *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Anaerococcus prevotii*, *Eggerthella lenta*, *Enterococcus faecalis*, *Gemella morbillorum*, *Parvimonas micra*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium propionicum*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, grupo de *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mitis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia*.

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, que envolvem a detecção de macromoléculas como DNA ou RNA bacteriano, vem sendo possível refinar e redefinir o conhecimento da diversidade microbiológica das infecções endodônticas (Siqueira; Rôças, 2005). Os métodos moleculares apresentam vantagens sobre os métodos dependentes de cultura, incluindo maior sensibilidade e detecção de micro-organismos 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 a avaliação da microbiota que persiste após os procedimentos endodônticos de desinfecção (Siqueira; Rôças, 2009). Estudos utilizando esses métodos confirmaram a prevalência de espécies Gram-positivas em infecções endodônticas persistentes. Entretanto, poucos estudos moleculares avaliaram a prevalência e quantidade de

bactérias ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo após os procedimentos endodônticos de desinfecção (Rôças et al., 2014; Neves et al., 2014; Gomes et al., 2015).

Até o presente momento, a maioria dos estudos moleculares avaliando as bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção utilizou métodos baseados em DNA, em especial, estudos baseados na detecção do gene 16S *rRNA* (rDNA). Esses estudos apresentam a vantagem de possibilitar a análise quantitativa dessas bactérias; utilizando, entre outros métodos, a reação de qPCR (reação de polimerase em cadeia quantitativa), que proporciona uma quantificação absoluta das bactérias baseada em número de cópias de rDNA. Estudos clínicos utilizando qPCR revelaram que o preparo químico-cirúrgico foi eficiente em promover a redução de bactérias dos canais radiculares. Entretanto, existem divergências entre os estudos moleculares que avaliaram a eficácia da medicação intracanal em promover redução de micro-organismos dos canais radiculares. Alguns autores relataram uma redução do número de cópias de rDNA após o uso da medicação intracanal (Paiva et al., 2013a; Provenzano et al., 2015; Nakamura et al., 2018); outros afirmaram não haver diferença entre o número de cópias de rDNA detectados após o preparo químico-cirúrgico e aquele detectado após a medicação intracanal (Sakamoto et al., 2007; Blome et al., 2008; Rôças; Siqueira, 2011b; Teles et al., 2014; Ferreira et al., 2015); enquanto outro autor identificou um aumento do número de cópias de rDNA após o uso da medicação intracanal (Zandi et al., 2016). Entretanto, vale ressaltar, que esses estudos moleculares baseados em rDNA apresentam uma limitação, que é a não distinção entre as células vivas e mortas (Siqueira; Rôças, 2005; Loozen et al., 2011; Brudin et al, 2013). Esse fato pode comprometer a avaliação dos procedimentos de desinfecção, levando a uma superestimação da quantidade de bactérias persistentes.

Uma alternativa para distinguir as células viáveis das não viáveis é a utilização de métodos moleculares baseados na detecção do RNA ribossômico (rRNA), por ser este um indicador de viabilidade celular tanto de bactérias cultiváveis quanto das bactérias ainda não cultiváveis. Este método envolve primeiro uma reação de transcriptase reversa (RT), com a síntese de uma fita complementar de DNA (cDNA), seguido de um ensaio de qPCR (RT-qPCR). Os ensaios moleculares utilizando o rRNA são muito sensíveis porque o rRNA se apresenta em número elevado em bactérias metabolicamente ativas. Entretanto, apesar dos resultados obtidos pela reação de qPCR baseado em rRNA refletirem a viabilidade bacteriana, estes não são capazes de proporcionar sua quantificação absoluta. Devido às limitações de

cada método molecular, foi proposto o uso combinado das reações de qPCR baseada em rRNA e rDNA, possibilitando a avaliação simultânea da viabilidade e da abundância de células bacterianas (Campbell et al., 2011; Pitkänen et al., 2013; Pinheiro et al., 2015). Nesse contexto, a razão rRNA/rDNA poderá fornecer dados sobre a atividade metabólica de diferentes bactérias em uma mesma comunidade, que pode variar de dormente a altamente metabólica.

Até o presente momento, existem poucos estudos que avaliaram a viabilidade das bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção utilizando métodos baseados em rRNA (Rôças; Siqueira, 2010; Pinheiro et al., 2015). Especificamente, um estudo avaliou a atividade metabólica de *Enterococcus faecalis* após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares submetidos ao retratamento endodôntico (Pinheiro et al., 2015). Entretanto, não há na literatura estudos que avaliem a atividade metabólica de bactérias ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo.

A família *Bacteroidaceae* foi descrita com base na análise filogenética das sequências de genes 16S rRNA, compreendendo os gêneros: *Acetofilamentum*, *Acetomicrobium*, *Acetothermus*, *Anaerorhabdus* e *Bacteroides* (Bergey et al. 1974). Membro dessa família, *Bacteroidaceae [G-1]* sp. oral taxon 272, foi encontrado em infecções endodônticas persistentes após o preparo químico-cirúrgico (Rôças et al., 2014; Neves et al., 2014; Gomes et al., 2015). Nesses estudos, *Bacteroidaceae [G-1]* sp. oral taxon 272 e *Fretibacterium fastidiosum* (*Synergistetes* oral clones W090/W028) estão entre as bactérias ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo mais prevalentes em infecções endodônticas persistentes.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a abundância e a atividade metabólica das bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção, através de métodos moleculares baseados em rDNA e rRNA. A análise da redução e do metabolismo bacteriano foi realizada após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal, investigando bactérias totais e uma espécie bacteriana de difícil cultivo (www.homd.org), *Bacteroidaceae [G-1]* sp. oral taxon 272. A hipótese de nulidade é que os procedimentos endodônticos de desinfecção não influenciam na redução e no metabolismo de bactérias totais e de *Bacteroidaceae [G-1]* sp. oral taxon 272.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A microbiota persistente após os procedimentos endodônticos de desinfecção pode ser estudada por métodos dependentes de cultura dos micro-organismos ou por métodos independentes do cultivo, envolvendo a detecção de macromoléculas como DNA ou RNA bacteriano. A cultura de micro-organismos foi tradicionalmente utilizada para identificação da microbiota endodôntica; porém, nas últimas duas décadas os métodos moleculares independentes de cultura têm sido cada vez mais utilizados para esse fim. Nesse tópico será realizada uma revisão dos estudos clínicos que avaliaram a microbiota dos canais radiculares antes e após os procedimentos endodônticos de desinfecção utilizando métodos dependentes ou independentes de cultura dos micro-organismos. Nos estudos utilizando métodos dependentes de cultura, a redução bacteriana após os procedimentos endodônticos foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônia (ufc) e a identificação bacteriana foi realizada através de provas bioquímicas ou de provas moleculares após o isolamento bacteriano. Nos estudos utilizando métodos independentes de cultura, a análise da microbiota foi realizada por métodos moleculares qualitativos (PCR - *reação de polimerase em cadeia*), semi-quantitativos (hibridização DNA-DNA) ou quantitativos (qPCR - *reação de polimerase em cadeia quantitativa*). A análise da diversidade microbiana também foi realizada por sequenciamento genético em alguns estudos moleculares.

2.1 Bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção: estudos clínicos analisados por métodos dependentes de cultura

Stewart (1955) estudou a importância do preparo químico-cirúrgico com NaOCl (0,5%). Foram selecionados 50 dentes com periodontite apical. Na primeira sessão foi realizado o preparo químico-cirúrgico e foram coletadas amostras. Na segunda sessão, se o dente apresentasse cultura negativa na primeira sessão e o paciente não apresentasse sintomatologia o dente estava pronto para ser obturado. Se, entretanto, o paciente apresentasse sensibilidade, edema ou fistula foi feito uma nova coleta. Caso a coleta da primeira sessão fosse positiva, realizava-se um novo preparo químico-cirúrgico com uma lima de diâmetro maior e realizava-se uma nova coleta. Após o preparo químico-cirúrgico da primeira sessão

94% apresentavam culturas negativas. Entretanto, quando as amostras da segunda sessão foram cultivadas, após a instrumentação 76% (38 dentes) apresentavam-se negativas. Os autores concluíram que o preparo químico-cirúrgico é a etapa mais importante do tratamento endodôntico.

Ingle e Zeldow (1958) avaliaram o papel do preparo químico-cirúrgico na redução dos micro-organismos. Foram selecionados 89 pacientes com necrose pulpar. As amostras foram coletadas após a cirurgia de acesso, após o preparo químico-cirúrgico irrigado com água destilada estéril e após uma irrigação final também realizado com água destilada. Sem o uso de medicação intracanal, o paciente retornava 48h após e nova amostra foi coletada. As amostras foram cultivadas e analisadas por meio da contagem das ufc. Nas amostras iniciais 27% apresentaram se negativas, portanto os autores continuaram a análises apenas com os resultados iniciais positivos. Após o preparo químico-cirúrgico e irrigação final apenas 13 dentes apresentaram culturas negativas. Na segunda sessão apenas 3 dentes apresentaram culturas negativas. Os autores concluíram que o uso da água destilada como irrigante é ineficaz, observando a necessidade do uso de uma medicação intracanal, e que o resultado de culturas negativas não significa que os canais estejam estéreis.

Zeldow e Ingle (1963) tentaram mostrar a importância do controle bacteriano durante o tratamento endodôntico. Foram selecionados 89 dentes com necrose pulpar. Os dentes foram acessados e realizado o preparo químico-cirúrgico com água destilada estéril, então foi realizado uma segunda sessão 48h depois desse procedimento, sem o uso da medicação intracanal, para a finalização do tratamento endodôntico. As amostras foram coletadas no início da primeira e segunda sessão. Dos 89 dentes tratados, 24 apresentavam culturas iniciais negativas. No momento da obturação 62 (67%) dentes apresentavam culturas positivas. Os autores concluíram que de acordo com os resultados que a presença de bactérias no momento da obturação não é determinante para o sucesso ou o fracasso do tratamento endodôntico.

Byström e Sundqvist (1981) avaliaram a redução microbiana durante o tratamento endodôntico de 15 dentes com periodontite apical. Para isto, foi realizado o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares com limas manuais e irrigação com soro fisiológico. Após o preparo químico-cirúrgico, bactérias foram detectadas em 7 casos. Após 5 sessões de tratamento, as bactérias persistentes nos canais radiculares foram: *Streptococcus* spp., *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus morbillorum*, *Peptostreptococcus* sp., *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptostreptococcus micros*, *Eubacterium* sp. grupo 1, *Eubacterium* sp. grupo 4, *Eubacterium alactotyticum*, *Lactobacillus*

sp. grupo 1 e 3, *Fusobacterium* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides* sp., *Bacteroides oralis* e *Enterobacter* sp. Os autores concluíram que a instrumentação e a irrigação com soro fisiológico reduzem número de células, entretanto na maioria dos casos o canal continua contaminado.

Byström et al. (1985) avaliaram clinicamente a eficácia da medicação intracanal de hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2), de paramonoclorofenol e de paramonoclorofeno canforado em 65 dentes com periodontite apical. As amostras foram coletadas antes do preparo químico-cirúrgico e após o uso das diferentes medicações. Os micro-organismos foram cultivados em câmara de anaerobiose. Todas as amostras iniciais apresentavam-se positivas. Para o grupo do Ca(OH)_2 após um mês do uso da medicação não houveram amostras positivas, entretanto quando a medicação foi removida após 4 dias, uma cultura apresentou-se positiva com aproximadamente $1,0 \times 10^2$ células bacterianas. As bactérias presentes foram *Wolinella recta* e *Fusobacterium nucleatum*. Esses resultados demonstram que a pasta de Ca(OH)_2 utilizada como medicação intracanal é eficaz na redução de micro-organismos sendo desta maneira possível realizar o tratamento endodôntico de dentes com periodontite apical em duas sessões.

Byström e Sundqvist (1985) estudaram a eficiência antimicrobiana do hipoclorito de sódio (NaOCl) (0,5%), NaOCl (5%), e NaOCl (5%) associado ao ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) (15%) como soluções irrigadoras auxiliares durante o preparo químico-cirúrgico de 60 dentes com periodontite apical. Todas as amostras foram positivas na primeira sessão, na segunda 12 casos positivos para o grupo do NaOCl (0,5%), 10 casos positivos para o grupo NaOCl (5%), e 11 casos positivos NaOCl (5%) associado ao EDTA (15%). Na terceira sessão, quando se utilizou a medicação intracanal a base de Ca(OH)_2 por um período de 2 a 4 semanas, houve maior redução 8 casos positivos para o grupo do NaOCl (0,5%), 6 casos positivos para o grupo NaOCl (5%), e 3 casos positivos NaOCl (5%) associado ao EDTA (15%). Na terceira sessão, as bactérias mais frequentes após o preparo químico-cirúrgico do grupo do NaOCl (0,5%) foram: *Streptococcus milleri*, *S. mutans*, *S. sanguinis*, *P. anaerobius*, *Arachnia propionica*, *Eubacterium brachy*, *Eubacterium lentum*, *Lactobacillus* sp., *Fusobacterium* sp., *F. nucleatum*, *Bacteroides* sp., *Bacteroides gingivalis* e *Bacteroides intermedius*; do grupo do NaOCl (5,0%) foram: *Streptococcus intermedius*, *P. micros*, *E. lentum*, *Eubacterium timidum*, *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus* sp. Grupo 1, *Fusobacterium* sp., *F. nucleatum*, *Bacteroides* sp., *B. oralis*, *Capnocytophaga ochracea*, *W. recta*; e do grupo do NaOCl (5,0%) associado ao EDTA foram: *S. milleri*, *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. intermedius*, *S. morbillorum*, *P. anaerobius*, *P. micros*, *A. propionica*, *E. alactotyticum*, *E. brachy*, *E. lentum*, *E. timidum*, *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus* sp. grupo 1, *Fusobacterium*

sp., *F. nucleatum*, *Bacteroides* sp., *B. gingivalis*, *B. intermedius*, *B. oralis*, *C. ochracea* e *W. recta*. Os resultados demonstraram que o grupo do NaOCl (5%) associado com EDTA apresentou-se mais eficiente na redução microbiana quando comparado aos grupos que utilizou somente o NaOCl independentemente de sua concentração.

Sjögren e Sundqvist (1987) avaliaram o efeito antimicrobiano da instrumentação ultrassônica e NaOCl (0,5%) em 31 dentes com periodontite apical assintomática. Todas as amostras iniciais foram positivas. Na segunda sessão 9 eram positivas e após a terceira sessão 7 eram positivas. Os micro-organismos os quais persistiram após o tratamento endodôntico foram: *F. nucleatum*, *A. propionica*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii*, *S. intermedius*, *Actinomyces viscosus*, *P. micros*, *S. milleri*. O uso do ultrassom é um coadjuvante nos procedimentos de desinfecção do canal radicular, e é necessário o uso de medicação intracanal com Ca(OH)_2 entre as sessões para reduzir o quanto possível os níveis bacterianos.

Orstavik et al. (1991) avaliaram a redução bacteriana com a técnica de instrumentação de alargamento e o uso da medicação intracanal de Ca(OH)_2 . Foram selecionados 23 dentes com periodontite apical. O tratamento foi padronizado em duas sessões realizando-se o preparo químico-cirúrgico com solução salina e o uso da medicação de Ca(OH)_2 por uma semana. As amostras bacteriológicas foram coletadas antes e após o preparo químico-cirúrgico, de cada sessão. As amostras iniciais da primeira sessão todas apresentaram-se positivas, após o preparo químico-cirúrgico 14 (61%) amostras continuavam positivas. Na segunda sessão, após o uso da medicação 8 (34%) amostras continuavam positivas e pós o preparo químico-cirúrgico não houveram culturas positivas. Em conclusão, o preparo químico-cirúrgico e a medicação intracanal de uma semana com Ca(OH)_2 reduziram significativamente o crescimento bacteriano das amostras do canal radicular. Os canais radiculares preparados com diâmetros maiores na primeira sessão apresentavam uma menor quantidade de bactérias.

Sjögren et al. (1991) avaliaram a efetividade da medicação intracanal com Ca(OH)_2 em 30 dentes com periodontite apical. Para isto, os dentes foram tratados com NaOCl 0,5% e então foram divididos em 2 grupos: um com Ca(OH)_2 por 10 minutos (n=12) e outro por 7 dias (n=18). Todas as amostras iniciais foram positivas. Os resultados demonstraram que haviam uma mediana de $6,5 \times 10^3$ e $9,8 \times 10^4$ células bacterianas nas coletas iniciais no grupo do Ca(OH)_2 por 10 minutos e no grupo do 7 dias, respectivamente. Após o preparo químico-cirúrgico foi observada uma quantidade $<10^2$ células bacterianas, e metade dos casos ainda continuavam positivos em ambos os grupos. Após o uso da medicação intracanal por 10

minutos ainda foi encontrado 6 casos positivos enquanto com o uso da medicação por 7 dias não houve presença de culturas positivas. Os micro-organismos persistentes foram: *Fusobacterium* spp., *F. nucleatum*, *Bacteroides denticola*, *Enterococcus faecalis*, *A. viscosus*, *Bacteroides buccae*, *P. micros*, *W. recta*, *E. alactotyticum*, *Lactobacillus cateniforme* e *Lactobacillus* spp. Este trabalho confirma que o Ca(OH)_2 elimina de modo eficaz os micro-organismos que podem sobreviver após o preparo químico-cirúrgico e que os melhores resultados alcançados foram com a medicação de Ca(OH)_2 por 7 dias.

Gomes et al. (1996) investigaram as variações na suscetibilidade da microbiota ao preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares em dentes com periodontite apical primária (n=15) ou com periodontite apical persistentes/ secundárias (n=27). Para isto realizaram o preparo químico-cirúrgico com NaOCl a 2,5% e limas manuais, as coletas foram realizadas antes e após o preparo químico-cirúrgico. Os micro-organismos presentes após o preparo químico-cirúrgico foram: *S. milleri*, *P. micros*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *S. sanguinis*, *Prevotella buccae*, *A. israelii*, *Actinomyces meyeri*, *Actinomyces odontolyticus*, *Eubacterium aerofaciens*, *E. lentum*, *Gemella mobillorum*, *Prevotella oralis*, *Capnocytophaga* spp., *Clostridium subterminale*, *Lactobacillus plantarum* e *Peptostreptococcus prevotii*. Deste modo concluíram que existem espécies mais resistentes do que outras ao preparo químico-cirúrgico.

Sjögren et al. (1997) investigaram a influência da infecção endodôntica no prognóstico do tratamento realizado em sessão única. Para isso foram selecionados dentes unirradiculares (n=55) com periodontite apical e amostras microbiológicas foram coletadas antes e após o preparo químico-cirúrgico com NaOCl (0,5%). Todas as amostras iniciais de cultura microbiana apresentaram-se positivas e após o preparo químico-cirúrgico 20. Os micro-organismos identificados após o preparo químico-cirúrgico foram: *E. faecalis*, *Propionibacterium acnes*, *S. constellatus*, *Propionibacterium propionicum*, *P. anaerobius*, *Bacteroides gracilis*, *P. micros*, *Bacteroides* spp., *E. alactolyticum*, *P. buccae*, *E. lentum*, *P. oralis*, *Eubacterium nodatum*, *E. timidum*, *F. nucleatum*, *A. israelii*, *Campylobacter rectus*, *A. naeslundii* e *A. odontolyticus*. Os casos foram acompanhados por 5 anos. O reparo da rarefação óssea periapical ocorreu em 94% dos casos de cultura negativa. Entretanto nas amostras que se apresentaram positivas antes da obturação do canal, a taxa de sucesso do tratamento foi de 68%. Logo, os micro-organismos não podem ser completamente eliminados do sistema de canais radiculares antes da obturação. E para reduzir ainda mais a quantidade de bactérias é necessário o uso de uma medicação intracanal.

Dalton et al. (1998) compararam redução de micro-organismos após instrumentação com limas rotatórias de Níquel-Titânio (NiTi) com a técnica de instrumentação escalonada utilizando limas manuais de aço inoxidável. Foram selecionados e randomizados 48 de acordo com o tratamento. O preparo químico-cirúrgico foi realizado com soro fisiológico e então foi realizado uma irrigação final com NaOCl (1%). As amostras foram coletadas antes, durante e após o tratamento endodôntico. As amostras foram incubadas em câmara de anaerobiose por 1 semana a 37°C, as ufc foram contadas e normalizadas na base log10. Todas as amostras iniciais apresentaram-se positivas com uma média de 4,6 ufc e após preparo químico-cirúrgico 2,2 ufc. Os resultados demonstraram que houve uma redução do número de bactérias, entretanto não houve diferença nos grupos estudados. Portanto, não houve diferença na redução de micro-organismo em ambos os grupos com a solução salina como irrigante. A redução bacteriana foi progressiva, conforme os diâmetros das limas fossem aumentando, observando assim um menor número de bactérias na última lima utilizada. E nenhuma das técnicas conseguiu tornar os canais livres de bactérias.

Sundqvist et al. (1998) avaliaram os micro-organismos presentes em dentes com necessidade de retratamento e estabelecer o resultado do tratamento conservador. As amostras foram coletadas após a remoção da guta percha, após o preparo químico-cirúrgico com NaOCl (0,5%), depois do acesso na segunda sessão e após 7 a 14 dias de medicação intracanal Ca(OH)_2 . Na primeira sessão as bactérias presentes após o preparo químico-cirúrgico eram *E. faecalis*, *S. anginosus*, *S. constellatus*, *Streptococcus mitis*, *P. micros*, *A. israelii*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *E. timidum*, *P. acnes*, *P. propionicum*, *F. nucleatum*, *B. gracilis*, na segunda sessão estavam presentes *E. faecalis*, *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. parasanguinis*, *A. israelii*, *P. alactolyticus*, *E. timidum*, *L. catenaforme*, *P. acnes*, *P. propionicum*, *B. gracilis* e *Candida albicans*. Cinquenta dos 54 (93%) pacientes, foram avaliados no controle radiográfico, 37 (74%) apresentavam reparo da rarefação óssea periapical e 13 foram considerados fracasso. A presença de micro-organismos no momento da obturação e o tamanho da lesão periapical foram fatores que tiveram uma influência negativa no prognóstico.

Shuping et al. (2000) avaliaram a redução bacteriana com limas rotatória de NiTi e irrigação com NaOCl (1,25%) e o efeito da medicação de Ca(OH)_2 por pelo menos uma semana. As amostras foram coletadas antes, durante, após o preparo químico-cirúrgico e após uso da medicação intracanal de dentes com periodontite apical. As amostras foram cultivadas e realizou-se a contagem das ufc. Para os resultados serem analisados foram transformados na base log10. Quarenta e uma das 42 amostras iniciais foram positive com uma média de 5,51,

ao final do preparo químico-cirúrgico obteve-se uma média de 1,27. Na amostra S4, 26 (61,9%) apresentavam culturas negativas. A medicação intracanal foi utilizada em uma média de 25,1 dias, com uma faixa de variação de 7 a 203 dias. Todos os casos foram realizados em duas sessões. Após o uso da medicação 37(92,5%) das amostras apresentaram-se negativas. Em suma, há uma redução bacteriana progressiva entre as amostras iniciais e o aumento do taper durante a instrumentação dos canais radiculares com o NaOCl. O Ca(OH)_2 utilizado por pelo menos uma semana reduziu em 92,5% a presença de bactérias no interior dos canais radiculares. Também foi observada uma significativa redução após o químico-cirúrgico e após a medicação intracanal.

Peciulien et al. (2001) avaliaram a ocorrência de leveduras, bactérias Gram-negativas e *Enterococcus* em canais com necessidade de retratamento e comparar, os achados com o tamanho da lesão e a ocorrência de flare-ups. Foram selecionados 40 dentes com necessidade de retratamento. Os dentes foram acessados, a guta percha foi removida e o preparo químico-cirúrgico foi realizado com NaOCl (2,5%) e EDTA (17%). Esses dentes foram divididos em grupos, sendo, no grupo A os canais receberam o Ca(OH)_2 por 10-14 dias e no grupo B foi realizado uma irrigação final de iodo e então foram obturados. As amostras microbiológicas foram coletadas antes e após o preparo químico-cirúrgico e no grupo B após a irrigação com iodo. Os micro-organismos foram isolados de 33 dos 40 dentes inclusos no estudo. As amostras coletadas após o preparo químico-cirúrgico apresentaram 10 de 33 culturas positivas. Sendo que o *E. faecalis* estava presente em 6 casos. Fungos e bactérias Gram-negativas anaeróbicas facultativas não foram encontradas nessa coleta. O número de bactérias encontrada nas amostras após o preparo químico-cirúrgico estava menor quando comparadas as amostras iniciais. Deste modo os resultados apresentaram uma alta prevalência de bactérias entéricas e fungos em dentes com necessidade de retratamento. O iodo melhorou o efeito antimicrobiano do tratamento.

Card et al. (2002) tentaram determinar se o aumento do preparo apical aumenta na redução de micro-organismos cultiváveis no canal radicular. Foram selecionados 40 pacientes com evidências clínicas e radiográficas de periodontite apical. As amostras foram coletadas após a cirurgia de acesso (S1) e após a cada etapa do preparo químico-cirúrgico o qual foi irrigado com NaOCl (1%). A primeira instrumentação foi realizada com limas rotatórias ProFile® (0.04 taper) (S2). A segunda instrumentação foi realizada com limas Light-Speed® com a intenção de ampliar o terço apical (S3). Sendo que a raiz mesial dos molares foi instrumentada até o diâmetro de 60 e os caninos e pré-molares até o diâmetro de 80. Trinta e oito das 40 amostras iniciais apresentaram se positivas. Os autores observaram uma diferença

estatisticamente significativa entre S1 e S2, entretanto não houve diferença entre S2 e S3. Os pré-molares não apresentaram culturas positivas após a instrumentação. Já os molares 81.5% (22/27) apresentaram culturas negativas após a primeira instrumentação e 88.9%(24/27) após a segunda instrumentação (S3). Deste modo, os autores concluíram que porcentagem considerável dos canais radiculares continuam positivas mesmo com a preparo apical maior utilizado neste estudo, para haver uma redução ainda maior os autores sugerem o uso da medicação intracanal.

Peters et al. (2002) investigaram quais foram as bactérias presentes no canal radicular com periodontite apical e se o Ca(OH)_2 influenciou no comportamento desses micro-organismos entre as sessões. Foram selecionados 42 pacientes com periodontite apical os quais foram divididos em 2 grupos: Grupo da sessão única (n=21) e o grupo das múltiplas sessões (n=21). As coletas microbiológicas do grupo de sessão única, foram realizadas antes e após o preparo químico-cirúrgico o qual foi irrigado com NaOCl (2%), enquanto que para o grupo das múltiplas sessões realizaram mais duas coletas, sendo elas após a remoção da medicação intracanal de Ca(OH)_2 e outra após repreparo químico-cirúrgico. Todas as amostras iniciais foram positivas com uma média total de $1,0 \times 10^6$ ufc. Após o preparo químico-cirúrgico o número de amostras positivas caiu significativamente para 10 amostras positivas, sendo sua média total de $1,8 \times 10^3$ ufc. Entretanto, após 1 mês do uso da medicação intracanal 15 dentes apresentavam culturas positivas com uma média de $9,3 \times 10^3$ ufc. E não foi observado diferença do número ufc no final da primeira sessão e no final da segunda sessão. Os micro-organismos mais frequentemente encontrados foram *P. intermedia*, *Capnocytophaga* spp., *A. odontolyticus*, *P. acnes* e *P. micros*. Embora a pasta de Ca(OH)_2 tenha sido colocada nos canais preparados, o número de canais positivos aumentou no período entre as visitas.

Peters e Wesselink, (2002) avaliaram o prognóstico de 39 dentes com periodontite apical, relacionando as culturas positivas e negativas em dentes tratados em sessão única ou duas sessões utilizando o Ca(OH)_2 por 1 mês como medicação intracanal. Na primeira sessão, foi realizado o acesso e o preparo químico-cirúrgico com NaOCl (2%) e então os dentes foram divididos em 2 grupos: grupo (1) da sessão única os quais foram obturados (n=21) e o grupo (2) das duas sessões os quais foram medicados com Ca(OH)_2 e solução salina (n=18). As coletas foram realizadas antes e após o preparo químico-cirúrgico e apenas no grupo das duas sessões após o uso da medicação intracanal. Os pacientes foram acompanhados por 4,5 anos para avaliar o índice de sucesso. Dos 21 dentes tratados em uma sessão, 17 apresentaram o reparo da rarefação óssea periapical (81%), e 4 apresentaram uma redução do

tamanho da rarefação (19%). No grupo das duas sessões, 12 apresentaram o reparo da rarefação periapical (71%), e 4 apresentaram a redução da lesão (23%) apenas 1 dente apresentou fracasso no tratamento (6%). Dos 30 casos que foram obturados com cultura negativa 22 (74%) houve reparo (11 do grupo 1 e 11 do grupo 2) enquanto que 7 dos 8 dentes (6 do grupo 1, um do grupo 2) que apresentaram culturas positivas também foi observado o reparo. Logo os autores concluíram que não há diferença no tratamento de canal realizado em uma ou duas sessões. Contudo, mais estudo prospectivos devem ser feitos com um número maior de pacientes.

Ercan et al. (2004) tiveram como objetivo comparar a eficácia da clorexidina 2% e NaOCl 5,25% como irrigante. Foram selecionados 30 pacientes com periodontite apical os quais foram submetidos ao tratamento endodôntico. As amostras foram coletadas após cirurgia de acesso, após o preparo químico-cirúrgico e após 48h do preparo químico-cirúrgico realizado. Cultivadas em câmara de anaerobiose, o grupo da clorexidina todas as amostras apresentavam-se positivas, após o preparo químico-cirúrgico 3 amostras estavam positivas as quais mantiveram-se positivas após 48h. No grupo do NaOCl todas as amostras iniciais também se apresentavam positivas e nas amostras subsequentes 4 amostras continuavam positivas. Os autores concluíram que ambos os irrigantes são efetivos na redução de microrganismos.

Kvist et al. (2004) avaliaram as condições bacteriológicas dos canais radiculares após o tratamento endodôntico em sessão única ou em duas sessões. Foram selecionados dentes com periodontite apical (n=96) os quais foram randomizados em 2 grupos: sessão única e múltiplas sessões. As coletas iniciais foram realizadas nos 2 grupos, no grupo da sessão única foi realizada após o preparo químico-cirúrgico realizado com NaOCl (5%) e no grupo de sessão múltipla houve uma coleta após a remoção do Ca(OH)_2 . As amostras iniciais mostraram a presença de 98% de microrganismos nos dentes. Após a instrumentação apresentou uma redução nas amostras cultiváveis em 29% em sessão única e, em duas sessões com uso do Ca(OH)_2 observou-se um aumento na quantidade de microrganismos para 39%. Os micro-organismos mais prevalentes após o preparo químico-cirúrgico foram: *Streptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp. e *Prevotella* spp. Após a medicação intracanal com Ca(OH)_2 foram isolados *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Concluiu-se que, do ponto de vista microbiológico, o tratamento de dentes com periodontite apical realizada em duas sessões não foi mais eficaz do que o procedimento realizado em sessão única.

McGurkin-Smith et al. (2005), tiveram como objetivo determinar a redução bacteriana utilizando a lima Profile GT[®], um protocolo de irrigação com NaOCl (5,25%) e EDTA, e

medicação intracanal de Ca(OH)_2 . Foram selecionados dentes inferiores com periodontite apical. As amostras bacterianas foram coletadas após o acesso cirúrgico, após o preparo químico-cirúrgico e irrigação final, e após uma semana de medicação intracanal. As amostras iniciais 93,55% apresentavam-se positivos com uma mediana de $5,60 \times 10^4$ ufc. Após o preparo químico-cirúrgico e a irrigação final 52,72% das amostras continuavam positivas com uma mediana de $8,00 \times 10^1$ ufc. Após a utilização medicação de Ca(OH)_2 18,51% das amostras apresentavam positivas com uma mediana de $8,25 \times 10^1$ ufc. Deste modo uma adequada instrumentação, irrigação e o uso da medicação intracanal pode aumentar o índice de sucesso.

Waltimo et al. (2005) avaliaram a eficácia do preparo químico-cirúrgico dos canais com NaOCl (2,5%) e a medicação intracanal com o Ca(OH)_2 no controle da infecção e no reparo das lesões periapicais. Foram selecionados 50 dentes, randomizados e alocados em dos três grupos: sessão única (grupo SV, n=20), uma semana de Ca(OH)_2 (grupo CH, n=18), ou canal foi deixado vazio, mas selado por uma semana (grupo EC, n=12). As amostras microbiológicas foram coletas antes e após o preparo químico-cirúrgico em todos os grupos, na primeira sessão, após medicação intracanal e preparo químico-cirúrgico no grupo CH, e no grupo EC, foram coletadas antes e após o preparo químico-cirúrgico na segunda sessão. Reparo das rarefações ósseas perirradiculares foram controlados com radiografica periapicas a cada 4, 12, 26, e 52 semanas. As amostras foram cultivadas. As amostras iniciais apresentaram-se positivas. Após o preparo químico-cirúrgico, as culturas apresentaram positivas em 20% para o grupo SV, 22% para o grupo CH e 23% para o grupo EC. Na segunda sessão, no grupo CH apresentou 33% das culturas positivas e após o preparo químico-cirúrgico todas as amostras apresentaram-se negativas. Já no grupo EC, antes do preparo químico-cirúrgico apresentou 67% e após 17% de culturas positivas. As bactérias mais presentes após o preparo químico-cirúrgico no grupo SV foram: *Veillonella* sp., *Alpha-haemolytic Streptococcus* sp., no grupo CH *Alpha-haemolytic Streptococcus* sp., e no grupo EC *Alpha-haemolytic Streptococcus* sp., *Peptostreptococcus* sp. Os autores concluíram que o NaOCl tem uma boa eficácia clínica no controle da infecção. O Ca(OH)_2 não apresentou os resultados esperado, e se faz necessário desenvolvimento medicamentos intracanaís mais efetivos na desinfecção.

Chu et al. (2006) compararam a eficácia do preparo químico-cirúrgico e de 3 tipos diferentes de medicação intracanal (anti-inflamatório esteroideal, antibiótico ou pasta de Ca(OH)_2) na redução de micro-organismos dos canais radiculares. Foram selecionados 88 dentes com periodontite apical. As amostras microbiológicas foram coletadas antes do

preparo químico-cirúrgico com NaOCl (0,5%) e após medicação intracanal, por uma semana. Oitenta e sete amostras iniciais foram positivas, após o uso da medicação intracanal com anti-inflamatório esteroidal, antibiótico ou pasta de Ca(OH)_2 , em porcentagem de culturas positivas foram 48% (13 de 27), 31% (8 de 26), e 31% (11 de 35), respectivamente. Sendo que a média de ufc foram de $5,2 \times 10^6$, $4,9 \times 10^6$ e $2,5 \times 10^6$ para anti-inflamatório esteroidal, antibiótico ou pasta de Ca(OH)_2 , respectivamente. As bactérias remanescentes após a medicação com Ca(OH)_2 foram: *Capnocytophaga* spp., *Eikenella corrodens*, *Bifidobacterium* spp., *C. subterminale*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinomyces* spp., *Veillonella dispar*, *Veillonella* spp., *Neisseria* spp., *P. micros*, *P. prevotii*, *Gemella morbillorum*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *S. constellatus* e *Streptococcus* spp. Os resultados deste estudo indicam que os diferentes medicamentos podem afetar o microbiota e a quantidade de micro-organismos cultiváveis. Entretanto observou-se resultados semelhantes entre o Ca(OH)_2 e as outras medicações estudadas.

Carver et al. (2007) compararam a eficácia de duas técnicas preparo químico-cirúrgico em raízes manuais de raízes mesiais com periodontite apical. Os pacientes foram divididos em 2 grupos: Grupo manual/rotatório com 16 dentes os quais foram preparados com limas manuais e rotatórias; e Grupo manual/rotatório/ultrassom com 15 dentes, os quais foram preparados de maneira similar, sendo posteriormente realizada a agitação ultrassônica com NaOCl 6%. As amostras coletadas antes e após o preparo químico-cirúrgico e após a agitação ultrassônica. As amostras foram incubadas e cultivadas em ágar sangue por 7 dias em câmara de anaerobiose a 37° e então as ufc foram contadas e normalizadas na base log10. Todas as amostras iniciais apresentaram-se positivas. A instrumentação rotatória e manual apresentou-se eficientes na remoção de microrganismos ($P < 0.001$) indicando uma média uma média de 5,6 e 3,4 ufc, respectivamente. No grupo da instrumentação rotatória após o uso da irrigação ultrassônica apresentou uma média de 1,2 ufc. Os resultados demonstraram que quando realizou a irrigação ultrassônica houve uma maior redução na quantidade de culturas positivas ($P = 0,04$). Deste modo, os autores observaram que a irrigação ultrassônica após o preparo químico-cirúrgico reduziu o número de ufc e concluíram que a irrigação ultrassônica deve ser realizada para uma maior redução e assim atingir o objetivo de obter um maior número de sucesso no tratamento endodôntico.

Manzur et al. (2007) avaliaram a efetividade de diferentes medicações (Ca(OH)_2 com água estéril; clorexidina; Ca(OH)_2 associado com a clorexidina) na redução microbiana em dentes com periodontite apical. Amostras foram coletadas antes e após o preparo químico-cirúrgico com NaOCl (1%), e após medicação intracanal por uma semana e então realizaram

uma nova coleta. As amostras foram cultivadas. As amostras iniciais apresentavam uma média de $3,3 \times 10^7$ ufc, as amostras pós o preparo químico-cirúrgico $1,37 \times 10^3$ ufc, após medicação uma mediana de $2,98 \times 10^2$ ufc. Dividindo em grupos: O grupo do Ca(OH)_2 , nas coletas iniciais haviam 11 culturas positivas, pós o preparo químico-cirúrgico 3 e após a medicação intracanal 2; no grupo da clorexidina, as amostras iniciais apresentaram 11 culturas positivas, após o preparo químico-cirúrgico 4 e após medicação intracanal 5; No grupo do Ca(OH)_2 , nas coletas iniciais haviam 11 culturas positivas, após o preparo químico-cirúrgico 4 e após a medicação intracanal 2. Logo os autores concluíram que não houve diferença entre os grupos do preparo químico-cirúrgico e a medicação intracanal independente do grupo e que a eficácia antibacteriana das medicações estudadas é similar.

Paquette et al. (2007) avaliaram a eficácia da solução de clorexidina 2% em 22 dentes com periodontite apical. Os dentes foram instrumentados na primeira sessão, medicados com clorexina, e a segunda sessão foi marcada 1-2 semanas depois. As amostras bacteriológicas foram coletadas na primeira e na segunda sessão, antes (1A, 2A) e após (1B, 2B) o preparo químico-cirúrgico. A contagem de bactérias viáveis foi obtida por cultura (ufc) e microscopia usando com corantes vitais. A média da ufc da amostra 1A foi significativamente maior ($p < 0,0001$) do que todas as outras amostras com média de 10^5 ufc. A média da amostra 2A (10^2 ufc) era significante maior ($p < 0,05$) do que amostra 1B (10^1 ufc). A média de ufc da amostra 2B (10^1 ufc) não foi significativamente diferente das amostras 1B (10^1 ufc). A diferença entre as ufc após o uso da medicação intracanal por 7 e 14 dias foi significativa da amostra 1B ($p < 0,05$) e amostra 2A ($p < 0,03$) mas não para as amostras 1A e 2B. Em conclusão, a solução de clorexidina a 2% aplicado como medicação intracanal durante 7 dias a 14 dias não aumentou nem reduziu a quantidade de culturas bacterianas além daquelas alcançadas pelo preparo químico-cirúrgico na primeira sessão.

Siqueira et al. (2007a) estudaram a efetividade do preparo químico-cirúrgico com NaOCl 2,5% e medicação intracanal de Ca(OH)_2 associado a glicerina em 11 dentes com periodontite apical. Por meio da cultura bacteriana, todas as amostras iniciais foram positivas tendo uma mediana de 3×10^5 ufc, após o preparo químico-cirúrgico 5 eram positivas e após o uso da medicação intracanal 2 casos continuavam positivos, ambos com uma mediana 0. As bactérias foram cultivadas e então identificadas por meio do sequenciamento do gene *16S rRNA*. As bactérias encontradas após o preparo químico-cirúrgico foram *S. mitis*, *Streptococcus gordonii*, *S. oralis/mitis/sanguinis*, *Neisseria sicca*, *Flavobacterium* sp., *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Por outro lado, as espécies mais encontradas após a medicação intracanal foram *F. nucleatum* e *Lactococcus garvieae*. Concluiu-se que todo o

protocolo antibacteriano utilizado neste estudo reduziu significativamente o número de bactérias no canal e tornou a maioria dos canais livres de bactérias cultiváveis.

Siqueira et al. (2007b) estudaram a redução de micro-organismos, pelo método de cultura, e identificação, pelo método de sequenciamento do gene *16S rRNA*., em 12 dentes com periodontite apical após preparo químico-cirúrgico com NaOCl (2,5%) e medicação intracanal de Ca(OH)_2 associado ao paramonoclorofenol canforado e glicerina, por uma semana. As 11 amostras iniciais foram positivas com uma mediana de $3,02 \times 10^5$ ufc, após o preparo químico-cirúrgico 5 amostras foram positiva com uma mediana de $1,2 \times 10^2$ ufc, e após o uso da medicação intracanal apenas um caso continuou positivo com 4×10^2 cfu. As bactérias encontradas após o preparo químico-cirúrgico foram *Streptococcus oralis*, *P. alactolyticus*, *Micromonas micros*, *S. anginosus*, *S. constellatus/intermedius*, *Streptococcus parasanguinis*, *P. acnes*, *S. aureus*, *Delftia* sp. e *Cellulomonas parahominis*. O único micro-organismo encontrado após medicação foi *P. acnes*. Concluiu-se que o preparo químico-cirúrgico com 2,5% de NaOCl como irrigante reduziu significativamente o número de bactérias no canal, mas não conseguiu tornar o canal livre de bactérias cultiváveis em mais da metade dos casos. A medicação intracanal 7 dias com pasta Ca(OH)_2 associado ao paramonoclorofenol canforado aumentou significativamente o número de casos de cultura negativa.

Siqueira et al. (2007c) avaliaram a redução bacteriana após preparo químico-cirúrgico com clorexidina 0,12% e medicação intracanal de Ca(OH)_2 associado à clorexidina 0,12% em 17 dentes com periodontite apical. Amostras microbiológicas foram coletados antes e após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal por 7 dias. Das 17 amostras iniciais 13 apresentaram se positivas com uma mediana de $1,1 \times 10^6$ ufc, após o preparo químico-cirúrgico 7 amostras foram positiva com uma mediana de 4×10^2 ufc, e após o uso da medicação intracanal apenas um caso continuou positivo, com uma mediana de 0. As bactérias foram cultivadas e então identificadas por meio do sequenciamento do gene *16S rRNA*. As bactérias encontradas após o preparo químico-cirúrgico foram *Streptococcus mitis* biovar, *P. acnes*, *Prevotella* oral clone FM005, *P. alactolyticus*, *A. odontolyticus*, *Actinomyces urogenitalis*, *Streptococcus oralis*, *S. sanguinis*, *Propionibacterium granulosum*, *S. aureus* e *Proteobacterium* clone FAC20. Após a medicação intracanal foram encontradas *S. mitis* e *P. acnes*. Concluiu-se que o preparo químico-cirúrgico com 0,12% de solução de clorexidina como irrigante reduziu significativamente o número de bactérias intracanaís, mas não conseguiu tornar o canal livre de bactérias cultiváveis em cerca de metade dos casos. A

aplicação da medicação intracanal de 7 dias com a pasta $\text{Ca}(\text{OH})_2$ associado a clorexidina aumentou significativamente o número de casos negativos.

Siqueira et al. (2007d) compararam a atividade antibacteriana do NaOCl 2,5% e a clorexidina 0,12% quando utilizados com irrigante durante o preparo químico-cirúrgico de 34 dentes com periodontite apical. As bactérias foram cultivadas e identificadas por meio da análise de sequenciamento do gene *16S rRNA*. 32 amostras iniciais foram positivas com uma mediana de $7,32 \times 10^5$ ufc e $8,5 \times 10^5$ ufc para o grupo do NaOCl 2,5% e para o grupo da clorexidina 0,12%, respectivamente. Após o preparo químico-cirúrgico, a mediana de ufc de colônia nas amostras irrigadas com NaOCl foi de $2,35 \times 10^3$ e com clorexidina foi de 2×10^2 . As bactérias isoladas após o preparo químico-cirúrgico com NaOCl 2,5% foram: *Streptococcus oralis*, *F. nucleatum*, *S. mitis*, *P. alactolyticus*, *S. constellatus/ intermedius*, *S. gordonii*, *S. parasanguinis*, *P. acnes*, *N. sicca*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli* e *Flavobacterium* sp. Por sua vez, no grupo da clorexidina foram isolados: *S. mitis*, *Streptococcus oralis*, *S. sanguinis*, *P. alactolyticus*, *Prevotella* oral clone FM005, *A. odontolyticus*, *Actinomyces urogenitalis*, *S. aureus*, *Proteobacterium* clone FAC20, *Delftia* sp. e *Propionibacterium granulosum*. Com estes resultados foi possível concluir que não há diferença estatisticamente significativa entre as 2 substâncias.

Schirrmeister et al. (2007) avaliaram a presença de micro-organismos durante várias etapas do retratamento endodôntico conservador em 20 dentes. As amostras foram coletadas após a remoção do material obturador, após o preparo químico-cirúrgico com NaOCl (2,5%) e EDTA (17%), após uma irrigação final com clorexidina (2%) e após medicação intracanal com $\text{Ca}(\text{OH})_2$. As amostras foram cultivadas e realizado o ensaio da reação de polimerase em cadeia (PCR) com iniciador universal e específico para *E. faecalis*. Após a remoção do material obturador, 12 dentes (60%) continham micro-organismos cultiváveis, os quais apresentavam uma mediana de $3,5 \times 10^3$ ufc e $1,5 \times 10^5$ de cultivo aeróbio e anaeróbio, respectivamente. Após o preparo químico-cirúrgico com irrigação com NaOCl e EDTA e a irrigação final com clorexidina não apresentou culturas positivas. Depois de 2 ou 3 semanas, na segunda sessão, após o uso da medicação intracanal 2 amostras foram positivas. O número de resultados positivos nas amostras iniciais dos resultados obtidos pelo PCR foi de 65%. Destes casos o *E. faecalis* foi encontrado em 31% dos casos após a remoção do material obturador. E nas etapas subsequentes não foram encontrados micro-organismos. Os autores concluíram que com o preparo químico-cirúrgico sendo irrigado com NaOCl e EDTA são suficientes para a descontaminação do sistema radicular durante o retratamento endodôntico.

Vianna et al. (2007) identificaram as bactérias presentes após cirurgia de acesso, após o preparo químico-cirúrgico e após medicação intracanal em 24 dentes com periodontite apical. O preparo químico-cirúrgico foi realizado utilizando o gel de clorexidina 2% e os dentes foram divididos em 3 grupos de acordo com a medicação intracanal: $\text{Ca}(\text{OH})_2$, clorexidina 2% e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ associado à clorexidina 2%. Foram utilizadas técnicas de cultivo aeróbias e anaeróbias para identificação e análise da redução bacteriana após os procedimentos endodônticos. As espécies bacterianas mais encontradas após o preparo químico-cirúrgico foram *P. acnes* e *P. propionicum*. Após 7 dias de medicação intracanal, as espécies mais frequentes foram *P. acnes*, *Clostridium argentinense*, *A. meyeri*, *A. naeslundii*, *Bifidobacterium spp.* e *G. morbillorum*. As amostras iniciais apresentaram uma média de $2,8 \times 10^5$ ufc, após o preparo químico-cirúrgico houve uma redução para uma média de $1,0 \times 10^2$ ufc e após o uso medicação intracanal do grupo da pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ obtiveram uma média de $2,0 \times 10^2$ ufc, do grupo da clorexidina $1,5 \times 10^3$ ufc, e do grupo da associação $9,7 \times 10^1$ ufc. Os autores concluíram que houve maior redução durante o preparo químico-cirúrgico e que não houve redução significativa com o uso da medicação intracanal por uma semana. Desta forma, o uso da medicação intracanal para um maior sucesso do tratamento endodôntico é questionável.

Wang et al. (2007) avaliaram a efetividade da clorexidina gel (2%), como substância química auxiliar, e da pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ associado a clorexidina gel, como medicação intracanal, na redução microbiana. Foram selecionados 43 pacientes com periodontite apical. Paciente com pulpite irreversível foram incluídos como controle negativo. As amostras bacterianas foram coletadas após cirurgia de acesso (S1), após preparo químico-cirúrgico (S2), e após duas semanas de medicação intracanal (S3). As amostras foram cultivadas. Dos dentes que apresentaram culturas positivas em S1, 35 de 39 (89,7%) eram negativas em S2. Deste modo observou-se uma redução significativa no número de micro-organismos entre S1 e S2. A medicação intracanal foi utilizada por aproximadamente 19 dias. Trinta e três de 36 (91,7%) apresentaram culturas negativas. Desta maneira não havendo diferença entre S2 e S3. Os autores concluíram que o tratamento endodôntico em sessão única é desejável quando o preparo químico-cirúrgico estiver completo. Os resultados deles apresentaram que a clorexidina gel 2% foi efetivo na desinfecção do canal radicular.

Martinho e Gomes (2008) quantificaram endotoxinas e bactérias cultiváveis no canal radicular com periodontite apical antes e após o preparo químico-cirúrgico com NaOCl (2,5%) e investigaram uma possível correlação entre a endotoxinas, bactérias cultiváveis com a presença de sintomatologia clínica. As amostras foram coletadas de 24 dentes selecionados.

A técnica de cultura foi utilizada para determinar a ufc. O Lisado de Amebócitos do *Limulus* foi o utilizado para mensurar os níveis de endotoxina. Todas as amostras iniciais foram positivas com uma mediana de $2,64 \times 10^5$ ufc e após o preparo químico-cirúrgico houve uma redução para $5,25 \times 10^2$ ufc. O presente estudo demonstrou que o preparo químico-cirúrgico foi capaz de reduzir o número de micro-organismos.

Vianna et al. (2008) tiveram como objetivo identificar 40 espécies bacterianas e quantificar o número de bactérias totais nas amostras do canal radicular após cirurgia de acesso, após o preparo químico-cirúrgico e após a medicação intracanal. Foram selecionados 24 dentes para o estudo. O preparo químico-cirúrgico foi realizado com clorexidina gel 2% e então 3 medicações intracanaís foram utilizadas [M1: pasta Ca(OH)_2 ; M2: clorexidina gel (2%); e M3: a pasta de Ca(OH)_2 associado a clorexidina gel (2%)] por uma semana. Foi utilizado hibridização DNA-DNA para detectar 40 espécies bacterianas após o cultivo das amostras. Técnicas de cultura aeróbias e anaeróbias foram utilizadas para determinar a comunidade bacteriana pela ufc. Todas as amostras foram positivas nas coletas iniciais tendo uma média de $2,0 \times 10^5$ ufc. Após o preparo químico-cirúrgico 8 casos continuavam positivos com uma média de $1,0 \times 10^2$ ufc. Após 7 dias da medicação intracanal 13 casos apresentaram-se positivos com uma média de variação de $6,0 \times 10^2$ ufc. Esse aumento após a medicação intracanal não é significante quando comparadas com o preparo químico-cirúrgico. Deste modo pode-se concluir que a maior quantidade de bactérias foi encontrada nas amostras iniciais. Após a preparo químico-cirúrgico utilizando gel de clorexidina (2%) como substância auxiliar, obteve-se uma grande redução nas bactérias. Por outro lado, o uso da medicação intracanal durante 7 dias não melhorou a redução bacteriana obtida pela preparo químico-cirúrgico. Além disso, contribuiu para um ligeiro aumento nos números bacterianos e no número de casos positivos.

Garcez et al. (2010) investigaram a redução bacteriana após a terapia fotodinâmica em 31 dentes com necessidade de retratamento endodôntico convencional. As amostras microbiológicas foram coletadas após a remoção da guta percha, após o preparo químico-cirúrgico realizado com solução de clorexidina 2% e após a terapia fotodinâmica realizada com foto sensibilizador o qual foi uma associação entre polietilenimina e clorina o qual foi encubado por 2 minutos e irradiado 240 segundos num total de 9,6 J. A identificação bacteriana foi realizada por testes fenotípicos. Após o preparo químico-cirúrgico as bactérias mais prevalentes foram: *Enterococcus* spp., *Actinomyces* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium* spp. e *Porphyromonas* spp. Após o uso da terapia fotodinâmica não foi

observado crescimento bacteriano. O uso da terapia fotodinâmica associado ao tratamento endodôntico convencional leva a uma maior redução da carga microbiana.

Beus et al. (2012) compararam clinicamente o efeito da irrigação ultrassônica passiva (PUI) com a irrigação convencional (IC) e da medicação intracanal. Foram selecionados 50 pacientes com periodontite apical. Os dentes foram randomizados em 2 grupos: grupo da irrigação convencional e o grupo da PUI. Ambos os grupos passariam pela etapa da medicação intracanal com Ca(OH)_2 . As coletas microbianas foram obtidas antes do preparo químico-cirúrgico (S1); após o protocolo da irrigação: sendo que no grupo IC, a irrigação seria apenas com NaOCl (1%) e no grupo PUI, a irrigação seria composta por NaOCl (1%) + EDTA (17%) + Clorexidina (2%) (S2); após 1 semana de medicação intracanal (S3); e depois da reinstrumentação (S4). Das coletas iniciais 98% foram positivas. Após irrigação convencional e a PUI apresentaram uma redução de 80% e 84%, respectivamente. Após o uso da medicação intracanal de Ca(OH)_2 no total das amostras (IC + PUI) reduziu para 87% e após a reinstrumentação para 91%. Desta maneira não houve diferença estatística entre os métodos de irrigação.

Endo et al. (2012) realizaram um estudo clínico para quantificar as bactérias cultiváveis nos canais radiculares de dentes com periodontite apical persistente após o tratamento endodôntico. Foram selecionados 50 pacientes com necessidade de retratamento. As amostras foram coletadas após a remoção da guta percha e após o preparo químico-cirúrgico com clorexidina gel a 2% e irrigação final com EDTA (17%). Técnica de cultura foi utilizada para determinar ufc e Lisado de Amebócitos do Limulus foi o utilizado para mensurar o nível de endotoxina. Todas as amostras após a remoção da guta percha eram positivas, tendo uma mediana de $5,14 \times 10^3$ ufc e após o preparo químico-cirúrgico uma mediana de 20. Observando assim, após o preparo químico-cirúrgico uma redução bacteriana de 99,61%. Em suma o preparo químico-cirúrgico foi eficaz na redução dos micro-organismos no tratamento da periodontite apical.

Paiva et al. (2012) tiveram como objetivo avaliar os efeitos antimicrobianos do preparo químico-cirúrgico utilizando instrumentos rotatórios de níquel titânio, e desinfecção complementar com PUI (n= 13) ou irrigação convencional com clorexidina a 2% (n= 14). Para isso, foram selecionados dentes com periodontite apical. As amostras foram coletadas antes (S1) e após preparo químico-cirúrgico com NaOCl (2,5%), e então foram divididos em 2 grupos: grupo da PUI com ativação de NaOCl (2,5%), e o grupo da irrigação convencional com solução de clorexidina (2%) e então as amostras foram cultivadas. Nas coletas iniciais todas as amostras foram positivas. No grupo da PUI após o preparo químico-cirúrgico

apresentaram 5 (38,5%) casos positivos e após a irrigação complementar 3 (23%) casos positivos. No grupo da irrigação com clorexidina após o preparo químico-cirúrgico apresentaram 5 (36%) casos positivos e após a irrigação complementar 2 (14%) casos positivos. Deste modo, os procedimentos complementares de desinfecção com a PUI ou irrigação convencional com clorexidina reduz o número de casos positivos na cultura de bactérias.

Endo et al. (2013) detectaram os microrganismos em dentes com necessidade de retratamento e quantificou as ufc durante diferentes estágios. Foram selecionados 50 dentes e as amostras foram coletadas antes e após preparo químico-cirúrgico com clorexidina gel (2%) e após as medicações intracanal, as quais, foram randomizados e divididas em três grupos: [Ca (OH)₂ associado com 2% clorexidina gel por 14 dias], [Ca (OH)₂ associado com soro fisiológico por 14 dias] ou 2% clorexidina gel por 7 dias. As amostras foram cultivadas para a realização da contagem das ufc e identificadas por meio de cultura e ensaio de PCR (16S *rRNA*). Todas as amostras iniciais foram positivas com uma mediana de $5,14 \times 10^3$ ufc. Após o preparo químico-cirúrgico obteve-se 10 dentes com cultura positiva com uma mediana de $5,14 \times 10^3$ ufc. Após o uso da medicação intracanal apenas 11 culturas foram positivas, e a mediana foi de 40 ufc. A redução microbiana após o preparo químico-cirúrgico foi de 99,61% ufc, entretanto não houve diferença estatisticamente significante quando comparado a medicação intracanal. Os micro-organismos mais prevalentes após o preparo químico-cirúrgico foram *Neisseria* spp., *Haemophilus aphrophilus*, *Eggerthella lenta*, *E. faecalis* e após a medicação intracanal *E. faecalis*, *A. viscosus* e *Aerococcus viridans*. Deste modo foi possível observar que a grande maioria das bactérias encontradas após o tratamento foram Gram-positivas. Além disso, os resultados demonstraram que a clorexidina é efetiva para desinfecção do canal radicular, e que a medicação intracanal não melhora a desinfecção.

Halbauer et al. (2013) avaliaram o efeito antibacteriano do preparo químico-cirúrgico com NaOCl (2,5%) e gás ozônio em 23 dentes com periodontite apical: 17 com infecções endodônticas primárias e 6 com necessidade de retratamento. As amostras foram cultivadas e identificadas por testes fenotípicos. Após o uso do ozônio houve uma redução de 82% dos casos. Os micro-organismos remanescentes após tratamento com ozônio foram: *S. mitis*, *Neisseria saprophytica*, *S. epidermidis*, *Corynebacterium* spp., *E. faecalis*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *S. constellatus*, *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *P. acnes*, *P. melaninogenica* e *S. epidermidis*. Os resultados deste estudo mostram a diversidade das espécies de bactérias remanescentes no canal radicular após o preparo químico-cirúrgico. A utilização do ozônio na terapia endodôntica

diminuiu o número de ufc quando comparadas com os resultados após o preparo químico-cirúrgico.

Xavier et al. (2013) compararam a eficácia do tratamento endodôntico em 1 ou 2 sessões na remoção de bactérias cultiváveis em canais radiculares. Foram selecionados 48 dentes com periodontite apical primária. A primeira amostra era coletada após o acesso e então os dentes divididos aleatoriamente em quatro grupos: G1, NaOCl (1%); G2, clorexidina gel (2%); G3, NaOCl (1%) associado com medicação intracanal de Ca(OH)_2 ; e G4, clorexidina gel (2%) associado com medicação intracanal de Ca(OH)_2 . Amostras foram coletadas após o preparo químico-cirúrgico, apenas em G1 e G2, e após 14 dias da medicação intracanal, apenas em G3 e G4. A técnica de cultura foi utilizada para realizar a contagem bacteriana. Todas as amostras foram positivas na coleta inicial com uma mediana de $1,6 \times 10^6$ ufc. Separando por grupos o grupo G1 sua coleta inicial apresentava uma mediana de $1,6 \times 10^7$ ufc após o preparo químico-cirúrgico uma mediana de $3,4 \times 10^2$ ufc; No grupo G2 sua coleta inicial apresentava uma mediana de $1,6 \times 10^6$ ufc; após o preparo químico-cirúrgico uma mediana de $8,0 \times 10^2$ ufc; No grupo G3 na coleta inicial apresentava uma mediana de $1,04 \times 10^7$ ufc e após medicação intracanal uma mediana de $7,2 \times 10^2$ ufc; No grupo G4 na coleta inicial apresentava uma mediana de $4,2 \times 10^4$ ufc e após a medicação intracanal apresentava $2,2 \times 10^2$ ufc. Ambos os protocolos são eficientes em reduzir bactérias, entretanto não foi possível eliminá-las.

Jurič et al. (2014) avaliaram a terapia fotodinâmica como procedimento complementar de desinfecção dos canais radiculares em 21 casos com necessidade de retratamento. As amostras microbiológicas foram coletadas após a remoção do material obturador, após o preparo químico-cirúrgico com NaOCl (2,5%) e após a terapia fotodinâmica com corante a base de cloreto de fenotiazínio, o qual foi agitado por lima K #15 e encubado por 2 minutos. Após isso o canal foi lavado com água e seco para remover o excesso do fotossensibilizante, seco com pontas de papel e irradiado por 60 segundo (com uma energia total de 6J) no modo de onda contínua. Os micro-organismos persistentes após preparo químico-cirúrgico e terapia fotodinâmica foram: *E. faecalis*, *Peptostreptococcus* spp., *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *Porphyromonas* spp., *Veillonella parvula* e *P. aeruginosa*. Os resultados demonstram que a terapia fotodinâmica utilizado como complemento do tratamento endodôntico convencional alcançou uma redução significativa da carga microbiana intracanal.

Martinho et al. (2014) compararam a eficácia de sistemas reciprocantes de lima única e sistemas rotatórios de limas múltiplas na remoção de endotoxinas e bactérias cultiváveis. Foram selecionados 48 dentes com periodontite apical primária os quais foram divididos em

quatro grupos: WaveOne (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) ($n = 12$); Reciproc (VDW, Munich, Germany) ($n = 12$), ProTaper (Dentsply Maillefer) ($n = 12$), e Mtwo (VDW) ($n = 12$). As amostras foram coletadas antes e após o preparo químico-cirúrgico, sendo que a irrigação foi realizada com NaOCl (2,5%). A Técnica de cultura foi usada para contagem das ufc e Lisado de Amebócitos do Limulus foi o utilizado para mensurar o nível de endotoxina. Todas as amostras iniciais apresentaram culturas positivas. No grupo WaveOne, amostras iniciais observou-se uma mediana de $1,4 \times 10^5$ ufc e após preparo químico-cirúrgico uma mediana de $2,3 \times 10^2$ ufc. No grupo Reciproc, amostras antes do preparo químico-cirúrgico observou-se uma mediana de $1,7 \times 10^5$ ufc e após preparo químico-cirúrgico uma mediana de $1,2 \times 10^2$ ufc. No grupo ProTaper, amostras iniciais apresentaram uma mediana de $1,6 \times 10^5$ ufc e após preparo químico-cirúrgico uma mediana de $3,4 \times 10^2$ ufc. No grupo MTwo, nas amostras iniciais foram identificadas uma mediana de $1,5 \times 10^7$ ufc e após preparo químico-cirúrgico uma mediana de $8,4 \times 10^2$ ufc. Os instrumentos são eficientes na redução microbiana, mas não são efetivos em elimina-los.

Teles et al. (2014) avaliaram a redução bacteriana após o preparo químico-cirúrgico com NaOCl 3% e medicação intracanal utilizando Ca(OH)_2 ou gel de clorexidina 2% por 14 dias em 69 dentes com necrose pulpar. Após o preparo químico-cirúrgico, apresentou uma média de $2,7 \times 10^2$ ufc na análise por cultura microbiológica. Entretanto, uma elevada quantidade de bactérias permaneceu nos canais radiculares após medicação intracanal nos 2 grupos. Na análise entre os grupos, o grupo do Ca(OH)_2 apresentou menor número de ufc ($6,2 \times 10^3$ ufc) quando comparado ao grupo da clorexidina ($2,0 \times 10^3$ ufc). Deste modo, os autores concluíram que a medicação intracanal não foi eficaz na redução bacteriana, mas a pasta de Ca(OH)_2 apresentou uma melhor ação antibacteriana do que o gel de clorexidina 2%.

Ferreira et al. (2015) realizaram cultura bacteriana de bactérias persistentes após o uso de Ca(OH)_2 ou Ca(OH)_2 associado à clorexidina como medicação intracanal em 20 dentes com infecções endodônticas primárias. Nas amostras iniciais do grupo do Ca(OH)_2 apresentou uma mediana de $4,5 \times 10^5$ ufc/mL, após o preparo químico-cirúrgico houve uma redução para 10 ufc/mL e após 14 dias do uso da medicação intracanal estavam presentes uma mediana de 20 ufc/mL. No grupo do Ca(OH)_2 associado à clorexidina apresentou uma mediana de $8,4 \times 10^5$ ufc/mL, após o preparo químico-cirúrgico houve uma redução para 7,5 ufc/mL e após 14 dias do uso da medicação intracanal estavam presentes uma mediana de 10 ufc/mL. Os autores concluíram que Ca(OH)_2 associado à clorexidina mostrou mais efetivo na redução de micro-organismos.

Gomes et al. (2015) compararam o perfil microbiano antes e após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares com clorexidina gel 2% em 15 dentes com lesões endo-periodontais. A identificação bacteriana foi realizada por cultura e por sequenciamento de nova geração. Na análise da microbiota por cultura, as bactérias foram isoladas em apenas 2 casos após o preparo químico-cirúrgico e identificadas como: *P. intermedia/nigrescens*, *Gemella haemolysans*, *P. propionicum* e *Streptococcus salivarius*. Conclui-se que a comunidade microbiana presente nas lesões endodônticas-periodontais combinadas é complexa e mais diversificada.

Barbosa-Ribeiro et al. (2016) avaliaram os níveis de ácido lipoteicóico e de micro-organismos Gram-positivos e sua redução após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal. Para isto foram selecionados 20 dentes unirradiculares com necessidade de retratamento. Os dentes foram randomizados em 2 grupos de acordo com a substâncias utilizadas para o preparo químico-cirúrgico: gel de clorexidina (2%) e NaOCl (6%). Amostras foram coletadas antes e após o preparo químico-cirúrgico e após 30 dias de medicação intracanal com pasta de Ca(OH)_2 associado a clorexidina gel. Os microrganismos foram identificados pelo método da cultura. As bactérias cultiváveis foram determinadas pela contagem da ufc. Após o prepare químico-cirúrgico, as espécies mais frequentemente detectados foram *E. faecalis* e *Micrococcus* spp. Após a medicação intracanal, as espécies mais frequentemente detectadas eram *E. faecalis* e *Staphylococcus* spp. O número inicial de bactérias viáveis estava na faixa de $3 - 2,34 \times 10^2$ ufc/mL. Após o preparo químico-cirúrgico tinha um faixa $0 - 5 \times 10^2$ ufc/mL. Após o uso da medicação intracanal tinha uma faixa de $0 - 3 \times 10^2$ ufc/mL. Deste modo, houve uma redução na quantidade de micro-organismos durante o tratamento endodôntico. E além disso, bactérias Gram-positivas estavam presentes em todas as etapas do tratamento.

Donyavi et al. (2016) avaliaram a eficácia antibacteriana do tratamento endodôntico realizado em sessão única ou em duas sessões em 30 dentes com periodontite apical. As amostras microbiológicas dos canais radiculares foram coletadas antes e após o preparo químico-cirúrgico com NaOCl 6% e no grupo de duas sessões, após a medicação intracanal com Ca(OH)_2 associado a clorexidina (0,2%) por 14 dias. A análise dos resultados foi realizada por meio da contagem de bactérias anaeróbias, aeróbias e *E. faecalis*. A redução de bactérias foi de 87,71% anaeróbias, 93,98% aeróbias e de *E. faecailis* foi de 88,99% nos dentes os quais foi utilizado medicação intracanal enquanto os dentes tratados em sessão única houve uma redução de 48,6% anaeróbias, 40,05% aeróbias e de *E. faecalis* foi de 63,19%. Entretanto, a porcentagem de redução de *E. faecalis* foi semelhante entre os grupos.

Desta forma a medicação intracanal apresenta uma redução maior na quantidade de microrganismos.

Łysakowska et al. (2016) examinaram a presença de bactérias após o preparo químico-cirúrgico com dos canais radiculares de 28 dentes com necessidade de retratamento e 9 dentes com infecções endodônticas primárias. Um total de 14 cepas foram isoladas após o preparo químico-cirúrgico das infecções primárias, sendo as mais presentes *Enterococcus* spp. e *Clostridium* spp. Porém, uma maior diversidade de micro-organismos foi cultivada nos casos com necessidade de retratamento sendo as mais presentes: *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Propionibacterium* spp., *Actinomyces* spp. e *Lactobacillus* spp. A infecção intracanal apresentada foi polimicrobiana sendo a cepa mais prevalente foi *E. faecalis*.

Rajaram et al. (2016) avaliaram a presença de espécies do gênero *Porphyromonas* e *Prevotella* nos canais radiculares de 31 dentes com infecções endodônticas primárias. As amostras foram coletadas após o acesso e após preparo químico-cirúrgico com NaOCl (2,5%) e então foi realizado uma nova coleta. Dos 31 pacientes, 25 apresentaram as bactérias estudadas após abertura. Após o preparo químico-cirúrgico apenas 5 casos continuavam positivos, sendo *Prevotella* spp. mais predominantes do que *Porphyromonas* spp. A presença desses micro-organismos na maioria das amostras revela que eles desempenham um papel significativo na patogênese das infecções endodônticas.

Herrera et al. (2017) conduziram um estudo clínico para investigar a influência da ativação-ultrassônica do EDTA (17%) após o preparo químico-cirúrgico na redução de endotoxinas e bactérias cultiváveis em dentes com periodontite apical. Foram selecionados 24 dentes com periodontite apical e amostras foram coletadas antes e após o preparo químico-cirúrgico com clorexidina gel 2%, os dentes foram divididos em 2 grupos: grupo do EDTA com ativação ultrassônica e grupo do EDTA sem ativação ultrassônica. As amostras foram cultivadas para determinar as ufc. Lisado de Amebócitos do *Limulus* foi o utilizado para mensurar o nível de endotoxina. Todas as amostras iniciais foram positivas com uma mediana de $1,2 \times 10^7$ ufc. Após o preparo químico-cirúrgico houve uma redução de 99,87%. Entretanto em relação ao EDTA quando realizou-se a agitação houve uma redução de 99,98% e quando não se realizou agitação 99,93%, portanto não houve diferença entre os grupos. Deste modo o preparo químico-cirúrgico foi eficaz em reduzir o número de bactérias, mas não é capaz de eliminá-las. Agitação do EDTA não foi eficaz em reduzir o número de bactérias quando comparado ao grupo que não foi agitado.

Pourhajibagher et al. (2017) avaliaram o efeito da terapia fotodinâmica na redução bacteriana durante o retratamento endodôntico de 14 dentes com periodontite apical pós-

tratamento. As amostras foram coletadas após o preparo químico-cirúrgico com NaOCl (2,5%) e após a terapia fotodinâmica a qual o fotossensibilizante utilizado foi a solução de azul de toluidina na concentração de 25µg o qual foi encubada por 5 minutos. Em seguida, o canal foi irradiado por laser de diodo com ondas de comprimentos de 635nm com uma potência de saída de 220 mW por 30s por canal. Os micro-organismos isolados foram identificados por testes bioquímicos e por sequenciamento do gene 16S *rRNA*. Após o preparo químico-cirúrgico foram isolados os seguintes micro-organismos: *V. parvula*, *P. acnes*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *L. acidophilus*, *E. faecalis*, *A. naeslundii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *S. sanguinis*, *S. mitis* e *C. albicans*. Após a terapia fotodinâmica houve uma redução de micro-organismos, entretanto ainda estavam presentes *E. faecalis* e *C. albicans*. Após a utilização da terapia fotodinâmica no tratamento endodôntico diminuiu significativamente o número de bactérias e fungos relatadas em dentes com necessidade retratamento.

De acordo com os trabalhos baseados nos métodos dependentes de cultura acima revisados todos concordam que o preparo químico-cirúrgico é eficaz na redução microbiana. Entretanto, em relação ao uso da medicação intracanal há divergência entre os autores. Estudos relataram que a medicação intracanal com Ca(OH)₂ foi efetiva na redução microbiana (Byström et al., 1985; Byström; Sundqvist, 1985; Sjögren; Sundqvist, 1987; Orstavik et al., 1991; Sjögren et al., 1997; Shuping et al., 2000; McGurkin-Smith et al., 2005; Chu et al., 2006; Siqueira et al., 2007a; Siqueira et al., 2007b; Siqueira et al., 2007c; Donyavi et al., 2016). Por outro lado, outros estudos observaram que não houve diferença entre os resultados obtidos após o preparo químico-cirúrgico e aqueles obtidos após a medicação intracanal (Peters; Wesseling, 2002; Waltimo et al., 2005; Manzur et al., 2007; Schirrmeister et. al., 2007; Vianna et al., 2007; Wang et al., 2007; Beus et al., 2012; Endo et al., 2013; Xavier et al., 2013; Teles et al., 2014; Barbosa-Ribeiro et al., 2016). Ainda, existem também os estudos que observaram aumento na quantidade de micro-organismos após a utilização da medicação intracanal (Peters et al., 2002; Kvist et al., 2004; Vianna et al., 2008). Os micro-organismos cultiváveis mais prevalentes, nesta revisão de literatura, foram: *Streptococcus* spp., *P. acnes*, *P. micros* e *E. faecalis*. Entre as espécies de estreptococos, *S. sanguinis* e *S. mitis* foram os mais prevalentes.

2.2 Bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção: estudos clínicos analisados por métodos moleculares independentes de cultura

2.2.1 Métodos moleculares baseados em rDNA (gene 16S *rRNA*)

Vianna et al. (2006) avaliaram o número de bactérias antes e após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares utilizando hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% ou clorexidina 2% em 32 dentes com periodontite apical assintomática. Bactérias foram detectados por reação de polimerase em cadeia quantitativa (qPCR) (SYBRGreen) em todas as coletas iniciais dos canais radiculares: $2,8 \times 10^6$ células bacterianas no grupo do NaOCl 2,5% e $2,3 \times 10^6$ no grupo da clorexidina 2%. Após o preparo químico-cirúrgico, apesar de significativa redução da carga microbiana, bactérias foram detectadas em todos os casos, com exceção de apenas um dente para o grupo do NaOCl. O nível bacteriano foi reduzido para $2,0 \times 10^2$ e $6,2 \times 10^4$ células bacterianas após o preparo dos canais radiculares com NaOCl 2,5% e clorexidina 2%, respectivamente. Os autores concluíram que NaOCl 2,5% teve uma maior capacidade em promover a morte bacteriana e sua remoção dos canais radiculares quando comparado à clorexidina 2 %.

Sakamoto et al. (2007) avaliaram por qPCR a redução de bactérias após o preparo químico-cirúrgico com NaOCl 2,5% incluindo a fase de irrigação final com EDTA (17%) e NaOCl (2,5%) e após medicação intracanal com hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) com paramonoclorofenol canforado por 1 semana em 18 dentes com periodontite apical. As bactérias persistentes foram identificadas pelo método de clonagem e sequenciamento do gene 16S *rRNA*. Quinze dentes foram selecionados para realizar a análise quantitativa. Todas as coletas iniciais foram positivas para presença de bactérias, enquanto 10 (67%) permaneceram positivas após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal. O número médio de bactérias nas diferentes amostras dos canais radiculares foi: $1,72 \times 10^7$ nas amostras iniciais; $5,75 \times 10^4$ após o preparo químico-cirúrgico e $2,53 \times 10^4$ após a medicação intracanal. Após os procedimentos endodônticos 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. Os autores relataram que o preparo químico-cirúrgico com NaOCl 2,5% foi eficaz em reduzir a microbiota endodôntica. Por outro lado, a medicação intracanal não foi capaz de promover

uma redução significativa de bactérias quando comparada ao preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares. Embora bactérias ainda não-cultiváveis façam parte da comunidade bacteriana persistente após os procedimentos de desinfecção, *Streptococcus* spp. foram as espécies dominantes na comunidade bacteriana e também as mais prevalentes.

Blome et al. (2008) avaliaram a redução bacteriana promovida pelo preparo químico-cirúrgico com NaOCl 2% ou clorexidina 0,1% incluído a fase de irrigação final com agitação ultrassônica de acordo com a substância química auxiliar utilizada, e medicação intracanal com Ca(OH)₂ com um veículo a base de água por 14 dias. Foram selecionados 40 dentes com periodontite apical assintomática e necessidade de tratamento ou retratamento endodôntico. As amostras iniciais dos canais radiculares foram todas positivas para presença de bactérias por qPCR. Bactérias estavam presentes em todas as coletas iniciais: $1,5 \times 10^7$ e $2,6 \times 10^5$ bactérias nos casos de infecções endodônticas primárias e secundárias, respectivamente. O preparo químico-cirúrgico com irrigação ultrassônica, independente da solução irrigadora utilizada, promoveu uma redução significativa do número de bactérias em infecções endodônticas primárias e secundárias, com valores de $2,3 \times 10^4$ e $6,4 \times 10^3$ bactérias, respectivamente. Entretanto, o número de bactérias permaneceu elevado nos canais radiculares mesmo após o uso da medicação intracanal: $8,6 \times 10^3$ bactérias nas infecções primárias e $7,1 \times 10^3$ nas secundárias. Os autores concluíram que o preparo químico-cirúrgico foi eficaz em promover uma redução bacteriana nos canais radiculares de pelo menos 95%.

Vianna et al. (2008) identificaram e quantificaram o número de bactérias totais nas amostras do canal radicular antes e após o preparo químico-cirúrgico e após a medicação intracanal de 24 dentes com periodontite apical. Foi realizado o preparo químico-cirúrgico utilizando a substância química auxiliar o gel de clorexidina 2% e 3 medicações intracanal foram estudadas [M1: a pasta Ca(OH)₂; M2: clorexidina gel (2%); e M3: pasta de Ca(OH)₂ associado a clorexidina gel (2%)] por 7 dias. A técnica de cultura de bactérias aeróbias e anaeróbias foi utilizada para determinar a comunidade bacteriana pela ufc e para identificar os micro-organismos foi utilizado hibridização DNA-DNA de 40 espécies. Após o preparo químico-cirúrgico as espécies mais encontradas foram *Capnocytophaga ochracea* (2/4; 50%), *Treponema socranskii* ssp. *socranskii* (1/4; 25%), *F. nucleatum* ssp. *polymorphum* (1/4, 25%), *Enterococcus faecalis* (1/4; 25%) e *Campylobacter showae* (1/4; 25%). Após medicação intracanal as espécies mais encontradas foram *Gemella morbillorum* (2/4; 50%), *Leptotrichia buccalis* (1/4, 25%), *F. nucleatum* ssp. *polymorphum* (1/4; 25%), *E. faecalis* (1/4; 25%) e *Capnocytophaga sputigena* (1/4; 25%). Deste modo foi possível observar que pela técnica de

hibridização DNA-DNA que as infecções endodônticas primárias são caracterizadas por uma grande variedade de espécies bacterianas.

Rôças e Siqueira (2011a) compararam a eficácia antimicrobiana do NaOCl 2,5% e clorexidina 0,12% quando utilizados como irrigantes durante o preparo químico-cirúrgico em 47 dentes com necrose pulpar e periodontite apical. Os autores utilizaram PCR de amplo espectro para detectar micro-organismos e hibridização DNA-DNA de captura reversa para identificação bacteriana. Bactérias foram detectadas em todas as amostras iniciais dos canais radiculares. Após o preparo químico-cirúrgico, bactérias foram detectadas em 60% dos casos no grupo do NaOCl 2,5% e em 53% dos casos no grupo da clorexidina 0,12%. As espécies mais prevalentes após o preparo químico-cirúrgico foram: *P. acnes*, *Streptococcus* spp., *Porphyromonas endodontalis*, *Dialister invisus*, *Prevotella baroniae* e *Selenomonas sputigena*. Os 2 protocolos de preparo químico-cirúrgico estudados promoveram redução significativa de bactérias dos canais radiculares.

Rôças e Siqueira (2011b) avaliaram o efeito antimicrobiano do preparo químico-cirúrgico utilizando NaOCl 2,5% como irrigante e da medicação intracanal com diferentes pastas de Ca(OH)_2 . Foram selecionados 24 dentes com necrose pulpar e periodontite apical, que foram divididos igualmente em 2 grupos de acordo com os medicamentos: Ca(OH)_2 / glicerina e Ca(OH)_2 / paramonoclorofenol canforado/ glicerina. Os medicamentos permaneceram nos canais radiculares por 7 dias. Os autores utilizaram PCR de amplo espectro para detectar micro-organismos e hibridização DNA-DNA de captura reversa para identificação bacteriana. Do total de dentes estudados, 54% dos casos permaneceram infectados após o preparo químico-cirúrgico e 37,5% após o uso da medicação intracanal. Na análise dentro de cada grupo, houve redução significativa de reações PCR-positivas entre a coleta inicial e as realizadas após os procedimentos de desinfecção. Entretanto, não houve diferença entre as coletas realizadas após preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal. Da mesma forma, na análise entre os grupos, não houve diferença entre os medicamentos testados. As bactérias mais presentes após os procedimentos endodônticos foram *P. acnes* e *Streptococcus* spp. Os autores concluíram que o número de espécies bacterianas foi substancialmente reduzido após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal. No entanto, a presença de níveis detectáveis de bactérias persistentes em muitos casos indica que deve-se buscar estratégias antimicrobianas mais efetivas durante o tratamento endodôntico.

Paiva et al. (2012) tiveram como objetivo avaliar os efeitos antimicrobianos do preparo químico-cirúrgico utilizando instrumentos rotatórios de níquel titânio, e desinfecção

complementar com irrigação ultrassônica passiva (PUI) (n= 13) ou uma irrigação final com clorexidina a 2% (n= 14). Foram selecionados dentes com periodontite apical. Amostras foram coletadas antes (S1) e após preparo químico-cirúrgico com NaOCl (2,5%), e então foram divididos em 2 grupos: grupo da PUI com ativação de NaOCl (2,5%), ou irrigação com solução de clorexidina (2%). E então foi realizado PCR. Nas coletas iniciais todas foram positivas. No grupo da PUI após o preparo químico-cirúrgico apresentaram 9 (69%) dos casos positivos e após a irrigação complementar 7 (54%) casos positivos. No grupo da irrigação com clorexidina após o preparo químico-cirúrgico apresentaram 9 (64%) dos casos positivos e após a irrigação complementar 6 (43%) casos positivos. Deste modo, os procedimentos complementares de desinfecção com a PUI ou uma irrigação final com clorexidina reduz o número de casos positivos nas análises moleculares.

Paiva et al. (2013a) avaliaram a redução microbiana o preparo químico-cirúrgico, seguido por uma irrigação complementar e uma semana de medicação intracanal. Foram selecionados 14 dentes com periodontite apical antes (S1) e após o preparo químico-cirúrgico com NaOCl (2,5%) incluindo uma irrigação adicional com EDTA (17%) e NaOCl (2,5%) (S2), uma irrigação final com clorexidina (S3) e uma semana de medicação intracanal com pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e clorexidina (S4). Logo foi extraído o rDNA e foram realizadas as seguintes análises de qPCR para redução microbiana e para identificação de bactérias persistentes realizaram clonagem e sequenciamento. Todas amostras iniciais foram positivas, 50% dos casos continuaram positivos em S2 e S3 e 42% manteve-se positivo após S4. A mediana do número de células bacterianas foi de $8,16 \times 10^5$. Esse número diminuiu em S2 para uma mediana de $2,11 \times 10^3$. Em porcentagem de redução entre S1 e S2 houve uma redução de 98,8%. A irrigação complementar com clorexidina (S3) reduziu para uma mediana de $1,61 \times 10^3$, sendo essa redução de 70,1%. A medicação intracanal reduziu ainda mais sendo uma mediana de 0. As bactérias encontradas após o preparo químico-cirúrgico foram *Streptococcus salivarius*, *E. minutum*, *Campylobacter rectus*, *Synergistetes clone W090*, *Tannerella forsythia*, *P. gingivalis*, *M. timidum*, *Alishewanella jeotgali*, *Delftia acidovorans*, *Rahnella sp. GTbG5*, *Rubrobacter sp. VS-111*, *Uncultured gamma proteobacterium* e *Uncultured bacterium*. E após a irrigação com clorexina foi *E. minutum*, *F. nucleatum*, *C. gracilis*, *Prevotella genomospecies C1*, *Prevotella sp. SG12*, *Corynebacterium glutamicum*, *Clostridium butyricum*, *Hydrogenophilus hirschii*, *Massilia sp. 4D3c*, *Corynebacterium sp. 110393*, *Uncultured actinobacterium*, *Uncultured bacterium (AB286475)* e *Uncultured bacterium (FJ873275)*. Deste modo os passos complementares de desinfecção com irrigação

final de clorexidina seguido de medicação de intracanal de Ca(OH)_2 promoveu uma redução maior de bactérias do que os alcançados apenas pelos procedimentos químico-cirúrgico.

Paiva et al. (2013b) analisaram os efeitos antimicrobiana da PUI após o preparo químico-cirúrgico utilizando instrumentação rotatória de NiTi e com irrigação de NaOCl (2,5%). Amostras foram coletadas de 10 dentes com periodontite apical antes do preparo químico-cirúrgico (S1), após o preparo químico-cirúrgico (S2) e após o PUI com NaOCl (S3). Então foram realizados um PCR de amplo espectro para a presença de bactérias, para quantificar a redução microbiana foi realizado um qPCR, e para identificar a bactérias persistentes por clonagem e sequenciamento. Nas amostras iniciais todos os casos apresentaram-se positivos, entretanto, após preparo químico-cirúrgico 60% dos casos continuavam positivos os quais mantiveram-se positivos após o uso da medicação intracanal. Em relação a redução microbiana a média em S1 era de $2,21 \times 10^6$ e esse número diminuiu significativamente neste estudo em S2 para $2,01 \times 10^4$. Após o passo complementar da PUI essa média reduziu para $1,65 \times 10^4$ células bacterianas. Após o preparo químico-cirúrgico as bactérias encontradas foram *F. nucleatum*, *Campylobacter gracilis*, *P. aeruginosa*, *Uncultured actinobacterium clone*, *Mogibacterium timidum*, *Actinomyces naeslundii*, *Moraxella osloensis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Rubrobacter* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Uncultured bacterium*, *Hyphomicrobium vulgare*, *Uncultured gamma proteobacterium clone* e *Uncultured bacterium*. Após a complementação com a PUI foram encontradas *F. nucleatum*, *C. gracilis*, *P. aeruginosa*, *Uncultured actinobacterium clone*, *M. timidum*, *Eubacterium minutum*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Prevotella* sp., *Corynebacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *Brevundimonas* sp., *Haemophilus* sp. e *Haemophilus haemolyticus*. Deste modo, este estudo mostrou que o tratamento endodôntico reduz o número de casos positivos, o número de células bacterianas e a diversidade. Em relação a PUI não foi possível observar redução significativa na redução de micro-organismos.

Rôças et al. (2013) compararam a redução bacteriana promovida por duas técnicas de instrumentação em 45 dentes com periodontite apical. O preparo químico-cirúrgico foi realizado com limas manuais ou rotatórias de NiTi utilizando NaOCl 2,5% ou clorexidina 2% como solução irrigadora. As amostras dos canais radiculares, antes e após o preparo químico-cirúrgico incluindo a fase de irrigação final de acordo com a substância química auxiliar utilizada, foram analisadas por reações de qPCR. A instrumentação rotatória de NiTi resultou em menos casos com reações positivas (60%) quando comparada à instrumentação manual (95%). Entretanto, a análise quantitativa da redução bacteriana não revelou diferença entre as duas técnicas de instrumentação. Houve uma redução de $6,01 \times 10^6$ células bacterianas

iniciais para $3,01 \times 10^4$ após a instrumentação manual dos canais radiculares. Da mesma forma, no grupo da instrumentação mecanizada, o número de bactérias reduziu de $9,89 \times 10^5$ para $5,65 \times 10^3$ células bacterianas. O preparo químico-cirúrgico realizado com limas manuais ou rotatórias de NiTi promoveram uma redução significativa de bactérias dos canais radiculares, considerando que os parâmetros de alargamento e irrigação foram similares entre os grupos.

Neves et al. (2014) avaliaram a redução bacteriana após o preparo dos canais radiculares utilizando o sistema SAF (*Self Adjusting File*) e limas manuais. Foram selecionados 50 dentes unir radiculares com necrose pulpar e periodontite apical. A análise quantitativa de bactérias foi realizada por qPCR e a identificação bacteriana por meio da hibridização DNA-DNA de captura reversa. Todas as amostras iniciais apresentaram-se positivas, após o preparo químico-cirúrgico 45,5% e 95,5 dos casos positivos no grupo SAF e no grupo de limas manuais, respectivamente. O sistema SAF promoveu uma redução de uma média de $1,6 \times 10^7$ células bacterianas nas coletas iniciais para $1,34 \times 10^4$ células bacterianas nas coletas após o preparo químico-cirúrgico incluindo a fase da irrigação convencional. As limas manuais de NiTi promoveu uma redução de uma média de $5,67 \times 10^7$ células bacterianas nas coletas iniciais para $1,12 \times 10^5$ células bacterianas nas coletas após o preparo químico-cirúrgico incluindo a fase da irrigação convencional. O sistema SAF também resultou em um menor número de reações PCR-positivas (45,5%) quando comparado ao grupo da instrumentação manual (95,5%). As bactérias mais prevalentes após o preparo químico-cirúrgico foram *Bacteroidaceae [G-1] sp oral taxon 272*, *D. invisus* e *T. forsythia*. Deste modo, a instrumentação com o sistema SAF foi mais efetiva em reduzir o número de bactérias quando comparada à instrumentação com limas manuais. No entanto, como metade das amostras ainda tinham bactérias detectáveis após a instrumentação com SAF, a desinfecção complementar ainda se torna necessária para maximizar a eliminação bacteriana.

Rôças et al. (2014) avaliaram a suscetibilidade de algumas bactérias ainda não cultiváveis (ou de difícil cultivo) ao preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares em 25 dentes com periodontite apical. O preparo químico-cirúrgico com instrumentos rotatórios de NiTi, NaOCl 2,5% e complementados com irrigação final (EDTA 17% e NaOCl 2,5%) com promoveu uma redução significativa de bactérias totais: $9,98 \times 10^5$ células bacterianas iniciais para $4,07 \times 10^3$ células bacterianas finais. O número de amostras qPCR- positivas após o preparo diminuiu para 16 (64%). As bactérias mais prevalentes nas coletas iniciais foram *Bacteroidaceae [G-1] sp oral taxon 272* (24%; $6,31 \times 10^3$) e *Fretibacterium fastidiosum* (20%; $1,7 \times 10^3$ cópias de DNA). Essas espécies/ taxa bacterianas também foram detectadas

após o preparo químico-cirúrgico, em menor prevalência e quantidade: *Bacteroidaceae [G-1]* sp oral taxon 272 (4%; 4×10^2 cópias de DNA) e *F. fastidiosum* (4%; 1×10^2 cópias de DNA). Os achados confirmaram que bactérias ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo podem participar da microbiota associada à periodontite apical. *Bacteroidaceae [G-1]* sp oral taxon 272 e *F. fastidiosum* foram os mais prevalentes, mas raramente como espécies/taxa dominantes da comunidade bacteriana. O preparo químico-cirúrgico foi altamente eficaz em eliminar completamente as bactérias estudadas ou, pelo menos, reduzir substancialmente seus níveis.

Teles et al. (2014) avaliaram a redução bacteriana após o preparo químico-cirúrgico com NaOCl 3% incluindo a fase de irrigação final com ácido cítrico 10% e NaOCl 3% e após 14 dias de medicação intracanal utilizando Ca(OH)_2 ou gel de clorexidina 2% em 69 dentes com necrose pulpar. Após o preparo químico-cirúrgico, houve uma redução de 99,1% do número de bactérias na análise por qPCR. Entretanto, uma elevada quantidade de bactérias permaneceu nos canais radiculares após medicação intracanal nos 2 grupos. Na análise entre os grupos, o grupo do Ca(OH)_2 apresentou menor número de bactérias ($2,2 \times 10^5$ cópias de DNA) quando comparado ao grupo da clorexidina ($9,1 \times 10^6$ cópias de DNA). Deste modo, os autores concluíram que a medicação intracanal não foi eficaz na redução bacteriana, mas a pasta de Ca(OH)_2 apresentou uma melhor ação antibacteriana do que o gel de clorexidina 2%.

Ferreira et al. (2015) determinaram por hibridização DNA-DNA o perfil microbiológico de bactérias persistentes após o uso de Ca(OH)_2 ou Ca(OH)_2 associado à clorexidina como medicação intracanal em 20 dentes com infecções endodônticas primárias. As bactérias mais prevalentes foram: *C. ochracea* (70%) e *F. nucleatum ssp. vincentii* (70%) nas coletas iniciais; *Enterococcus faecium* (60%) nas coletas após preparo químico-cirúrgico; *F. nucleatum ssp. vincentii* (90%) e *E. faecium* (40%) nas coletas após a medicação intracanal. Os 2 medicamentos testados reduziram o número de espécies bacterianas quando comparados às coletas iniciais dos canais radiculares. Porém, o número de espécies bacterianas persistentes foi menor no grupo do Ca(OH)_2 associado à clorexidina. Os autores concluíram que Ca(OH)_2 associado à clorexidina mostrou um maior espectro de ação antibacteriano, porém não foi eficaz contra *Enterococcus*, indicando que novas estratégias contra *Enterococcus* devem ser investigadas.

Gomes et al. (2015) compararam o perfil microbiano antes e após o preparo químico-cirúrgico com clorexidina gel 2% e solução salina em 15 dentes com lesões endo-periodontais. Na análise da microbiota por sequenciamento de nova geração, as espécies bacterianas mais detectadas após o preparo químico-cirúrgico foram: *E. faecalis*,

Streptococcus salivarius/vestibularis, *Parvimonas micra*, *Prevotella nigrescens*, *Eubacterium brachy*, *Filifactor alocis* e *Fretibacterium fastidiosum*. Os filos mais frequentemente encontrados foram: *Desulfobulbus* sp oral taxon 041, *Stomatobaculum* sp oral taxon 373, *Peptostreptococcaceae* sp oral taxon 383 e *Erysipelothrichaceae* sp. oral taxon 905. Esses resultados revelaram a complexidade da comunidade bacteriana persistente após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares.

Provenzano et al. (2015) avaliaram a presença de ácidos graxos de cadeia curta e de bactérias específicas com potencial de produzir esses ácidos em canais radiculares de 19 dentes com periodontite apical. As bactérias foram identificadas por qPCR em amostras coletadas antes e após preparo químico-cirúrgico e após 1 semana de medicação intracanal a base de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ com paramonoclorofenol canforado e glicerina. Bactérias estavam presentes em 100% das amostras iniciais, em 71% dos casos após preparo químico-cirúrgico e em 47% das amostras após a medicação intracanal. *Streptococcus* spp. foram as espécies mais prevalentes após preparo químico-cirúrgico (65%) e após medicação intracanal (35%). O filo *Actinobacteria* também estava presente nas infecções endodônticas persistentes após o preparo (47%) e medicação intracanal (35%). Bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta, assim como seus produtos, foram frequentemente detectadas nas amostras após os procedimentos endodônticos de desinfecção.

Rodrigues et al. (2015) compararam a redução bacteriana após o preparo químico-cirúrgico realizado com NaOCl 2,5% e 2 sistemas de instrumentação, SAF (*Self Adjusting File*) ou TFA (*Twisted File Adaptive*), em 48 dentes com necessidade de retratamento endodôntico convencional. As amostras foram analisadas por qPCR para bactérias totais, *Streptococcus* spp. e *E. faecalis*. No grupo SAF, bactérias foram detectadas em 48% dos casos após o preparo químico-cirúrgico, numa média de $9,43 \times 10^2$ cópias de DNA; enquanto no grupo TFA, bactérias estavam presentes em 32% dos casos, numa média de $7,71 \times 10^1$ cópias de DNA. *Streptococcus* spp. foram detectados em 43% dos casos do grupo SAF e em 27% do grupo TFA; enquanto *E. faecalis* não foi detectado nas amostras pós-tratamento. Portanto, ambos os sistemas de instrumentação foram eficientes na redução bacteriana, sem diferença significativa entre os 2 sistemas estudados em relação à desinfecção de dentes com periodontite apical e necessidade de retratamento endodôntico.

Neves et al. (2016) avaliaram a redução bacteriana promovida por 2 sistemas de preparo dos canais radiculares: um sistema de lima única com movimento recíprocante (Reciproc) e um sistema rotatório de múltiplas limas (BioRace) utilizando NaOCl (2,5%) como substância química auxiliar. Foram selecionados 60 dentes com periodontite apical

assintomática. O DNA das amostras foi extraído e a redução dos níveis de bactérias totais e *Streptococcus* spp. foi avaliada por qPCR. Bactérias estavam presentes em níveis elevados em todas coletas iniciais: $7,1 \times 10^5$ cópias de DNA para o grupo Reciproc e $1,31 \times 10^5$ para o grupo BioRace. Após o preparo químico-cirúrgico incluindo a etapa de irrigação final com EDTA (17%) e NaOCl (2,5%), 55% e 50% dos casos permaneceram infectados, com valores de $7,05 \times 10^2$ e $6,03 \times 10^1$ cópias de DNA para os grupos Reciproc e BioRace, respectivamente. Ambos os protocolos também foram efetivos em reduzir os níveis de *Streptococcus* spp. após o preparo dos canais radiculares. Este estudo demonstrou que o sistema reciprocante de lima única e o sistema rotatório de múltiplas limas foram efetivos na redução de bactérias em dentes com periodontite apical. Independente do sistema utilizado, aproximadamente metade dos dentes ainda apresentavam bactérias detectáveis por qPCR.

Rôças et al. (2016) compararam a atividade antimicrobiana do NaOCl 2,5% e clorexidina 2% como substâncias químicas auxiliares durante o preparo químico-cirúrgico em 50 dentes com periodontite apical. A redução dos níveis de bactérias totais e *Streptococcus* spp. foi avaliada por qPCR. Bactérias foram detectadas em todas as amostras iniciais. Após o preparo químico-cirúrgico com NaOCl 2,5% e clorexidina 2%, bactérias foram detectadas em 44% e 40% das amostras, respectivamente. Na análise quantitativa de bactéria totais, foi detectada uma média de $3,7 \times 10^5$ células bacterianas nas amostras iniciais e $1,49 \times 10^2$ células após o preparo químico-cirúrgico com NaOCl 2,5%. No grupo da clorexidina 2%, foi detectada uma média de $8,77 \times 10^4$ e $2,81 \times 10^3$ células bacterianas nas amostras iniciais e após o preparo químico-cirúrgico, respectivamente. Na análise quantitativa de *Streptococcus* spp., ambos os protocolos foram efetivos em reduzir os níveis dessa espécie bacteriana. Os autores concluíram que não há diferença na efetividade antimicrobiana do NaOCl 2,5% e clorexidina 2% como substâncias auxiliares no preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares.

Zandi et al. (2016) compararam a eficácia antimicrobiana do NaOCl (1%) e da digluconato de clorexidina (2%) nos casos de retratamento. Foram selecionados 67 dentes com necessidade de retratamento. Os dentes foram randomizados e distribuídos em 2 grupos. As amostras foram coletadas antes (S1) e após (S2) o preparo químico-cirúrgico fazendo a irrigação com NaOCl ou clorexidina e após o uso da medicação intracanal de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ com solução salina estéril por uma média de 25 dias (S3); para avaliar a redução microbiana foi realizado o ensaio de qPCR. No grupo do NaOCl nas amostras iniciais houve uma média de $7,96 \times 10^4$ células bacterianas. Após o preparo químico-cirúrgico houve uma redução na média de $2,95 \times 10^2$ e após a medicação intracanal observaram um aumento na média de 3,52

$\times 10^2$ quando comparados ao preparo químico-cirúrgico. No grupo da clorexidina antes do preparo químico-cirúrgico foram detectadas uma média de $5,37 \times 10^5$ células bacterianas, após o preparo químico-cirúrgico houve uma redução na média $1,10 \times 10^3$ e após o uso da medicação intracanal, os autores observaram um aumento na média de $1,95 \times 10^3$ quando comparados ao preparo químico-cirúrgico. Logo o NaOCl e a clorexidina reduziram a quantidade de bactérias na infecção intracanal. A medicação intracanal com Ca(OH)_2 reduziu o número de canais com infecção persistente, mas resultou em carga bacteriana maiores nos casos positivos.

Rodrigues et al. (2017) avaliaram por qPCR a redução bacteriana após o preparo químico-cirúrgico com instrumentos rotatórios de NiTi de diferentes diâmetros para o preparo apical. Foram selecionados 43 dentes com periodontite apical pós-tratamento e com indicação de retratamento endodôntico convencional. Os dentes foram divididos em 2 grupos de acordo com a solução irrigadora: NaOCl 2,5% (n=22) e solução salina (n=21). As amostras bacteriológicas foram coletadas após a remoção da obturação endodôntica inicial, após o uso do primeiro instrumento do sistema TFA (*Twisted File Adaptive*) e após o terceiro instrumento do sistema TFA. No grupo da solução salina, foi realizada uma irrigação final de NaOCl 1%. Todas as amostras iniciais foram positivas em ambos os grupos, 67% e 32% dos casos continuavam positivos para os grupos da solução salina e do NaOCl (2,5%), respectivamente. No grupo da solução salina após a irrigação final 38% continuavam positivas. No grupo da solução salina, a média do número de cópias de DNA nas amostras foram: $1,98 \times 10^4$ nas amostras iniciais, $2,10 \times 10^3$ após o primeiro instrumento, $6,4 \times 10^2$ após o terceiro instrumento e $5,4 \times 10^2$ após a irrigação final. No grupo do NaOCl 2,5%, a média do número de cópias de DNA foi: $8,24 \times 10^4$ nas amostras iniciais, $1,65 \times 10^3$ após o primeiro instrumento, $7,71 \times 10^1$ após o terceiro instrumento. Nos 2 grupos, o alargamento apical até o terceiro instrumento promoveu uma maior redução bacteriana do que o primeiro instrumento. Na análise entre os grupos, o NaOCl 2,5% promoveu uma maior redução bacteriana do que a solução salina nos preparos apicais mais amplos. Este estudo demonstrou que o aumento do diâmetro apical durante o preparo proporcionou uma melhor desinfecção dos canais radiculares. A eficácia do NaOCl 2,5% foi melhor observada em preparos apicais maiores.

Nakamura et al. (2018) avaliaram por qPCR o efeito da ativação ultrassônica na redução de bactérias quando comparada à irrigação convencional. As amostras foram coletadas em 50 dentes com periodontite apical assintomática após a cirurgia de acesso, após

o preparo químico-cirúrgico com instrumentos reciprocantes e NaOCl 2,5%, após os protocolos de irrigação final e após a medicação intracanal com Ca(OH)₂ com polietileno glicol por 14 dias. Bactérias estavam presentes em todas as amostras iniciais: $1,49 \times 10^6$ e $8,55 \times 10^5$ células bacterianas nos grupos da ativação ultrassônica e irrigação convencional, respectivamente. O número de bactérias reduziu após o preparo químico-cirúrgico para o grupo da irrigação ultrassônica passiva com 76% de amostras positivas com uma mediana de $1,41 \times 10^4$ cópias de rDNA, após irrigação ultrassônica 68% dos casos continuavam positivos com uma mediana de $4,29 \times 10^3$ cópias de rDNA e após a medicação intracanal 64% das amostras estavam positivas com uma mediana de $2,39 \times 10^3$ cópias de rDNA. Redução bacteriana também foi observada no grupo da irrigação convencional: 80% dos casos positivos e uma mediana de $3,53 \times 10^4$ cópias de rDNA após o preparo químico-cirúrgico, 72% dos casos positiva com uma mediana de $1,08 \times 10^4$ cópias de rDNA após a irrigação convencional e 60% dos casos permaneciam positivos com uma mediana de $4,56 \times 10^3$ após a medicação intracanal. Na comparação dos grupos, a ativação ultrassônica promoveu uma maior redução de bactérias nos canais radiculares. Deste modo a ativação ultrassônica foi mais efetiva do que a irrigação convencional para redução do número de bactérias dos canais radiculares após o preparo químico-cirúrgico.

2.2.2 Métodos moleculares baseados em *rRNA* (RNA ribossômico)

Rôças e Siqueira (2010) identificaram as bactérias persistentes após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal com Ca(OH)₂ com paramonoclorofenol canforado por 7 dias utilizando *rRNA*. As amostras microbiológicas foram coletadas dos canais radiculares de 15 dentes. Após a extração de RNA, foi realizada a reação de transcrição reversa (RT) para confecção de cDNA, que foi utilizado na reação de hibridização DNA-DNA de captura reversa para identificação bacteriana. Bactérias viáveis estavam presentes em 60% dos casos após o preparo químico-cirúrgico e 53% após a medicação intracanal. As espécies bacterianas mais prevalentes nas amostras iniciais em dentes com periodontite apical foram *Olsenella uli* (10/15, 67%), *Pyramidobacter piscicola* (9/15, 60%), *Streptococcus species* (8/15, 53%), *Bacteroidetes oral clone X083* (8/15, 53%), *T. forsythia* (7/15, 47%), *A. israelii* (7/15, 47%) e *Eubacterium sulci* (7/15, 47%). Após o preparo químico-cirúrgico foram *Streptococcus spp.* (7/15, 47%), *F. nucleatum* (6/15, 40%), *O. uli* (5/15, 33%), *P. acnes* (4/15,

27%), *P. endodontalis* (4/15, 27%), e *Peptostreptococcus stomatis* (4/15, 27%) e após medicação intracanal *Streptococcus spp.* (7/15, 47%), *P. acnes* (4/15, 27%), *O. uli* (4/15, 27%), e *F. nucleatum* (3/15, 20%). A diversidade bacteriana foi drasticamente reduzida após os procedimentos endodônticos de desinfecção. As espécies/ taxa bacterianas mais frequentemente encontradas nas amostras após tratamento podem ser um fator de risco para persistência da doença; entretanto, esse fato ainda precisa ser determinado por estudos longitudinais.

Pinheiro et al. (2015) investigaram a sensibilidade da reação de qPCR baseado em rRNA (RT-qPCR), comparado ao método baseado em rDNA (gene *rRNA*), para identificação de *E. faecalis* em amostras clínicas de 18 dentes com necessidade de retratamento endodôntico. *E. faecalis* foi detectado em 77,8% e 72,2% das amostras iniciais utilizando qPCR baseado em *rRNA* e *rDNA*, respectivamente. Em contraste, após o preparo químico-cirúrgico, *E. faecalis* foi detectado em apenas 33,3% das amostras usando rDNA e em 61,1% das amostras analisadas pelo método baseado em rRNA. O número de cópias de rRNA de *E. faecalis* foi maior que o número de cópias de rDNA nas amostras antes e após o preparo químico-cirúrgico, indicando uma grande sensibilidade no método baseado em rRNA. Nas amostras positivas para rRNA e rDNA, foi calculada a razão rRNA/rDNA para análise do metabolismo bacteriano. Essa análise revelou que o número de cópias de rRNA era mais elevado do que o número de cópias rDNA, indicando que *E. faecalis* permanecia metabolicamente ativo nas infecções persistentes após o preparo químico-cirúrgico. Esses resultados demonstraram que qPCR baseado em rRNA foi mais sensível que o método baseado em rDNA para detecção de *E. faecalis* em amostras de canais radiculares. Este estudo também mostrou que o *E. faecalis* pode permanecer metabolicamente ativo após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares.

Em resumo, a maior parte dos estudos moleculares avaliando a microbiota endodôntica são baseados em rDNA. Estudos da microbiota endodôntica persistente utilizando métodos moleculares baseados em rRNA são escassos; especialmente estudos analisando a suscetibilidade de bactérias de difícil cultivo ou ainda não cultiváveis. Na revisão dos estudos moleculares baseados em rRNA ou rDNA, todos concordaram que o preparo químico-cirúrgico foi a fase do tratamento que promoveu a maior redução microbiana. Entretanto, em relação ao uso da medicação intracanal, houve divergência entre os autores: 3 estudos relataram que a medicação intracanal com Ca(OH)_2 foi efetiva na redução microbiana; 4 estudos observaram que não houve diferença entre os resultados obtidos após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal; e 1 estudo observou um aumento na

quantidade de bactérias após a utilização medicação intracanal com Ca(OH)_2 . Os micro-organismos mais prevalentes, nesta revisão de literatura, foram: *Streptococcus* spp., *E. faecalis*, *P. acnes* e *F. nucleatum*. As bactérias ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo mais frequentemente encontradas após os procedimentos de desinfecção foram *Fretibacterium fastidiosum* (*Synergistetes* oral clones W090/W028) e *Bacteroidaceae [G-1]* sp oral taxon 272. Baseados nas divergências encontradas na literatura e com objetivo de aprofundar o conhecimento das infecções endodônticas persistentes, este estudo irá avaliar a atividade metabólica de bactérias totais e de uma bactéria de difícil cultivo após as diferentes etapas do tratamento endodôntico, utilizando métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o número e a viabilidade de bactérias persistentes após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o número e a viabilidade de bactérias totais e de *Bacteroidaceae* [G-1] sp. oral taxon 272 após os procedimentos endodônticos.
- Comparar as taxas de detecção de bactérias totais e de *Bacteroidaceae* [G-1] sp. oral taxon 272 em amostras endodônticas pelos ensaios de qPCR baseados em rRNA e rDNA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada neste trabalho baseou-se em estudos clínicos e microbiológicos prévios (Pinheiro et al., 2015; Nakamura et al., 2018). Todos os procedimentos foram realizados de modo cauteloso, seguindo protocolos a fim de garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados

4.1 Aspectos éticos

Os procedimentos clínicos foram realizados na Clínica de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), mediante a prévia aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa nº 2.201.768 (ANEXO A) desta instituição e após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por cada paciente (APÊNDICE A). Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Microbiologia Molecular do Departamento de Dentística da FOUSP e no Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4.2 Procedimento e coletas clínicas

4.2.1 Seleção de pacientes

Os critérios de inclusão/ exclusão de pacientes foram baseados em estudo prévio (Nakamura et al., 2018). Os critérios de inclusão foram: pacientes com diagnóstico de necrose pulpar (confirmado pela resposta negativa ao teste de sensibilidade ao frio com gás refrigerante) e periodontite apical assintomática. Os critérios de exclusão foram: pacientes que utilizaram antibióticos nos últimos 3 meses; 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° (Schneider, 1971), e raízes mais curtas que 15 mm ou maiores que 25 mm foram excluídos. Também foram excluídos da pesquisa pacientes com alterações sistêmicas relevantes, como doenças degenerativas crônicas, processos infecciosos, doenças autoimunes ou imunodeficiências induzidas ou adquiridas, portadores de marca-passo ou próteses coronarianas.

Após a aplicação dos critérios acima relatados, foram selecionados 15 pacientes com dentes com infecções endodônticas primárias para tratamento endodôntico e coletas microbiológicas.

4.2.2 Coletas microbiológicas e procedimentos clínicos

Os procedimentos clínicos foram realizados na Clínica de Pós-Graduação da FOU SP por 2 pós-graduandos do Programa de Odontologia (área de concentração em Endodontia) com experiência de mais de 5 anos na especialidade. As coletas microbiológicas foram realizadas de acordo com estudos prévios (Nakamura et al., 2018) e estão descritos detalhadamente no APÊNDICE B.

Após o exame clínico e radiográfico inicial, os pacientes receberam 10mL de antisséptico bucal para bochechar por 1 minuto. Então, os dentes foram anestesiados e realizado o isolamento absoluto com arco plástico (SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), lençol de borracha (SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), grampos metálicos adequados (SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e barreira gengival (Top Dam, FGM, Brasil). A antisepsia do campo operatório e da coroa dentária foram realizadas com swabs esterilizados (Berkshire Corporation, North Carolina, EUA) embebidos em peróxido de hidrogênio 30% por 30s, seguido por hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl, Fórmula e Ação farmácia de manipulação, São Paulo, SP, Brasil), por mais 30s, sendo este neutralizado por tiosulfato de sódio 5% (Fórmula e Ação farmácia de manipulação, São Paulo, SP, Brasil) (Rôças et al., 2004).

A cirurgia de acesso foi realizada em duas etapas, com auxílio de pontas diamantadas esféricas 1014, 1015, 1014HL ou 1015HL (Microdont Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil) em alta-rotação refrigerados com auxílio de seringas de 20mL (BD

Company, São Paulo, SP, Brasil) e soro fisiológico esterilizados (Laboratórios B. Braun, São Gonçalo, RJ, Brasil), tomando-se o cuidado de não acessar a câmara pulpar. Após este procedimento, o protocolo de antissepsia da coroa dental e o campo operatório foi novamente realizado, como já foi descrito anteriormente; e a cirurgia de acesso finalizada com novas pontas esterilizadas, refrigeradas com soro fisiológico. Coleta da coroa (ângulo cavo-superficial da cavidade de acesso) foi realizada com papel absorvente para comprovar a eficácia das manobras de desinfecção. A ausência de bactérias na coleta da coroa dentária foi comprovada por meio de PCR convencional, utilizando iniciadores universais para o domínio *Bacteria* (APÊNDICE C).

Ao término destes procedimentos, a câmara pulpar foi aspirada e o canal radicular preenchido com solução salina. A odontometria foi realizada com um Instrumento tipo K número 10 (DentsplyMaillefer, Baillagues, Suíça) com auxílio de localizador foraminal (J. Morita Brasil, São Paulo, SP, Brasil). O comprimento real de trabalho (CRT) foi determinado em 0,5 mm aquém do limite zero observado no localizador foraminal. Um instrumento tipo H número 15 foi pressionado contra as paredes do canal para criar raspas de dentina e suspender bactérias na solução. Cinco cones de papel número 15 esterilizados foram introduzidos individualmente no canal para coletar o conteúdo inicial de bactérias (**S1**), sendo mantidos em posição por 1 minuto cada. A parte ativa da lima utilizada e os 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).

No passo seguinte, 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. Se o travamento fosse compatível com instrumentos 10 ou 15, o dente foi excluído da pesquisa, pela dificuldade da realização da coleta inicial. Se o travamento fosse compatível com as limas 20, 25 ou 30, o instrumento Reciproc R40 foi escolhido; e quando o instrumento inicial de referência fosse o 35 ou 40, o preparo foi realizado com o instrumento Reciproc R50.

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 selecionado foi levado ao interior do conduto em movimento recíprocante, seguindo sequências de três ciclos de penetração/retrocesso, de maneira a avançar em direção apical a cada ciclo. Ao término de cada sequência, o instrumento foi limpo com gaze esterilizada 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 apirrogênicas 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 apirrogênico. Assim, realizando uma nova coleta microbiológica (S2), como descrito anteriormente.

Após a coleta, foi realizada uma irrigação final com NaOCl 2,5% e EDTA-T 17% com um protocolo semelhante ao descrito por Nakamura et al. (2018). Os canais radiculares foram secos com pontas de papel absorvente, e então, preenchidos com a pasta de hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) Ultracal XS (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA). Esta pasta apresenta um veículo aquoso à base de metil-celulose e vem acondicionada em uma seringa plástica acoplada a uma agulha NaviTip (0,33 mm de diâmetro). A agulha foi inserida no comprimento real de trabalho para proporcionar o preenchimento do canal radicular em toda sua extensão. Após o preenchimento, essa pasta foi compactada com bolinhas de algodão esterilizadas com auxílio de pinças clínicas e calcadores de Paiva. O completo preenchimento do canal radicular foi verificado através de radiografia periapical. Por fim, as cavidades de acesso foram seladas com uma camada de 2 mm de espessura de obturador provisório endodôntico (Dentalvile, Joinville, SC, Brasil) e uma camada de cimento de ionômero de vidro Riva Self Cure (SDI Limited, Victoria, Australia).

Os pacientes retornaram à clínica da faculdade para uma segunda sessão de tratamento após um período de 14 dias, e os procedimentos de anestesia, isolamento absoluto, abertura

coronária e desinfecção do campo operatório foram realizados seguindo o mesmo protocolo utilizado na primeira sessão clínica. Após a remoção do selamento provisório e nova coleta para verificação da desinfecção do campo, a medicação intracanal foi removida do interior dos canais radiculares utilizando-se 10 mL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 17% por canal e leve agitação com limas manuais tipo K número 15. E então, uma terceira coleta (S3) foi realizada em ambos os grupos seguindo os mesmos critérios de procedimentos realizados nas coletas anteriores.

Em seguida, os canais foram irrigados com 10 mL de NaOCl 2,5% e re-instrumentados com o mesmo instrumento utilizado na primeira sessão de tratamento. Então, um novo procedimento de irrigação final com 10 ml de NaOCl (2,5%), 10 ml de EDTA (17%), com seringa e pontas de irrigação.

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

Todas as amostras foram armazenadas em freezer -20°C até o momento da análise microbiológica.

4.3 Análise microbiológica

4.3.1 Extração de DNA/RNA e síntese do cDNA

Essa fase foi realizada no Laboratório de Microbiologia Molecular do Departamento de Dentística da FOU SP. As amostras endodônticas foram descongeladas e homogeneizadas por agitação durante 1 minuto. A extração de DNA e RNA foi realizada com o kit de purificação *MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit* (Epicentre Technologies, Madison, WI, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante, e está descrita detalhadamente no APÊNDICE C. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C , os sobrenadantes foram descartados e os precipitados (também chamados

pellet) 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 precipitação proteica. Após nova centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e submetidos a 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.

4.3.2 Análise quantitativa e da atividade metabólica de bactérias totais através de qPCR baseado em rDNA e rRNA

Os níveis de rDNA e rRNA de todas as amostras foram quantificados por qPCR. Para análise do total de bactérias, as reações de qPCR foram realizadas com um par de iniciadores universais para a região conservada do gene 16S *rRNA* do domínio *Bacteria*, conforme descrito por Shelburne et al. (2000): 5'- GAG AGT TTG ATY MTG GCT CAG – 3' e 5'- GAA GGA GGT GWT CCA RCC GCA- 3'. As reações foram realizadas em placas de 96 poços com um volume total de 20 µL contendo: 10 µL Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 100 nM de cada iniciador, água e 2 µL do DNA ou cDNA.

Nos controles negativos foram utilizados 2 µL de água como molde, 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). O ciclo de amplificação foi: 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento a 60°C por 1 min e extensão a 95°C por 15s. Os resultados foram analisados pelo software *StepOne Plus Software v2.3* (Applied Biosystems). A curva padrão foi construída utilizando plasmídeos recombinantes contendo fragmentos de 1.500 pb do gene 16S *rRNA* de *Enterococcus faecalis*, como descrito anteriormente (Pinheiro et al., 2015). Diluições padronizadas de plasmídeos (10^8 a 10^2 cópias de DNA) foram corridas em triplicata, e o limite de detecção foi 10^2 cópias de DNA. O coeficiente de correlação (r^2), eficiência de amplificação (E) e valores de y da curva padrão para qPCR utilizando iniciadores universais foram 0,989, 97,8% e 34,5, respectivamente. Todas as amostras foram corridas em triplicata, utilizando o valor médio para análise do número de cópias de rRNA e rDNA por amostra de canal radicular. Para avaliar a atividade metabólica, foi realizado cálculo da razão rRNA/rDNA nas amostras positivas em ambas as reações de qPCR.

4.3.3 Análise quantitativa e da atividade metabólica de *Bacteroidaceae [G-1]* sp oral taxon 272

As reações de qPCR foram realizadas de acordo com o item 4.3.2., utilizando iniciadores específicos para o gene 16S *rRNA* de *Bacteroidaceae [G-1]* sp oral taxon 272 (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' e 5'- GA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'). A curva padrão foi construída utilizando plasmídeos recombinantes contendo fragmentos do gene 16S *rRNA* de *Bacteroidaceae [G-1]* sp oral taxon 272. Inicialmente, foi realizada uma reação de PCR convencional utilizando iniciadores específicos em um volume de 50µL: 5 µL de Buffer, 1,5 de MgCl₂, 4µL de dNTP, 1µL de cada iniciador, 36µL de água, 0,5 de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 1µL de DNA. 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 dessa espécie bacteriana. Em seguida foi realizada a clonagem desses amplicons em células de *Escherichia coli* DH5α utilizando-se o kit comercial TOPO TA Cloning® – Version U (Invitrogen, Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante. 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 (Teixeira et al., 2009). O

coeficiente de correlação (r^2), eficiência de amplificação (E) e valores de y da curva padrão para qPCR utilizando iniciadores específicos para *Bacteroidaceae* [G-1] sp oral taxon 272 foram 0,99; 101,4% e 32,41, respectivamente.

4.4 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, S2 e S3 foi realizada utilizando o teste de Wilcoxon para amostras relacionadas. A comparação entre as reações de qPCR baseada em rDNA e rRNA foi realizada utilizando o teste de Wilcoxon para análise quantitativa e teste de McNemar para comparação da taxa de detecção dos métodos. As bactérias foram consideradas metabolicamente ativas se a razão rRNA/rDNA for maior ou igual 1, conforme descrito por Campbell et al. (2011). O teste de Wilcoxon foi utilizado para avaliar as diferenças nas razões rRNA/rDNA das bactérias entre as amostras S1, S2 e S3.

RESULTADOS

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

5.1 Análise de bactérias totais após os procedimentos endodônticos utilizando ensaios de qPCR baseados em rDNA e rRNA

Bactérias foram detectadas em todas as 15 coletas iniciais (S1) utilizando os ensaios de qPCR baseados em rDNA e rRNA. Após o preparo químico-cirúrgico, foram detectadas bactérias em 87% (13/15) das amostras S2 pelo método baseado em rDNA e em 93% (14/15) dos casos pelo método baseado em rRNA. Após a medicação intracanal, rDNA foi detectado em 80% (12/15) das amostras S3, enquanto o rRNA permaneceu detectável em 93% (14/15) dos casos. Na comparação entre os grupos, não houve diferença na taxa de detecção bacteriana dos ensaios baseados em rDNA e rRNA (Tabela 5.1).

Tabela 5.1- Taxa de detecção de bactérias totais de ensaios baseados em RNA ribossômico (rRNA) e DNA ribossômico (rDNA)

(rRNA) e RNA ribossômico (rDNA)										
Bactérias totais		S1			S2			S3		
		rDNA		Valor de <i>P</i>	rDNA		Valor de <i>P</i>	rDNA		Valor de <i>P</i>
		+	-		+	-		+	-	
rRNA	+	15	0	1,00	13	1	1,00	12	2	0,5
	-	0	0		0	1		0	1	

Fonte: a autora.

+, amostras com resultados positivos em qPCR; -, amostras com resultados negativos em qPCR; S1, amostras coletadas antes do preparo químico-cirúrgico; S2, amostras coletadas após do preparo químico-cirúrgico; S3 amostras coletadas após a medicação intracanal. O teste de McNemar foi utilizado para comparar a diferença a taxa de detecção entre os métodos ($P < 0,05$ indica diferença estatística significativa)

Os dados quantitativos relacionados ao rDNA e rRNA bacteriano das amostras dos canais radiculares em cada etapa do tratamento endodôntico estão representados na Figura 5.1. O número de cópias de rDNA e rRNA sofreu uma redução significativa após o preparo químico-cirúrgico ($P = 0,01$, para ambos). Entretanto, após o uso da medicação intracanal houve um aumento significativo do número de cópias de rRNA bacteriano ($P = 0,01$). Na

comparação entre os métodos, o número de cópias de rRNA bacteriano foi consideravelmente maior que o número de cópias de rDNA nas amostras S3 quando com parada as amostras S2 ($P = 0,001$) (Tabela 5.2).

Figura 5.1- Número de cópias de rDNA e rRNA (valores medianos) nas amostras dos canais radiculares em cada etapa do tratamento endodôntico: S1, amostras coletadas antes do preparo químico-cirúrgico; S2, amostras coletadas após do preparo químico-cirúrgico; S3 amostras coletadas após a medicação intracanal

Fonte: a autora.

Tabela 5.2 - Valores da mediana (mínima - máxima) do número cópias de 16S rDNA e rRNA de bactérias totais nas amostras dos canais radiculares antes (S1) e após (S2) o preparo químico cirúrgico e após a medicação intracanal (S3)

Amostras	Grupos		P
	rDNA	rRNA	
S1	1,87 x 10 ⁵ (2,62 x 10 ⁴ - 4,02 x 10 ⁵)	3,93 x 10 ⁵ (4,23 x 10 ⁴ - 5,02 x 10 ⁵)	0,77
S2	7,86 x 10 ⁴ (0,00 - 1,70 x 10 ⁵)	1,04 x 10 ⁵ (0,00 - 2,30 x 10 ⁵)	0,39
S3	7,97 x 10 ⁴ (0,00 - 2,30 x 10 ⁵)	2,15 x 10 ⁵ (0,00 - 2,28 x 10 ⁸)	0,001*

Fonte: a autora.

O símbolo (*) indica que houve diferença entre os valores de mediana de bactérias totais nas amostras S3 entre os grupos rDNA e rRNA (teste de Wilcoxon signed rank, $P < 0,05$)

5.2 Atividade metabólica de bactérias totais antes e após os procedimentos endodônticos

Para as amostras positivas em ambos os ensaios, foi calculada a razão rRNA/rDNA para avaliar a atividade metabólica das bactérias em diferentes etapas do tratamento endodôntico. No início do tratamento, a razão rRNA/rDNA foi positiva (mediana 1, intervalo 1 a 34) para as 15 amostras S1, revelando que as bactérias estavam metabolicamente ativas, porém com uma grande variação do estado metabólico nos canais radiculares estudados. Após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares, 13 amostras S2 permaneceram positivas para ambos os ensaios de qPCR, com uma redução significativa da razão rRNA/rDNA (mediana 1, intervalo 0 a 5; $P = 0,04$). Por outro lado, houve um aumento da razão rRNA/rDNA após o uso da medicação intracanal nas 12 amostras S3 analisadas quando comparada às amostras S2 (mediana 2, intervalo 1 a 18; $P = 0,04$).

5.3 Análise de *Bacteroidaceae* [G-1] sp. oral taxon 272 após os procedimentos endodônticos utilizando ensaios de qPCR baseados em rDNA e rRNA

Bacteroidaceae [G-1] sp. oral taxon 272 foi detectado em 40% (6/15) e 47% (7/15) das amostras S1 utilizando qPCR baseado em rDNA e rRNA, respectivamente. Essa espécie bacteriana permaneceu nos canais radiculares após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal em todos casos positivos em S1 (Tabela 5.3).

Tabela 5.3- Taxa de detecção de *Bacteroidaceae* [G-1] sp. oral taxon 272 por ensaios baseados em RNA ribossômico (rRNA) e DNA ribossômico (rDNA)

<i>Bacteroidaceae</i> sp. HOT-272	S1			S2			S3		
	rDNA		Valor de P	rDNA		Valor de P	rDNA		Valor de P
	+	-		+	-		+	-	
rRNA	+	6	1	1,00	6	1	1,00	6	1
	-	0	8		0	8		0	8

Fonte: a autora.

+, amostras com resultados positivos em qPCR; -, amostras com resultados negativos em qPCR; S1, amostras coletadas antes do preparo químico cirúrgico; S2, amostras coletadas após do preparo químico cirúrgico; S3 amostras coletadas após a medicação intracanal. O teste de McNemar foi utilizado para comparar a diferença a taxa de detecção entre os métodos ($P < 0,05$ indica diferença estatística significativa)

Os dados quantitativos relacionados ao rDNA e rRNA de *Bacteroidaceae* [G-1] sp. oral taxon 272 nas amostras dos canais radiculares estão representados na Tabela 5.4. Na comparação entre S1 e S2, não houve redução do número de cópias de rDNA ($P = 0,5$) e rRNA ($P = 1$). Resultados semelhantes foram encontrados na comparação entre S2 e S3, revelando que a medicação intracanal não promoveu redução de cópias de rDNA ($P = 0,2$) nem de rRNA ($P = 0,9$). Na comparação entre os métodos, o número de cópias de rRNA de *Bacteroidaceae* [G-1] sp. oral taxon 272 foi maior do que o número de cópias de rDNA, notadamente nas amostras S1 e S2 (Tabela 5.4).

Na análise da quantificação absoluta baseada em rDNA, observou-se que a abundância relativa de *Bacteroidaceae* [G-1] sp. oral taxon 272, ou seja, a abundância desse táxon em relação ao número de bactérias totais nas amostras estudadas foi de: 1,45% nas amostras iniciais, 5,05% após o preparo químico cirúrgico e de 6,29% após o uso da medicação intracanal.

Tabela 5.4- Valores da mediana (mínima - máxima) do número cópias de 16S rDNA e rRNA de *Bacteroidaceae* [G-1] sp. oral taxon 272 nos canais radiculares antes (S1) e após (S2) o preparo químico cirúrgico e após a medicação intracanal (S3)

Amostras	Grupos		P
	rDNA	rRNA	
S1	2,72 x 10 ³ (0,00 - 6,28 x 10 ³)	7,68 x 10 ³ (0,00 - 1,37 x 10 ⁵)	0,01*
S2	3,97 x 10 ³ (0,00 - 5,88 x 10 ³)	7,25 x 10 ³ (0,00 - 7,84 x 10 ⁴)	0,01*
S3	5,01 x 10 ³ (0,00 - 1,74 x 10 ⁴)	7,52 x 10 ³ (0,00 - 2,94 x 10 ⁴)	0,12

Fonte: a autora.

O símbolo (*) indica que houve diferença entre os valores de mediana de *Bacteroidaceae* [G-1] sp. oral taxon 272 nas amostras S1 e S2 entre os grupos rDNA e rRNA (teste de Wilcoxon signed rank, $P < 0,05$)

5.4. Atividade metabólica de *Bacteroidaceae* [G-1] sp. oral taxon 272 antes e após os procedimentos endodônticos

No início do tratamento, o valor mediano da razão rRNA/rDNA foi 3 (intervalo 1 a 4) para 6 amostras S1 positivas em ambos os ensaios de qPCR. Após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares, as amostras S2 permaneceram positivas e não houve redução significativa da razão rRNA/rDNA (mediana 1,5, intervalo 1 a 14; $P = 0,7$). Essa razão se

manteve constante após o uso da medicação intracanal nas 6 amostras S3 analisadas (mediana 1,5, intervalo 0 a 23; $P = 0,5$). Esses resultados revelaram que *Bacteroidaceae* [G-1] sp. oral taxon 272 permaneceu metabolicamente ativo nos canais radiculares após os procedimentos endodônticos de desinfecção.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a redução e o metabolismo de bactérias após os procedimentos endodônticos de desinfecção utilizando métodos moleculares baseados em rRNA e rDNA. Esse foi o primeiro estudo a utilizar a razão rRNA/rDNA para avaliar a atividade metabólica de bactérias totais e de uma bactéria de difícil cultivo, *Bacteroidaceae [G1]* sp. oral taxon 272 após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal com hidróxido de cálcio. Na análise de bactérias totais, o preparo químico-cirúrgico promoveu uma redução do número de bactérias e de seu metabolismo; portanto a hipótese de nulidade para essa etapa do tratamento foi rejeitada. Por outro lado, o metabolismo de bactérias totais aumentou após o uso da medicação intracanal. Na análise de *Bacteroidaceae [G1]* sp. oral taxon 272, o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal não promoveram a redução do número de células bacterianas nem de seu metabolismo; portanto a hipótese de nulidade para essa espécie bacteriana foi aceita.

Na análise de bactérias totais, todas as amostras apresentaram resultados positivos em S1 em ambos os ensaios de qPCR, corroborando os estudos anteriores que utilizaram métodos moleculares baseados rDNA para detecção de bactérias nos canais radiculares com polpa necrótica e periodontite apical (Vianna et al., 2006; Sakamoto et al., 2007; Blome et al., 2008; Rôças; Siqueira, 2011a, b; Paiva et al., 2012; Paiva et al., 2013a, b; Rôças et al., 2013; Neves et al., 2014; Teles et al., 2014; Provenzano et al., 2015; Rodrigues et al., 2015; Rôças et al., 2016; Nakamura et al., 2018; Rodrigues et al., 2017). É importante ressaltar que todas as amostras de controle de esterilidade do campo operatório deram resultados negativos nas reações de PCR utilizando iniciadores universais para o domínio *Bacteria*. Os resultados negativos indicam que o protocolo de desinfecção do campo operatório utilizando peróxido de hidrogênio 30% e NaOCl 2,5%, realizado em duas etapas, foi eficaz em eliminar o DNA contaminante das superfícies dentárias, confirmando achados prévios (Kaufman et al., 2005; Sedgley et al., 2006; Montagner et al., 2012; Gomes et al., 2013; Stojanovic et al., 2014; Moraes et al., 2015; Pinheiro et al., 2015; Nakamura et al., 2018).

Após o preparo químico-cirúrgico, 87% das amostras foram positivas para os ensaios de qPCR baseados em rDNA. Estes resultados concordam com estudos moleculares prévios que detectaram rDNA bacteriano em 67% a 94% dos casos após o preparo dos canais radiculares (Vianna et al., 2006; Sakamoto et al., 2007; Paiva et al., 2012b; Provenzano et al.,

2015; Nakamura et al., 2018). Outros estudos utilizando qPCR baseados em rDNA encontraram uma prevalência menor de amostras positivas após o preparo químico-cirúrgico, aproximadamente 40% (Rodrigues et al., 2015; Rôças et al., 2016). As diferenças entre os estudos podem estar relacionadas ao momento da coleta dos canais radiculares (antes ou após a irrigação final), além de aspectos técnicos do preparo químico-cirúrgico, incluindo a técnica de instrumentação, a substância química complementar e o volume da solução irrigadora. Outro fator que pode influenciar o resultado é o pequeno número de pacientes analisados no presente estudo, assim como na maioria dos estudos moleculares prévios (em média, $n < 20$). No presente estudo, as amostras S2 foram coletadas de 15 canais radiculares após o preparo químico-cirúrgico com instrumentos mecanizados (Reciproc) e irrigação com 40 mL de NaOCl 2,5%. Em estudo prévio utilizando o mesmo protocolo de preparo em 50 dentes com infecções endodônticas primárias, 78% das amostras foram qPCR-positivas após o preparo químico-cirúrgico (Nakamura et al., 2018).

Na análise quantitativa realizada por qPCR baseado em rDNA, o número de cópias de rDNA sofreu uma redução significativa após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares. Esses dados estão de acordo com estudos moleculares prévios que mostraram que o preparo químico-cirúrgico mecanizado utilizando instrumentos de níquel-titânio e irrigação com NaOCl a 2,5% promoveu uma redução significativa do total de bactérias dos canais radiculares, com bactérias persistentes na ordem de grandeza de 10^3 a 10^4 (Sakamoto et al., 2007; Rôças et al., 2013; Neves et al., 2014; Neves et al., 2016; Rôças et al., 2014; Rôças et al., 2016; Nakamura et al., 2018). A redução bacteriana após o preparo químico-cirúrgico está relacionada à remoção mecânica do biofilme aderido às paredes dos canais radiculares através da instrumentação auxiliada pela ação antibacteriana do irrigante e pela remoção de bactérias promovida pelo fluxo da irrigação/ aspiração.

No presente estudo, além da quantificação absoluta de bactérias por qPCR baseado em rDNA, utilizamos o ensaio de RT-qPCR. Os métodos baseados em rRNA proporcionam uma maior sensibilidade do que outras metodologias e pode ser usado para determinar a viabilidade celular porque o rRNA é mais abundante e menos estável do que rDNA (Matsuda et al., 2007; Pitkänen et al., 2013; Pinheiro et al., 2015). Além disso, considerando que o número de rRNA transcritos por células é dependente do estado metabólico das bactérias, a razão do número de cópias de 16S rRNA sobre o número de cópias de rDNA tem sido utilizada para pesquisar a atividade metabólica bacteriana (Campbell et al., 2011; Pitkänen et al., 2013; Pinheiro et al., 2015). Após o preparo químico-cirúrgico, observou-se uma maior prevalência de casos positivos para bactérias totais em S2 (93%) com a utilização de qPCR

baseado em rRNA quando comparado ao método baseado em rDNA (87%); porém, não houve diferença estatística quanto à taxa de detecção bacteriana nas diferentes etapas do tratamento. Da mesma forma, o número de cópias de rRNA ($1,04 \times 10^5$) foi maior do que o número de cópias de rDNA ($7,86 \times 10^4$) de bactérias totais nas amostras S2. A razão rRNA/rDNA revelou que embora o preparo químico-cirúrgico tenha promovido uma redução do metabolismo bacteriano em relação às amostras iniciais, as bactérias persistentes continuam viáveis nos canais radiculares.

Após a medicação intracanal com pasta de Ca(OH)_2 , com exceção de 1 caso, todas as amostras positivas em S2 permaneceram positivas em S3 nas reações de qPCR baseadas em rDNA. Esses dados estão de acordo com os achados de Sakamoto et al. (2007) que relataram uma alta prevalência de reações qPCR positivas após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal: 67% dos casos positivos em ambas as etapas do tratamento de dentes com infecções endodônticas primárias. Da mesma forma, Zandi et al. (2016) relataram que a porcentagem de amostras positivas após a medicação intracanal (51%) foi igual a de amostras positivas após o preparo químico-cirúrgico em dentes com infecções endodônticas persistentes/ secundárias. No entanto, Provenzano et al. (2015) relataram que a medicação intracanal com Ca(OH)_2 reduziu a porcentagem de amostras positivas (47%) quando comparada ao preparo químico-cirúrgico (71%). Os estudos que avaliaram o efeito antimicrobiano da medicação intracanal por qPCR baseado em rDNA são limitados e apresentam uma variação quanto ao uso e à composição da pasta de Ca(OH)_2 , utilizando diferentes veículos (soro fisiológico, polietilenoglicol, metilcelulose ou paramonoclorofenol canforado e glicerina) em diferentes tempos de atuação (7 a 25 dias). Esses fatores tornam difícil a comparação direta entre os resultados obtidos pelos diferentes estudos.

Na análise quantitativa, os resultados do presente estudo mostraram que uso da medicação intracanal com Ca(OH)_2 com veículo inerte (metilcelulose) por 14 dias não contribuiu para uma redução adicional do número de cópias de rDNA bacteriano após o preparo químico-cirúrgico. Esses dados corroboram os achados prévios de estudos moleculares baseados em rDNA (Sakamoto et al., 2007; Blome et al., 2008; Rôças; Siqueira, 2011b; Teles et al., 2014).

No presente estudo, podemos observar um aumento considerável do número de cópias de rRNA após o uso da medicação intracanal quando comparado ao preparo químico-cirúrgico. A alta taxa de rRNA/rDNA nas amostras de canais radiculares sugere um aumento no metabolismo bacteriano para bactérias totais após a medicação intracanal. Uma das razões

pelas quais as bactérias podem permanecer viáveis nos canais radiculares é a sua localização no interior dos túbulos dentinários/ ramificações ou sua organização em biofilmes, impedindo o efeito do Ca(OH)_2 . Além disso, alguns micro-organismos podem tolerar a mudanças de pH devido a ativação da bomba de prótons e/ou outros dispositivos de tamponamento, os quais ajudam a manter o pH interno praticamente constante (Siqueira et al., 1998; Siqueira; Uzeda, 1998; Padan et al., 1981).

Além da análise de bactérias totais persistentes nos canais radiculares, é necessária a investigação da composição dessa comunidade bacteriana. As bactérias de difícil cultivo ou ainda não-cultiváveis fazem parte da infecção endodôntica (Sakamoto et al., 2007; Munson et al., 2002; Rôças et al., 2014; Barbosa-Ribeiro et al., 2016) e, conseqüentemente, podem fazer parte da patogênese da periodontite apical. Essas bactérias foram identificadas pelo gene 16S rRNA e a sua fisiologia, capacidade patogênica e susceptibilidade aos procedimentos endodônticos é praticamente desconhecida. Nesse contexto, o método baseado em rRNA se torna fundamental para análise do metabolismo de bactérias de difícil cultivo ou não-cultiváveis, especialmente após os procedimentos endodônticos de desinfecção. Entretanto, até o presente momento, poucos estudos analisaram a viabilidade de bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção por métodos moleculares baseados em RNA (Williams et al., 2006; Rôças; Siqueira, 2010; Pinheiro et al., 2015).

O *Bacteroidaceae* [G1] sp. oral taxon 272 é uma bactéria de difícil cultivo também chamado de *Bacteroidetes* clone oral X083, identificado por Paster et al. (2001). Nas amostras iniciais, 40% dos casos foram positivos para *Bacteroidaceae* [G1] sp. oral taxon 272 em ensaio de qPCR baseado em rDNA. Após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal, *Bacteroidaceae* [G1] sp. oral taxon 272 persistiu em 20% dos casos. Os dados de prevalência antes e após o preparo químico-cirúrgico estão de acordo com os achados de Neves et al. (2014). Porém, Rôças et al. (2014) revelaram uma menor prevalência de *Bacteroidaceae* [G1] sp. oral taxon 272 antes e após o preparo químico-cirúrgico: 24% e 4%, respectivamente.

No ensaio de qPCR baseado em rRNA com iniciadores específicos para *Bacteroidaceae* [G-1] sp. oral taxon 272, 47% das amostras S1 foram positivas. Após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal, *Bacteroidaceae* [G-1] sp. oral taxon 272 persistiu em 47% dos casos. A razão rRNA/rDNA revelou que *Bacteroidaceae* sp. oral taxon 272 permaneceu metabolicamente ativo após os procedimentos de desinfecção. Esses dados corroboram os achados prévios de Rôças e Siqueira (2010) que detectaram *Bacteroidaceae* [G-1] sp. oral

taxon 272 após os procedimentos endodônticos de desinfecção em um estudo baseado em rRNA, porém em menor prevalência. As diferenças entre os estudos podem estar relacionadas à sensibilidade dos métodos moleculares empregados; no presente estudo foi utilizado qPCR, enquanto no estudo anterior foi utilizado um ensaio de hibridização DNA-DNA após a reação de transcrição reversa.

O presente estudo baseado em rRNA e rDNA revelou que bactérias podem persistir ativas nos canais radiculares após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal com Ca(OH)_2 . O aumento do metabolismo bacteriano após a medicação intracanal revelou que Ca(OH)_2 , quando utilizado no protocolo descrito no presente estudo, foi ineficaz contra as bactérias persistentes nos canais radiculares após o preparo químico-cirúrgico. Esses dados indicam que novas substâncias ou novas formulações da pasta de Ca(OH)_2 devam ser pesquisadas como medicação intracanal. O presente estudo também revelou que *Bacteroidaceae* [G-1] sp. oral taxon 272 faz parte da microbiota persistente. Estudos longitudinais devem ser realizados para estudar a relação entre a persistência de bactérias viáveis revelada pelos métodos moleculares e a taxa de sucesso do tratamento endodôntico.

7 CONCLUSÃO

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

- O preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares promoveu a redução do número e do metabolismo de bactérias persistentes. Por outro lado, após o uso da medicação intracanal com Ca(OH)_2 , houve um aumento do metabolismo das bactérias persistentes em relação às amostras coletadas após o preparo químico-cirúrgico.
- *Bacteroidaceae* [G-1] sp. oral taxon 272 permaneceu metabolicamente ativo após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal, participando, assim, da composição da microbiota persistente.
- A taxa de detecção do ensaio de qPCR baseado em rRNA foi semelhante à do qPCR baseado em rDNA para análise de bactérias totais e de *Bacteroidaceae* [G-1] sp. oral taxon 272 em amostras de canais radiculares coletadas antes e após os procedimentos de desinfecção.

REFERÊNCIAS¹

- Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of lipoteichoic acid contents and cultivable bacteria at the different phases of the endodontic retreatment. *J Endod*. 2016 Apr;42(4):552-6. doi: 10.1016/j.joen.2016.01.002.
- Beus C, Safavi K, Stratton J, Kaufman B. Comparison of the effect of two endodontic irrigation protocols on the elimination of bacteria from root canal system: a prospective, randomized clinical trial. *J Endod*. 2012 Nov;38(11):1479-83. doi: 10.1016/j.joen.2012.07.005.
- Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, Online © 2015 Bergey's Manual Trust. This article is © 2011 Bergey's Manual Trust. DOI: 10.1002/9781118960608.fbm00058. Published by John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
- 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.
- Brudin L, Jorfeldt L, Pahlm O. Comparison of two commonly used reference materials for exercise bicycle tests with a Swedish clinical database of patients with normal outcome. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2014 Jul;34(4):297-307. doi: 10.1111/cpf.12097. Epub 2013 Oct 31.
- Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J*. 1985 Jan;18(1):35-40.
- Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res*. 1981 Aug;89(4):321-8.
- Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol*. 1985 Oct;1(5):170-5.
- 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.
- Card SJ, Sigurdsson A, Orstavik D, Trope M. The effectiveness of increased apical enlargement in reducing intracanal bacteria. *J Endod*. 2002 Nov;28(11):779-83.
- Carver K, Nusstein J, Reader A, Beck M. In vivo antibacterial efficacy of ultrasound after hand and rotary instrumentation in human mandibular molars. *J Endod*. 2007 Sep;33(9):1038-43. Epub 2007 Jul 20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.11.026>.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Chu FC, Leung WK, Tsang PC, Chow TW, Samaranayake LP. Identification of cultivable microorganisms from root canals with apical periodontitis following two-visit endodontic treatment with antibiotics/steroid or calcium hydroxide dressings. *J Endod* 2006 Jan;32(1):17–23.

Dalton BC, Orstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M. Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. *J Endod*. 1998 Nov;24(11):763-7.

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.

Endo MS, Ferraz CC, Zaia AA, Almeida JF, Gomes BP. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. *Eur J Dent*. 2013 Jul;7(3):302-9. doi: 10.4103/1305-7456.115414.

Endo MS, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Oct;31(10):2575-83. doi: <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1598-6>

Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gül K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. *J Endod*. 2004 Feb;30(2):84-7.

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.

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.

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

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.

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

Halbauer K, Prskalo K, Janković B, Tarle Z, Pandurić V, Kalenić S. Efficacy of ozone on microorganisms in the tooth root canal. *Coll Antropol*. 2013 Mar;37(1):101-7.

Herrera DR, Martinho FC, de-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPFA. Clinical efficacy of EDTA ultrasonic activation in the reduction of endotoxins and cultivable bacteria. *Int Endod J*. 2017 Oct;50(10):933-940. doi: 10.1111/iej.12713.

Ingle JI, Zeldow BJ. An evaluation of mechanical instrumentation and the negative culture in endodontic therapy. *J Am Dent Assoc*. 1958 Oct;57(4):471-6.

Jurič IB, Plečko V, Pandurić DG, Anić I. The antimicrobial effectiveness of photodynamic therapy used as an addition to the conventional endodontic re-treatment: a clinical study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014 Dec;11(4):549-55. doi: 0.1016/j.pdpdt.2014.10.004.

Takehashi 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.

Kaufman B, Spångberg L, Barry J, Fouad AF. *Enterococcus* spp. in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. *J Endod*. 2005 Dec;31(12):851-6.

Kvist T, Molander A, Dahlen G, Reit C. Microbiological evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized, clinical trial. *J Endod*. 2004 Aug;30(8):572–6.

Loozen G, Boon N, Pauwels M, Quirynen 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.

Łysakowska ME, Ciebiada-Adamiec A, Sienkiewicz M, Sokołowski J, Banaszek K. The cultivable microbiota of primary and secondary infected root canals, their susceptibility to antibiotics and association with the signs and symptoms of infection. *Int Endod J*. 2016 May;49(5):422-30. doi: 10.1111/iej.12469. Epub 2015 Jun 12.

Manzur A, González AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. *J Endod*. 2007 Feb;33(2):114-8.

Martinho FC, Gomes AP, Fernandes AM, Ferreira NS, Endo MS, Freitas LF, Camões IC. Clinical comparison of the effectiveness of single-file reciprocating systems and rotary systems for removal of endotoxins and cultivable bacteria from primarily infected root canals. *J Endod*. 2014 May;40(5):625-9. doi: 10.1016/j.joen.2013.12.006.

Martinho FC, Gomes BP. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod*. 2008 Mar;34(3):268-72. doi: 10.1016/j.joen.2007.11.015.

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

McGurkin-Smith R, Trope M, Caplan D, Sigurdsson A. Reduction of intracanal bacteria using GT rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca(OH)₂. *J Endod* 2005 May;31(5):359-63.

Molander A, Warfvinge J, Reit C, Kvist T. Clinical and radiographic evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of asymptomatic necrotic teeth with apical periodontitis: a randomized clinical trial. *J Endod*. 2007 Oct;33(10):1145-8.

Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, Sanches PF, Gomes BP. Clustering behavior in microbial communities from acute endodontic infections. *J Endod*. 2012 Feb;38(2):158-62. doi: 10.1016/j.joen.2011.09.029.

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

Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res*. 2002 Nov;81(11):761-6.

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

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

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

Orstavik D, Kerekes K, Molven O. Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial infection during treatment of apical periodontitis: a pilot study. *Int Endod J*. 1991 Jan;24(1):1-7.

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

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

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

Paiva SS, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC, Rachid CT, Rosado AS. Molecular microbiological evaluation of passive ultrasonic activation as a supplementary

disinfecting step: a clinical study. *J Endod.* 2013b Feb;39(2):190-4. doi: 10.1016/j.joen.2012.09.014.

Paquette L, Legner M, Fillery ED, Friedman S. Antibacterial efficacy of chlorhexidine gluconate intracanal medication in vivo. *J Endod.* 2007 Jul;33(7):788-95. Epub 2007 May 2.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 2001 Jun;183(12):3770-83. doi: 10.1128/JB.183.12.3770-3783.2001

Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J.* 2001 Sep;34(6):429-34.

Peters LB, Wesselink PR. Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms. *Int Endod J* 2002 Aug;35(8):660 –7.

Peters LB, van Winkelhoff AJ, Buijs JF, Wesselink PR. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *Int Endod J.* 2002 Jan;35(1):13–21. doi: 10.1046/j.0143-2885.2001.00447.x

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

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

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.

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. Epub 2015 Mar 19.

Rajaram A, Kotrashetti VS, Somannavar PD, Ingalagi P, Bhat K. Culture-based identification of pigmented *Porphyromonas* and *Prevotella* species in primary endodontic infections. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2016;10(3):136-41. doi: 10.15171/joddd.2016.022.

Ramachandran Nair PN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod.* 1987 Jan;13(1):29-39.

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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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.

Schirrmeister 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.

Schneider SW (1971) A comparison of canal preparations in straight and curved canals. *Oral Surgery* 32:271-75.

Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod.* 2006 Feb;32(2):104-9.

Shuping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod.* 2000 Dec;26(12):751-5.

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

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 2009 Nov;88(11):969-81. doi: 10.1177/0022034509346549.

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.

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

Siqueira JF Jr, Guimarães-Pinto T, Rôças IN. Effects of chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite and intracanal medication with calcium hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals. *J Endod.* 2007a Jul;33(7):800-5.

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

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

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.* 2007c May;33(5):541-7.

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.

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.

Sjögren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J.* 1991 May;24(3):119 –25.

Sjögren U, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of ultrasonic root canal instrumentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1987 Mar;63(3):366-70.

Stewart GG. The importance of chemomechanical preparation of the root canal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1955 Sep;8(9):993-7.

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

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

Teixeira SR, Mattarazo F, Feres M, Figueiredo LC, de Faveri M, Simionato MR, Mayer MP. Quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *fimA* genotypes in smoker chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009 Jun;36(6):482-7. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01411.

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

Vianna ME, Horz HP, 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.

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

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

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

Wang CS, Arnold RR, Trope M, Teixeira FB. Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacteria. *J Endod*. 2007 Nov;33(11):1283-9.

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

Xavier AC, Martinho FC, Chung A, Oliveira LD, Jorge AO, Valera MC, Carvalho CA. One-visit versus two-visit root canal treatment: effectiveness in the removal of endotoxins and cultivable bacteria. *J Endod*. 2013 Aug;39(8):959-64. doi: 10.1016/j.joen.2013.04.027.

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.

Zeldow BI, Ingle JJ. Correlation of the positive culture to the prognosis of endodontically treated teeth: a clinical study. J Am Dent Assoc. 1963 Jan;66(1):9-13.

APÊNDICE A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

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

Pesquisador responsável: Ericka Tavares Pinheiro

Equipe de pesquisa: Prof. Dr. Giulio Gavini, Profa. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer, Alexandre Pinheiro Lima de Carvalho, Carlos Goes Nogales, Laura Cristina Leite Nardello, Fernanda Pinheiro Bruno, Luiza Riomar Paz, Roberto Xavier Romero Cazares, Bárbara Guedes Alves.

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

Telefone para contato: (11) 3091-7839 / (11) 2648-8293

Local da coleta de dados: Clínica da Pós-Graduação da FOU SP

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “**Análise da Comunidade Bacteriana Metabolicamente Ativa nas Infecções Endodônticas Persistentes após Diferentes Protocolos Clínicos de Desinfecção: Estudo Molecular baseado em RNA e DNA**” que tem como objetivo avaliar o quanto a agitação da solução irrigadora por ultrassom, laser ou instrumento endodôntico consegue diminuir o número de bactérias encontradas no canal radicular.

A pesquisa será realizada na Clínica da Pós Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, e serão selecionados pacientes da Clínica de Endodontia da FOU SP já em tratamento.

O procedimento consiste em, detectada no exame clínico e radiográfico a infecção do canal, estes pacientes serão convidados a participar da pesquisa permitindo a coleta do conteúdo que está dentro do canal durante todo o tratamento para a pesquisa. Os demais serão encaminhados para outras disciplinas para que possam ser realizados os tratamentos necessários.

O tratamento consiste em duas sessões, sendo que a primeira será feita o procedimento relacionado com o tratamento de canal, com o uso ou não da agitação da solução irrigadora e as coletas. Na segunda sessão, será feito o fechamento do canal, uma nova coleta e restauração do dente, finalizando o tratamento. O tratamento será feito com anestesia para conforto do paciente, e serão realizadas apenas as radiografias necessárias para a realização do tratamento. Anualmente o participante da pesquisa retornará à Clínica de Endodontia para controle do tratamento.

Rubrica Participante da Pesquisa

Rubrica do Pesquisador Responsável

1/3

Os participantes da pesquisa serão divididos em 4 grupos: 1 – Seringa plástica descartável e pontas de irrigação; 2 – Agitação da solução irrigadora com ultrassom; 3- Agitação com instrumento endodôntico; 4- Agitação da irrigação a laser.

O risco deste tratamento é uma sensibilidade após as consultas de tratamento, que o pesquisador responsável estará à inteira disposição para solucionar. O benefício ao participante da pesquisa será o tratamento de canal garantindo melhor saúde bucal.

Aos participantes desta pesquisa são assegurados:

- Ressarcimento de todos os gastos;
- Assistência em virtude dos danos decorrentes da pesquisa;
- Indenização em casos de danos decorrentes da pesquisa;
- Acesso aos resultados dos exames radiográficos;
- Os dados fornecidos serão confidenciais;
- Liberdade de retirada do Consentimento sem penalização por parte dos pesquisadores;
- Liberdade de recusar em participar do estudo sem penalização por parte dos pesquisadores responsáveis;
- Em caso de interrupção do estudo receberá assistência adequada de forma gratuita pelo tempo que for necessário;

O pesquisador responsável, Ericka Tavares Pinheiro, poderá ser encontrado no telefone (11) 2648-8293, ou na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

CEP-FOUSP - Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – Avenida Professor Lineu Prestes nº 2227 – 05508-000 – São Paulo – SP – Telefone (11) 3091.7960 – e-mail cepfo@usp.br. O horário de atendimento ao público e pesquisadores é: de segunda a sexta-feira das 9 as 12h e de 14 as 16h (exceto em feriados e recesso universitário). O Comitê é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. (Resolução CNS nº 466 de 2012).

Rubrica Participante da Pesquisa

Rubrica do Pesquisador Responsável

2/3

Este termo está sendo elaborado em duas vias, sendo uma do participante da pesquisa e outra do pesquisador responsável.

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

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Nome do participante da pesquisa:

Endereço: _____

_____ Telefone: (_____)

Assinatura do Participante da pesquisa

Assinatura do Pesquisador Responsável

APÊNDICE B – 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 C – 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 200µL 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 500µL 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 500µL 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 200µL.

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/µL (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 1µL 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 1uL 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

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA USP - SÃO
PAULO

Continuação do Parecer: 2.201.768

Objetivo da Pesquisa:

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Recomendações:

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

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

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

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA USP - SÃO
PAULO

Continuação do Parecer: 2.201.768

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 04 de Agosto de 2017

Assinado por:

Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br