YESKA BRAGA HORI

**Análise *in vivo* da atividade antimicrobiana do Endo-PTC leve associado ao
hipoclorito de sódio 1%**

São Paulo

2017

YESKA BRAGA HORI

Análise *in vivo* da atividade antimicrobiana do Endo-PTC leve associado ao hipoclorito de sódio 1%

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Giulio Gavini

São Paulo

2017

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

Hori, Yeska Braga.

Análise *in vivo* da atividade antimicrobiana do Endo-PTC leve associado ao hipoclorito de sódio 1% / Yeska Braga Hori ; orientador Giulio Gavini. -- São Paulo, 2017.

87 p. : fig., quad., ; 30 cm.

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

Versão corrigida

1. Endodontia. 2. Hipoclorito de sódio - Odontologia. 3. Preparos dentários. 4. Periodontite periapical. I. Gavini, Giulio. II. Título.

Hori YB. Análise *in vivo* da atividade antimicrobiana do Endo-PTC leve associado ao hipoclorito de sódio 1%. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 21 / 02 /2018

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Éricka Tavares Pinheiro

Instituição: Universidade de São Paulo Julgamento: Aprovado

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

Instituição: Universidade Paulista Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Eduardo Akisue

Instituição: Universidade Santa Cecília Julgamento: Aprovado

Aos meus pais José Francisco e Vânia, vó Mariza, vó Cida e vô Isalto, meus maiores
exemplos de vida, de onde vem o amor que existe em mim.

À minha irmã Shine, por ser minha metade que mais amo, estaremos juntas sempre
pro que der vier.

Ao meu grande amor Fred, por estar ao meu lado em todos os momentos, onde
encontro minha felicidade e quem me completa.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Giulio Gavini, uma honra tê-lo como orientador, por toda confiança, orientação e ensinamentos. Muito obrigada por tornar possível a realização deste trabalho. Minha admiração e gratidão, por esta oportunidade, sob os cuidados de um exemplo de professor, de grandes valores profissionais e humanos.

À Prof. Dra. Éricka Tavares Pinheiro, sempre me incentivou, além do grande auxílio e orientações na parte clínica e laboratorial deste trabalho.

À grande amiga Prof. Laís Cunha Prado, pela materialização dos resultados deste trabalho, obrigada pela bondade, paciência e humildade com que você passa seus conhecimentos.

À amiga Laura Nardello, pela grande ajuda na parte laboratorial deste trabalho, pela companhia nesses anos de mestrado.

À irmã que a vida de mestrado me deu, Priscila Oliveira Fernandes, companheira inseparável desta vida acadêmica, obrigada por estar sempre ao meu lado, sem você não teria sido tão especial.

Ao grande amigo André Craveiro, por toda sua alegria e companheirismo.

À todos os amigos e colegas da pós-graduação por todos os momentos compartilhados, J. Edgar Valdívia, Leonardo Medina Poveda, Alessandra Gambini, Prof. Elaine Faga Iglecias, Prof. Laila Freire, Alexandre Pinheiro, Carlos Nogales.

À todos os professores da disciplina de Endodontia, com que aprendi muito, Celso Luiz Caldeira, Igor Prokopwitsch, José Luiz Lage-Marques, Marcelo dos Santos.

Aos funcionários do Departamento de Dentística, da Clínica Odontológica e da Biblioteca da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Aos amigos colegas do trabalho que me apoiaram e incentivaram, me ajudando de alguma forma, Felipe Galego, Marcelo Sirolli, Edilma Santos, Juliana Bueno, Renata Savassa, Thayná Gonçalves, Daniela Soller.

Ao grande e inesquecível, Prof. Dr. João Humberto Antoniazzi, por sua dedicação e
por seus conhecimentos revolucionários.

"Na sei como o mundo me vê, mas me sinto uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedra mais lisa ou uma concha mais bonita, enquanto o imenso oceano de verdades continua misterioso diante dos meus olhos".

Isaac Newton

RESUMO

Hori YB. Análise *in vivo* da atividade antimicrobiana do Endo-PTC leve associado ao hipoclorito de sódio 1% [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Corrigida.

Durante o preparo químico-cirúrgico são utilizados instrumentos e substâncias químicas, que constituem um binômio indivisível e necessário para alcançar a modelagem e a sanificação dos canais radiculares. Assim, propõe-se com este trabalho avaliar *in vivo*, por meio de método molecular de PCR quantitativo, baseado em DNA (qPCR), a eficiência do preparo químico-cirúrgico empregando como agente de irrigação o Hipoclorito de Sódio (NaOCL) a 2,5% ou o Gel de Endo PTC associado ao Hipoclorito de Sódio a 1,0% na redução bacteriana de canais radiculares de dentes portadores de periodontite apical primária. Foram selecionados 30 pacientes portadores de infecção endodôntica primária, totalizando 30 dentes, com rarefação óssea periapical visível na radiografia, sem tratamento endodôntico prévio. Os pacientes foram divididos de forma randomizada em dois grupos distintos, de acordo com a substância química auxiliar utilizada durante a instrumentação, NaOCL 1% + Endo-PTC leve ou NaOCL 2,5%. Em todos os casos empregou-se instrumentos Reciproc R40 ou R50 e as coletas foram realizadas antes (S1) e após o prepare químico-cirúrgico (S2). A análise de aderência foi realizada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, as análises intragrupo foram realizadas com teste de Wilcoxon para amostras relacionadas e as comparações entre os dois grupos foram realizadas com o teste de Mann-Whitney, para a análise quantitativa de bactérias. Em ambos os grupos, houve diminuição significativa no número de bactérias entre S1 e S2 ($p < 0,05$). No grupo NaOCL 1% + Endo-PTC leve, houve redução de $3,7 \times 10^5$ (S1) para $5,7 \times 10^4$ (S2). No grupo NaOCL 2,5%, redução de $1,3 \times 10^5$ (S1) para $1,1 \times 10^4$ (S2). Na comparação entre grupos, o NaOCL a 2,5% (91,62%) promoveu maior redução bacteriana do que o grupo NaOCL 1% + Endo-PTC (84,60%) ($p < 0,05$).

Palavras-chave: Endo-PTC leve. Hipoclorito de sódio. Preparo químico-cirúrgico. Reciproc. Redução microbiana. Periodontite apical. qPCR. Tratamento endodôntico.

ABSTRACT

Hori YB. *In vivo* analysis of the antimicrobial activity of the light Endo-PTC associated with 1% sodium hypochlorite [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Corrigida.

During the chemomechanical preparation, instruments and chemical substances are used, which constitute an indivisible and necessary binomial to achieve modeling and sanification. Knowing the auxiliary chemical substances, understanding their mechanisms of action, being able to use them efficiently, is fundamental, so that the chemical-surgical preparation is well performed by the clinician. Thus, the purpose of this study is to evaluate *in vivo*, the efficiency of the chemomechanical preparation using as the irrigant agent 2,5% sodium hypochlorite and Endo-PTC gel, associated to 1% sodium hypochlorite, to assess the bacterial reduction of root canals of teeth with primary apical periodontitis, using a molecular quantitative method DNA-based – polymerase chain reaction (qPCR). Were selected 30 patients with primary infection totaling 30 teeth, with visible periapical bone rarefaction on the radiography, without previous endodontic treatment. Patients were randomly divided into two distinct groups according to the auxiliary chemical substances used during the instrumentation, 1% sodium hypochlorite associated with Endo-PTC gel or 2,5% sodium hypochlorite. In all cases, reciproc instruments R40 or R50 were used and the samples were taken before (S1) and after chemical surgical preparation (S2). The adherence analysis was performed using the Kolmogorov-Smirnov test, intragroup analysis were performed with Wilcoxon test for related samples and comparisons between the two groups were performed with the Mann-Whitney test for the quantitative analysis of bacteria. In the both groups, there was a significant decrease in the number of bacteria between S1 and S2 ($p < 0,05$), the inicial sample (S1) of the group Endo-PTC, the median $3,7 \times 10^5$, reduced to $5,7 \times 10^4$. In the other group of NaOCl, the median in S1 was $1,3 \times 10^5$ that reduced to $1,1 \times 10^4$. In the comparison between groups, the 2,5% NaOCl promoted a greater microbial reduction of 91,62%, than the Endo-PTC associated with 1% NaOCl ($p < 0,05$) 84,60%.

Keywords: Light Endo-PTC. Sodium hypochlorite. Chemomechanical preparation. Reciproc. Microbial reduction. Apical periodontitis. qPCR. Endodontic treatment

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Eficiência da curva de PCR..... 51

Figura 4.2 - A: Coleta (C1) do campo operatório com cone de papel absorvente. B: Coleta (S1) antes do preparo químico-cirúrgico com lima H. C: Colocação da parte ativa da lima no criotubo com RNAlater. D: Criotubos esterilizados contendo RNA later, já com as partes ativas das limas H e cones de papel absorvente após as coletas..... 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CHX	Clorexidina
CRT	comprimento real de trabalho
EDTA	ácido etileno diamino tetra-acético
µL	microlitros
mL	mililitros
mm	milímetro
NaOCl	Hipoclorito de sódio
PQC	Preparo químico-cirúrgico
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
s	segundo
UFC	unidade formadora de colônias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	Estudos com outras substâncias químicas ou pastas.....	29
3	PROPOSIÇÃO.....	43
3.1	Objetivos Específicos.....	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	Aspectos Éticos	45
4.2	Seleção dos pacientes	45
4.3	Preparo dos canais e coletas microbiológicas	47
4.4	Análise quantitativa de bactérias	50
4.5	Análise Estatística	51
5	RESULTADOS	53
6	DISCUSSÃO.....	55
7	CONCLUSÕES.....	61
	REFERÊNCIAS	63
	APÊNDICES	77
	ANEXOS.....	85

1 INTRODUÇÃO

O preparo químico-cirúrgico tem como objetivo modelar e sanificar os canais radiculares, promovendo sua desinfecção e limpeza. Durante o preparo, ocorre a redução dos microrganismos e seus subprodutos, responsáveis pelo surgimento e manutenção da periodontite apical. Esta doença infecciosa é sustentada por biofilme bacteriano aderido às paredes dos canais, istmos, ramificações, além do interior dos túbulos dentinários. Portanto, o sucesso do tratamento endodôntico passa obrigatoriamente pelo controle da infecção.

Dominar o conhecimento das substâncias químicas auxiliares, entender seus mecanismos de ação, ser capaz de empregá-las de modo eficiente, é fundamental para que o preparo químico-cirúrgico seja bem executado pelo clínico. A substância química auxiliar deve possuir propriedades que facilitem a atuação dos instrumentos, promovam a remoção dos restos orgânicos, exercendo atividade antimicrobiana e apresentando biocompatibilidade com os tecidos periapicais.

O hipoclorito de sódio devido a seu efeito antimicrobiano e capacidade de dissolução de matéria orgânica é a solução irrigadora mais utilizada em Endodontia, em concentrações que variam de 0,5% a 5,25%.

O creme de Endo-PTC associado ao hipoclorito de sódio é uma associação de fármacos muito empregada na Endodontia brasileira, desde a década de 1970, apresentando propriedades físico-químicas e biológicas muito interessantes. Desde o emprego experimental do Endo-PTC, proposto em 1969, sucessivas alterações foram feitas em sua composição para se obter uma consistência ideal preservando suas propriedades. Diversos estudos foram realizados testando o Endo-PTC e suas características, mas em sua maioria, as pesquisas foram realizadas *in vitro*, avaliando sua capacidade de alterar a permeabilidade dentinária, sua característica lubrificante e atividade antibacteriana, sendo esta, principalmente analisada por métodos bacteriológicos dependentes de cultura, que apesar de detectar bactérias cultiváveis, apresentam limitações como a impossibilidade de detectar viabilidade de bactérias ainda não cultiváveis e sua baixa sensibilidade. Essas deficiências do método podem subestimar as taxas bacterianas resistentes aos procedimentos endodônticos. Os métodos moleculares surgiram para superar essas limitações visto que a quantificação de bactérias é baseada na detecção de DNA. Este método permite a detecção de

bactérias não cultiváveis, possuindo alta sensibilidade, capaz de detectar microrganismos mesmo em baixa quantidade.

A necessidade de comprovar clinicamente os efeitos antimicrobianos do creme de Endo-PTC é essencial para justificar seu emprego, em detrimento ao uso isolado do hipoclorito de sódio.

Assim, propõe-se com este estudo comparar, *in vivo*, por qPCR, a redução bacteriana em dentes portadores de periodontite apical primária, instrumentados com Endo-PTC leve associado ao hipoclorito de sódio 1% ou hipoclorito de sódio 2,5%.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O alcance do sucesso do tratamento endodôntico depende de requisitos fundamentais como o conhecimento adequado da anatomia radicular, bem como a correta execução dos procedimentos. O complexo sistema de canais radiculares é composto por canal principal, canais laterais, recorrentes, acessórios, secundários, deltas apicais, múltiplos forames, istmos, além de curvaturas; estas áreas de difícil acesso ou até inacessíveis aos instrumentos interferem na escolha não só dos instrumentos, mas também das soluções que serão necessárias durante a limpeza e desinfecção (Walton, 1976; Siqueira, 1997; Wu; Wesselink, 2001; Peters et al; 2001; Estrela et al; 2002; Ricucci; Bergenholtz, 2003; Nair et al; 2005; Haapasalo et al; 2005).

A sanificação e modelagem do canal radicular é o princípio básico da instrumentação endodôntica, os conceitos estabelecidos por Schilder em 1974, continuam sendo base para os objetivos tridimensionais de modelagem, limpeza e obturação que desejamos hoje. A modelagem se baseia na ação dos instrumentos, ou seja, na confecção de um canal cirúrgico que mantenha o forame na sua posição original, mantendo as paredes regulares e lisas. A sanificação visa promover a limpeza (removendo restos de tecido orgânico e inorgânico) e a desinfecção (eliminando os microrganismos e seus subprodutos) favorecendo assim a posterior obturação (Gavini, 1994; Gavini et al; 1996; Siqueira et al; 2005; Zehnder, 2006).

Com os avanços tecnológicos, a Endodontia conta com recursos como a tomografia computadorizada volumétrica de feixe cônico e a microtomografia computadorizada volumétrica (MICRO CT), ferramentas que nos permitem, o estudo e reprodução tridimensional da anatomia interna e externa. A MICRO CT permite a avaliação da ação dos instrumentos obtendo análises tanto qualitativas e quantitativas, sem necessidade de destruição dos espécimes. (Peters et al; 2000, 2001; Peters, 2004; Paqué et al. 2009, 2012; Iglecias, 2014; Busquim et al; 2015). Além disso, pode-se avaliar a ação de irrigantes e sistemas de irrigação na remoção de debris durante o PQC (Versiani et al; 2015, Freire et al; 2015).

Áreas não tocadas tanto pelos instrumentos, conseqüentemente não atingidas pelas soluções irrigadoras, durante o preparo, vão manter a permanência de microrganismos, os quais se mantêm organizados em biofilme nas superfícies da

dentina radicular. Estes microrganismos alcançam os túbulos dentinários em uma profundidade de até 300µm, mantendo assim a infecção endodôntica (Berutti et al; 1997; Siqueira et al; 2002; Love; Jenkinson, 2002; Love, 2004).

Portanto, o preparo químico-cirúrgico, depende tanto do desgaste da dentina como da ação da substância química auxiliar, mantendo as raspas de dentina excisada em suspensão, para que o fluxo produzido durante a irrigação e aspiração remova detritos e microrganismos favorecendo a limpeza dos canais radiculares (Gavini, 1992, 1994; Gavini et al; 1996; Barbin et al; 1999; Spanó et al; 2001; Estrela et al; 2002; Huang et al; 2008; Siqueira et al; 2010).

No entanto, a seleção da substância química está relacionada à análise das propriedades físico-químicas e biológicas, de modo que satisfatoriamente cumpram os objetivos, sem lesar os tecidos vivos do periodonto apical. A associação de diferentes substâncias pode ser interessante para suprir e complementar a ação desejada das soluções durante o preparo químico-cirúrgico. A utilização da substância química promove auxílio essencial para a sanificação do complexo sistema de canais radiculares (Paiva e Antoniazzi, 1973; Gavini, 1992; Simi et al; 1999; Silva et al; 2004).

O hipoclorito de sódio é entre as diversas soluções, a mais utilizada. Sua utilização clínica apresenta concentrações que variam de 0,5 a 5,25%. Muitos estudos avaliam de uma forma geral sua ação na limpeza e desinfecção durante o tratamento endodôntico.

Dakin em 1915, utilizou uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% estabilizado com ácido bórico, como medicamento para limpar feridas na Primeira Guerra Mundial. Em 1936, Walker relatou a primeira utilização do hipoclorito de sódio na irrigação do canal radicular, combinado com a ação mecânica de preparo dos canais, sendo utilizada a soda clorada duplamente concentrada, o que lhe deu resultados satisfatórios.

O hipoclorito de sódio apresenta a desejável característica de dissolução de matéria orgânica (Goldman et al; 1982; Baumgartner e Mader, 1987; Baumgartner e Cuenin, 1992). Quanto maior a concentração da solução de hipoclorito de sódio, mais rápida é a dissolução do tecido pulpar e menor o consumo de cloro (Spanó et al; 2001).

A liberação de oxigênio nascente e cloro possuem alto poder bactericida, sendo que a velocidade de potencial antimicrobiano aumenta proporcionalmente à concentração (Aun e Paiva 1982). Além disso, a formação de cloraminas interfere no metabolismo celular pela ação oxidante que gera inibição enzimática irreversível nas

bactérias e degradação de ácidos graxos e lipídeos (Estrela et al; 2002). A redução bacteriana após PQC ocorre independente da concentração sendo que a troca regular e o uso de grandes quantidades de irrigantes compensa os efeitos da concentração da solução de NaOCl (Siqueira et al; 2000).

Para suprir as necessidades não atendidas pelas soluções, diferentes associações foram sugeridas nos últimos anos, dentre elas peróxido de uréia, peróxido de hidrogênio, EDTA, entre outras (Grossman, 1941 e 1943; Auerbach 1953 e Stewart 1955; Nygaard-Ostby 1957, Ram 1980, Cobe 1960).

Stewart et al. (1961), vendo a necessidade de novas substâncias auxiliares durante a instrumentação, empregou o peróxido de uréia veiculado em glicerina anídrica (Gly-Oxide – 10% de peróxido de uréia) no preparo químico-cirúrgico alternando com irrigação com soda clorada. Além de funcionar como lubrificante facilitando a ação do instrumento nas paredes do canal radicular, O peróxido de uréia ao reagir com o hipoclorito de sódio libera oxigênio, formando bolhas, o que mantém os debris em suspensão, e apresenta ação antibacteriana. Em 1969, os mesmos autores sugeriram a utilização DO Rc-Prep, uma associação composta pelo peróxido de uréia 10%, EDTA 15% e Carbowax 75%. A associação aumenta a permeabilidade dentinária e sua utilização com soda clorada resulta em efervescência e ação bactericida.

Em 1974, Paiva e Antoniazzi modificaram a fórmula original do Rc-Prep proposta por Stewart et al, substituindo o EDTA pelo detergente Tween 80 e a glicerina por carbowax, surgindo o creme Endo-PTC (peróxido de uréia 10%, Tween 80 -15%, Carbowax 75%). O Carbowax É uma substância graxa, detergente, solúvel em água, que age como veículo favorecendo a lubrificação, diminuindo os riscos de travamento dos instrumentos na parede do canal, além de tornar a reação entre o hipoclorito de sódio e o peróxido de uréia mais lenta, tornando seu efeito contínuo por mais tempo. Os autores sugeriram a utilização do creme associado ao hipoclorito de sódio 0,5% (Líquido de Dakin), no lugar do hipoclorito de sódio 5%. Durante o preparo, pequenas quantidades do líquido de Dakin são adicionados, resultando na reação entre o hipoclorito de sódio e o peróxido de uréia da fórmula. O resultado da reação entre o peróxido de uréia e o hipoclorito de sódio SÃO oxigênio nascente e compostos intermediários de cloro ativo, gerando efervescência e promovendo a desinfecção. A presença do Tween 80, um detergente, diminui a tensão superficial, permitindo maior

contato com as paredes do canal radicular, favorecendo a limpeza das superfícies de contato.

A associação do líquido de Dakin ao Endo-PTC é reportada como tendo excelente efeito bactericida e lubrificante (Paiva e Antoniazzi, 1973), além de apresentar aumento da permeabilidade dentinária (Batista et al; 1977; Moura et al. 1978, Robazza et al; 1981; Oliveira Filho et al; 1988; Prokopowitsch, 1988; Prokopowitsch et al; 1989; Prokopowitsch, 1994; Amorim et al; 2001; Cardoso e Prokopowitsch, 2004; Souza et al; 2005). Por outro lado, Silva et al. (2004), Em estudo *in vitro* concluíram que o hipoclorito de sódio a 0,5% associado ao creme de Endo-PTC não foi eficaz contra *Staphylococcus aureus* e o EDTA-T a 17% não apresentou atividade antibacteriana contra nenhum dos microrganismos testados.

O Endo –PTC existe no mercado na forma de creme , e mais recentemente foi lançado o Endo-PTC leve, na consistência de gel, que apresenta a mesma composição do Endo-PTC original (Peróxido de uréia, Tween 80 e carbowax). A diferença entre o Endo-PTC original e o leve está no peso molecular do carbowax, utilizado como veículo, o qual apresenta um peso molecular bem menor que o utilizado no Endo-PTC original, o que torna sua consistência mais fluída.

A consistência cremosa de algumas substâncias químicas, segundo alguns autores, faz com que o acúmulo de debris na região apical e a dificuldade de sua remoção, prejudiquem o sucesso do tratamento endodôntico (Gavini et al; 1994; Santos, 2000; Monteiro et al; 2008).

Em seus estudos, Holland et al. (1990), Carvalho et al. (1999); Nery (2000), Vance et al. (2004) comprovaram que o creme de Endo-PTC favorece a formação de grande quantidade de debris e sua incapacidade de remover o magma dentinário formado durante a instrumentação dos canais radiculares.

Ferreira et al. (2005) sugeriram a mudança do veículo do creme de Endo-PTC, alterando também a sua consistência. No lugar de Carbowax, o gel de carbopol, mantendo o Endo-PTC na forma de gel. Os autores concluíram que o emprego de gel como veículo, foi capaz de proporcionar índice de permeabilidade semelhante ao do protocolo tradicionalmente empregado, mas sem diferenças estatísticas significantes entre o grupo do gel e do creme de Endo-PTC. Resultado semelhante ao estudo de Carvalho et al. (2005).

Souza et al. (2005) avaliaram a variação de permeabilidade provocada pela associação Dakin + Endo-PTC, segundo a dinâmica de substituições de substância química, pela avaliação de infiltração de corante indicador. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com e sem renovação do hipoclorito de sódio. A análise dos resultados permitiu concluir que a dinâmica de substituições dos agentes químicos, não constitui fator importante na relação da permeabilidade dentinária durante o preparo do sistema endodôntico.

Para Polidoro et al. (2007) e Rodrigues et al. (2015), quando avaliada por microscopia eletrônica de varredura, a utilização de Endo PTC creme ou Endo PTC leve não apresentou diferenças estatisticamente significativas na limpeza das paredes do canal radicular do terço apical. Quando o EDTA foi utilizado, foi alcançado melhor resultado de limpeza, sem diferença estatística significativa entre as substâncias. Chegando à conclusão que o uso do EDTA é essencial para promover a remoção de smear-layer, a qual não é afetada pelo tipo de formulação de Endo-PTC. Usando metodologia semelhante, Monteiro et al. (2008) encontraram diferença estatisticamente significativa, sendo que o grupo Endo-PTC leve se mostrou superior aos demais no terço médio e apical. Os autores concluíram que as substâncias veiculadas em polietilenoglicol e em menor viscosidade ofereceram melhor padrão de limpeza.

2.1 Estudos que avaliaram redução bacteriana após o PQC

O processo de PCR foi inventado por Kary Mullis em 1983, revolucionando o campo da biologia molecular. É um processo complexo, porém com alto poder e versatilidade para manipulação e análise de DNA. O método baseia-se na replicação *in vitro* de DNA, através de ciclos repetitivos de reações simples. Os principais reagentes a serem utilizados no PCR são o DNA alvo a ser amplificado, oligonucleotídeos de cadeia única (primers), os quais complementares às sequências do DNA alvo, quantidades excessivas dos quatro trifosfatos do lado do desoxirribonucleico (dNTPs), e uma DNA polimerase termo estável. A DNA polimerase mais utilizada é a isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*, (Taq DNA polimerase). As reações de amplificação são realizadas utilizando

termocicladores de DNA. O DNA alvo serve como molde, o qual em altas temperaturas quebram as ligações de hidrogênio que mantêm as fitas unidas, liberando assim cadeias simples de DNA. Uma grande vantagem do método é que o DNA não precisa ser puro ou abundante, pode ser uma espécie menor em uma mistura complexa de outro DNA e outras substâncias. Muito relevante quando se investiga a presença de uma determinada espécie microbiana em uma infecção mista. Os primers são selecionados para abranger o material genético desejado, definindo as duas extremidades do trecho ampliado do DNA. Em sequência uma nova cadeia complementar de DNA novo é sintetizada através da extensão de cada primer, anelado pela Taq polimerase na presença de dNTPs em excesso. Todos os produtos sintetizados vão atuar como modelos para novas reações de extensão em cada ciclo subsequente. O resultado é a amplificação exponencial de novos produtos de DNA, compreendendo de 25 a 40 ciclos de amplificação. Entre os métodos de detecção de microbiana, o PCR exhibe melhor taxa de detecção, de 1 a 10 células em uma amostra, assim o método possui excelente sensibilidade e especificidade. Já o método de cultura usando meios não seletivos pode detectar $10^4 - 10^5$ células em uma amostra. Quando meios seletivos são utilizados, a sensibilidade do método de cultura aumenta para 10^3 células. Uma vez que não há carga bacteriana exata para induzir clinicamente uma lesão periapical, seria ideal que o método detectasse o menor número possível de células bacterianas em amostras de canais radiculares. A alta sensibilidade do método PCR em relação a sua sensibilidade, refere-se ao fato do número de células bacterianas coletadas nos canais radiculares pode ser baixo, devido as dificuldades encontradas para a realização das coletas de amostras. As dificuldades estão relacionadas às restrições físicas do sistema de canais radiculares, dependendo da profundidade em que as pontas de papel absorvente são introduzidas no interior do canal, poder de absorção dos cones de papel e do número e tamanho das pontas utilizadas.

A cultura de amostras requer pelo menos 8 horas de incubação no meio de cultura, seguida de testes bioquímicos entre outros para a identificação dos microrganismos. O tempo para identificação pode ser ainda maior para microrganismos de crescimento lento ou para amostras com baixa contagem microbiana. Métodos tradicionais de cultura, laboratórios podem exigir de 7 a 14 dias para identificar bactérias anaeróbias, enquanto PCR pode fornecer informações em apenas algumas horas. Os métodos de cultura proporcionaram e ainda tem muito a

ajudar na elucidação das doenças infecciosas. No entanto, as abordagens moleculares para detectar e identificar espécies microbianas tem muitas vantagens quando comparadas com a cultura. Os métodos moleculares, particularmente PCR, são mais específicos, precisos, sensíveis e mais rápidos que o método de cultura, além disso podem detectar microrganismos não cultiváveis além de permitirem uma identificação mais precisa de cepas bacterianas cultiváveis com comportamento fenotipicamente divergente ou convergente, podem ser usadas com confiabilidade durante a terapia antimicrobiana e não requerem microrganismos viáveis para a detecção o que é vantajoso em processos infecciosos causados por bactérias anaeróbias, que podem não sobreviver ao transporte e manipulação de espécimes.

As abordagens de PCR contribuíram significativamente para o conhecimento da microbiota do canal radicular, permitindo o reconhecimento de novos patógenos endodônticos, fortalecendo a associação de algumas bactérias anaeróbias cultiváveis, porém fastidiosas, com infecções do canal. A utilização bem direcionada desses métodos fornece informações valiosas em relação a identificação e compreensão dos fatores causais associados às doenças endodônticas além de contribuir para o desenvolvimento de estratégias de tratamento aprimoradas. (Siqueira e Roças, 2003)

Sua aplicação em pesquisas *in vivo* é de extrema importância, uma vez que que é durante o preparo químico-cirúrgico que há a redução dos microrganismos, além disso quando os métodos são utilizados em pesquisas *in vitro* não reproduzem exatamente, não só em relação as dificuldades práticas, mas a condição clínica e preservação.

Uma breve revisão de pesquisas clínicas, que avaliaram a importância do preparo químico-cirúrgico, em relação as substâncias químicas e instrumentos utilizados, utilizando métodos de cultura e moleculares, mas em sua maioria métodos moleculares para comparar as condições antes e após o preparo químico-cirúrgico.

Estudos de Bystrom e Sundqvist (1985), avaliaram o efeito antibacteriano da irrigação de canais radiculares infectados, com soluções de hipoclorito de sódio a 0,5% e 5%. Foram estudados sessenta dentes unirradiculares com necrose pulpar, paredes da câmara pulpar intactas e evidências radiográficas de destruição óssea periapical. Em 20 canais radiculares foi utilizada a solução de hipoclorito de sódio 0,5% (pH 9), e em outros 20 canais, solução de hipoclorito de sódio 5% (pH9), e em mais 20 canais foram usados para irrigação de hipoclorito de sódio a 5% e EDTA a 15% (pH 8). Os resultados indicaram que não houve diferença no efeito anti-

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

Chavez de Paz et al. (2003), em pesquisa estudaram o padrão de bactérias que permaneceram após o tratamento químico-cirúrgico de canais radiculares. Foram analisadas amostras de 200 dentes que receberam tratamento endodôntico. Para ser incluído, as amostras tiveram que ser coletadas em uma sessão subsequente aquela em que a terapia endodôntica foi iniciada. Achados bacteriológicos foram ligados a parâmetros clínicos e radiográficos. Um total de 248 amostras foram isoladas de 107 dentes, no qual 25 apresentaram crescimento bacteriano. Houve uma prevalência de bactérias gram-positivas (85%). *Lactobacillus* spp. (22%), *Streptococcus* spp. (18%), *Enterococcus* spp. (12%) foram os mais frequentes. Anaeróbios gram-negativos foram relativamente esporádicos. As lesões ósseas radiográficas, dor persistente a utilização de hidróxido de cálcio como medicação intracanal foram correlacionadas à presença de bactérias ($p > 0,05$). Uma vez estabelecidas, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Lactobacillus* parecem sobreviver normalmente após o tratamento endodôntico de dentes com periodontite apical.

Gomes et al. (2006), investigaram as variações na susceptibilidade dos membros da microbiota do canal radicular ante e após procedimentos biomecânicos. Quarenta e dois canais radiculares foram investigados microbiologicamente. As amostras foram coletadas antes e após a instrumentação e os resultados foram comparados. Em 15 casos de canais previamente não tratados, apesar das mudanças no tamanho da população microbiana, nenhuma mudança significativa na composição de espécies da microbiota foi observada. No entanto, em 27 casos, após o tratamento endodôntico, foi encontrada uma diminuição no número de *Peptostreptococcus* spp. ($P = 0,008$). Quando todos os 42 casos foram considerados em conjunto, foram encontradas reduções significativas entre a primeira e segunda amostra para anaeróbios ($P = 0,0117$) e para as espécies Gram-positivas ($p = 0,008$), especialmente *Peptostreptococcus* spp. ($P = 0,02$). Por conseguinte, concluiu-se que certas espécies são mais resistentes aos procedimentos biomecânicos do que outros.

Viana et al. (2006), analisaram *in vivo*, a redução microbiana, após o preparo químico-cirúrgico de 32 canais radiculares humanos com polpa mortificada, com NaOCl 2,5% ou gel de clorexidina 2%. A avaliação da redução bacteriana foi realizada por meio de qPCR com kits SybrGreen e TaqMan, e métodos de cultura. Observou-

se nos resultados das contagens de UFCs que a quantidade de bactérias foi reduzida significativamente em ambos os grupos (mais de 96%). No entanto, usando qPCR, a quantidade de bactérias antes e após o preparo, foi maior do que quando avaliado por contagem de UFCs. Além disso, a redução de bactérias no grupo NaOCl (SybrGreen: 99,99%; TaqMan: 99,63%) foi significativamente maior do que no grupo CHX (SybrGreen: 96,62%; TaqMan: 96,60%). De acordo com a técnica de cultura, 75% dos casos estavam livres de bactérias após o preparo no grupo NaOCl, enquanto 50% dos casos estavam livres de bactérias no grupo CHX.

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

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

Siqueira Jr. (2007d), estudaram a eficácia do NaOCl 2,5% e CHX 0,12% como irrigantes na redução bacteriana em canais radiculares de dentes infectados com periodontite apical. Foram selecionados 32 dentes com infecções primárias. Amostras

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

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

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

bactérias e fungos, e reação de PCR para bactérias, fungos e Archea. Todas as amostras iniciais foram positivas para as bactérias, fungos não foram detectados, e Archea ocorreu em apenas uma amostra. O preparo químico-cirúrgico foi significativamente eficaz na redução da incidência de cultura positiva e resultados de PCR. Embora ambas as abordagens complementares tenham reduzido a incidência de resultados bacteriológicos, 27 positivos quando comparados com amostras S2, a redução não foi estatisticamente significativa. A análise entre os grupos não demonstrou haver diferença significativamente entre as técnicas.

Beus et al. (2012), compararam *in vivo* os resultados da irrigação convencional com NaOCl 1% e da PUI com NaOCl 1% + EDTA 17% + CHX 2%, bem como os efeitos da medicação intracanal de Ca(OH)_2 , na eliminação de bactérias de canais de dentes com periodontite apical de 50 pacientes. Os indivíduos foram divididos em 2 grupos e receberam tratamento endodôntico em 2 sessões, com uso de medicação intracanal de Ca(OH)_2 por um período de 14 dias. Após o PQC, Os dentes foram tratados aleatoriamente com um dos protocolos na primeira visita. Amostras microbiológicas foram coletadas em quatro momentos: (S1) antes de instrumentação, (S2), após o protocolo de irrigação, (S3) após a medicação, e (S4) antes da obturação. A irrigação convencional e a PUI resultaram em canais livres de bactérias em 80% e 84% dos casos, respectivamente, ao final da primeira visita. Após a medicação o total da amostra aumentou para 87% livre de bactérias, e a reinstrumentação gerou um total de 91%. Não houve diferença estatística entre os métodos de irrigação ou entre os resultados obtidos em uma ou duas sessões.

Alves et al. (2012) comparam *ex vivo* a redução bacteriana em canais radiculares ovais, promovida por uma técnica de instrumento único e uma técnica rotatória por meio de qPCR e culturas microbiológicas. Canais com secção oval, de dentes extraídos contaminados com *E.faecalis*, foram instrumentados usando sistema recíprocante de instrumento único Reciproc ou instrumentos rotatórios BioRaCe. Amostras bacteriológicas foram realizadas antes (S1) e após a instrumentação (S2). A análise intragrupo da contagem de UFCs mostrou que ambos os protocolos promoveram uma redução significativa de bactérias. A análise intergrupo não mostrou diferenças significativas entre os dois sistemas de instrumentação.

Para comparar a eficácia antibacteriana de duas técnicas de instrumentação, usando instrumentos manuais de Ni-Ti e instrumentos rotatórios de Ni-Ti, em canais radiculares de dentes com periodontite apical; Roças et al. (2013), utilizaram dentes

com canais únicos, os quais foram instrumentados utilizando instrumentos manuais de Ni-Ti, na técnica de movimento de rotação alternada ou instrumentos rotatórios BioRace. O irrigante utilizado em ambos os grupos foi NaOCl 2,5%. O DNA das amostras coletadas antes e após a instrumentação foram submetidos a análise quantitativa por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). A análise qualitativa também foi realizada usando dados de presença/ ausência de ensaios de cultura e qPCR. As bactérias foram detectadas em todas as amostras S1 por ambos os métodos. Na análise de cultura, 45% e 35% dos canais ainda foram positivos para a presença de bactérias após a instrumentação manual e rotatória, respectivamente ($p>0,05$). A instrumentação rotatória resultou em significativamente em menos casos de qPCR positivos (60%) do que a instrumentação manual de Ni-Ti (95%) ($p=0,01$). A comparação intergrupos de dados quantitativos não mostrou diferença significativa entre as duas técnicas. Não houve diferença significativa na redução bacteriana nos canais infectados após a instrumentação utilizando instrumentos manuais de Ni-Ti ou rotatórios. Em termos de incidência de resultados positivos para bactérias, a cultura também não mostrou diferenças significativas entre os grupos, mas a instrumentação rotatória gerou resultados mais negativos na análise de qPCR.

Basmaci et al. (2013) avaliaram o efeito das técnicas de instrumentação recíproca de instrumento único e instrumentação rotatória com o uso de diversos regimes de irrigação na redução de *E.faecalis* do interior de 81 canais radiculares de pré-molares inferiores humanos extraídos. Os dentes foram divididos em 9 grupos, de acordo com o instrumento e o regime de irrigação utilizados: grupo 1-A – Self Adjusting File (SAF) e solução salina estéril; grupo 1-B – SAF e NaOCl 5% + EDTA 15%; grupo 1-C – SAF e NaOCl 5% + ácido maleico 7%; grupo 2-A: Reciproc e solução salina; grupo 2-B – Reciproc e NaOCl 5 % + EDTA 15%; grupo 2-C – Reciproc e NaOCl 5 % + ácido maleico 7%; grupo 3-A – ProTaper e solução salina; grupo 3-B – ProTaper e NaOCl 5% + EDTA 15%; grupo 3-C – ProTaper e NaOCl 5% + ácido maleico 7%. Após o PQC, os dentes receberam nova contaminação com *E.faecalis* e, após 21 dias, cada canal foi irrigado com o regime de irrigação pertinente ao seu grupo. Amostras microbiológicas foram realizadas antes e após o PQC e após a irrigação final. As amostras foram semeadas em placas e mantidas em estufa e, após 48 horas, realizou-se a contagem de UFCs. Todas as técnicas e regimes de irrigação foram eficazes em reduzir significativamente a quantidade de bactérias do canal radicular. Não foram observadas diferenças significativas na redução bacteriana entre as técnicas de

instrumento único (SAF e Reciproc) e rotatórios, ou entre os diferentes regimes de irrigação.

Machado et al. (2013) comparam a redução bacteriana obtida com sistemas reciprocantes e rotatórios no preparo de canais radiculares contaminados com biofilme de *E.faecalis*. Sessenta canais disto-vestibulares de molares superiores foram contaminados com *E.faecalis* por um período de 21 dias. Os canais radiculares foram divididos em cinco grupos (n=12) de acordo com o sistema utilizado para o preparo do canal: Waveone, Reciproc, ProTaper, Mtwo e instrumentação manual. Os controles negativos consistiram de cinco canais não contaminados. Amostras bacteriológicas foram coletadas antes, imediatamente, e 7 dias após o PQC. Todas as técnicas analisadas diminuíram significativamente a quantidade de bactérias do interior dos canais radiculares. No entanto, não foram observadas diferenças significativas na diminuição bacteriana entre as técnicas. Após 7 dias, observou-se novo aumento na quantidade de bactérias em todos os dentes.

Rôças et al. (2014), pesquisaram a susceptibilidade de sete filótipos bacterianos, ainda não cultivados e uma espécie de difícil cultura após os procedimentos químicos-mecânicos. Canais radiculares de 28 dentes, unirradiculares, com periodontite apical, foram preparados utilizando instrumentos rotatórios de Ni-Ti e NaOCl 2,5% como irrigante. Amostras de DNA foram coletadas antes (S1) e depois do preparo químico-mecânico (S2). Foram submetidas a análise quantitativa do total de bactérias e das taxas mais prevalentes. *Bacteroidaceae* sp. HOT-272 e *F. fastidiosum* (20%), foram as espécies mais prevalentes em S1. Após o preparo químico-cirúrgico houve redução significativa no total de bactérias ($p<0,001$), mas 64% dos canais ainda foram positivos para a presença de bactérias. Apenas *Bacteroidaceae* sp HOT-272 e *F. fastidiosum* foram detectados em S2 (cada um em uma amostra). A taxa de redução em ambos foi altamente significativa ($p<0,01$). Os resultados confirmaram que várias bactérias ainda não cultivadas e de difícil crescimento, podem estar associadas a periodontite apical e que os procedimentos químico-mecânicos foram altamente eficazes na eliminação ou redução das taxas bacterianas.

Neves et al. (2014), verificaram *in vivo*, a eficácia antibacteriana do instrumento self-adjusting file (SAF), utilizando métodos moleculares. Os canais radiculares de dentes unirradiculares, com periodontite apical, foram instrumentados com o sistema SAF, sob irrigação contínua com NaOCl 2,5%. A extração do DNA das amostras

coletadas antes e após a instrumentação, foram submetidos a análise quantitativa de contagem totais de bactérias e níveis de estreptococos por qPCR. O ensaio de hibridização de DNA-DNA por checkerboard, foi utilizado para identificar as taxas bacterianas antes (S1) e após a instrumentação(S2). O SAF também foi comparada com instrumento de Ni-Ti, utilizando a técnica de instrumentação manual para redução bacteriana total. O sistema SAF reduziu significativamente as contagens de bactéria as totais. Quantitativamente, a redução de 99,9% no total das contagens bacterianas associadas ao sistema SAF, foi superior à redução de 95,1% obtido pela instrumentação manual ($p<0,01$). O SAF resultou em mais casos com resultados negativos de PCR para bactérias (54,5%) do que a instrumentação manual (4,5%) ($p<0,01$). Análise checkerboard revelou que alguns estreptococos anaeróbios e mesmo bactérias ainda não cultivadas podem resistir aos efeitos de procedimentos químico-cirúrgicos.

O estudo clínico randomizado de Rôças et al. (2016), comparou os efeitos antibacterianos da irrigação com hipoclorito de sódio 2,5% ou clorexidina (CHX) 2%, durante o preparo de canais radiculares infectados, com instrumento rotatórios de Ni-Ti. Os canais radiculares de 50 dentes unirradiculares, com periodontite apical foram preparados usando instrumentos rotatórios BioRace (FKG Dentaire, La Chaux-de-Fonds, Suíça) e irrigação com hipoclorito de sódio 2,5% ($n=25$) ou CHX 2% ($n=25$). As amostras foram retiradas do canal radicular antes (S1) e após o preparo químico-mecânico (S2). O DNA foi extraído das amostras clínicas e a redução dos níveis de bactérias e estreptococos totais, foram avaliadas por meio de um ensaio de reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), baseados RNA 16S ribossomal. Todas as amostras de S1, foram positivas para a presença de bactérias. Após o preparo utilizando NaOCl 2,5% ou CHX 2%, 44% e 40% dos canais radiculares ainda apresentavam bactérias detectáveis, respectivamente. Quanto as contagens bacterianas totais, um número médio de células bacterianas de $3,7 \times 10^5$ estava presente em amostras S1 do grupo NaOCl, com redução substancial em S2 para uma média de $5,49 \times 10^2$ ($p<0,01$). No grupo CHX, uma carga bacteriana média de $8,77 \times 10^4$ ocorreu em S1, com uma redução significativa em S2 para uma média de $2,81 \times 10^3$ ($p<0,01$). As diferenças na presença/ausência e nos dados quantitativos, não foram estatisticamente significativas ($p>0,05$). Ambos os protocolos de irrigação foram altamente eficazes na redução dos níveis de espécies de *Streptococcus* ($p<0,01$). Na

conclusão, não foi observada diferença significativa para a eficácia antibacteriana clínica do preparo utilizando NaOCl 2,5% ou CHX 2% como irrigante principal.

Zandi et al. (2016), compararam os efeitos antibacterianos de hipoclorito de sódio (NaOCl) 1% e de digluconato de clorexidina (CHX) 2% durante o retratamento de dentes com periodontite apical. Os dentes tratados endodonticamente, com periodontite apical, foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos. As amostras bacteriológicas foram retiradas dos canais antes (S1) e após o preparo (S2), usando irrigação com NaOCl ou CHX, e após a medicação com hidróxido de cálcio (S3). A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), baseada em genes de RNA ribossômico 16S, foi realizada para quantificar bactérias totais, estreptococos e *Enterococcus faecalis*. Quarenta e nove dentes foram analisados (NaOCl, n=20; CHX, n=29). O DNA bacteriano ocorreu em todas as amostras de S1, estreptococos em 57% e *E. Faecalis* em 6%. As contagens bacterianas totais diminuíram de S1 para S2 em ambos os grupos ($p<0,01$), mas foram maiores em S3 do que S2 ($p<0,01$). Trinta e cinco por cento (35%) dos dentes no grupo NaOCl foram positivos em S, diminuindo para 20% em S3. No grupo CHX, 41% foram positivos em S2, diminuindo para 31% em S3. A carga bacteriana em S1 influenciou a incidência de bactérias em S2 ($p<0,01$). Os estreptococos foram significativamente reduzidos em ambos os grupos, e *E. faecalis* foi encontrada em apenas uma amostra de S2 e não em S3. Não foi encontrada diferença significativa entre NaOCl e CHX. Concluíram que o NaOCl e CHX reduziram a contagem bacteriana e o número de canais com infecção. A medicação intracanal com hidróxido de cálcio reduziu o número de canais com infecção persistente, mas resultou em contagens bacterianas, em geral maiores nos casos positivos para bactérias. A eficácia do tratamento antimicrobiano pode ser influenciada pela carga bacteriana inicial.

Rico-Romano et al. (2016), realizaram um estudo randomizado, duplo cego. Os objetivos foram avaliar a atividade antimicrobiana *in vivo* de hipoclorito de sódio (NaOCl) versus gluconato de clorexidina (CHX), usado em combinação com EndoActivator® ou IRRi S® em pacientes com periodontite apical. Um total de 120 pacientes com periodontite apical (em canais radiculares únicos ou múltiplos), foram distribuídos aleatoriamente nos quatro protocolos de irrigação descritos abaixo: Grupo A: NaOCl 5,25% + EndoActivator®; Grupo B: NaOCl 5,25%+ IRRi S®; Grupo C: CHX 2%+ EndoActivator®; Grupo D: CHX 2% + IRRi S®. As pontas de papel foram utilizadas para coletar as amostras biológicas antes (amostras 1^A) e após irrigação

(amostras 1B). As unidades viáveis de formação de colônias (CFU), foram quantificadas duas vezes: (1) sem especiação, e (2) apenas para *Enterococcus faecalis* (EF). A análise estatística foi realizada usando SPSS 22.0 para Windows. Não foram observadas diferenças significativas entre NaOCl e CHX na redução da UFC; na verdade, a redução foi $< 93\%$ para os dois irrigantes. Por outro lado, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as duas técnicas de ativação (sônica e ultra-sônica), na redução de *Enterococcus faecalis* (EF). Assim, a eficácia da ativação ultra-sônica, foi significativamente maior ($< 93\%$; $p=0,012$) em comparação com a ativação sônica. Após a combinação dos dois fatores com as duas técnicas de ativação (grupos A, B, C e D), observaram também diferenças significativas entre o grupo A e B ($p=0,025$) na redução das populações EF, atingindo até 94%. Conclui-se que, NaOCl e CHX são eficazes na redução da carga bacteriana intracanal. A ativação por ultrassom é a técnica de ativação mais efetiva na redução das populações de EF.

Rodrigues et al. (2017), realizaram um estudo clínico, que avaliou a influencia do tamanho do preparo apical, usando instrumentação rotatória de Ni-Ti e o efeito de um desinfetante, na redução bacteriana em dentes com canal já tratados, com periodontite apical. Quarenta e três dentes com periodontite apical pós tratamento, foram selecionados para retratamento. Os dentes foram divididos aleatoriamente em 2 grupos de acordo com o irrigante utilizado (NaOCl 2,5%, $n=22$, solução salina, $n=21$). Os canais foram preparados com o sistema Twisted File Adaptive (TFA) (SybronEndo, Orange, CA). As amostras bacteriológicas foram coletadas antes do preparo (S1), após o uso do primeiro instrumento (S2) e depois do terceiro instrumento do sistema TFA (S3). No grupo salino, uma amostra adicional foi realizada após a irrigação final com NaOCl 1% (S4). O DNA foi extraído das amostras clínicas e submetido a reação de qPCR em tempo real, para avaliar os níveis de bactérias e estreptococos totais. As coletas S1 de todos os dentes foram positivos para bactérias. O preparo do primeiro para o terceiro instrumento, do sistema TFA, mostrou uma redução bacteriana intracanal altamente significativa independente do irrigante ($p<0,01$). A ampliação apical para o terceiro instrumento, causou uma diminuição significativamente maior nas contagens bacterianas do que no primeiro instrumento ($p>0,05$). NaOCl foi significativamente melhor do que a solução salina depois de usar o maior instrumento da série ($p<0,01$). Os autores concluíram que, independentemente do tipo do irrigante, um aumento no tamanho do preparo apical,

aumentou significativamente a desinfecção do canal radicular. O benefício desinfetante do NaOCl em relação a solução salina, foi significante em preparos apicais de maior diâmetro.

No entanto, é nosso intuito, alcançar a tão desejada sanificação do sistema de canais radiculares, uma vez que a redução microbiana está diretamente relacionada com o preparo químico cirúrgico, sendo a presença e eliminação dos microrganismos confrontada com o tipo de substâncias químicas auxiliares, objeto de muitos estudos. Visto que, os resultados de pesquisas *in vitro*, não reproduzem de maneira fiel, resultados *in vivo*, bem como avaliar a utilização de um lubrificante com propriedade antimicrobiana, associado a um hipoclorito de sódio de menor concentração, durante o preparo, ofereceria redução microbiana efetiva e segura. Neste contexto, a necessidade de avaliar a capacidade antimicrobiana dos agentes químicos utilizados durante a instrumentação, requer estudos clínicos, em busca de uma substância química auxiliar eficiente, que associada a instrumentação, proporcione condições favoráveis para a reparação tecidual.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vivo*, por meio de método molecular de PCR real time baseado em DNA (qPCR), a eficiência do preparo químico-cirúrgico empregando como agente de irrigação o Hipoclorito de Sódio a 2,5% ou o Gel de Endo PTC leve associado ao Hipoclorito de Sódio a 1,0% na redução bacteriana de canais radiculares de dentes portadores de periodontite apical primária.

3.1 Objetivos específicos

- Quantificar a redução de bactérias após o preparo químico – cirúrgico, de acordo com a substância química utilizada;
- Avaliar se a utilização do Gel de Endo PTC associado ao Hipoclorito de Sódio a 1,0% é mais eficaz na redução bacteriana do que o Hipoclorito de Sódio a 2,5%.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

Os procedimentos clínicos foram realizados na Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, mediante a prévia aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa 13396213.1.0000.0075 (ANEXO A) desta instituição e após o consentimento livre e esclarecido dos pacientes (Anexo B). Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Microbiologia Molecular do Departamento de Dentística - FOUSP.

4.2 Seleção dos Pacientes

Foram selecionados 30 pacientes portadores de infecção endodôntica primária, totalizando 30 dentes, com rarefação óssea periapical visível na radiografia, sem tratamento endodôntico prévio, em condições que justifiquem a realização do tratamento endodôntico. Foram excluídos da pesquisa, pacientes com alterações sistêmicas relevantes, como doenças degenerativas crônicas, processos infecciosos, doenças autoimunes ou imunodeficiências induzidas ou adquiridas. Também foi necessária a ausência de utilização de antibióticos, no período de 90 dias anteriores ao início da pesquisa.

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

Foi realizado o cálculo amostral no programa Graphpad Prism, utilizando como base os dados do estudo piloto. O teste bilateral para duas amostras independentes com relação entre elas de 1:1, nível de significância de 0,05% e poder de teste de 0,85 resultou em um tamanho de amostra de 15 casos para cada grupo. Foram excluídos da análise, 4 pacientes que, após o tratamento endodôntico, descobriram alterações sistêmicas.

Os pacientes foram divididos de forma randomizada em dois grupos distintos, de acordo com a substância química auxiliar utilizada durante a instrumentação. Em um dos grupos experimentais foi utilizado hipoclorito de sódio a 1% associado ao gel de Endo-PTC leve (Fórmula e Ação, Farmácia de Manipulação, São Paulo, Brasil) e no outro grupo o hipoclorito de sódio a 2,5%. A randomização foi realizada por meio de um sistema eletrônico de randomização online (Research Randomizer, www.randomizer.org), e o operador só tinha conhecimento da solução irrigadora a ser utilizada no momento do preparo químico-cirúrgico.

A organização dos procedimentos clínicos e de coleta podem ser visualizados no organograma.

Organograma 4.1 – Ilustração dos procedimentos clínicos e coletas microbiológicas dos procedimentos clínicos e coletas microbiológicas

4.3 Preparo dos canais radiculares e coletas microbiológicas

Após o exame clínico e radiográfico inicial, todos os pacientes receberam 10mL de antisséptico bucal (clorexidina 0,12%), para bochechar por 1 minuto. Após a anestesia foi 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 do dente foi realizada com swabs esterilizados (Berkshire Corporation, North Carolina, USA) embebidos em peróxido de hidrogênio 30% por 30s, seguido por hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl, Fórmula e Ação farmácia de manipulação, São Paulo, SP, Brasil), por mais 30s, sendo este neutralizado por tiosulfato de sódio 5%.

A cirurgia de acesso foi realizada em duas etapas, com auxílio de brocas diamantadas esféricas 1015 (Microdont Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil), em alta-rotação refrigerados com auxílio de seringas de 10mL (BD Company, São Paulo, SP, Brasil) e soro fisiológico esterilizado e apirogênico (Laboratórios B. Braun, São Gonçalo, RJ, Brasil), tomando-se o cuidado de não acessar a câmara pulpar. Após este procedimento, a coroa dental e o campo operatório foram novamente desinfetados, como descrito anteriormente, e a cirurgia de acesso foi finalizada com novas brocas esterilizadas, refrigeradas com soro fisiológico esterilizado e apirogênico. Foram realizadas coletas da coroa do dente e imediações da câmara pulpar, para comprovar a eficácia das manobras de antisepsia. A ausência de bactérias no campo operatório foi comprovada por meio de PCR convencional utilizando *primers* universais para o domínio *Bacteria*. Em caso de presença de bactérias na amostra, o dente e as amostras coletadas subsequentemente foram excluídos da pesquisa.

Ao término destes procedimentos, a câmara pulpar foi aspirada e o canal radicular preenchido com solução salina esterilizada e apirogênica. A odontometria foi realizada com um Instrumento tipo K (Dentsply Maillefer, Baillagues, Suíça) que melhor se ajustou no canal radicular, tendo como medida 1,0mm aquém do forame apical, com auxílio de localizador foraminal (J. Morita Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Um instrumento tipo H número 15 FOI pressionado contra as paredes do canal para suspender bactérias, na solução de soro fisiológico depositada no interior do canal

radicular. Quatro cones de papel número 15 esterilizados e apirogênicos foram introduzidos 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 inseridos em criotubos esterilizados contendo 1 mL de solução RNA later, para análise de bactérias.

Após essa coleta, UM cartão (pré-randomizado) foi removido de um envelope que indicou o protocolo de irrigação a ser usado durante esta fase, a saber: NaOCl a 1% + Endo PTC leve ou NaOCl 2,5%.

GRUPO NAOCL 1% + Endo PTC leve: A solução de hipoclorito de sódio 1% foi depositada na câmara pulpar e levada no sentido coroa-ápice com um instrumento tipo K número 10 (Dentsply Maillefer, Baillagues, Suíça), agitando a substância. Este processo foi repetido, até o comprimento real de trabalho (CRT) estabelecido a 1,0mm aquém do forame apical. Após a odontometria e o esvaziamento do canal, instrumentos manuais do tipo K (Dentsply Maillefer, Baillagues, Suíça), foram levados sem pressão até CRT. O primeiro instrumento que demonstrou travamento no CRT foi utilizado como base para a escolha do instrumento Reciproc (VDW GmbH, Munique, Alemanha) a ser utilizado, de acordo com as recomendações do fabricante. O preparo químico ciúrgico (PQC) foi realizado com motor VDW-silver (VDW GmbH, Munique, Alemanha) seguindo a cinemática de três ciclos de penetração/retrocesso, até o CRT. Ao final de cada ciclo, o instrumento foi limpo com uma gaze esterilizada e o canal irrigado com 10 ml de hipoclorito de sódio 1%. A câmara pulpar e o canal radicular foram preenchidos com Endo-PTC gel (Fórmula e Ação farmácia de manipulação, São Paulo, SP, Brasil) utilizando-se seringa descartável de 3 ml (BD Company, São Paulo, SP, Brasil), acoplada À ponta White Mac (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, Estados Unidos da América). Hipoclorito de sódio a 1% (Fórmula e Ação farmácia de manipulação, São Paulo, SP, Brasil) foi gotejado sobre o gel, verificado o efeito de efervescência iniciou-se a instrumentação com o instrumento recíprocante selecionado. Esse procedimento foi repetido sempre que a efervescência diminuía ou ao final de cada ciclo de penetração/retrocesso. A cada ciclo o canal foi irrigado com 10 ml de hipoclorito de sódio 1%, bem como ao término do preparo químico-cirúrgico, totalizando 30 ml. Durante o PQC, a irrigação/aspiração dos canais foi realizada com seringas plásticas esterilizadas e apirogênicas de 10 ml (BD Company, São Paulo, SP, Brasil), pontas de irrigação endodôntica com diâmetro 30G e saída lateral Endo-EZE Irrigator (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT,

Estados Unidos da América) e cânulas de aspiração SurgiTip (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, Estados Unidos da América) acopladas à bomba à vácuo odontológica.

GRUPO NAOCL 2,5%: A solução de hipoclorito de sódio 2,5% foi depositada na câmara pulpar e levada no sentido coroa-ápice com um instrumento tipo K número 10 (Dentsply Maillefer, Baillagues, Suíça), agitando a substância. Este processo foi repetido, até o comprimento real de trabalho (CRT) estabelecido a 1,0mm aquém do forame apical. Após a odontometria e o esvaziamento do canal, instrumentos manuais do tipo K (Dentsply Maillefer, Baillagues, Suíça), foram levados sem pressão até CRT. O primeiro instrumento que demonstrou travamento no CRT foi utilizado como base para a escolha do instrumento Reciproc (VDW GmbH, Munique, Alemanha) a ser utilizado, de acordo com as recomendações do fabricante. O PQC foi realizado com motor VDW-silver (VDW GmbH, Munique, Alemanha), A câmara pulpar e o canal radicular foram preenchidos com hipoclorito de sódio 2,5% e a instrumentação foi realizada seguindo a cinemática de três ciclos de penetração/retrocesso, até o CRT. Ao final de cada ciclo, o instrumento foi limpo com uma gaze esterilizada e o canal irrigado com 10 ml de hipoclorito de sódio 2,5%.

Em ambos os grupos, ao término do PQC, o conteúdo do canal foi aspirado com pontas *Capillary tips* 0,014" e 0,019" (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, Estados Unidos da América) e realizada irrigação com 5ml de tiosulfato de sódio 5% por 1 minuto. O canal foi preenchido com soro fisiológico esterilizado e aprotínico e nova coleta (S2) realizada como descrito anteriormente.

Os canais radiculares foram então preenchidos com Hidróxido de Cálcio (Ultracal®) e tiveram suas aberturas coronárias seladas com uma camada de obturador provisório à base de óxido de zinco (Dentalvile, Joinville, SC, Brasil) e uma camada de cimento de ionômero de vidro (Vidrion R, SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Após o período de 14 dias, removida a medicação intracanal com 10mL de EDTA – T (Fórmula e Ação, Farmácia de manipulação, São Paulo, Brasil), os dentes foram reinstrumentados com o mesmo instrumento recíprocante da sessão anterior, utilizando o mesmo protocolo de irrigação da primeira sessão, e obturados por meio de técnica de condensação lateral de guta-percha e cimento AH-Plus (Dentsply

Maillefer, Baillagues, Suíça).

As aberturas coronárias foram seladas com resina composta (Z350, 3M Corporation, St. Paul, MN, EUA).

4.4 Análise quantitativa de bactérias

A extração de DNA foi realizada com o kit de purificação MasterPure (Epicentre, Madison, WI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas com *primers* universais para a região 16S rRNA, conforme descrito por Shelburne et al. (2000).

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

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

Figura 4.1 – Eficiência da curva

4.5 Análise Estatística

Os dados obtidos foram tabulados de acordo com o grupo, tratamento e variável estudada, e foram analisados estatisticamente com auxílio do software Graphpad Prism 7 (GraphPad, LaJolla, CA, USA).

A análise de aderência foi realizada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov com intervalo de significância de 5% ($\alpha=0,05$). Observaram-se distribuições não-normais entre os grupos analisados, desta forma, optou-se pela realização de testes não-paramétricos numéricos para analisar as hipóteses experimentais. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5%.

Por se tratarem dos mesmos dentes em diferentes momentos do tratamento endodôntico, as análises intragrupo foram realizadas com teste de Wilcoxon para amostras relacionadas. Já as comparações entre os dois grupos foram realizadas com o teste de Mann-Whitney, para a análise quantitativa de bactérias.

Figura 4.2 – A: Coleta (C1) do campo operatório com cone de papel absorvente. B: Coleta (S1) antes do preparo químico-cirúrgico com lima H. C: Colocação da parte ativa da lima no criotubo com RNAlater. D: Criotubos esterilizados contendo RNA later, já com as partes ativas das limas H e cones de papel absorvente após as coletas

5 RESULTADOS

A tabela 5.1 mostra as medianas das contagens de bactérias das amostras realizadas para os dois grupos experimentais (NAOCL 1% + EndoPTC e NaOCL 2,5%). Pode-se observar também o percentual de redução entre cada momento do tratamento e o valor de p de cada comparação, calculado na análise estatística.

Em ambos os grupos, houve diminuição significativa no número de bactérias entre S1 e S2 ($p < 0,05$). Na comparação entre grupos o grupo NaOCL 2,5% promoveu maior redução microbiana, que o GRUPO NAOCL 1% + EndoPTC, observando-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 5.1 – Medianas e intervalo da quantidade de bactérias em S1 e S2, % de redução bacteriana

Grupos	Amostra Inicial (S1)		Após Instrumentação (S2)		% de redução	p
	N	Mediana (Intervalo)	N	Mediana (Intervalo)		
NAOCL 1% + EndoPTC	11	$3,7 \times 10^5$ ($2,91 \times 10^4 \sim 1,41 \times 10^6$)	11	$5,7 \times 10^4$ ($0 \sim 3,59 \times 10^5$)	84,60	0,0017
NaOCL 2,5%	15	$1,3 \times 10^5$ ($6,89 \times 10^3 \sim 1,32 \times 10^6$)	15	$1,1 \times 10^4$ ($0 \sim 2,09 \times 10^4$)	91,62	0,0003
		0,2645			0,0024	p

6 DISCUSSÃO

Devido à importância da substância química durante o preparo químico-cirúrgico, é desejável relacionar criteriosamente suas propriedades e associações a fim de alcançar êxito na limpeza e desinfecção dos canais radiculares.

Idealmente, estas substâncias devem possuir efetiva atividade antimicrobiana, além de facilitar a ação dos instrumentos, apresentando efeito lubrificante, remover debris, mantendo-os em suspensão, favorecendo sua eliminação, e promover dissolução de matéria orgânica. Sendo assim os procedimentos para a limpeza e desinfecção são extremamente dependentes dos efeitos químicos e mecânicos dos irrigantes (Simi et al; 1999; Siqueira et al; 1999).

As bactérias e seus produtos desempenham papel crucial no desenvolvimento de doenças periapicais (Takehashi et al. 1965, Möller et al. 1981, Sundqvist, 1992), sendo que sua presença no canal radicular DE dentes desvitalizados leva a destruições ósseas periapicais.

Os efeitos mecânicos durante a irrigação são gerados pelo fluxo da solução irrigadora, independente do tipo de irrigante, a população bacteriana é reduzida pelos efeitos mecânicos produzido pela irrigação, afirmam Siqueira et al. (1999).

Com o preparo químico-cirúrgico, além da modelagem, a limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares almeja a eliminação dos microrganismos e neutralização de seus produtos. O ideal é alcançar redução da quantidade de microrganismos a um número compatível com reparação periapical. De fato, devemos ressaltar que as propriedades dos irrigantes para alcançarmos esses objetivos, devem respeitar os princípios biológicos, sem causar danos aos tecidos vivos da região periapical, possuindo baixa toxicidade e mesmo assim, capazes DE combater os microrganismos presentes no canal principal e na intimidade dos túbulos dentinários. (Paiva; Antoniazzi, 1973; Siqueira et al; 2008).

Cabe À substância química auxiliar complementar o desempenho dos modernos instrumentos rotatórios e reciprocantes, visto que sua simplicidade na sequência de preparo, envolvendo poucas mudanças de instrumentos, com menor volume de irrigantes sendo utilizado. Conseqüentemente, o menor tempo de contato do conteúdo do canal e da dentina radicular com a solução irrigadora, sugere que a utilização de associações de fármacos na forma de cremes com atividade

antibacteriana pode ser vantajoso durante a instrumentação. A recomendação dos fabricantes de instrumentos, para uso de cremes durante a instrumentação, está relacionada principalmente a sua ação lubrificante que facilita a ação mecânica dos instrumentos, prevenindo entraves e aumentando sua vida útil.

Apesar das suas propriedades bem definidas, muitos estudos avaliaram atributos das substâncias químicas, principalmente sua atuação sobre os microrganismos *in vitro*, estes estudos não reproduzem precisamente sua performance *in vivo* (Wong et al; 2014). Com isso há necessidade de estudos clínicos randomizados, para que os resultados e observações possam traduzir exatamente a prática clínica.

Neste estudo, avaliamos a redução bacteriana, comparando amostras antes e após o preparo dos canais radiculares, comparando NaOCl 2,5 % e NaOCl 1% + Endo-PTC leve, como substâncias químicas auxiliares durante o PQC.

As amostras coletadas pré e pós preparo, foram analisadas e comparadas, aplicando qPCR, para quantificar a carga bacteriana. O qPCR real time foi escolhido por ser uma ferramenta independente de cultura, fundamental na quantificação da microflora endodôntica (Siqueira; Roças, 2003; 2014). A relevância da avaliação por meio deste método molecular, através de DNA, se justifica por ser uma abordagem, que permite quantificação precisa, na qual inclui em sua contagem espécies bacterianas não cultiváveis. Por outro lado, por ser um ensaio que quantificamos através do DNA bacteriano, obtemos um número, talvez maior do que o esperado, devido a presença do DNA de bactérias viáveis e não viáveis presentes nas amostras (Vianna et al; 2006; Roças et al; 2014).

Em nosso estudo clínico, o percentual de redução bacteriana para os dois grupos experimentais foram 91,62% para o grupo NaOCl 2,5%, e 84,6% do grupo NaOCl 1% + Endo PTC leve.

Em ambos os grupos, obtivemos uma diminuição significativa no número de bactérias, quando comparadas as amostras S1 e S2. Sendo que na comparação entre os grupos, o grupo do NaOCl 2,5% promoveu maior redução bacteriana, do que o NaOCl 1% + Endo PTC.

O hipoclorito de sódio é o irrigante mais comumente empregado no tratamento endodôntico, porém não há um consenso comum a respeito da concentração ideal a ser usada. Sua concentração varia de 0,5% a 5,25%, a qual tem sua atividade antimicrobiana diretamente proporcional a sua concentração. Contudo, sua toxicidade também aumenta de acordo com a concentração. Portanto deve-se considerar o risco

benefício para a escolha da solução irrigadora. É desejável, que esta possua baixa toxicidade e efeitos antimicrobianos adequados (Tanomaru Filho et al, 2002)

Spangberg et al. (1973), mostraram que o NaOCl 5,25% foi considerado mais forte que o necessário para eliminar cepas bacterianas, geralmente encontradas em canais radiculares infectados.

Alguns estudos clínicos não encontraram diferença significativa no efeito antibacteriano quando comparados NaOCl 0,5% e 5%. (Byström; Sundqvist, 1985; Cvek et al; 1976; Siqueira et al; 2000). Outros estudos encontram que a efetividade antibacteriana do NaOCl reduz após sua diluição (Siqueira et al; 1998; Yesilsoy et al; 1995).

Siqueira et al. (2000), comparando três concentrações de NaOCl 1%, 2,5% e 5,25%, não encontram diferença entre as concentrações utilizadas em relação aos efeitos antibacterianos em dentes com raízes infectadas. Os resultados do estudo sugerem que se faça uma frequente e copiosa irrigação com uma solução de menor concentração, para manter a reserva de cloro suficiente para eliminar um número significativo de células bacterianas. Baseando-se neste estudo a necessidade de usar uma concentração muito alta de NaOCl se torna muito questionável.

O hipoclorito de sódio sofre influência de vários fatores, os quais podem alterar suas propriedades, tornando-a mais ou menos efetiva principalmente quanto sua ação de dissolução de tecido orgânico e ação antimicrobiana. Contudo, as soluções de hipoclorito de sódio podem exercer mesmo papel, e obter resultados equivalentes, microbiologicamente, ao se trabalhar com valores de pH determinados e maior tempo de contato. Em pH mais elevado, o hipoclorito de sódio dissolve mais matéria orgânica, próximo a 11, dispensando o emprego de soluções com concentrações elevadas. Sendo assim, utilizando uma solução de hipoclorito de sódio a 1% com pH próximo a 11, atende os requisitos de solução bactericida e solvente de tecido orgânico, sendo bem tolerada pelo tecido conjuntivo (Pashley et al; 1985; Siqueira et al; 2005)

Para eliminar células bacterianas do sistema de canais radiculares o irrigante de atingir, ou alcançá-las. Muitas áreas do sistema de canais radiculares são inacessíveis aos efeitos químicos e mecânicos do preparo, servindo como abrigo para microrganismos, como túbulos dentinários, istmos, ramificações entre outros. Aun (1979), mostra em seu estudo que o uso de instrumentos ao eliminar a dentina contaminada, favorece a ação antimicrobiana nas camadas mais profundas da dentina

pela diminuição da distância entre o microrganismo e a substância química. Além do fato de que a instrumentação aumenta o contato entre os microrganismos e a solução irrigadora, tornando sua ação mais rápida e efetiva na destruição microbiana.

Como modo de compensar possíveis efeitos tóxicos, mantendo sua atividade antimicrobiana, optamos pela concentração 2,5%, e para o outro grupo, associamos uma solução de NaOCl 1%, de menor concentração, com um gel lubrificante com propriedades antimicrobianas, assim intencionados a utilizar uma menor concentração sendo menos tóxico aos tecidos, mas ao mesmo tempo associado a outra substância para otimizar e potencializar os efeitos, compensando a menor concentração do NaOCl.

O uso do Endo-PTC está indicado quando do emprego de instrumentação manual ou mecanizada, sendo utilizado durante a utilização do instrumento. Instituído por Paiva e Antoniazzi (1973), teve sua formulação original alterada, substituindo-se o Carbowax com peso molecular 1200, por outro mais leve 400 pm.

Esta modificação diminui consideravelmente a viscosidade do Endo-PTC tradicional, aumentando sua capacidade de escoamento, sem modificar suas propriedades lubrificante, antimicrobiana e seu efeito sobre a permeabilidade dentinária.

O Endo-PTC original é neutralizado pelo líquido de Dakin, o leve e na forma de de gel, devem ser empregados em associação com hipoclorito de sódio 1%, mostrando grande liberação de oxigênio molecular singlete. Em um processo de efervescência, que por ação mecânica, elimina do canal radicular para o meio exterior remanescente de dentina, substâncias orgânicas, bactérias e outros produtos tóxicos que foram excisados pelos instrumentos.

Os componentes do Endo-PTC possuem funções bem específicas, o veículo vai funcionar como o transporte das substâncias além controlar a liberação e durabilidade das reações, tornando viável a associação das substâncias; o Tween 80, detergente, o qual diminui a tensão superficial e facilita a penetração das substâncias nos túbulos dentinários, umectante e emulsionante, adsorvendo a gordura e mantendo-a em suspensão, o peróxido de uréia é um agente antimicrobiano, e quando reage com o hipoclorito libera o oxigênio nascente e um composto de cloro ativo, efetivo no combate aos microrganismos comumente encontrados no canal radicular. (Paiva; Antoniazzi, 1973; Carvalho et al; 2005).

A efetividade do Endo-PTC é comprovada por muitos estudos *in vitro*, que avaliam sua atividade antimicrobiana, aumento da permeabilidade dentinária, limpeza das predes dentinárias, remoção de smear layer, qualidade do preparo (Batista et al; 1977; Robazza et al; 1981; Oliveira-Filho et al; 1988; Prokopowitsch, 1988; Prokopowitsch et al; 1989; Pesce et al; 1997; Amorin et al; 2001; Carvalho et al; 2005).

Muitos trabalhos (Holland et al. 1990; Carvalho et al. 1999; Nery 2000, Ferreira et al. 2003; Rodrigues et al. 2015) questionam a limitação do Endo-PTC na remoção do magma dentinário ou smear layer, além da formação de detritos promovida pelo uso do creme principalmente na região apical. Acreditam que a utilização de substâncias químicas auxiliares de consistência cremosa no preparo do sistema de canais radiculares, aumentam a condensação de debris, principalmente na região apical, dificultando sua remoção (Santos, 2000). Ferreira et al. (2003), Carvalho et al. (2005), observaram em seus resultados que o emprego do Endo-PTC gel foi tão eficiente quanto o creme, no aumento da permeabilidade dentinária. Na qual a alteração do veículo do Endo-PTC não alterou as propriedades testadas.

Porém há necessidade de testar suas ações *in vivo*, o que nos despertou a escolha para a utilização do Endo-PTC leve. Uma vez que o Endo-PTC tradicional usado com hipoclorito de sódio é uma substância química muito utilizada nas faculdades brasileiras (Albergaria, 1988/1989).

No presente estudo foi utilizado o Endo-PTC leve, o qual apresenta maior facilidade de manipulação em relação ao creme, diminuindo tempo clínico, facilitando sua introdução no interior do canal radicular.

Pelos resultados obtidos em nosso estudo clínico, sendo o grupo do Endo – PTC com menor redução bacteriana, podemos interpretá-los avaliando a concentração do NaOCl que foi menor do que do grupo no qual foi utilizado a irrigação convencional com 2,5%, tendo maior tempo de contato no interior do canal radicular, tanto durante a irrigação, como a sua presença durante a instrumentação.

Em relação ao veículo do Endo-PTC utilizado, dificulta a eliminação do DNA bacteriano do interior dos canais radiculares, além da sua consistência de gel, que dificulta sua lavagem das paredes dentinárias, o Endo-PTC (tradicional, leve ou gel) associado somente ao hipoclorito de sódio não tem capacidade de promover uma boa remoção de smear-layer, havendo a necessidade do uso de uma substância quelante associada, no caso EDTA (Zehnder, 2006; Yamazaki et al; 2010; Rodrigues et al; 2015). Esta, formada durante a instrumentação, composta por dentina excisada,

matéria orgânica e microrganismos que aderem nas parede do canal radicular (Sen et al; 1995). Sendo assim, o veículo utilizado pode ter favorecido a permanência do DNA bacteriano presente ainda nas amostras S2, dificultando sua remoção.

Sob as condições desta pesquisa clínica, mostra-se necessária uma análise das amostras através de RNA, para assim obter resultados mais precisos, quantificando apenas bactérias viáveis presentes no sistema de canais radiculares.

7 CONCLUSÕES

Considerando os resultados de redução bacteriana pós preparo químico-cirúrgico em canais radiculares de dentes com periodontite apical, pode-se concluir que:

- Ambos os regimes de irrigação promoveram redução bacteriana significativa entre as amostras S1 e S2;
- O Endo-PTC leve associado ao hipoclorito a 1% foi menos eficiente na redução bacteriana do que NaOCl 2,5%.

REFERÊNCIAS¹

Albergaria S. Substâncias químicas auxiliares da instrumentação dos canais radiculares utilizadas nas universidades brasileiras. Rev Fac Odontol Univ Fed Bahia. 1988/1989 jan-dez; 8(9):1-13.

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

Amorin CVG, Lage-Marques JL. Análise comparativa da permeabilidade dentinária após o preparo do canal variando as substâncias químicas. In: Anais da 18a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica; 2001; Águas de Lindóia. São Paulo: SBPqO; 2001. p. 75.

Antoniuzzi JH. Análise in vitro da atividade antimicrobiana de algumas substâncias auxiliares da instrumentação no preparo químico-mecânico de canais radiculares de dentes humanos [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 1973

Auerbach MB. Antibiotics vs instrumentation in endodontics. N Y St Dent. J.1953; 19(5):225-8.

Aun CE, Paiva JG. Viabilidade da velocidade da ação germicida do hipoclorito de sódio em função da concentração. Rev Assoc Paul Cir Dent 1982;36(5):510-9.

Aun CE. Possíveis variações do efeito antimicrobiano de uma solução de hipoclorito de sódio em função da concentração, tempo de contacto e da experimentação com e sem o uso de instrumentos endodônticos. (Contribuição ao estudo) [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 1979.

Aun CE, Paiva JG, Antoniuzzi JH. Avaliação através da microscopia eletrônica de varredura, da limpeza da prede do canal radicular (terço apical), após o preparo químico-mecânico tendo como fonte de o tipo e o numero de de uso de instrumentos. Rev Assoc Paul Cir Dent 1990; 44 (1)1:13-7.

Baker NA, Eleazer PD, Averbach RE, Seltzer S. Scanning electron microscopic study of the efficacy of various irrigating solutions. J Endod. 1975 Apr;1(4):127-35.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Barbin EL. Estudo in vitro do efeito da adição de lauril dietilenoglicol éter sulfato de sódio nas soluções de hipoclorito de sódio sobre suas propriedades físico-químicas anteriores e posteriores à dissolução do tecido pulpar bovino. 108p. [Dissertação] Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, 1999.

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

Batista A, Pesce HF, Bombana AC, Sydney GB. Análise com auxílio da microscopia eletrônica de varredura da limpeza das paredes do canal radicular (terço apical), frente a algumas soluções irrigadoras. *Rev Bras Odontol*. 1977;2(54):111-5.

Baumgartner JC, Cuenin PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *J Endod*. 1992 Dec;18(12):605-12.

Baumgartner JC, Mader CL. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. *J Endod*. 1987 Apr;13(4):147-57.

Berutti E, Marini R, Angeretti A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *J Endod*. 1997 Dec;23(12):725-7.

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.

Buck R, Eleazer PD, Staat RH. In vitro disinfection of dentinal tubules by various endodontics irrigants. *J Endod*. 1999 Dec;25(12):786-8.

Busquim S, Cunha RS, Freire L, Gavini G, Machado ME, Santos M. A micro-computed tomography evaluation of long-oval canal preparation using reciprocating or rotary systems. *Int Endod J*. 2015 Oct;48(10):1001-6. doi: 10.1111/iej.12398. Epub 2014 Nov 12.

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.

Cardoso LN, Prokopowitsch I. Avaliação da permeabilidade dentinária, após instrumentação rotatória variando-se as substâncias químicas auxiliares. *Braz Oral Res.* 2004;18:122.

Carvalho EMOF, Robazza CRC, Lage-Marques JL, Mello I. Análise da superfície dentinária, por meio de microscopia eletrônica, após condicionamento ácido. *Rev Bras Odontol.* 1999 maio-jun; 56(3):108-11.

Carvalho GI, Habitante SM, Lage-Marques JL. Análise da alteração da permeabilidade dentinária promovida pela substância Endo-PTC empregando diferentes veículos. *Cienc Odontol Bras* 2005 out-dez.;8(4):23-8.

Chavez de Paz LE, Dahlen G, Molander A, Moller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J* 2003;36:500 – 8.

Cobe HM. Investigations of a new dental chemotherapeutic agent in the presence of blood. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1960 Jun;13: 678-85.

Cruz A, Vera J, Gascón G, Palafox-Sánchez CA, Amezcua O, Mercado G. Debris remaining in the apical third of root canals after chemomechanical preparation by using sodium hypochlorite and glyde: an in vivo study. *J Endod.* 2014 Sep; 40(9):1419-23. doi: 10.1016/j.joen.2014.05.013.

Cvek M, Nord CE, Hollender L. Antimicrobial effect of root canal débridement in teeth with immature root. A clinical and microbiologic study. *Odontol Revy.* 1976; 27(1):1-10.

Dakin HD. On the use of certain antiseptic substances in the treatment of infected wounds. *Br Med J.* 1915 Aug 28;2(2852):318-20.

Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002;13(2):113-7.

Ferreira MB, Carvalho EMOF, Lage-Marques JLS. Avaliação da permeabilidade dentinária dos canais radiculares utilizando gel e creme Endo-PTC como substâncias químicas auxiliares. *Rev Odontol Univ São Paulo.* 2005; 12(1): 32-7.

Ferreira MB, Carvalho EMOF, Carvalho BCF, Leite RCSR, Robazza CRC, Lage-Marques JL. Avaliação da limpeza dos canais radiculares utilizando creme e gel Endo PTC como substância química auxiliar. In: *Anais da 20a reunião Anual da Sociedade*

Brasileira de Pesquisa Odontológica; 2003; Águas de Lindóia. São Paulo: SBPqO; 2003. p 38.

Freire LG, Iglecias EF, Cunha RS, dos Santos M, Gavini G. Micro computed tomographic evaluation of hard tissue debris removal after different irrigation methods and its influence on the filling of curved canals. J Endod. 2015 Oct; 41(10): 1660-6.

Gavini G. Análise in vitro da limpeza do terço apical do canal radicular, quanto à remoção do magma dentinário, à luz da microscopia eletrônica de varredura, tendo como fonte de variação o regime de irrigação e as soluções irrigantes [Tese]. São Paulo, Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 1994.

Gavini G. Avaliação in vitro da limpeza da parede do canal radicular (terço apical), após o preparo químico-mecânico, valendo-se da microscopia eletrônica de varredura, tendo como fonte de variação a solução irrigadora e seu volume [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 1992.

Gavini G, Aun CE, Akisue E. Influência da camada residual de magma no selamento apical de dentes obturados com cones de guta-percha e cimento de N-Rickert. RPG R. Pos-Grad 1996 São Paulo, 3 (3):155-158.

Gavini G, Aun CE, Pesce HF. Análise das condições de limpeza do terço apical do canal radicular após o preparo químico-mecânico. R. Odontol. Univ. São Paulo, 1994 Bauru, v. 8, n. 3, p. 155-162.

Goldman M, Goldman LB, Cavaleri R, Bogis J, Lin PS. The efficacy of several endodontic irrigating solutions: a scanning electron microscopic study: Part 2. J Endod. 1982 Nov;8(11):487-92.

Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. Enterococcus faecalis in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006 Aug; 102(2):247-53.

Grandini S, Balleri P, Ferrari M. Evaluation of glyde file prep in combination with sodium hypochlorite as a root canal irrigant. J Endod. 2002 Apr;28(4):300-3.

Grossman LI. Irrigation of root canals. J Amer Dent Assoc. 1943;30(23):1915-17.

Grossman LI & Meiman BW. Solution of the pulp tissue by chemical agents. J Amer Dent Ass. 1941;28:223-5.

Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil JM. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endodontic Topics*, 2005 Hoboken, v.10, p.77-102.

Heling I, Irani E, Karni S, Steinberg D. In vitro antimicrobial effect of RC-Prep within dentinal tubules. *J Endod*. 1999 Dec; 25(12):782-5.

Holland R, Nery MJ, Rabello FJGD, Souza V, Bernabé PFE, Mello W, Otoboni Filho JA. Presença de detritos na região apical de cães após o preparo biomecânico com ou sem o emprego de substância auxiliar cremosa. *Rev Odontol Unesp*. 1990, jan-fev;19(1):105-12.

Iglecias EF. Avaliação qualitativa e quantitativa da instrumentação e obturação de canais radiculares achatados utilizando-se microtomografia computadorizada [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014.

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.

Lim TS, Wee TY, Choi MY, Koh WC, Sae-Lim V. Light and scanning electron microscopic evaluation of Glyde File Prep in smear layer removal. *Int Endod J*. 2003 May;36(5):336-43.

Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(2):171-83.

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

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

Möller AJR, Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 1981 Dec; 89(6): 475-84.

Monteiro PG, Bombana A, Santos, M, Zaragoza RA. Análise da limpeza dentinária em canais radiculares preparados com um sistema rotatório e diferentes substâncias químicas. RGO, 2008, v. 56, n.1, p. 7-15.

Moura AAM, Robazza CRC, Paiva JG. A relação entre a permeabilidade dentinária e o uso de Endo-PTC no preparo do canal, estudo in vivo e in vitro. Rev. Assoc Paul Cirur Dent. 1978 jan-fev;32(1):37-46.

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

Nery MJ. Tratamento de dentes com lesões periapicais crônicas: influência de algumas substâncias utilizadas no preparo biomecânico de canais radiculares obturados com o cimento Sealapex [Tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia; 2000.

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. Epub 2013 Jul 6.

Nygaard-Östby B. Chelation in root canal therapy. Odontologisk Tidskrift. 1957; 65(2):3-11.

Oliveira-Filho AO, Bombana AC, Jaeger RG, Araújo NS. Efeitos da limpeza do canal radicular frente ao uso de substâncias químicas auxiliares . In: Anais da 5a reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica; 1988; Águas de Lindóia. São Paulo: SBPqO.

Paiva JG, Antoniazzi JH. O uso de uma associação de peróxido de uréia e detergente (Tween 80) no reparo químico-mecânico dos canais radiculares. Rev Assoc Paul Cir Dent 1973;27(7):416- 23. 9.

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.

Paqué F, Al-Jadaa A, Kfir A. Hard-tissue debris accumulation created by conventional rotary versus self-adjusting file instrumentation in mesial root canal systems of mandibular molars. *Int Endod J*. 2012 May;45(5):413-8. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01991.x.

Paqué F, Ganahl D, Peters OA. Effects of root canal preparation on apical geometry assessed by micro-computed tomography. *J Endod*. 2009 Jul;35(7):1056-9. doi: 10.1016/j.joen.2009.04.020.

Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J Endod*. 1985 Dec;11(12):525-8.

Pesce HF, Medeiros JMF, Bombana AC. Influence of use of endo PTC on the periapical seal of root canal. *Braz Endod J*. 1997 jan-fev;2(1):29-33.

Peters OA. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. *J Endod*. 2004 Aug;30(8):559-67.

Peters OA, Laib A, Göhring TN, Barbakow F. Changes in root canal geometry after preparation assessed by high-resolution computed tomography. *J Endod*. 2001 Jan;27(1):1-6.

Peters OA, Laib A, Rügsegger P, Barbakow F. Three-dimensional analysis of root canal geometry by high-resolution computed tomography. *J Dent Res*. 2000 Jun;79(6):1405-9.

Peters OA, Schönenberger K, Laib A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int Endod J*. 2001 Apr;34(3):221-30.

Polidoro KP, Oliveira EPM, Melo TAF, Borin G. Análise comparativa entre o Endo PTC original e leve como substâncias auxiliares no preparo de canais radiculares pelo método manual e mecanizado. *Rev Odonto*. 2007 jul-dez;15(30).

Prokopowitsch I. Análise in vitro da permeabilidade dentinária radicular do terço apical, tendo como fonte de variação a substância química auxiliar da instrumentação (Contribuição ao estudo). [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 1988.

Prokopowitsch I. Influência do uso de do hidróxido de cálcio como medicação intracanal na permeabilidade e limpeza dentinária radicular em dentes portadores de rizogênese incompleta (Estudo in vitro). [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 1994.

Prokopowitsch I, Moura AAM, Muench A. Análise in vitro da permeabilidade dentinária do terço apical, tendo como fonte de variação a substância química auxiliar da instrumentação. Rev Odontol. Univ São Paulo. 1989 abr./jun.; 3(2):345-53.

Ram Z. Chelation in root canal therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1980;49(1):64-74.

Rico-Romano C, Zubizarreta-Macho Á, Baquero-Artigao MR, Mena-Álvarez J. An analysis in vivo of intracanal bacterial load before and after chemo-mechanical preparation: A comparative analysis of two irrigants and two activation techniques. J Clin Exp Dent. 2016 Feb 1;8(1):e9-e13. doi: 10.4317/jced.52585.

Ricucci D, Bergenholtz G. Bacterial status in root-filled teeth exposed to the oral environment by loss of restoration and fracture or caries-a histobacteriological study of treated cases. Int Endod J. 2003 Nov;36(11):787-802.

Robazza CRC, Paiva JG, Antoniazzi JH. Variações na permeabilidade da dentina radicular quando do emprego de alguns fármacos auxiliares do preparo endodôntico. Contribuição ao estudo. Rev Assoc Paul Cir Dent. 1981;35(6):528-33.

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. Epub 2016 Apr 30.

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

Rodrigues E, Albergaria S, Barbosa GL, Santoro M, Pacheco P, Leal Silva EJ. Effectiveness of different formulations of Endo-PTC to promote root canal cleaning. *Indian J Dent Res.* 2015 Sep-Oct;26(5):520-3. doi: 10.4103/0970-9290.172079.

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.

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.

Santos FLHV. Eficácia na remoção in vitro do creme de Endo-PTC após a irrigação-aspiração final, utilizando espectrofotômetro de massas na detecção de resíduos de carbowax [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2000.

Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. *Dent Clin North Am.* 1974 Apr;18(2):269-96.

Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol.* 1995 Feb;11(1):6-9.

Sen BH, Wesselink PR, Türkün M. The smear layer: a phenomenon in root canal therapy. *Int Endod J.* 1995 May;28(3):141-8.

Silva ARP, Pires MAV, Chavasco JK, Robazza CRC, Carvalho EMOF. Atividade antimicrobiana de substâncias químicas no preparo do sistema de canais radiculares. *JBE;*2004 5(16):40-3.

Simi JJ, Pesce H F, Medeiros JMF. Eficácia de substâncias químicas auxiliares na instrumentação de canais radiculares. *Rev Odontol Univ São Paulo.* 1999;13(2): 153-7.

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

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

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Lopes HP. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002 Feb; 93(2):174-8.

Siqueira JF Jr, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, de Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro. *Int Endod J.* 1997 Jul;30(4):279-82.

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

Siqueira JF Jr, 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.* 2007 Jun;33(6):667-72.

Siqueira JF Jr, Lima KC, Magalhães FA, Lopes HP, de Uzeda M. Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *J Endod.* 1999 May; 25(5):332-5.

Siqueira JrJF, Rôças IN. Present status and future directions in endodontic microbiology. *Endodontic Topics* 2014, 30, 3-22.

Siqueira EL, Santos M, Bombana AC. Dissolução de tecido pulpar bovino por duas substâncias químicas do preparo do canal radicular. *RPG R. Pos-grad.* 2005 São Paulo, 12 (3): 308- 315.

Siqueira JF Jr, Alves FR, Almeida BM, de Oliveira JC, Rôças IN. Ability of chemomechanical preparation with either rotary instruments or self-adjusting file to disinfect oval-shaped root canals. *J Endod.* 2010 Nov;36(11):1860-5. doi: 10.1016/j.joen.2010.08.001.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod*. 2000 Jun; 26(6):331-4.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Riche FN, Provenzano JC. Clinical outcome of the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using an antimicrobial protocol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Nov;106(5):757-62. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.06.007.

Siqueira JF Jr, Araújo MC, Garcia PF, Fraga RC, Dantas CJ. Histological evaluation of the effectiveness of five instrumentation techniques for cleaning the apical third of root canals. *J Endod*. 1997 Aug;23(8):499-502.

Siqueira JF Jr, Lima KC, Magalhães FAC, Lopes HP, Uzeda M. Mechanical reduction of the bacterial cell number inside the root canal by three instrumentation techniques. *J Endodon* 1999;25:332-5.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J Dent*. 2003 Jul;31(5):333-9.

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.

Souza EB, Amorim CVG, Lage-Marques JL. Avaliação de permeabilidade dentinária relacionada à dinâmica de substituição das substâncias químicas auxiliares do preparo dos canais radiculares. *RPG Rev Pós Grad* 2005;12(2):195-8.

Spangberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effects of dental materials. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1973 Dec;36(6):856-71.

Spanó JC, Barbin EL, Santos TC, Guimarães LF, Pécora JD. Solvent action of sodium hypochlorite on bovine pulp and physico-chemical properties of resulting liquid. *Braz Dent J*. 2001;12(3):154-7.

Stewart GG. A scanning electron microscopic study of the cleansing effectiveness of three irrigating modalities on the tubular structure of dentin. *J Endod*. 1998 Jul;24(7):485-6.

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

Stewart GG, Cobe HM, Rappaport H. A study of a new medicament in the chemo-mechanical preparation of infected root canals. *J Am Dent Assoc;* 1961;63:33-7.

Stewart GG, Kapsimalas P, Rappaport H. EDTA and urea peroxide for root canal preparation. *J Am Dent Assoc.* 1969 Feb;78(2):335-8..

Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol.* 1992 Oct;7(5):257-62.

Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LA, Aníbal FF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *Int Endod J.* 2002 Sep;35(9):735-9.

Vance R, Cruz CW, Zöllner NA, Habitante SM. Permeabilidade dentinária após a instrumentação endodôntica. *RGO.*2004 out-dez;53(4):277-80.

Versiani MA, De-Deus G, Vera J, Souza E, Steier L, Pécora JD, Sousa-Neto MD. 3D mapping of the irrigated areas of the root canal space using micro-computed tomography. *Clin Oral Investig.* 2015 May;19(4):859-66. doi: 10.1007/s00784-014-1311-5.

Vertucci FJ. Root canal anatomy of the human permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1984 Nov;58(5):589-99.

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

Walker A. A definitive and dependable therapy for pulpless teeth. *J. Am. Dent. Assoc.* 1936; 23(2): 1418-25.

Walton RE. Histologic evaluation of different methods of enlarging the pulp canal space. *J Endod.* 1976 Oct;2(10):304-11.

Weine FS, Healey HJ, Gerstein H, Evanson L. Canal configuration in the mesiobuccal root of the maxillary first molar and its endodontic significance. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1969 Sep;28(3):419-25.

Wong S, Mundy L, Chandler N, Upritchard J, Purton D, Tompkins G. Antibacterial properties of root canal lubricants: a comparison with commonly used irrigants. *Aust Endod J*. 2014 Dec;40(3):111-5. doi: 10.1111/aej.12075.

Wu MK, Wesselink PR. A primary observation on the preparation and obturation of oval canals. *Int Endod J*. 2001 Mar;34(2):137-41.

Yamazaki AK, Moura-Netto C, Salgado RJ, Kleine BM, Prokopowitsch I. Ex vivo analysis of root canal cleaning using Endo-PTC associated to NaOCl and different irrigant solutions. *Braz Oral Res*. 2010 Jan-Mar;24(1):15-20.

Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endod*. 1995 Oct;21(10):513-5.

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.

Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod*. 2006 May;32(5):389-98.

APÊNDICE A - Tabela dos pacientes do grupo Endo-PTC associado ao hipoclorito de sódio 1%

Paciente	Gênero	Dente (Raiz)	Diâmetro inicial	Diâmetro final (instrumento)
P3	F	22	#20	R50
P5	F	12	#20	R50
P7	M	45	#20	R50
P9	M	31	#20	R40
P11	F	14 (P)	#20	R50
P12	F	22	#20	R50
P15	F	47 (D)	#20	R50
P17	M	46 (D)	#25	R50
P18	F	46 (D)	#20	R50
P19	F	11	#20	R50
P21	F	14 (P)	#20	R40

APÊNDICE B – Procedimentos laboratoriais

1 EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO

- Manter os microtubos contendo as amostras no gelo até o completo descongelamento do meio de transporte
- Homogeneizar cada amostra em agitador de vortex durante 1min a fim de desprender a maior quantidade possível de bactérias na solução
- Centrifugar as amostras em centrífuga refrigerada a 4°C e 13.000RPM por 10min
- Em um tubo tipo Falcon de 15mL estéril, preparar uma mistura de 300µL de Tissue e Cell Lysis (MasterPure DNA purification kit - Epicentre) e 2µL de Proteinase K (Life Technologies Corp), em volume necessário para a quantidade de amostras a ser analisada, com sobra (MIX- 1)
- Remover as amostras da centrífuga e, com auxílio de pipetas de 1000µL, descartar o sobrenadante mantendo o pellet
- Adicionar 300µL do MIX-1 a cada amostra
- Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 10s
- Aquecer as amostras em banho-Maria a 65°C por 15 min, misturando-as em agitador de vortex por 10s a cada 5min
- Esfriar as amostras em gelo por 5min
- Adicionar 150µl de MPC Protein precipitation reagent (MasterPure DNA purification kit - Epicentre) a cada amostra
- Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 10s
- Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 10min
- Transferir o sobrenadante para microtubos de 1,5mL, esterilizados e devidamente identificados, e descartar o microtubo contendo o pellet
- Adicionar mais 25µl de MPC Protein precipitation reagent a cada amostra
- Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 10s
- Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 10min
- Transferir o novo sobrenadante para novos microtubos de 1,5mL, esterilizados e devidamente identificados, e descartar o microtubo contendo o pellet

- Adicionar 500µL de isopropanol 100% a cada microtubo e invertê-los 30/40 vezes
- Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 10min
- Descartar o isopropanol, com pipetas e ponteiras de 1000µL, atentando para não remover o pellet
- Acrescentar 500µL de etanol 70% ao pellet
- Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 10s
- Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 5min
- Retirar parte do etanol 70%, deixando apenas cerca de 50µL no fundo do microtubo
- Centrifugar novamente a 4°C e 13.000RPM por 5min
- Remover totalmente o etanol 70% com ponteiras de 200µL
- Manter os tubos abertos em temperatura ambiente para evaporar o remanescente de etanol
- Adicionar 35µL de TEBuffer (Life Technologies Corp) em cada amostra
- Hidratar as amostras, mantendo-as no gelo ou, preferencialmente, no termomixer (Eppendorf, Hauppauge, NY, EUA) a 40°C por 10 minutos
- Analisar a concentração de ácidos nucleicos no espectrofotômetro (NanoDrop 1000 – Thermo Fisher Scientific).

2 PCR CONVENCIONAL

A reação descrita a seguir foi padronizada para detecção de DNA bacteriano com uso de primers universais específicos para o domínio Bacteria. O volume total de cada reação é de 50µL, sendo o tamanho do produto de amplificação de 1500pb. Os primers utilizados foram baseados no trabalho de Shelburne et al (2000), na concentração de 0,4mM, sendo: Forward: 5'-CCA TGA AGT CGG AAT CGC TAG -3' e Reverse: 5'-GCT TGA CGG GCG GTG T-3'. Para evitar contaminação das amostras de DNA, todos os procedimentos foram realizados em câmaras de fluxo laminar específicos para realização de PCR. Todos os materiais utilizados, com exceção dos tubos contendo as amostras e os

reagentes, foram abertos dentro da câmara e permaneceram em seu interior durante o processo de desinfecção com luz ultravioleta.

- Manter os tubos contendo as amostras em gelo até o completo descongelamento da solução

- Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 15s

- Centrifugar as amostras por 5 segundos em 1200RPM para coletá-las no fundo do microtubo

- Em uma estante resfriada para PCR, posicionar microtubos de 200µL, em número suficiente para a quantidade de amostras, controle positivo e controle negativo da reação, identificando-os devidamente

- Em um microtubo de 1,5mL realizar uma mistura (MIX-2), com volume suficiente para todas as amostras, controles positivo e negativo da reação, dos seguintes reagentes nas respectivas proporções:

- PCR Buffer (Life Technologies Corp).....5µL
- Mg2 para PCR (Life Technologies Corp).....1,5µL
- dNTP de trabalho (2,5mM; Life Technologies Corp)4µL
- Taq polimerase (Life Technologies Corp)0,5µL
- Ultrapure water36µL
- Primer universal Forward (Exxtend, Paulínia, SP, Brasil)1µL
- Primer universal Reverse (Exxtend, Paulínia, SP, Brasil)1µL

- Depositar 49µL do MIX-2 em cada microtubo de 200µL

- Adicionar 1µL de cada amostra no respectivo microtubo

- Adicionar 1µL da amostra de DNA correspondente ao controle positivo no respectivo microtubo

- No tubo a ser utilizado como controle negativo, adicionar 1µL de Ultrapure water.

2.1 AMPLIFICAÇÃO DO DNA EM TERMOCICLADOR

- Homogeneizar as soluções nos tubos para PCR em mini-centrífuga por 2s

- Posicionar as microtubos no termociclador (T-100 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA) e programar a corrida conforme descrito:

- Etapa de denaturação – 95oC por 2 min
- 36 ciclos de C95oC por 30s, 60oC por 1min, e 72oC por 1min
- Extensão final a 72oC por 10min

2.2 ELETROFORE EM GEL DE AGAROSE

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

- Ligar o aparelho, ajustando a voltagem em 80V e 200mA e o timer em 40 minutos. Após a corrida, proceder com a leitura e documentação fotográfica do gel em luz ultravioleta.

3 PCR EM TEMPO REAL

Para evitar contaminação das amostras de DNA, todos os procedimentos devem ser realizados em câmaras de fluxo laminar específicos para realização de PCR. Todos os materiais utilizados, com exceção dos tubos contendo as amostras e os reagentes, deverão ser abertos dentro da câmara e permanecer em seu interior durante o processo de desinfecção com luz ultravioleta. Os procedimentos devem ser realizados com luvas sem talco para não comprometer a reação. Devem ser utilizadas apenas ponteiros com filtro, adquiridas em racks esterilizados e livres de DNases e RNases, assim como os microtubos.

3.1 PREPARO DA CURVA PADRÃO

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

3.2 PREPARO DA REAÇÃO

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

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

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

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

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

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

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

Pesquisador: Vitor Cesar Nakamura

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 13396213.1.0000.0075

Instituição Proponente: FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENTO CIENT E TEC ODONTOLOGIA

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 428.730

Data da Relatoria: 18/10/2013

Apresentação do Projeto:

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

Objetivo da Pesquisa:

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Recomendações:

Nenhuma

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 428.730

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 18 de Outubro de 2013

Assinador por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

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

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Estudo: ANÁLISE *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ENDO-PTC LEVE ASSOCIADO AO HIPOCLORITO DE SÓDIO 1%

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Giulio Gavini

Equipe de Pesquisa: Profa. Dra. Ericka T. Pinheiro, Prof. Ms. Vitor C. Nakamura

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

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

Local de coletas de dados: Clínica Odontológica da FOU SP.

O objetivo desta pesquisa é comparar duas substâncias de irrigação quanto a diminuição de bactérias do canal radicular. Para isso serão tratados dentes que apresentam infecção do canal radicular. Durante o tratamento, será utilizada uma das seguintes técnicas de irrigação do canal radicular: 1 – será utilizada uma seringa plástica descartável e pontas metálicas para irrigar com hipoclorito de sódio 2,5% para irrigar o canal; 2 – também será utilizada uma seringa plástica descartável e pontas metálicas, com hipoclorito de sódio 1% + gel de Endo – PTC leve, durante a instrumentação do canal radicular.

É importante ressaltar que estas substâncias, já se mostraram eficientes na redução de bactérias do canal radicular em estudos já realizados, e são rotineiramente utilizados em consultórios odontológicos para o tratamento de canal. Durante o tratamento, o pesquisador irá coletar amostras do conteúdo do canal. Ao término da primeira sessão do tratamento, o pesquisador irá colocar uma medicação de hidróxido de cálcio no interior do canal para aumentar a desinfecção proporcionada. Depois de duas semanas, o tratamento endodôntico será concluído e o dente restaurado. Caso necessário, o paciente será encaminhado para outras disciplinas para que possam ser realizados outros tratamentos. O tratamento será feito com anestesia para conforto do paciente, e serão realizadas apenas as radiografias necessárias para a realização do tratamento.

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

Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária, São Paulo, SP – 05508-000 – Fone (11)3091-7960). Após ler estas informações e de ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelo pesquisador, concordo em participar de forma voluntária neste estudo.

Nome: _____

Endereço: _____

RG: _____ Tel: _____

São Paulo, ____ de _____ de 20 ____.

Paciente

Pesquisador