

FACULDADE SETE LAGOAS

FERNANDA PINHEIRO BRUNO

**Prevalência e natureza de bactérias após os procedimentos endodônticos de
desinfecção reveladas por estudos moleculares: revisão de literatura**

Osasco

2018

FERNANDA PINHEIRO BRUNO

**Prevalência e natureza de bactérias após os procedimentos endodônticos de
desinfecção reveladas por estudos moleculares: Revisão de literatura**

Monografia apresentada à Associação Brasileira de Odontologia, regional Osasco, para obtenção do título de Especialista.

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Profa. Dra. Laila Gonzales Freire Gusukuma

Osasco

2018

Bruno FP.

Prevalência e natureza de bactérias após os procedimentos endodônticos de desinfecção reveladas por estudos moleculares: Revisão de literatura - 2018. 36 f.

Orientadora: Profa. Dra. Laila Gonzales Freire Gusukuma
Monografia (especialização) - Faculdade Sete Lagoas, 2018.

1. Bactérias 2. Prevalência 3. Estudos moleculares

I. Título. II. Laila Gonzales Freire Gusukuma

Banca Examinadora

Prof(a). Laila Gonzales Freire Gusukuma Instituição: ABO-Osasco

Julgamento: Aprovada Assinatura: _____

Prof(a). Leonardo Medina Poveda Instituição: ABO-Osasco

Julgamento: Aprovada Assinatura: _____

Aprovada em: 5 de Abril de 2018

Dedico esse trabalho primeiramente à Deus, porque sem ele nada disso seria possível. Ele confiou a mim a missão de cumprir mais essa tarefa e graças ao teu amor e misericórdia e a concluí.

Dedico também aos meus pais Suely Bruno e Romeu Bruno e aos meus irmãos Charles Bruno e Thiago Bruno por acreditarem no meu sonho e por sonharem ele comigo, amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Deus que é a minha força motriz é a quem eu mais devo ser grata por todas as bênçãos e lutas que vivi durante esse processo. Sem dúvida alguma hoje sinto-me mais madura porque Deus esteve comigo em todos esses momentos. Agradeço aos meus pais que colaboraram e se desdoblaram para me ajudar desde o deslocamento para o curso até por ouvirem minhas aulas, mesmo não entendendo nada do que eu estava falando, e claro não posso deixar de ser grata por toda a paciência comigo nesse processo que passamos juntos, foi um período de muita luta, mas Deus nos deu a vitória. Agradeço ao meu companheiro João Paulo por toda serenidade nos momentos difíceis que vivemos durante este processo, obrigada, pois esteve ao meu lado com olhar de calma fazendo me perceber que não adiantava desesperar e sim erguer a cabeça e continuar em frente. Agradeço aos meus amigos Ezequias Rodrigues e Mariana Reis que me apoiaram cada um ao seu modo e se hoje sou uma profissional melhor devo em partes isso também a vocês. Agradeço à minha tia Marly que me deu força e me motivou a sempre buscar algo além do que os meus olhos pudessem ver. Agradeço à minha amiga e sogra Vanda Ribeiro por todo direcionamento e ensinamento com palavras e atitudes que me fizeram voltar para o caminho da perseverança. Aos colegas de curso e professores deixo o meu muito obrigada por toda a ajuda, pelas palavras ditas e por aquelas não ditas verbalmente, mas igualmente importantes por terem sido expressadas com abraços, olhares e atitudes, Deus abençoe a cada um de vocês.

"Porque onde está o teu tesouro, aí estará também o teu coração"

Mateus 6.21

RESUMO

Bruno FP. **Prevalência e natureza de bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção reveladas por estudos moleculares**: revisão de literatura. 2018. 34 f. Monografia (Especialização) - Associação Brasileira de Odontologia, Faculdade Sete Lagoas, Osasco, 2018.

O objetivo do tratamento endodôntico de dentes com periodontite apical é promover a máxima sanificação do sistema de canais radiculares. Entretanto, bactérias podem persistir após os procedimentos endodônticos. O advento das técnicas moleculares de detecção e identificação bacteriana, baseada em DNA ou RNA bacteriano, proporcionou um maior conhecimento da diversidade microbiológica das infecções endodônticas persistentes. O número de estudos clínicos que utilizaram métodos moleculares para avaliar a suscetibilidade de bactérias aos procedimentos endodônticos aumentou consideravelmente nos últimos 10 anos. O objetivo desta revisão de literatura foi avaliar a prevalência e a natureza de bactérias após os procedimentos endodônticos de desinfecção revelada pelos estudos moleculares. Foram analisados estudos clínicos que utilizaram métodos moleculares para avaliação de bactérias presentes após diferentes protocolos de desinfecção, incluindo: uso de diversos instrumentos mecanizados e substâncias irrigantes, protocolos de desinfecção endodôntica complementar transoperatória e medicação intracanal. Estudos clínicos revelaram que o preparo químico-cirúrgico foi eficiente em promover a redução de bactérias dos canais radiculares, porém mais de 50% dos canais radiculares permaneceram infectados. A pesquisa da eficácia de protocolos de desinfecção endodôntica complementar transoperatória, como a irrigação ultrassônica passiva, ainda está no seu início e estudos clínicos utilizando métodos moleculares apresentaram resultados promissores. Os estudos moleculares que avaliaram a eficácia da medicação intracanal em promover redução de micro-organismos dos canais radiculares revelaram resultados divergentes. *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria* foram os filos bacterianos mais comumente encontrados após instrumentação e medicação de canais radiculares analisados por métodos moleculares, confirmando achados prévios dos métodos de cultura. Entre as bactérias ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo, os filos *Synergistetes* e *Bacteroidetes* foram os mais frequentemente encontrados após os

procedimentos endodônticos de desinfecção. Com base na revisão de literatura realizada, pode-se concluir que, embora o preparo químico-mecânico reduza os níveis microbianos do SCR, muitos casos permanecem infectados, abrigando uma microbiota diversa com a participação de bactérias ainda não cultiváveis ou de difícil cultivo. Os resultados desse estudo indicam que novas estratégias de desinfecção endodôntica precisam ser investigadas.

Palavras-chave: Microbiota de infecção endodôntica primária. Microbiota de infecção persistente. qPCR. Métodos de redução bacteriana.

ABSTRACT

Bruno FP. **Prevalence and nature of persistent bacteria after endodontic disinfection procedures revealed by molecular studies:** literature review. 2018. 34 f. Monografia (Especialização) - Associação Brasileira de Odontologia, Faculdade Sete Lagoas, Osasco, 2018.

The goal of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis is to promote maximum sanification of the root canal system. However, bacteria may persist after endodontic procedures. The advent of molecular bacterial detection and identification techniques, based on bacterial DNA or RNA, provided a better knowledge of the microbiological diversity of persistent endodontic infections. The number of clinical trials that used molecular methods to assess the susceptibility of bacteria to endodontic procedures has increased considerably over the last 10 years. The aim of this literature review by molecular studies was to evaluate the prevalence and nature of bacteria after endodontic disinfection procedures. We analysed clinical studies that used molecular methods to evaluate presence of bacteria after different disinfection protocols, including: the use of several mechanized instruments and irrigating substances, endodontic protocols for complementary disinfection and intracanal medication. Clinical studies revealed that the chemical-surgical preparation was efficient in promoting the reduction of root canal bacteria, but more than 50% of the root canals remained infected. Research on the efficacy of transoperative endodontic complementary disinfection protocols, such as passive ultrasonic irrigation, is still in its beginning and clinical studies using molecular methods have shown promising results. Molecular studies that evaluated the efficacy of intracanal medication in promoting reduction of root canal microorganisms revealed divergent results. Firmicutes, Proteobacteria and Actinobacteria were the bacterial phyla most commonly found after instrumentation and root canal medication analysed by molecular methods, confirming previous findings of the culture methods. Among the bacteria that are not yet cultivable or difficult to culture, the phyla Synergistetes and Bacteroidetes were the most frequently found after the endodontic disinfection procedures. Based on the literature review, it can be concluded that, although the chemical-mechanical preparation reduces the microbial levels of SCR, many cases remain infected, harbouring a diverse microbiota with the participation of bacteria that

are not yet cultivable or difficult to culture. The results of this study indicate that new endodontic disinfection strategies need to be investigated. Key words: Microbiota of primary endodontic infection. Microbiota of persistent infection. qPCR. Methods of bacterial reduction.

Key words: Microbiota of primary endodontic infection. Microbiota of persistent infection. qPCR. Methods of bacterial reduction.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	PROPOSIÇÃO	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Diversidade microbiana	16
3.2	Redução microbiana após procedimentos endodônticos	18
4	DISCUSSÃO	24
5	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	30
	BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	35

1 INTRODUÇÃO

O objetivo do tratamento endodôntico de dentes com polpa necrosada é reduzir o máximo possível os micro-organismos do sistema de canais radiculares (SCR), tendo em vista que estes são os agentes etiológicos da periodontite apical. As bactérias estão presentes na forma de biofilme aderido às paredes dos canais radiculares e no interior dos túbulos dentinários. Portanto, para promover a redução bacteriana é necessário desorganizar essa estrutura por meios mecânicos, deixando as bactérias mais vulneráveis à ação química das soluções irrigadoras e medicações utilizadas durante os procedimentos endodônticos.

Estudos clínicos mostram que, embora o preparo químico-mecânico (PQM) reduza os níveis microbianos do SCR, muitos casos permanecem infectados. A infecção persistente após os procedimentos endodônticos pode culminar no insucesso do tratamento se essas bactérias alcançarem os tecidos periapicais em concentrações suficientes para induzir o processo inflamatório desses tecidos.

Estudos utilizando métodos dependentes de cultura demonstram que as bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas são as mais prevalentes após os procedimentos de modelagem, limpeza e desinfecção do SCR. *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria* são os filos bacterianos mais comumente encontrados nesses casos, demonstrando que estes são mais resistentes a mudanças de ambiente ocasionadas pelo PQM e medicação intracanal do que os outros membros da comunidade microbiana. Especificamente, algumas das espécies bacterianas mais encontradas após instrumentação e medicação de canais radiculares são *Streptococcus spp.* e *Propionibacterium acnes*.

Embora o método de identificação bacteriana por cultura tenha como vantagem a possibilidade de identificar espécies viáveis, essa técnica possui limitações importantes como a baixa especificidade e a impossibilidade de cultivar grande número de espécies bacterianas. Conhecendo as limitações do método de cultura, métodos moleculares independentes de cultura foram propostos para determinação da diversidade microbiana em infecções endodônticas. Esses métodos possibilitaram um aumento no número de filos bacterianos reconhecidos nas infecções endodônticas devido a sua maior especificidade, sensibilidade e acurácia na identificação microbiana. Esses métodos permitem a detecção de espécies microbianas não cultiváveis em um período de tempo inferior ao método de cultura.

Para identificação bacteriana por métodos moleculares, o gene alvo deve conter regiões únicas para cada espécie bacteriana. O alvo mais utilizado para esse fim é o gene 16rRNA (rDNA). Esses genes codificam moléculas de RNA ribossômico (rRNA). Considerando que cada bactéria possui poucas cópias do gene 16S rRNA, os dados da sequência desse gene podem ser usados tanto para identificação quanto para quantificação bacteriana. Entretanto, vale ressaltar, que os estudos moleculares baseados em rDNA também apresentam uma limitação, que é a não distinção entre as células vivas e mortas. Esse fato pode comprometer a avaliação dos procedimentos de desinfecção, levando a uma superestimação da quantidade de bactérias persistentes após o tratamento. Para solucionar esse problema, métodos moleculares baseados na detecção do próprio RNA ribossômico (rRNA) têm sido indicados para o estudo das infecções endodônticas, por ser este um indicador de atividade metabólica dos micro-organismos. Portanto, rDNA e rRNA são primordiais para os estudos moleculares, pois com a primeira molécula é possível fazer análise quantitativa e com a segunda é possível fazer análise da viabilidade celular.

Siqueira Jr e Rôças (2009) realizaram uma revisão de literatura dos estudos sobre a diversidade microbiana das infecções endodônticas, incluindo estudos moleculares e estudos baseados em cultura. Os autores mostraram que mais de 460 táxons (unidades em qualquer nível do sistema de classificação das bactérias) pertencentes a 100 gêneros e 9 filos bacterianos foram identificados em diferentes tipos de infecções endodônticas. Mais táxons foram divulgados por estudos moleculares do que pela cultura. Muitos táxons ainda não cultivados emergiram como candidatos. Os filos com maior riqueza de espécies foram *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*. Os autores concluíram que os estudos moleculares revelaram uma lista de candidatos a patógenos endodônticos, incluindo bactérias ainda não cultiváveis.

Na revisão de literatura realizada por Siqueira Jr e Rôças (2009), todos os estudos moleculares eram baseados em rDNA e a maioria realizava a análise apenas da composição da microbiota inicial presente nas infecções endodônticas primárias. Poucos estudos moleculares avaliaram a susceptibilidade dessas bactérias aos procedimentos do tratamento endodôntico. O número de estudos clínicos que utilizaram métodos moleculares para avaliar a suscetibilidade de bactérias aos procedimentos endodônticos aumentou consideravelmente nos últimos

10 anos. Portanto, o objetivo desta revisão de literatura foi avaliar a prevalência e a natureza de bactérias após os procedimentos endodônticos de desinfecção revelada pelos estudos moleculares.

2 PROPOSIÇÃO

Para o presente estudo foi proposto revisar dentro da literatura disponível a susceptibilidade de bactérias ao tratamento endodôntico de dentes com infecções endodônticas primárias determinada por estudos moleculares baseados em rRNA e rDNA.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Diversidade microbiana

Chávez de Paz (2012) verificou em estudo que tinha como objetivo investigar a capacidade de 4 tipos bacterianos do canal radicular estabelecer um biofilme multiespecífico e caracterizar a estrutura principal, composição e características fisiológicas desta comunidade. Foram utilizados quatro isolados clínicos retirados de canais radiculares infectados. *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus gordonii*, e *Enterococcus faecalis*, cresceram juntos em um sistema celular miniflow. Detecção simultânea das 4 espécies nas comunidades de biofilmes foram obtidas por fluorescência hibridização in situ em combinação com microscopia confocal em diferentes pontos de tempo. A técnica LIVE / DEAD BacLight (Molecular Probes, Carlsbad, CA) foi utilizada para avaliar a viabilidade celular e para calcular parâmetros arquitetônicos tridimensionais, como biovolume (mm³). Tinta de fluorescência Redox 5-ciano-2,3-ditolil tetrazolium cloreto foi utilizada para avaliar a atividade metabólica de bactérias de biofilme. Como resultados as 4 espécies testadas foram capazes de formar comunidades de biofilmes estáveis e reprodutíveis. Os biofilmes formados em meio rico geralmente mostraram crescimento contínuo ao longo do tempo, no entanto, na ausência de biofilmes de glicose apresentaram bio volumes significativamente menores. Uma proporção elevada de células viáveis (> 90%) foi geralmente observada e o crescimento do biofilme foi correlacionado com alta atividade metabólica das células. A estrutura da comunidade dos biofilmes formados em meio rico não mudou consideravelmente ao longo do período de 120 horas, durante o qual *E. Faecalis*, *L. salivarius* e *S. gordonii* foram mais abundantes. Os autores concluíram que a capacidade de 4 tipos de bactérias de canais radiculares para formar comunidades de biofilme multiespécies mostradas no estudo forneceu uma avaliação da comunidade sobre o estilo de vida desses microrganismos in vivo. Este modelo multiespécie poderia ser útil para pesquisas futuras simulando estresses representando condições in vivo.

Gomes et al. (2015) avaliaram o microbioma de lesões endo-perio antes e após o preparo químico-cirúrgico. Foram obtidas amostras clínicas de 15 canais radiculares com necrose pulpar e bolsas periodontais. Para a detecção bacteriana utilizou-se Next Generation Sequencing (NGS) e cultura. Bactérias foram detectadas

em 100% das amostras em ambos os sítios usando Next Generation Sequencing(NGS). *Firmicutes* foi o filo mais dominante em ambos os sítios usando os dois métodos. As espécies mais detectadas nos canais antes e após PQC foram *Enterococcus faecalis*, *Parvimonas micra*, *Mogibacterium timidum*, *Filifactor alocis*, e *Fretibacterium fastidiosum*. As espécies bacterianas frequentemente detectadas nas bolsas periodontais antes e após PQC usando NGS foram *P. micra*, *E. faecalis*, *Streptococcus constellatus*, *Eubacterium brachy*, *Tanerella forsythia* e *F. alocis*. O estudo permitiu concluir que a comunidade microbiana em lesões endo-perio é mais complexa do que dita em estudos prévios. É importante notar que bactérias podem sobreviver em alguns canais mesmo após o PQC. E que a similaridade da microbiota em ambos os sítios antes e após o PQC sugerem uma via de infecção entre polpa e periodonto. Na análise da microbiota por sequenciamento de nova geração, as espécies bacterianas mais detectadas após o preparo químico-cirúrgico foram: *E. faecalis*, *Streptococcus salivarius/vestibularis*, *Parvimonas micra*, *Prevotella nigrescens*, *Eubacterium brachy*, *Filifactor alocis* e *Fretibacterium fastidiosum*. Os filios mais frequentemente encontrados foram: *Desulfobulbus* sp oral taxon 041, *Stomatobaculum* sp oral taxon 373, *Peptostreptococcaceae* sp oral taxon 383 e *Erysipelothrichaceae* sp. oral taxon 905. Esses resultados revelaram a complexidade da comunidade bacteriana persistente após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares.

Nóbrega et al. (2016) exploraram a diversidade bacteriana de 10 canais radiculares com abscesso apical agudo utilizando análise clonal. Foram coletadas amostras de 10 pacientes submetendo-as ao isolamento de DNA bacteriano, amplificação do gene 16S rRNA, clonagem e sequenciamento. Em média 15 táxons foram identificados por canal. Um total de 689 clones foi analisado e 76 filotipos identificados, dos quais 47 (61,84%) eram espécies diferentes e 29 (38,15%) foram declarados como espécies ainda não cultiváveis ou ainda não caracterizadas. *Prevotella* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Filifactor alocis* e *Peptostreptococcus stomatis* foram as espécies mais frequentemente detectadas, seguidas por *Dialister invisus*, *Phocaeicola abscessus*, o clone oral *Lachnospiraceae* não caracterizado, *Porphyromonas* spp e *Parvimonas micra*. Oito filios foram detectados e os táxons mais freqüentemente identificados pertenciam ao filo *Firmicutes* (43,5%), seguido por *Bacteroidetes* (22,5%) e *Proteobacteria* (13,2%). Nenhuma espécie foi detectada em todas as amostras estudadas e algumas espécies foram identificadas em apenas

um caso. Com esse trabalho permitiu-se concluir que a infecção endodôntica primária aguda é caracterizada por ampla diversidade bacteriana e uma alta variabilidade interindividual foi observada. Bactérias Gram-negativas anaeróbias pertencentes ao filo *Firmicutes*, seguido por *Bacteroidetes*, foram os microrganismos mais freqüentemente detectados.

3.2 Redução microbiana após procedimentos endodônticos

Chávez de Paz et al. (2003) estudaram bactérias que se mantiveram no SCR após o preparo químico cirúrgico de 200 dentes com periodontite apical. Um total de 248 amostras foram coletadas de 107 dentes os quais apresentaram crescimento bacteriano. Houve prevalência de bactérias gram-positivas (85%). *Lactobacillus spp.* (22%), *Streptococcus* (18%), e *Enterococcus spp.* (12%) foram as mais frequentes. Anaeróbios gram-negativos foram esparsos. As lesões ósseas radiográficas, dor persistente e 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* demonstram sobreviver após o tratamento da periodontite apical.

Siqueira Jr. et al. (2007) estudou a eficácia do NaClO^- 2,5% e CHX 0,12% como irrigantes na redução microbiana em canais de dentes com periodontite apical. Amostras bacterianas de 32 dentes com infecção primária foram coletadas na cirurgia de acesso (S1) e após o PQC usando NaClO^- 2,5% ($n=16$) ou CHX 0,12% ($n=16$) como irrigantes (S2). Os isolados das amostras S2 foram identificados por meio de análise de sequenciamento genético da região 16 rRNA. Em S1 todos os canais se apresentaram positivos para bactérias, sendo o valor médio de microrganismos por canal $7,32 \times 10^5$ para o grupo NaClO^- e $8,5 \times 10^5$ para o grupo CHX. Em S2 o valor médio de bactérias em canais irrigados com NaClO^- foi $2,35 \times 10^3$ e CHX 2×10^2 . Não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos NaClO^- e CHX em relação ao número de casos que apresentaram culturas negativas ($p=0,72$) ou redução bacteriana quantitativa ($P=0,609$). O ensaio de identificação de espécies encontradas no interior dos canais mostrou que a taxa de bactérias mais observada foram *Streptococci*, representando 6 dos 13 táxons identificados.

Vianna et al. (2006) analisaram *in vivo* a redução microbiana após o PQC em 32 canais radiculares humanos com polpas mortificadas, irrigados com NaClO₂ 2,5% ou gel de Clorexidina 0,12%. A análise da redução bacteriana foi avaliada pelos métodos de cultura e qPCR com SybrGreen e TaqMan. Observando os resultados das contagens de UFCs a redução de micro-organismos foi substancial em ambos os grupos, mais de 96%. Na análise feita por PCR quantitativo o grupo NaClO₂ (SYBRGreen 99,99%; TaqMan: 99,63%) apresentou maior redução microbiana do que o grupo CHX (SYBRGreen 96,62%; TaqMan: 96,60%). De acordo com a técnica de cultura o grupo NaClO₂ apresentou 75% dos casos livres de bactérias após o PQC e o grupo CHX apresentou 50% dos casos livres de bactérias após o PQC.

Siqueira Jr. e Lopes (1999) em um trabalho de revisão estudaram as propriedades do hidróxido de cálcio por ter uma função primária como medicação intracanal de promover atividade antimicrobiana devido sua capacidade de causar danos na membrana citoplasmática da bactéria, bem como os íons hidroxila ocasionarem danos ao DNA bacteriano, desnaturação de proteínas e funcionar como uma barreira física. E concluíram que o hidróxido de cálcio é de grande importância na endodontia podendo ser indicado para diversas condições clínicas.

Shuping et al. (2000), testaram a redução microbiana com instrumentação rotatória de níquel-titânio com irrigação com NaClO₂ 1,25% e o efeito anti-bacteriano do hidróxido de cálcio (CaOH₂) por uma semana como medicação intracanal. Foram coletadas amostras de quarenta e dois dentes com lesão periapical crônica antes, durante e após instrumentação, e após a medicação intracanal. Para os canais que foram irrigados com NaClO₂ houve uma redução significativamente maior de bactérias quando comparado com os canais irrigados com solução salina ($p < 0,05$). Após a instrumentação associada com NaClO₂ 61,9% dos canais estavam livres de bactérias. A medicação de hidróxido de cálcio por pelo menos uma semana mostrou que 92,5% dos canais estavam livres de bactérias. Os resultados do estudo indicam que o preparo mecanizado junto ao hipoclorito de sódio (NaClO₂) é um passo importante na redução bacteriana do canal e que a adição do CaOH₂ como medicação intracanal deve ser realizada para alcançar índices satisfatórios de redução bacteriana.

Sakamoto et al. (2007) estudaram a redução microbiana obtida pelos procedimentos endodônticos e identificaram os táxons presentes após o tratamento. Amostras oriundas de canais radiculares com periodontite apical foram obtidas antes

(S1) e após o PQC com irrigação de NaClO₂ 2,5%(S2) e após a medicação intracanal com CaOH₂ entre as sessões (S3). As amostras foram submetidas a identificação de espécies bacterianas persistentes por clonagem de DNA e análise da biblioteca de clones, e as bactérias passaram por análise quantitativa pelo método de qPCR. As amostras S2 e S3 de cinco dos 15 casos mostraram resultados negativos. Nos 10 casos restantes, a instrumentação e a medicação intracanal promoveram redução significativa de 99,67% e 99,85% respectivamente quando comparados com S1. Quarenta e três táxons de bactérias distintas foram identificados, dos quais 24 (56%) tratavam-se de filotipos ainda não cultiváveis. *Streptococcus sp* foram os táxons mais prevalentes inclusive nas amostras pós tratamento.

Siqueira Jr, Guimarães-Pinto e Rôças (2007) analisaram o efeito do PQC com NaClO₂ 2,5% e CaOH₂ como medicação intracanal em bactérias cultiváveis de canais radiculares infectados. Foram obtidos 11 dentes com infecção intrarradicular primária e periodontite apical assintomática. As amostras foram obtidas antes do tratamento (S1), após o PQC com NaClO₂ 2,5% (S2), e após 7 dias com medicação de CaOH₂ em glicerina (S3). As bactérias cultiváveis foram obtidas de canais radiculares infectados nos 3 estágios contadas e identificadas por meio da análise de sequenciamento do gene 16S rRNA. Em S1 todos os canais foram positivos para bactérias (2,8 táxons por canal). Em S2, 5 casos (45,5%) ainda abrigava bactérias. Em S3 as bactérias foram cultivadas em 2 casos (18,2%), com 1 espécie por caso positivo. Uma redução significativa de bactérias foi observada entre S1 e S2, e entre S1 e S3. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa comparando S2 e S3. Conclui-se que todo protocolo antibacteriano utilizado neste estudo reduziu significativamente o número de bactérias no canal e a maioria dos canais tornaram-se livres de bactérias cultiváveis.

Beus et al. (2012) compararam resultados de protocolos *in vivo* da irrigação convencional com NaClO₂ 1% e da PUI com NaClO₂ 1% + EDTA 17% +CHX2%, além dos efeitos do CaOH₂ como medicação intracanal em dentes com periodontite apical de 50 pacientes. Os pacientes foram divididos aleatoriamente em 2 grupos e receberam tratamento endodôntico em 2 sessões. A medicação intracanal manteve-se nos condutos por 14 dias. Após o PQC os dentes receberam o protocolo de tratamento de modo aleatório. Amostras microbiológicas foram obtidas em quatro momentos: Antes da instrumentação (S1), após o protocolo de irrigação (S2), após a

medicação (S3) e antes da obturação (S4). A irrigação convencional e a PUI obtiveram canais livre de bactérias em 80 e 84% dos casos respectivamente, ao final da primeira sessão. Após a medicação o total das amostras livres de bactérias aumentou para 87%, e a reinstrumentação levou para 91% de amostras livres de bactérias. Não houve diferença estatística entre os métodos de irrigação ou entre os resultados obtidos em uma ou duas sessões.

Paiva et al. (2013) analisaram clinicamente os efeitos antimicrobianos dos procedimentos endodônticos utilizando métodos moleculares. Obtiveram 14 amostras de canais com periodontite apical antes (S1) e após instrumentação com NaClO₂ como irrigante (S2), e irrigação final com clorexidina (CHX) (S3) e após uma semana com medicação intracanal com CaOH₂ (S4). Foram analisados a incidência de resultados positivos para a presença de bactérias por meio de PCR de amplo espectro; impacto sobre as estruturas da comunidade bacteriana por PCR-Desnaturation Gradient Gel Electrophoresis (DGGE); dados quantitativos quanto a redução microbiana foram obtidos por qPCR; e identificação de bactérias persistentes por clonagem e sequenciamento. Todas as amostras S1 mostraram a presença de bactérias em todos os testes. Os procedimentos ocasionaram a redução da diversidade bacteriana além de reduzirem significativamente a incidência de resultados positivos e as contagens bacterianas ($P < 0,05$).

Sinha et al. (2013) realizaram um estudo in vivo para comparar a eficácia antimicrobiana da medicação intracanal com hidróxido de cálcio, clorexidina gel 2% e uma combinação dos dois contra anaeróbios facultativos, estritos e *Candida spp.* Foram obtidas amostras de 90 dentes antes do tratamento (S1), após o preparo químico cirúrgico realizado com instrumentos rotatórios e solução salina (S2). Os dentes foram divididos em três grupos quanto a medicação intracanal: Grupo I: hidróxido de cálcio, Grupo II: gel de clorexidina 2%, Grupo III: associação gel de clorexidina e hidróxido de cálcio. Após uma semana de medicação intracanal nova coleta foi realizada (S3). Os resultados mostraram que todos os medicamentos foram eficazes na eliminação de anaeróbios obrigatórios. Gel de clorexidina e a associação de clorexidina com hidróxido de cálcio mostrou maior efeito antimicrobiano contra anaeróbios facultativos e *Candida spp.* em comparação com hidróxido de cálcio sem associação com outra medicação, no entanto, o estudo não apresenta diferença estatisticamente significativa entre o Grupo II e Grupo III.

Nakamura et al. (2018) realizou um estudo in vivo que analisou os efeitos dos procedimentos endodônticos e da irrigação ultrassônica passiva (PUI) em bactérias e endotoxinas de canais radiculares. A terapia endodôntica convencional com a utilização de medicação intracanal com hidróxido de cálcio foi realizada em 50 pacientes com periodontite apical primária e coletas microbiológicas foram coletadas a cada etapa do tratamento. Os dentes foram divididos em dois grupos: PUI (n=25) e irrigação convencional (IC) (n=25). Foram feitos ensaios de PCR e Lisado de Amebócito de Limulus (LAL). Em ambos os grupos, houve diminuição significativa na concentração de endotoxinas entre uma etapa do tratamento e a etapa posterior. O mesmo foi observado quanto ao número de bactérias, exceto após a reinstrumentação dos canais para obturação. Com relação a redução bacteriana, a PUI foi capaz de reduzir significativamente mais o número de bactérias do que a IC, porém com relação as endotoxinas, não foram diferenças significativas entre os grupos.

Elnaghy, Mandorah e Se (2017) avaliou a eficácia da lima XP-endo Finisher (FKG Dentaire SA, La Chaux- de-Fonds, Suíça) na remoção de debris e smear layer em canais radiculares curvos em comparação com diferentes regimes de irrigação. Setenta e cinco molares humanos recém-extraídos com raiz mesial com curvatura de mais que 20° foram utilizados neste estudo. Os canais radiculares mesiais foram mecanicamente preparados utilizando o sistema rotativo BT-Race (FKG DENTAIRE, 2018) e divididos em cinco grupos (n = 15) de acordo com as seguintes técnicas de irrigação: controle positivo, não agitado, Agitação da lima, XP-endo Finisher, e EndoActivator (Dentsply Tulsa Dental Especialidades, Tulsa, OK, EUA). Os canais radiculares foram divididos longitudinalmente e avaliados por microscopia eletrônica de varredura. Os grupos XP-endo Finisher e EndoActivator revelaram escores significativamente menores de fragmentos e smear layer do que os outros grupos nas regiões coronal, média e apical ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos XP-endo Finisher e EndoActivator ($P [0,05$). A região apical apresentou maior escore de resíduos e camada de smear em comparação com as regiões coronal em todos os grupos ($P < 0,05$), com exceção do grupo controle positivo; não houve diferença significativa entre as três regiões do canal radicular ($P > 0,05$). A irrigação de canais radiculares curvos usando os métodos XP-endo Finisher e EndoActivator parece ser mais eficaz na remoção de detritos e smear layer do que os outros grupos testados.

Golob et al. (2017) determinaram a efetividade da PIPS na redução de *Enterococcus faecalis* na desinfecção dos canais radiculares, variando a energia do laser e a concentração do hipoclorito de sódio. 86 dentes unirradiculares extraídos foram preparados mecanicamente, esterilizados e depois inoculados com *E. faecalis* por 4 semanas. Foram divididos em 9 grupos e tratados com laser de ER:YAG usando PIPS com ponta 600/9 de acordo com os seguintes parâmetros: 10mJ ou 20mJ, 15Hz, e um pulso de 50 microssegundos de duração a 0.5W ou 0.3W de potência, respectivamente. Os canais foram irrigados com diferentes concentrações de NaClO₂ (1%, 3% e 5% e ativados com o protocolo da PIPS). A contagem bacteriana foi feita imediatamente após e 48 horas após a descontaminação e nova incubação em placa de ágar. Como resultados eles obtiveram diferença na contagem bacteriana antes e imediatamente após o tratamento, bem como nos grupos tratados com NaClO₂ 5% 48 horas após tratamento. Escaneamento com microscopia eletrônica mostrou ausência de bactérias e biofilme nas áreas escaneadas após tratamento com NaClO₂ 5%. Com base nesses resultados o trabalho permite concluir que a irrigação ativada com laser usando NaClO₂ 5% junto ao protocolo de PIPS modificado resulta em maior efetividade na erradicação de biofilmes bacterianos, além de remoção da smear layer.

4 DISCUSSÃO

Na literatura tem se um conceito permanente quanto ao estabelecimento de alterações pulpar e periapical relacionadas à presença de bactérias (KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1965; MÖLLER et al., 1981).

Segundo Siqueira Jr e Rôças (2009) mais de 460 táxons pertencentes a 100 gêneros e 9 filos foram identificados nos sistemas de canais radiculares de dentes que apresentavam algum tipo de infecção endodôntica. Ainda que os relatos quanto as espécies bacterianas presentes na infecção endodôntica primária mostram uma variedade de espécies, Siqueira Jr e Rôças (2005) apontaram que essa variedade pode ter sido subestimada devido as limitações de metodologia, como em métodos dependentes de cultura, tendo em vista que aproximadamente 50% da microbiota oral permanece não cultivável. Deste modo, a patogenicidade e sintomatologia ocasionada por bactérias não- cultiváveis pode ser não relacionada ou subestimada (KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1965; FABRICIUS et al., 1982).

Segundo Siqueira Jr e Rôças (2009) os métodos moleculares para identificação microbiana que são fundamentados no RNA bacteriano apresentam vantagens em relação ao método de cultura quanto a sua maior facilidade em favorecer o crescimento bacteriano em condições *in vitro*, além da maior sensibilidade que o método molecular possui na identificação bacteriana quando comparado ao método de cultura.

Métodos moleculares são atualmente o padrão ouro no que tange a análise microbiana. Ensaio de PCR quantitativo (qPCR) visando o gene rRNA (rDNA) foram utilizados em muitos estudos de microbiologia nos últimos anos. Especificamente, muitos ensaios de qPCR foram desenvolvidos e aplicados para a detecção e quantificação de bactérias. No entanto, o uso desses métodos encontrou algumas críticas como o DNA poder ser associado a células mortas e geralmente poder persistir no ambiente (KEER; BIRCH, 2003), resultando na superestimação de micro-organismos viáveis (NOBLE et al., 2010). Devido à sua fraca estabilidade fora da célula e sua correlação com a fisiologia celular, o RNA foi proposto como um alvo alternativo na detecção de bactérias (LU; STROOT; OERTHER, 2009). De acordo com Van der Vliet et al. (1994) o RNA é um indicador de bactérias viáveis e em atividade. Os esforços dirigidos para as transcrições de mRNA têm sido limitados a estudos que rastreiam características de grupos bacterianos específicos e na

maioria dos casos não são adequados para estudar todos os membros da comunidade bacteriana. Além disso, a frequência de detecção de testes que visam transcrições de mRNA são frequentemente baixo e, portanto, podem ter suas taxas detectadas apenas bactérias abundantes com alto metabolismo (SMITH; OSBORN, 2009). É vantajoso o uso de rRNA transcrito uma vez que o constituinte mais abundante dos ácidos nucléicos em bactérias (WATERS; MCCUTHAN, 1990) e primers universais podem ser usados simultaneamente para estudar grupos microbianos filogeneticamente divergentes. Além disso, o rRNA pode ser usado para monitorar o status da atividade bacteriana, e a taxa de transcrição de rRNA é uma taxa de crescimento dependente (PITKÄNEN et al., 2013).

A quantidade de RNA está relacionada à atividade da célula procariótica, deste modo a análise do RNA permite indicação mais expressiva dos patógenos que estão viáveis (MISKIN; FARRIMOND; HEAD, 1999). A molécula-alvo utilizada é rRNA, isso porque os métodos que utilizam essa molécula são mais sensíveis porque existem muitas cópias de rRNA nas bactérias que estão ativas. Além disso, utiliza-se rRNA como alvo, pois todos os exemplares do domínio bactéria possuem essa mesma molécula, sendo habitualmente utilizada para identificação de diferentes espécies bacterianas.

Os métodos moleculares para identificação microbiana representam recursos importantes para identificação de micro-organismos bem como sua posição taxonômica (SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2005). Com a utilização de métodos moleculares Nóbrega et al. (2016) relataram que 486 táxons foram identificados em infecções endodônticas sintomáticas, 265 em quadros assintomáticos e 165 em ambos os casos. De acordo com Gomes et al. (2015) os filos bacterianos mais comumente encontrados em infecções endodônticas são *Firmicutes*; *Bacteroidetes*; *Actinobacteria*; *Fusobacteria*; *Proteobacteria*; *Spirochaetes* e *Synergistes*. Sakamoto et al. (2007) detectaram *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*/*Peptostreptococcus sp.*, *Prevotella sp.*; *Dialister sp.*, *Mogibacterium sp.*, clone oral *Lachnospiraceae*, *Filifactor alocis*, clone oral *Megasphaera sp.*, clone oral *Veillonella sp.* apenas em casos assintomáticos, por outro lado *Prevotella intermedia* e *Dialister pneumosintes*, são detectados apenas nos casos sintomáticos (SAKAMOTO et al., 2007).

Devido à variedade de bactérias passíveis de serem encontradas no SCR, essa revisão de literatura se ateve as bactérias Gram-positivas que são mais

comumente encontradas em casos que onde há infecção primárias associadas a infecções persistentes (RÔÇAS; SIQUEIRA JR., 2010).

Os *Streptococcus spp.* de acordo com Gomes et al. (2004) são espécies anaeróbias facultativas que são mais encontradas nas infecções primárias. Love (2004) afirmou que *Streptococcus spp* são colonizadores primários do biofilme e são capazes de penetrar nos canalículos dentinários sozinhos ou agregados a outros micro-organismos. Prado (2014) revelou que o PQC foi eficaz na redução desse micro-organismo e que a MIC foi capaz de manter essa redução, pois com a Reação de Cadeia em Polimerase baseada em DNA detectou *Streptococcus spp* após PQC em 10% das amostras S2 e após a medicação intracanal 20% das amostras S3 continham *Streptococcus spp.* No entanto quando comparado com método baseado em RNA os resultados foram negativos tanto em S2 quanto S3.

De acordo com Rôças e Siqueira Jr. (2010) *Propionibacterium spp.* são micro-organismos Gram-positivos, encontrados em biofilmes extra radiculares, infecções endodônticas persistentes e tratam-se de bactérias anaeróbias estritas. A persistência dessas bactérias após PQC e MIC pode estar associada à capacidade de se organizarem em comunidade consórcio, mantendo-se mais resistentes aos antimicrobianos e menos susceptíveis as alterações ambientais (CHÁVEZ DE PAZ, 2007).

As bactérias associadas a infecções endodônticas persistentes podem ser identificadas como aquelas encontradas no conduto radicular no momento da obturação dos canais. É possível que muitos dos micro-organismos detectados possam não ter tempo nem quantidade suficiente para estabelecer uma infecção persistente e aquelas que forem passíveis de persistirem à modificação do ambiente podem ocasionar uma infecção tida como persistente e comprometer a terapia endodôntica (PRADO, 2014).

Analisando as substâncias químicas não há consenso na literatura quanto ao melhor irrigante entre hipoclorito de sódio e clorexidina, pois as duas substâncias são eficazes em reduzir substancialmente a microbiota endodôntica, no entanto não são capazes anular carga microbiana do interior do SCR (SIQUEIRA Jr; GIMARÃES-PINTO; RÔÇAS, 2007). Quanto a medicação intracanal, alguns estudos mostram que favorece a redução microbiana no canal (SINHA et al., 2013) e outros relatam ineficiência na eliminação de todos os tipos de micro-organismos encontrados no interior do canal endodôntico (SIQUEIRA JR; LOPES, 1999). A medicação intracanal

com hidróxido de cálcio foi eficiente na redução de carga bacteriana no interior dos canais (NAKAMURA et al., 2018), no entanto outros estudos não são capazes de fazer a mesma inferência, pois não houve diferença estatística significativa na redução microbiana entre o PQC e a medicação intracanal (SAKAMOTO et al., 2007).

Apesar do preparo químico mecânico diminuir significativamente a carga bacteriana nos canais radiculares, estudos com análise molecular demonstram que muitos casos se mantêm infectados após o preparo do canal radicular (VIANNA et al., 2006). Portanto, abordagens alternativas foram propostas para complementar a ação antimicrobiana do preparo químico mecânico de canais endodônticos infectados, incluindo um protocolo de irrigação final usando a ativação ultrassônica adicional do irrigante (SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2009), agitação com instrumento automatizado como XP- endo Finisher (ELNAGHY; MANDORAH; SE, 2017) e o uso de PIPS (photon-initiated photoacoustic streaming) (PEDULLÀ et al., 2012).

A ativação ultrassônica é baseada na transmissão de energia acústica através do irrigante por um fio (haste) de aço inoxidável ou uma lima de endodôntica (VAN DER SLUIS et al., 2007). Essa energia é dissipada através das ondas ultrassônicas criadas no irrigante que levam à cavitação (ROY et al., 1994) e transmissão acústica (AHMAD; PITT FORD; CRUM, 1987). Esta última é a força biofísica associada às limas de endodontia durante a atividade ultrassônica. Embora o mecanismo de ação para a ativação ultrassônica na irrigação do canal não seja claro, os estudos laboratoriais demonstraram que a ativação ultrassônica de soluções antimicrobianas promove a remoção de detritos de dentina (AMATO et al., 2011) e biofilme bacteriano de canais infectados (HARRISON et al., 2010; CACHOVAN et al., 2013; MOHMMED et al., 2016).

Outra alternativa utilizada que visa a redução microbiana obtida do PQM é o uso do instrumento XP – endo Finisher (FKG Dentaire, Swetzelander). Trata-se de lima mecanizada que deve ser utilizada após o preparo químico mecânico (PQM) do SCR para potencializar a limpeza do canal radicular enquanto mantém estrutura dentinária, a limpeza obtida pelo instrumento se dá por intermédio do contato (raspagem) gerado entre o instrumento e as paredes do canal. O instrumento XP- endo Finisher é baseado no princípio de memória de forma da liga NiTi. As limas são retas em sua fase martensítica (M), em temperatura ambiente. Ao serem inseridas no canal, são expostas à temperatura corpórea e mudam de forma devido à

memória molecular da fase austenítica (A). O formato da fase-A em rotação permite que o instrumento busque alcançar e limpar áreas de difícil acesso para os instrumentos padrão. Fabricado com a liga flexível à base de NiTi, e devido ao seu formato característico após a expansão, as limas XP-endo Finisher acompanham as paredes do canal radicular com um alcance de até 6 mm de diâmetro (FKG DENTAIRE, 2018).

A outra alternativa transoperatória que visa a potencialização da limpeza e desinfecção intracanal é a PIPS (photon-initiated photoacoustic streaming). Trata-se de uma técnica atribuída a atividades fotoacústicas e fotomecânicas. Neste método o laser Er:YAG é usado com uma ponta que é inserida no canal principal. Quando ativado há uma alta absorção do comprimento de onda do laser no irrigante e a combinação do pico de onda alcançado usando parâmetros abaixo de níveis ablativos resulta no fenômeno fotomecânico (GUNESER; ARSLAN; USUMEZ, 2015).

A relevância dessa revista de literatura no que tange a atividade metabólica dessas bactérias de caráter endodôntico é alta para o estabelecimento de terapias capazes de aniquilar ou neutralizar mecanismos de defesa microbiana, bem como a persistência desses micro-organismos no SCR.

5 CONCLUSÃO

A revisão da literatura pesquisada para este trabalho nos permite concluir que os procedimentos endodônticos relacionados ao PQC promovem redução dos níveis microbianos, no entanto, muitos canais continuam infectados. Com relação à medicação intracanal utilizada os estudos são controversos, alguns relatam potencialização da susceptibilidade microbiana outros, porém demonstram não haver redução bacteriana significativa. Os estudos que utilizaram métodos moleculares permitiram identificação tanto de bactérias não cultiváveis quanto cultiváveis, sendo que os filos que apresentaram maior prevalência de espécies viáveis após os procedimentos de desinfecção foram *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*. e as espécies correspondentes foram *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus spp.*, *Propionibacterium acnes*. E com base nessas informações pode-se atestar que ainda existe a necessidade de serem adotadas novas estratégias quanto a técnicas, instrumentos e substâncias para que se alcance a máxima sanificação dos sistemas de canais radiculares.

REFERÊNCIAS

AMATO, M. et al. Curved versus straight root canals: the benefit of activated irrigation techniques on dentin debris removal. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 111, n. 4, p. 529-534, Apr. 2011.

AHMAD, M.; PITT FORD, T. J.; CRUM, L. A. Ultrasonic debridement of root canals: an insight into the mechanisms involved. **J. Endod.**, New York, v. 13, n. 3, p. 93–101, Mar. 1987.

BEUS, C. et al. 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.**, New York, v. 38, n. 11, p. 1479-1483, Nov. 2012.

CACHOVAN, G. et al. Comparative antibacterial efficacies of hydrodynamic and ultrasonic irrigation systems in vitro. **J. Endod.**, New York, v. 39, n. 9, p. 1171–1175, Sep. 2013.

CHAVEZ DE PAZ, L. E. Development of a multispecies biofilm community by four root canal bacteria. **J. Endod.**, New York, v. 38, n. 3, p. 318-323, Mar. 2012.

CHÁVEZ DE PAZ, L. E. et al. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 36, n. 7, p. 500-558, July 2003.

CHÁVEZ DE PAZ, L. E. et al. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 40, n. 5, p.344-355, May 2007.

ELNAGHY, A. M.; MANDORAH, A.; SE, E. Effectiveness of XP-endo finisher, EndoActivator, and file agitation on debris and smear layer removal in curved root canals: a comparative study. **Odontology**, Tokyo, v. 105, n. 2, p. 178-183, Apr. 2017.

FABRICIUS, L. et al. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 90, n. 3, p. 200-206, June 1982.

FKG DENTAIRE SA. The XP-endo Finisher file Brochure. Disponível em: http://www.fkg.ch/sites/default/files/201610_fkg_xp_endo_finisher_brochure_v2_pt_web_0.pdf. Acesso em: 20 jan. 2018.

GOLOB, B. S. et al. Efficacy of photon-induced photoacoustic streaming in the reduction of *Enterococcus faecalis* within the root canal: different settings and different sodium hypochlorite concentrations. **J. Endod.**, New York, v. 43, n. 10, p. 1730-1735, Oct. 2017.

GOMES, B. P. et al. Microbiomes of endodontic-periodontal lesions before and after chemomechanical preparation. **J. Endod.**, New York, v. 41, n. 12, p. 1975-1984, Dec. 2015.

GOMES, B. P. et al. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 19, n. 2, p. 71-76, Apr. 2004.

GUNESER, M. B.; ARSLAN, D.; USUMEZ, A. Tissue dissolution ability of sodium hypochlorite activated by photon-initiated photoacoustic streaming technique. **J. Endod.**, New York, v. 41, n. 5, p. 729-732, May 2015.

HARRISON, A. J. et al. The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 43, n. 11, p. 968–977, Nov. 2010.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H. R.; FITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 20, p. 340-349, Sep. 1965.

KEER, J. T.; BIRCH, L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. **J. Microbiol. Methods**, Amsterdam, v. 53, n. 2, p. 175-183, May 2003.

LU, T.; STROOT, P. G.; OERTHER, D. B. Reverse transcription of 16S rRNA to monitor ribosome-synthesizing bacterial populations in the environment. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 75, n. 13, p. 4589-4598, July 2009.

MISKIN, I. P.; FARRIMOND, P.; HEAD, I. M. Identification of novel bacterial lineages as active members of microbial populations in a freshwater sediment using a rapid RNA extraction procedure and RT-PCR. **Microbiology**, Reading, v. 145, Pt 8, p. 1977-1987, Aug. 1999.

MOHMMED, S. A. et al. A novel experimental approach to investigate the effect of different agitation methods using sodium hypochlorite as an irrigant on the rate of bacterial biofilm removal from the wall of a simulated root canal model. **Dent. Mater.**,

Copenhagen, v. 32, n. 10, p. 1289–300, Oct. 2016.

MÖLLER, A. J. et al. Influence on periapical tissue of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 89, n. 6, p. 475-484, Dec. 1981.

NAKAMURA, V. C. et al. Effect of ultrasonic activation on the reduction of bacteria and endotoxins in root canals: a randomized clinical trial. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 51, p. e12-e22, Jan. 2018. Supplement 1. doi: 10.1111/iej.12783.

NÓBREGA, L. M. et al. Bacterial diversity of symptomatic primary endodontic infection by clonal analysis. **Braz. Oral Res.**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. e103, Oct. 2016.

NOBLE, R. T. et al. Comparison of rapid quantitative PCR-based and conventional culture-based methods for enumeration of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in recreational waters. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 76, n. 22, p. 7437-7443, Nov. 2010.

PAIVA, S. S. et al. Clinical antimicrobial efficacy of NiTi Rotary instrumentation with NaOCl irrigation, final rinse with chlorhexidine and interappointment medication: a molecular study. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 46, n. 3, p.225-233, Mar. 2013.

PEDULLÀ, E. et al. Decontamination efficacy of photon-initiated photoacoustic streaming (PIPS) of irrigants using low-energy laser settings: an ex vivo study. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 45, n. 9, p. 865-70, Sep. 2012.

PITKÄNEN, T. et al. Detection of fecal bacteria and source tracking identifiers in environmental waters using rRNA-based RT-qPCR and rDNA-based qPCR assays. **Environ. Sci. Technol.**, Washington, v. 47, n. 23, p. 13611-13620, 2013.

PRADO, L. C. **Estudo *in vivo* da susceptibilidade de bactérias Gram-positivas após procedimentos químico-cirúrgico e medicação intracanal pelo método de reação de cadeia de polimerase baseado em DNA e RNA.** 66 f. 2014.

Dissertação(Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA Jr, J. F. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. **J. Endod.**, New York, v. 36, n. 1, p. 45-52, Jan. 2010. doi: 10.1016/j.joen.2009.10.022.

- ROY, R. A.; AHMAD, M.; CRUM, L. A. Physical mechanisms governing the hydrodynamic response of an oscillating ultrasonic file. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 197–207, July 1994.
- SAKAMOTO, M. et al. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 22, n. 1, p. 19-23, Feb 2007.
- SINHA, N. et al. Evaluation of antimicrobial efficacy of calcium hydroxide paste, chlorhexidine gel, and a combination of both as intracanal medicament: an *in vivo* comparative study. **J. Conserv. Dent.**, [Amritsar], v. 16, n. 1, p. 65-70, Jan. 2013.
- SIQUEIRA Jr, J. F.; LOPES, H. P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 361-369, Sep. 1999.
- SIQUEIRA Jr, J. F.; RÔÇAS, I. N. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. **J. Endod.**, New York, v. 34, n. 11, p. 1291-1301, Nov. 2008.
- SIQUEIRA Jr, J. F.; RÔÇAS, I. N. Diversity of endodontic microbiota revisited. **J Dent Res.**, Chicago, v. 88, n. 11, p. 969-981, Nov. 2009.
- SIQUEIRA Jr, J. R.; RÔÇAS, I. N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2 – Redefining the endodontic microbiota. **J Endod.**, New York, v. 31, n. 7, p. 488-498, July 2005.
- SIQUEIRA Jr, J. F.; GIMARÃES-PINTO, T.; RÔÇAS, I. N. Effects of chemomechanical preparation with 2,5% sodium hypochlorite and intracanal medication with calcium hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals. **J Endod.**, New York, v. 33, n. 7, p. 800-805, July 2007.
- SIQUEIRA Jr, J. F. 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.**, St. Louis, v. 104, n. 1, p. 122-130, July 2007.
- SHUPING, G. B. et al. Reduction of intracanal using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. **J Endod.**, New York, v. 26, n. 12, p. 751-755, Dec. 2000.

SMITH, C. J.; OSBORN, A. M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. **FEMS Microbiol. Ecol.**, [Amsterdam], v. 67, n. 1, p. 6-20, Jan. 2009. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x.

VAN DER SLUIS, L. W. et al. An evaluation of the influence of passive ultrasonic irrigation on the seal of root canal fillings. **Int. Endod. J.**. Oxford, v. 40, n. 5, p. 356–361, May 2007.

VAN DER VLIET, G. M. et al. Assessment of mycobacterial viability by RNA amplification. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 38, n. 9, p. 1959-1965, Sep. 1994.

VIANNA, M. E. et al. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 39, n. 6, p.484-492, June 2006.

WATERS, A. P.; MCCUTHAN, T. F. Ribosomal RNA: nature's own polymerase-amplified target for diagnosis. **Parasitol. Today**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p.56-59, Feb. 1990.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

CALDWELL, D. E. et al. Germ theory vs. community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilms. **Adv. Dent. Res.**, [Washington, DC], v. 11, n. 1, p. 4-13, Apr. 1997.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Ann. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 49, p. 711-745, 1995.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, [Washington, DC], v. 15, n. 2, p.167-193, Apr. 2002.

NAIR, P. N. R. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. **J. Endod.**, New York, v. 13, n. 1, p. 29-39, Jan. 1987.

PETERS, L. B. et al. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 13-21, Jan. 2002.

PETERS L. B.; WESSELINK, P. R.; VAN WINKELHOFF, A. J. Combinations of bacterial species in endodontic infections. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 35, n. 8, p. 698-702, Aug. 2002.

PETERS, L. B. et al. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. **J. Endod.**, New York, v. 27, n. 2, p. 76-81, Feb. 2001.

PINHEIRO, E. T. et al. RNA-based assay demonstrated *Enterococcus faecalis* metabolic activity after chemomechanical procedures. **J. Endod.**, New York, v. 41, n. 9, p. 1441-1444, Sep. 2015.

SIQUEIRA Jr, J. F.; RÔÇAS, I. N. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. **J. Endod.**, New York, v. 34, n. 11, p. 1291-1301, Nov. 2008.

TRONSTAD, L.; SUNDE, P. T. The evolving new understanding of endodontic infections. **Endo Topics.**, [S.I.], v. 6, p. 57-77, Nov. 2003.