

Marcos Jacobovitz

BIOLOGIA MOLECULAR-TÉCNICA PCR. MONITORAÇÃO DO EFEITO DE CURATIVOS DE DEMORA À BASE DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO NA MICROBIOTA DE CANAIS RADICULARES EM DENTES DE HUMANOS PORTADORES DE LESÃO PERIAPICAL CRÔNICA

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para a
obtenção do título de Doutor em Endodontia.

Orientadora: Profa. Dra. *Izabel Yoko Ito*

ARARAQUARA
2003

Dados Curriculares

Marcos Jacobovitz

NASCIMENTO 3.7.1965 – RECIFE/PE

FILIAÇÃO David Jacobovitz Netto
Lêda Jacobovitz

1984/1986 Curso de Graduação
Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco

1987/1989 Curso de Graduação
Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP

1990/1991 Curso de Pós-Graduação em Endodontia, nível de Especialização na Escola de Aperfeiçoamento Profissional da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas - Regional de Araraquara

1992/1996 Curso de Pós-Graduação em Endodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP

1997/2003 Professor do Curso de Especialização em Endodontia da Escola de Aperfeiçoamento Profissional da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas - Regional de São Carlos

1999/2003 Curso de Pós-Graduação em Endodontia, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Dedicatória

Este trabalho é dedicado a meus pais **David Jacobovitz Netto** (*in memoriam*) e **Lêda Jacobovitz**. Aqueles que me possibilitaram a vida, o desenvolvimento, a formação, o equilíbrio e o permanente estado de felicidade interna, apesar das adversidades que possam aparecer. Obrigado pela escola, obrigado pelo exemplo, obrigado pelos pilares.

É, ainda, dedicado a outra modalidade de “pais”: aqueles que transmitem conhecimento, filosofia e formação. Personalidades aquilatadas pela inteligência, sabedoria e amor ao próximo. Ícones que carregam em suas costas e corações, uma legião de indivíduos formados e envolvidos na luta em prol de uma Odontologia de ponta. Parece simples, mas sem esquecermos que para tal propósito há que se optar pela total absorção à vida acadêmica em detrimento da tranquilidade de uma vida comum.

Prof. Dr. Mario Roberto Leonardo, Prof^a. Dr^a. Izabel Yoko Ito, Prof^a. Dr^a. Lea Assed Bezerra da Silva: obrigado pela escola, obrigado pelo exemplo, obrigado pelos pilares.

Finalmente, este trabalho é dedicado a aquelas pessoas também responsáveis pela minha plenitude, vontade de ir à luta e por aquele sorriso interior que carrego (já referido ali em cima, no primeiro parágrafo): **Daniela**, minha esposa, **Bruno** meu filho, e, **ao que virá**: obrigado pela escola, obrigado pelo exemplo, obrigado pelos pilares.

Agradecimentos

Professores da Disciplina de Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP: **Prof. Dr. Mário Roberto Leonardo**, **Prof. Dr. Roberto Miranda Esberard**, **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho**, **Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo**, **Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho**, **Prof. Dr. Fabio Luiz Camargo Vilella Berbert**, pelo espírito fraternal, pela dedicação e pela gentil acolhida

Prof. Dr. Ariano Penteado Simões Filho (*in memoriam*) e **Prof. Dr. Jayme Maurício Leal**.
Entusiastas da Endodontia. Também responsáveis por esta minha conquista.

Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves e da colega C.D. **Marlise Inêz Klein** da Disciplina de Microbiologia do Departamento de Diagnóstico Oral, FOP-UNICAMP - Piracicaba-SP pela cessão de espaço físico, disponibilidade pessoal e “ombro”, quando da análise laboratorial dos espécimes objetos deste estudo. Apesar da fase atribulada pela qual passavam, não mediram esforços para assistir à concretização do presente trabalho. A vocês, meu respeito e admiração.

Prof^a. Gisele Faria do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, pela análise estatística dos dados aqui apresentados. Grato pela disposição e amizade.

Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann do Grupo de Cristalografia (GC) do IFSC (USP-Campus de S. Carlos) e **Profa. Dr^a. Ana Paula Ulian de Araújo** do Grupo de Biofísica Molecular (BIO) do IFSC (USP-Campus de São Carlos) pelos meus primeiros passos nesta empreitada.

Prof. Dr. Raphael Carlos Comelli Lia - Lelo. Magnitude e simplicidade em um só indivíduo. Grato pela acolhida e arranque inicial em minha vida acadêmica.

Prof. Dr. Carlos Benatti Neto e Prof^a. Dr^a. Maria Rita Brancini de Oliveira: grato pelas oportunidades que aqui me conduziram. Grato pelo espaço que me deram em seus corações.

Ao amigo, C.D. **Paulo Tadeu da Silva:** por todas as lutas travadas em conjunto.

Funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora: Sra. **Célia Regina Fachine Sanches Silva**, pela amizade e profissionalismo com que conduziu a digitação deste trabalho, e a **Pedro Decário, Mercedes Emilia Rimoldi Guellis, Ivone Fornazari Domingues e Edison Luiz Mori**.

Seção de Pós-Graduação - Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP: **Mara Cândida Munhoz do Amaral, Rosangela Ap. Silva dos Santos, Silvia Regina Rodrigues Soares de Azevedo e Vera Lucia Perruci Roque**.

Funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP: **Maria José Peron**, pelo empenho sempre acompanhado de um sorriso, quando da revisão catalográfica deste trabalho, e demais amigos: **Maria Helena Matsumoto Komatsi Leves, Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas, Marley Cristina Chiusoli Montagnoli, Eliane Cristina Marques de Mendonça Spera, Maria Aparecida Capela Carvalho, Odete Aparecida Camilo, Adriano Ferreira Luiz, Eliane Maria Sanches Scarso, Maria Inês Carlos, Silvia Helena Acquarone Lavras**.

Prof^a. Dr^a. Miriam Aparecida Onofre e Sra. **Regina Sgobbi**, do Comitê de Ética Profissional (CEP) da Faculdade de Odontologia de Araraquara, pela receptividade, orientação, paciência e carinho.

Aos colegas de turma do Curso de Pós Graduação em Odontologia, nível Doutorado, área de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (turma 1999-2003): **Antônio Roberto Salgado, Carlos Augusto Santos César, Celso Emanuel de Souza Queiroz, Etevaldo Matos Maia Campos, Janir Alves Soares, Marccone Reis Luiz.**

Aos **demais colegas dos Curso de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

Aos **alunos do Curso de Especialização em Endodontia** da EAP-APCD, Regional de São Carlos, pelo apoio direto neste trabalho, carinho e amizade.

Agradecimentos Institucionais

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), na pessoa do Digníssimo Reitor **Prof. Dr. José Carlos Souza Trindade**

Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, na pessoa do Digníssimo Diretor, **Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached.**

Grupo de Biofísica Molecular (BIO) do Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo (USP), Campus de São Carlos.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio pecuniário.

Disciplina de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, Ribeirão Preto, SP.

Disciplina de Microbiologia do Depto de Diagnóstico Oral, FOP-UNICAMP Piracicaba-SP

Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas - Regional de São Carlos, na pessoa da digníssima presidente **Dr^a. Wilma Yukiko Kawakame.**

E a **todos os demais** que contribuíram direta ou indiretamente na confecção deste trabalho.

Sumário

INTRODUÇÃO	10
REVISÃO DA LITERATURA	19
PROPOSIÇÃO	75
MATERIAL E MÉTODO	76
RESULTADO	87
DISCUSSÃO	92
CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS	105
Anexo	133
Apêndice	136
Resumo	143
Abstract	144

Introdução

A Endodontia é a ciência e arte que envolve a etiologia, prevenção, diagnóstico e tratamento das alterações patológicas da polpa e de suas repercussões na região periapical e conseqüentemente no organismo (Leonardo & Leal⁷³, 1998).

Quando o complexo dentino pulpar é agredido pela cárie dentária a polpa pode reagir de várias maneiras à presença dos microrganismos, podendo chegar a um processo inflamatório irreversível, sempre acompanhado por resposta imunoinflamatória periapical. Essa reação, de cunho defensivo, pode tornar-se letal a este órgão devido às alterações vasculares, somadas às suas peculiaridades anatômicas (a polpa é cercada por paredes inexpandíveis). Ocorrendo a necrose pulpar, surge um ambiente propício à invasão microbiana (gangrena), de microrganismos provenientes principalmente da cavidade bucal, através das lesões de cárie ou restaurações deficientes (Sundqvist¹³⁹, 1976, Sundqvist¹⁴⁰, 1992, Sundqvist¹⁴¹, 1994). Esse processo, em fase mais tardia, resulta em consumo de oxigênio por espécies aeróbias, e principalmente por interações nutricionais entre espécies, gerando um shift microbiano e levando futuramente, à instalação de uma microbiota prevalentemente anaeróbia estrita ou facultativa (Sundqvist¹⁴¹, 1994; Haapasalo et al.⁵⁶). A atividade reabsortiva na região periapical ocorre

concomitantemente com o fluxo de produtos, subprodutos, toxinas e fragmentos de células microbianas para este sítio, gerando destruição óssea resultante da interação entre os agentes patogênicos e o arsenal de defesa do hospedeiro, constituído de células imunocompetentes ativas e seus produtos, caracterizando as lesões periapicais ^{1,17,97}

A terapêutica endodôntica deve ser instituída, de acordo com cada fase da patogênese pulpo-periapical, assim, diagnosticar é preciso, para que se faça o uso correto e direcionado de agentes medicamentosos (Leonardo & Leal⁷³, 1998).

Os recentes avanços da Ciência e Tecnologia vêm imprimindo marcantes transformações nas diversas áreas do conhecimento. Grandes conquistas podem ser constatadas nas ciências aeroespaciais, bélica, e da informática. Em particular, as ciências biológicas dispõem atualmente de novas tecnologias, que permitem métodos de pesquisa revolucionários, entre estes, a bioengenharia que traz consigo novos materiais e instrumentos. A biologia molecular sinaliza com grandes avanços, possibilitando a compreensão da “chave da vida”, o DNA, possibilitando a execução de técnicas sofisticadas como a própria clonagem de seres vivos. Na taxonomia, as técnicas de biologia molecular estão levando a descobertas de novas espécies de microrganismos, e conseqüentemente, de novas classificações, a partir de seqüências de nucleotídeos (constituintes dos ácidos nucléicos).

A Endodontia tecnológica, que une aspectos técnicos

baseados em conhecimentos relacionados às ciências básicas, muito se beneficia deste contexto. Os aspectos microbiológicos que envolvem a patogênese da polpa e periápice, são estudados exaustivamente para determinação e conhecimento de espécies microbianas predominantes no sistema de canais radiculares infectados, norteados o tipo de terapêutica a ser empregada.

Os líderes educacionais, responsáveis pela ciência endodôntica, deveriam ter um forte compromisso com o respeito ético ao paciente, isto é, buscar o elo que está sendo perdido entre a tecnologia e o desenvolvimento técnico desta especialidade.

Assim, o aprimoramento de estratégias eficazes para a terapia endodôntica em casos de dentes portadores de gangrena pulpar e alterações imunoinflamatórias do periápice, depende diretamente da compreensão da microbiota que infecta o sistema de canais radiculares.

À partir da análise pioneira de Miller⁸⁶ da microbiota endodôntica em 1894, diversas são as técnicas, ao longo do século passado, utilizadas na identificação da microbiota dos canais radiculares: como cultura (Miller⁸⁶, 1894; Brown & Rudolph²⁰, 1957; Winkler & van Amerongen¹⁵², 1959; Keudell et al.⁶⁹, 1976; Byström & Sundqvist²¹, 1981; Tronstad et al.¹⁴⁷, 1987; Abou-Rass & Bogen¹, 1998), microscopia de fase/campo escuro (Miller⁸⁶, 1894; Brown & Rudolph²⁰, 1957), Imunofluorescência (Assed⁸, 1993; Bohorques¹⁸, 1994), coloração de Brown & Brenn específicas para evidênciação de bactérias em

microscópio óptico (Bohorques¹⁸, 1994; Ribeiro¹¹¹, 1997; Godoy⁴⁷, 1999), microscópio eletrônico de varredura (Nair⁹⁷, 1987; Tronstad et al.¹⁴⁶, 1990; Molven et al.⁸⁹, 1991; Leonardo et al.⁷⁶, 2002).

Os microrganismos constituintes da microbiota de canais radiculares infectados, somente puderam ser isolados e estudados após o desenvolvimento de técnicas de colheita, transporte e cultura (Brown & Rudolph²⁰, 1957; Socransky et al.¹³², 1959; Winkler & van Amerongen¹⁵², 1959; Sundqvist¹³⁹, 1976; Haapasalo⁵⁶, 1986; Sundqvist¹⁴⁰, 1992).

Até a década de 70, as bactérias mais comumente isoladas de canais radiculares infectados eram descritas como aeróbias e anaeróbias facultativas, como *Streptococcus* α hemolíticos, *Streptococcus* γ hemolíticos, *Enterococcus*, e menos freqüentemente *S. aureus* e *Streptococcus* β hemolíticos. As técnicas de cultura eram inadequadas para o isolamento de anaeróbios estritos. Com o aprimoramento de técnicas de culturas em anaerobiose pôde-se constatar a grande representatividade de espécies bacterianas anaeróbias estritas na microbiota das infecções endodônticas (Kantz & Henry⁶⁷, 1974; Keudell et al.⁶⁹, 1976; Sundqvist¹⁴⁰, 1992; Sundqvist¹⁴¹, 1994; Ribeiro¹¹¹, 1997).

A eliminação da microbiota de canais radiculares infectados, tem sido motivo de preocupação na Endodontia. Numerosos são os relatos sobre a avaliação da eficácia da instrumentação, soluções irrigadoras, e curativos de demora (Heithersay⁵⁹, 1975; Tronstad et al.¹⁴⁸, 1980; Bystrom & Sundqvist²¹, 1981; Anthony et al.⁶, 1982; Bystrom et

al.²², 1985; Barbosa et al.¹², 1997; Almyroudi et al.⁴, 2002; Berbert et al.¹⁴, 2002; Gomes et al.⁴⁸, 2002; Peters & Wesselink¹⁰⁵, 2002; Tanomaru Filho et al.¹⁴⁴, 2002).

É sabido que, bactérias podem sobreviver aos efeitos do preparo biomecânico de canais radiculares de dentes com necrose pulpar e portadores de lesão periapical crônica, representando fator de risco para o prognóstico da terapêutica instituída. Assim uma estratégia antimicrobiana deve ser direcionada para a eliminação de microrganismos residuais, erradicando a infecção, reduzindo os riscos de fracasso (Leonardo ^{71, 72}, 1967, 1975). Desta forma, o uso de medicação tópica intracanal, entre sessões, deve ser considerado essencial como complementação terapêutica na terapia endodôntica (Leonardo et al.⁷⁵, 1992).

O hidróxido de cálcio, dentre as substâncias medicamentosas empregadas como curativo de demora em endodontia, tem sido a mais indicada, devido às suas propriedades biológicas, tanto para tratamentos conservadores do tecido pulpar, como para tratamento de lesões periapicais crônicas. Porém, necessita de tempo para que, através da difusão dentinária dos íons hidroxila possa atingir a microbiota localizada no sistema de canais radiculares, biofilme, cementoplastos além dos microrganismos da infecção extra-radicular, exercendo sua ação deletéria sobre estes (Horiba et al.⁶²; 1990; Nerwich et al.¹⁰⁰, 1993; Nagaoka et al.⁹⁶, 1995; Ribeiro¹¹¹, 1997; Silveira¹¹⁹, 1997), e seus produtos (Safavi & Nichols¹¹⁵, 1993, Safavi & Nichols¹¹⁶, 1994; Nelson Filho ^{98,99}, 2000, 2002). A eficácia da terapêutica empregada com medicamentos de

utilização intracanal deve também ser monitorada (Leonardo⁷², 1975; Cvek et al.²⁸, 1976; Ørstavik¹⁰⁴, 1981; Stevens & Grossman ¹³⁵,1983; Bystrom et al.²², 1985; Ferraresi & Ito⁴⁰, 1990; Foreman & Barnes⁴², 1990; Sjogren et al.¹³⁰, 1991; Stuart et al.¹³⁶, 1991; Chong & Pitt Ford²⁵, 1992; Fava³⁹, 1993; Leonardo et al.⁷⁴, 1994; Estrela et al.^{38,36,37}, 1994, 1998, 1999; Siqueira & Uzeda¹²¹, 1996; Alencar et al.³, 1997; Barbosa et al.¹², 1997; Silveira¹¹⁹, 1997; Siqueira & Uzeda¹²², 1997; Siren et al.¹²⁹, 1997; Leonardo et al.⁷⁹, 1999).

Alguns estudos de identificação de microrganismos da cavidade bucal, com o emprego das novas técnicas moleculares, apontam para a presença de espécies bacterianas jamais cultivadas naquelas lesões específicas, demonstrando maior acuracidade que quaisquer das técnicas utilizadas até hoje (Conrads et al.²⁶, 1997; Sachs & Hotzel¹¹⁴, 1998; Gonçalves & Mouton⁵², 1999; Siqueira Jr. et al.¹²⁴, 2000; Fouad et al.⁴¹, 2002; Munson et al.⁹⁵, 2002).

Para Kantz & Henry⁶⁷ (1974), antes do advento das inovações das técnicas de coleta e cultura de microrganismos em anaerobiose, todos exames microbiológicos de canais radiculares falharam no isolamento de bactérias anaeróbias em níveis consideráveis, pois aqueles exames eram baseados na coloração de Gram, morfologia da colônia (culturas em aerobiose) e testes bioquímicos. Utilizando a nova metodologia de cultura em anaerobiose, identificaram *Actinomyces israelii*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Campylobacter sputorum*, *Eubacterium alactolyticum*, *Fusobacterium fusiformis*, *Fusobacterium varium*, *Peptococcus morbillorum*, *Propionibacterium*

acnes, *Veillonella parvula*, além de várias outras. Nesse estudo não encontraram outras espécies de *Actinomyces*, bacilos anaeróbios formadores de esporos e treponemas.

De acordo com Harper-Owen et al.⁵⁸ (1999), as espécies cultiváveis podem ser consideradas apenas nos estudos qualitativos de microrganismos. Em 1963, Socransky et al.¹³² já alertavam para a imprecisão quanto às espécies que participam da colonização e patologia pulpar e periapical, afirmando naquela ocasião que 50% da microbiota oral não podiam ser cultivadas.

O desenvolvimento das técnicas moleculares trouxe um grande avanço para a microbiologia, podendo ser utilizadas na endodontia para identificação de espécies bacterianas relacionadas ou não com a patogênese pulpar e periapical, até então não evidenciadas por meio das técnicas disponíveis (Menard & Mouton⁸⁴, 1993; Conrads et al.²⁶, 1997; Bogen & Slots¹⁷, 1999; Gonçalves & Mouton⁵², 1999; Gonçalves et al.^{53,54}, 1999; Gatti et al.⁴⁵, 2000; Siqueira et al.¹²⁸, 2000; Sunde et al.¹³⁸, 2000; Jung et al.⁶⁵, 2001; Rolph et al.¹¹³ 2001; Fouad et al.⁴¹, 2002; Munson et al.⁹⁵, 2002). Exemplo disto é *Bacteroides forsythus*, jamais descrito na literatura como participante das lesões endodônticas ou periodontais, até o emprego de biologia molecular, que evidencia esta espécie bacteriana como sendo um dos microrganismos mais freqüentes nestas patologias (Guillot & Mouton⁵⁵, 1996; Conrads et al.²⁶, 1997; Meurman et al.⁸⁵ 1997; Gonçalves & Mouton⁵², 1999; Gatti et al.⁴⁵, 2000; Siqueira Jr. et al.¹²⁸,

2000, Sunde et al.¹³⁸ 2000).

A técnica PCR ("polymerase chain reaction", ou reação em cadeia da polimerase), é um dos métodos de biologia molecular idealizada em 1983 por Mullis et al.^{34,92,93,94}, que visa sintetizar, à partir de uma tira matriz de DNA proveniente de qualquer amostra biológica, por meio de reação enzimática *in vitro*, ampliações em grandes quantidades de seqüências específicas seccionadas daquele DNA, denominadas de *amplicons* ou produtos do PCR. A técnica permite identificação da origem da amostra, com alto grau de sensibilidade.

Diversas áreas da Ciência beneficiaram-se das aplicações do PCR. Útil na identificação de microrganismos causadores de enfermidades; diagnóstico de doenças genéticas; na medicina forense, como meio para análise de vestígios mínimos de material biológico, viabilizando a identificação de indivíduo do qual a amostra se originou (Alberts et al.², 1997); pesquisa da evolução de espécies, além de outros empregos.

Na Microbiologia sua importância é notória, identificando taxonomicamente microrganismos, uma vez que os níveis de DNA microbiano presentes em amostras clínicas são freqüentemente muito baixos (Fredricks & Relman⁴⁴, 1999). Devido ao fato de que cada microrganismo tem um único complemento de DNA (ou RNA), estas moléculas podem funcionar como uma "impressão digital", ajudando em suas identificações (Jung et al.⁶⁴, 2000).

A vantagem da técnica está na rápida execução, e pode ser encarada como ferramenta adicional: se a adoção de testes bacteriológicos (baseados em culturas), outrora refutados (Leonardo⁷², 1975), por não representar com exatidão correspondência com a microbiota endodôntica em tempo real, nos dias de hoje, pode-se lançar mão destas técnicas como complemento, no sentido de identificar a microbiota com agilidade, e direcionar o arsenal terapêutico contra microrganismos patogênicos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, leveduras²⁹ e bactérias entéricas com resistência intrínseca).

Chong & Pitt Ford²⁵ (1992) em revisão de literatura sobre curativos de demora em Endodontia, apontaram para a necessidade de testes bacteriológicos em casos refratários ao tratamento endodôntico, auxiliando na seleção da medicação mais apropriada. A eficácia de novos medicamentos empregados como curativo de demora, pode (e deve) ser checada por estas técnicas.

Os implementos desenvolvidos em decorrência de grandes saltos tecnológicos da Ciência, são de grande valor no tratamento de canais radiculares. Com o advento das técnicas moleculares, vislumbra-se uma nova fase da Endodontia tecnológica, onde o operador possa estar identificando microbiota específica das pulpoperiapicopatias, com segurança e precisão, direcionando terapias apropriadas e elevando índices de sucesso de seus tratamentos.

Revisão da literatura

▪ Microbiota das patologias pulpares e periapicais

Miller⁸⁶ (1894), em trabalho pioneiro, inicia uma linha de estudo das patologias pulpares, correlacionando-as à presença de bactérias. Profetizou que a nova abordagem, relacionando microrganismos às patologias pulpares, poderia apresentar não apenas valor experimental, mas aplicabilidade no tratamento de condições patológicas dos dentes e tecidos vizinhos.

Brown & Rudolph²⁰ (1957), selecionaram 70 pacientes cujos dentes apresentavam ausência de: exposição pulpar, lesões cáries profundas, defeitos anatômicos, restaurações extensas, envolvimento periodontal e história de trauma, para estudo da microbiota pulpar. Efetuando culturas em aerobiose e anaerobiose e avaliação direta dos espécimes por microscopia de fase/contraste e campo escuro, observaram microrganismos em 90% dos casos. Apontaram para o fato que microrganismos não cultiváveis (anaeróbios estritos), podem ser observados na microscopia, enfatizando a importância das técnicas alternativas na evidência das bactérias. Pela cultura encontraram 51,3% de anaeróbios facultativos, 23,9% de anaeróbios obrigatórios e

23,9% de aeróbios respectivamente presentes nos canais radiculares infectados.

Winkler & van Amerongen¹⁵² (1959), apresentaram os resultados bacteriológicos de 4000 culturas de canais radiculares. Relataram o isolamento de estreptococos em 63% dos casos: hemolíticos, estreptococos facultativos, principalmente, pertencentes aos grupos sorológicos F, G e C, e estreptococos do grupo D (especialmente o *Streptococcus liquefaciens*) e *Streptococcus mitis*.

Takehashi et al.⁶⁶ (1965), observaram as alterações patológicas resultantes de exposições pulpares em ratos *germ-free*, comparadas com aquelas em ratos convencionais com microbiota normal. Os períodos pós-operatórios analisados variaram de 1 a 42 dias. Os animais foram mortos e as maxilas removidas processadas e corados pelas técnicas hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson e Brown & Brenn. Em animais convencionais foi observada, a partir do oitavo dia, vitalidade pulpar apenas na metade apical. Em casos de períodos mais prolongados, constataram necrose pulpar total com formação de granulomas e abscessos em todos espécimes. Em contrapartida, nos animais *germ-free*, não observaram necrose pulpar, granulomas apicais ou abscessos. A formação de ponte dentinária foi vista à partir do 14º dia. Concluíram, então, que a presença ou ausência de microbiota é o fator

primordial na reparação pulpar em roedores.

Leonardo⁷¹ (1967), salientando as regiões do sistema de canais radiculares em que os microrganismos podem se propagar (zonas de propagação bacteriana), teceu considerações em torno dos métodos utilizados para tratamento de canais radiculares de dentes despulpados e infectados. Evidenciou o valor temporário do preparo biomecânico na desinfecção, sugerindo a importância da aplicação tópica de medicação, tornando o canal radicular propício à recepção do passo subsequente: a obturação.

Berg & Nord¹⁵ (1973), em estudo in vivo, utilizaram técnica especial de colheita para anaeróbios em dentes infectados de humanos, empregaram mistura gasosa de 3% de hidrogênio em nitrogênio, aplicada sobre o campo operatório (coroa e canal radicular), obtendo maior quantidade de bactérias anaeróbias, que as técnicas convencionais.

Kantz & Henry⁶⁷ (1974), coletaram amostras de 24 dentes necrosados de humanos com cavidade pulpar intacta de 20 pacientes. Desenvolveram nova metodologia para manter a anaerobiose durante a coleta de amostras de canais radiculares, como também para o transporte e identificação. Isolaram um total de 104 anaeróbios de 377 microrganismos, entre eles: *Actinomyces israelii*, *Bacteroides fragilis*,

Bacteroides melaninogenicus, *Campylobacter sputorum*, *Eubacterium alactolyticum*, *Fusobacterium fusiformis*, *Fusobacterium varium*, *Peptococcus morbillorum*, *Propionibacterium acnes*, *Veillonella parvula*. Porém não encontraram outras espécies de *Actinomyces*, bacilos anaeróbios formadores de esporos e treponemas.

Em 1975, Leonardo⁷² apontou para a controversa questão da importância do teste bacteriológico negativo de canais radiculares no momento de sua obturação, considerado de importância pela literatura. O autor comparou os resultados obtidos pelo tratamento de canais radiculares de dentes despulpados infectados e com reação periapical, obturados, quer com testes bacteriológicos negativos ou positivos. Efetuando o controle clínico radiográfico por um período mínimo de dois anos, concluiu que não existe diferença estatística significativa entre os resultados obtidos.

Keudell et al.⁶⁹ (1976), analisaram a microbiota isolada de cavidades pulpaes de 55 dentes de humanos (dos quais 13 com vitalidade pulpar e 42 com necrose pulpar). As amostras foram colhidas dos dentes sob fluxo de dióxido de carbono (97%) e hidrogênio (3%) livre de oxigênio, direcionada ao redor da abertura coronária. A técnica de identificação microbiológica utilizada foi a preconizada pelo Laboratório de Anaerobiose do Instituto Politécnico da Virgínia (VPI), para detecção

de anaeróbios obrigatórios. Anaeróbios facultativos foram identificados por procedimentos convencionais. Não foram detectadas bactérias anaeróbias nos 13 dentes com vitalidade pulpar. Dos dentes com necrose pulpar, 64% apresentavam anaeróbios obrigatórios, indo ao encontro de achados microbiológicos relatados por outros autores.

Sundqvist¹³⁹ (1976), avaliou a microbiota endodôntica, utilizando a técnica de cultura de microrganismos anaeróbios (câmara de anaerobiose com mistura de gases: hidrogênio, dióxido de carbono e nitrogênio, e eliminação catalítica do oxigênio e umidade relativa entre 30 e 50%). Para isso selecionou 32 dentes expostos a traumatismos. Destes, 19 apresentavam lesões periapicais evidentes, radiograficamente visíveis, com variação de 2 a 10mm de diâmetro. Os demais (13 dentes) não apresentaram imagens de lesões periapicais. Dos dentes com lesão periapical, detectaram microrganismos em 18, e nenhum em dentes sem lesão. Ao todo, 88 cepas bacterianas foram isoladas e constatou que quanto maior a lesão, maior o número de espécies bacterianas encontradas. Dentes portadores de quadros agudos, também, apresentavam maior número de bactérias.

Bystrom & Sundqvist²¹ (1981), avaliaram a eficácia da instrumentação manual em 15 dentes unirradiculados, portadores de necrose pulpar e lesão periapical, empregando como solução irrigadora o

soro fisiológico. Verificaram que o número de espécies bacterianas por canal radicular variou de 1 a 10, a média de células foi de 4×10^5 , variando de 10^2 a 10^7 , e os anaeróbios obrigatórios representavam 88% da amostragem. Após cada preparo biomecânico, o número de células bacterianas nos canais radiculares reduziu de 10^2 a 10^3 . Após quatro preparos biomecânicos, 47% da amostragem ainda apresentou crescimento bacteriano. As espécies mais comumente isoladas foram *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella oralis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium alactolyticum* e *Prevotella intermedia*. Os canais radiculares que permaneceram infectados ao final dos vários preparos biomecânicos, foram aqueles com elevado número de bactérias na amostra inicial.

Morse⁹¹ (1981), realizou estudo onde caracterizou a microbiota relacionada às patologias da polpa e periápice. De acordo com o autor, antes de 1970, as espécies mais comumente isoladas dos canais radiculares eram de estreptococos de grupo alfa-hemolíticos (aeróbios facultativos gram-positivos), que eram isolados usando técnicas de cultura padronizadas em aerobiose. Posteriormente, com o advento de novas técnicas de colheita, transporte e cultura em anaerobiose, constataram considerável população de bactérias anaeróbias estritas em canais radiculares infectados.

Nair et al.⁹⁷ (1987), avaliaram a microbiota do canal radicular e região periapical em 31 dentes infectados de humanos, portadores de necrose pulpar e lesão periapical crônica usando microscópio óptico e microscópio eletrônico de transmissão. 80,8% dos dentes estavam assintomáticos e todos os canais radiculares apresentaram microbiota mista. Das lesões avaliadas, apenas quatro granulomas e um cisto apresentaram bactérias localizadas intra e extracelularmente. Notaram predomínio de cocos, bacilos e formas filamentosas, e menos freqüentemente, densos agregados de bactérias aderidas à parede dentinária ou livres, cercadas de PMN. Em alguns segmentos havia várias camadas de bactérias condensadas, consistindo de vários morfotipos, com as formas filamentosas e cadeias de cocos se orientando perpendicularmente à parede do canal. Raramente, quando espessas o bastante, eram vistas pelo microscópio óptico, como estrutura em paliçada. Quatro granulomas continham bactérias no seu interior, caracterizando actinomicose. Em três casos, a placa bacteriana constituída por cocos, bacilos, filamentosos e espiroquetas, estendia-se pelo corpo da lesão, causando, diversos graus de necrose tecidual ou resposta inflamatória aguda. Ocorreu uma lesão cística, onde, em seu lúmen foram observadas bactérias isoladas e agregadas. Observaram numerosos neutrófilos contendo filamentosos em seu interior. Apenas em uma amostra, a microbiota na área do forame apical não estava separada do corpo da lesão por barreira de PMNs ou tecido da lesão, sendo

considerado “granuloma dormente”.

Tronstad et al.¹⁴⁷ (1987), examinaram a presença de bactérias em 8 dentes com lesões periapicais e assintomáticas, refratárias ao tratamento endodôntico convencional. O acesso às lesões periapicais foi conseguido por meio de técnicas cirúrgicas assépticas. Curetas esterilizadas foram utilizadas para a coleta do tecido mole das lesões e cortes superficiais das porções apicais. Utilizaram o meio para transporte VMGA III de Moller, e as culturas efetuadas em anaerobiose. Evidenciaram o crescimento bacteriano nas amostras das 8 lesões, dentre as quais 2 apresentaram, exclusivamente, bactérias anaeróbias e 5 lesões estavam intensamente colonizadas por anaeróbios. Encontraram espécies de *Bacteroides* pigmentados de negro, assim como, bacilos anaeróbios gram-positivos e cocos. Espécies de estreptococos facultativos, foram raramente isolados. Concluíram que bactérias anaeróbias são capazes de sobreviver e manter o processo infeccioso nos tecidos periapicais.

Ando & Hoshino⁵ (1990), investigaram a presença e os tipos de bactérias invasoras de camadas profundas (0,5 a 2,0mm da superfície da parede do canal radicular) de dentina de canais radiculares infectados de 8 dentes de humanos, recém-extraídos. Encontraram bactérias anaeróbias obrigatórias em 80% dos casos, com predominância

dos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*. Não encontraram nenhuma cepa de bacilos anaeróbios gram-negativos nas camadas profundas de dentina. Concluíram que a microbiota de camadas profundas da dentina apresenta similaridade com aquela coletada das camadas profundas de lesões cariosas de dentina coronária.

Horiba et al.⁶² (1990), avaliaram a distribuição de endotoxina nas paredes de canais radiculares de dentes infectados, examinando o pó de dentina destas regiões, em várias profundidades. Os dentes com reação periapical radiograficamente visível apresentaram maior conteúdo de endotoxinas, que foram quantificadas através de método colorimétrico. O conteúdo de LPS foi significativamente mais elevado em amostras da superfície da parede pulpar até 300µm em profundidade. Detectaram para todas as amostras a presença de endotoxinas.

van Winkelhoff et al.¹⁴⁹ (1992), teceram considerações quanto a espécies de bacteróides pigmentados de negro do gênero *Porphyromonas*: *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *P. assacharolytica*, que diferenciam-se por suas características bioquímicas. *P. endodontalis* é um bacilo não fermentativo, que exige fatores de crescimento, e é uma espécie caracterizada pela alta sensibilidade ao O₂, baixa virulência, resistência à fagocitose.

Drake et al.³² (1994), analisaram o efeito da camada residual (*smear layer*) sobre a retenção de bactérias usando um modelo *in vitro* de colonização bacteriana do canal radicular. Utilizaram 26 caninos extraídos de humanos, submetidos à biomecânica pela técnica de recuo progressivo, utilizando solução de NaOCl a 2,5%. Em seguida os dentes foram randomicamente, divididos em dois grupos, baseados no tipo de solução irrigadora final, a saber: 1-20mL de solução salina esterilizada ou 2-10mL de EDTA seguido de 10mL de NaOCl a 2,5%, para a remoção da camada residual (para o segundo grupo). Como indicador utilizaram o *Streptococcus anginosus (milleri)* em alíquotas de 3,0μL contendo 10⁶ufc. Os dentes inoculados e incubados foram seccionados e processados para análise microbiológica. Houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos testados: 10⁴ufc para dentes com camada residual preservada e 10⁵ufc para aqueles sem camada residual. Sugeriram que a camada residual produzida durante o preparo biomecânico pode inibir a colonização bacteriana dos canais radiculares. Ainda, sugeriram que a camada residual pode bloquear a entrada de bactérias em túbulos dentinários.

Sundqvist¹⁴¹ (1994), em estudo taxonômico concluiu que durante o curso da infecção endodôntica, inter-relações nutricionais (cadeia alimentar) se desenvolvem entre espécies microbianas, e os

shifts microbianos ocorrem como resultado destas relações. A patogenicidade da microbiota polimicrobiana do canal radicular é dependente do sinergismo microbiano.

Nagaoka et al.⁹⁶ (1995), no intuito de estudar o padrão de invasão bacteriana de túbulos dentinários utilizaram 19 pares de dentes de humanos (3^{os} molares) com ou sem vitalidade pulpar. Em cada caso, 30 ou 50 dias antes da exodontia, foram feitas, unilateralmente, pulpectomias e obturações dos canais. Cavidades de classe V envolvendo tecido dentinário foram confeccionadas na face palatina de cada dente (bilateralmente), e deixadas sem proteção e em contato com a microbiota oral, até que as extrações fossem realizadas. Postularam assim que dentes com vitalidade pulpar foram mais resistentes à invasão bacteriana dos canalículos dentinários comparados a aqueles dentes que passaram pelo tratamento endodôntico, sugerindo que polpas vitais exercem importante papel no impedimento de colonização bacteriana dos túbulos dentinários.

Assed et al.¹⁰ (1996), por meio de técnica de imunofluorescência indireta, estudaram a presença de 4 espécies bacterianas, *Actinomyces viscosus*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* em materiais colhidos antes da realização do preparo biomecânico de canais radiculares, de 25 dentes de

humanos com lesão de cárie, polpa necrótica e presença de reação periapical radiograficamente visível. A câmara coronária foi acessada sob condições assépticas, sendo o material recolhido com pontas de papel esterilizadas e colocadas em tubos de ensaio com fluido para transporte reduzido (RTF). Relataram que a reação de imunofluorescência indireta foi positiva em 24 de 25 amostras. Quatorze foram positivas para a espécie *Actinomyces viscosus*, 12 para *Prevotella intermedia*, 10 para *Fusobacterium nucleatum* e 4 para *Porphyromonas gingivalis*. Concluíram que a técnica utilizada para detecção de microrganismos apresentou maior acuracidade, se comparada às técnicas convencionais de cultura, além de ser uma técnica de rápida execução para detecção de anaeróbios em canais radiculares.

Gomes et al.⁵⁰ (1996), observaram que determinadas espécies bacterianas da microbiota endodôntica, estão relacionadas à presença de sinais e sintomas de origem endodôntica. Correlacionaram a presença de *Prevotella* spp/ *Peptostreptococcus* spp, *Prevotella melaninogenica*/ *Peptostreptococcus* spp e *Peptostreptococcus micros*/ *Prevotella melaninogenica* à dor espontânea; *Peptostreptococcus micros*/ *Prevotella* spp, relacionados à inflamação periodontal e, *Prevotella* spp/ *Eubacterium* spp e *Peptostreptococcus* spp/ *Eubacterium* spp, nos casos de canais úmidos. Concluíram que as bactérias gram-negativas são de fundamental importância clínica, pois as endotoxinas podem ser liberadas

no meio, ativando fator de Hageman e ativando a formação de bradicinina, potente mediador da dor.

Bae et al.¹¹ (1997), estudaram a ocorrência de *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* em infecções endodônticas utilizando a técnica sulfato dodecil de sódio poliacrilamida gel-eletroforese (SDS-PAGE) para a detecção da totalidade das proteínas celulares destas bactérias, possibilitando a distinção entre espécies. Isolaram 56 cepas de bacilos pigmentados de negro(BPN) provenientes de infecção endodôntica, previamente identificadas como *P. intermedia*. Com o uso desta técnica laboratorial, puderam distinguir as duas espécies, através das diferenças de pesos moleculares, registrados em diferentes bandas no processo de gel-eletroforese. Das 56 cepas de BPN, 41 (73,2%) foram identificadas como *P. nigrescens* e 15 (28,8%) como *P. intermedia*. Concluíram que *P. nigrescens* (e não *P. intermedia*), apresenta-se como o BPN mais comumente isolado de infecção de origem endodôntica.

Ribeiro¹¹¹ (1997), analisou a distribuição das bactérias nas estruturas mineralizadas de dentes portadores de necrose pulpar e nos granulomas apicais. Utilizou 32 raízes dentárias com lesões periapicais firmemente aderidas a seus ápices e 16 lesões isoladas, em cortes para fins de diagnóstico microscópico com laudos conclusivos de granulomas apicais. Os espécimes foram analisados pelo microscópio óptico.

Evidenciaram alta frequência de bactérias gram-positivas e gram-negativas no lume do canal principal e nas ramificações constituintes do delta apical, e também, em menor proporção nos túbulos dentinários, cementoplastos, superfície radicular externa e nos granulomas apicais. Sugeriu a necessidade do preparo biomecânico auxiliado por substâncias químicas antibacterianas, emprego de curativo de demora, além de adequado selamento do canal radicular em tratamentos de dentes com necrose pulpar e lesão periapical crônica.

Abou-Rass & Bogen¹ (1998), estudaram a microbiota de lesões periapicais após uma seleção criteriosa de casos clínicos cujas lesões não apresentassem quaisquer possibilidades de comunicação com a microbiota da cavidade oral, denominadas lesões fechadas. Treze casos de setenta, indicados para cirurgia parendodôntica foram selecionados para o estudo. Três amostras de cada caso foram coletadas pelo mesmo clínico: amostra 1- colhida com pontas de papel esterilizadas da periferia da lesão; amostra 2- porção do tecido inflamado e enucleado, e a amostra 3 - coletada com pontas de papel esterilizadas, do ápice, após a enucleação do tecido patológico. Todos os materiais foram submetidos à técnica de cultura anaeróbia. Em todos os 13 casos, as amostras coletadas do ápice mostraram presença de 63,6% de anaeróbios obrigatórios e 36,4% de anaeróbio facultativos. Com relação às espécies bacterianas foram encontrados 31,8% de *Actinomyces* sp., 22,7% de

Propionibacterium sp., 18,2% de *Streptococcus* sp., 13, 6% de *Staphylococcus* sp., 4,6% de *Porphyromonas gingivalis*, 4,6% de *Peptostreptococcus micros* e 4,6% de bactérias entéricas gram-negativas. Mostraram que lesões periapicais fechadas abrigam bactérias e que a dificuldade em erradicar os microrganismos do canal radicular durante o tratamento endodôntico, somados aos fatores anatômicos, pode facilitar a colonização do ápice radicular e tecidos periapicais circunjacentes, inibindo a reparação.

Bonifácio¹⁹ (2000), utilizando o microscópio eletrônico de varredura observou a prevalência de biofilme apical bacteriano em 100% das amostras de dentes de humanos portadores de reação periapical radiograficamente visível, associado à formação de zonas de reabsorção (crateras apicais), no entanto em dentes diagnosticados como portadores de polpas vitais, ou necrosados sem reação periapical visível radiograficamente (Grupos I e II) apresentavam normalidade estrutural e ausência de biofilme bacteriano apical.

Peters et al.¹⁰⁷ (2002) investigaram as combinações entre bactérias encontradas nas infecções endodônticas em dentes portadores de lesões periapicais sem sintomatologia nem sinais clínicos. Utilizaram amostras provenientes de 58 canais radiculares que foram cultivadas em anaerobiose, sendo os microrganismos contados e classificados. Oitenta

e uma combinações entre microrganismos foram encontradas e testadas em relação simbiótica, utilizando o teste exato de Fisher e Cálculo de razão de Odds. Todas as amostras continham microrganismos com uma média de ufc/mL (-1) de 8×10^4 por amostra. Espécies anaeróbias estritas foram encontradas em 87% de toda microbiota. As espécies bacterianas mais prevalentes foram *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros* e *Actinomyces odontolyticus*, presentes em 33, 29 e 19% respectivamente, dos canais radiculares testados. Uma significativa relação ($p < 0.05$) e uma razão de Odds > 2 , foram encontradas entre *P. intermedia* e *P. micros*, *P. intermedia* e *P. oralis*, *A. odontolyticus* e *P. micros*, *Bifidobacterium* spp. e *Veillonella* spp. Concluíram que patógenos que contaminam o endodonto não ocorrem de maneira randômica, mas são encontrados em combinações específicas.

- O uso do hidróxido de cálcio e associações na redução microbiana de canais radiculares infectados

Nygren¹⁰² (1838), é apontado como o autor do primeiro trabalho sobre o uso de hidróxido de cálcio contra afecções infecciosas dos dentes, preconizando seu uso para tratamento de fístulas dentais.

Em 1920, Herman introduz o hidróxido de cálcio na odontologia, empregando o Calxyl para capeamento de polpas expostas, observando reparo⁷³.

Rhoner¹¹⁰ (1940), pesquisa a utilidade do Calxyl na obturação de canais radiculares. No seu estudo in vivo, foram utilizados 20 dentes de humanos, submetidos à pulpectomia e preenchidos com o material. Posteriormente, foram analisados histologicamente 18 dentes, dos quais 13 considerados como casos de sucesso.

Frank⁴³ (1966), apresentou 3 casos clínicos, demonstrando o benefício do uso de pasta à base da associação de hidróxido de cálcio e paraclorofenol canforado no tratamento de dentes despulpados portadores de lesões periapicais e na rizogênese incompleta por induzir formação apical.

Binnie & Rowe¹⁶ (1973), induziram infecção em canais radiculares de dentes de cães, e após a realização do preparo biomecânico, obturaram com cimento de Grossman, Calxyl ou pasta de Ca(OH)_2 veiculada em água destilada. Observaram que este último material proporcionou melhores resultados frente ao quadro infeccioso. Concluíram que o hidróxido de cálcio é um material biológico para obturação de canais radiculares.

Heithersay⁵⁹ (1975), relacionando os benefícios do emprego do hidróxido de cálcio em dentes de humanos portadores de polpa necrótica e lesão periapical, concluiu que seu emprego simplifica o tratamento, e também colabora com a reparação tecidual.

Kawahara et al.⁶⁸ (1975), estudaram a eficácia antimicrobiana de concentrações reduzidas de paraclorofenol em solução aquosa contra 3 espécies bacterianas: o *Streptococcus faecalis* o *Streptococcus mitis* e o *Staphylococcus epidermidis* em câmaras coronárias de dentes extraídos de humanos. Observaram que, em pequenas doses (10µL de solução aquosa a 2%), o produto teve ação ótima sobre a redução bacteriana em até 72h contra todas as espécies utilizadas. Com estes resultados alertaram que o paraclorofenol não deve ser utilizada em altas concentrações (como no caso da associação com a cânfora, com relação de 3,5:6,5) devido ao seu efeito deletério sobre os

tecidos vivos, e também por ser eficaz em quantidades reduzidas.

Cvek et al.²⁸ (1976), utilizaram 141 incisivos permanentes de humanos, com rizogênese completa ou não, sem vitalidade pulpar, com ou sem reações periapicais radiograficamente visíveis. Avaliaram o efeito do tratamento endodôntico, clínica, microbiológica e radiograficamente. Os casos foram divididos em três grupos, de acordo com a solução irrigadora empregada: (I) soro fisiológico, (II) líquido de Dakin e, (III) solução de hipoclorito de sódio a 5%. Todos os canais foram preenchidos na mesma sessão com hidróxido de cálcio veiculado em ringer, sendo analisados após os períodos de 3 e 6 meses. No período de observação inicial constataram ausência de crescimento bacteriano em 90% dos casos, independente da condição pré-tratamento. Monitoraram as espécies bacterianas encontradas (com testes bioquímicos para bactérias aeróbias e análise cromatografia gasosa para anaeróbios) após o preparo biomecânico, e a utilização do curativo. Julgaram ser o hidróxido de cálcio eficaz em sua propriedade antimicrobiana, independente do acréscimo de quaisquer outras substâncias que pudessem lhe conferir potencialização.

Martin & Crabb⁸² (1977), realizaram uma revisão sobre o uso do hidróxido de cálcio como material endodôntico, e seu papel na endodontia conservadora. Com relação às suas propriedades

antimicrobianas, sugeriram o uso desta substância como alternativa ao uso de derivados fenólicos, apontando a ação higroscópica sobre a exsudação persistente quando usado no interior de canais infectados.

Holland et al.⁶⁰ (1978), testaram o poder antimicrobiano dos vapores do tricresol formalina, paramonoclorofenol, paramonoclorofenol canforado, paramonoclorofenol + furacin, creosoto de faia, eugenol e da cresatina, contra microrganismos isolados de canais infectados de dentes de humanos. Realizaram testes microbiológicos por contato e à distância e mostraram eficiência do tricresol formalina e do paramonoclorofenol (tanto por contato como à distância). O paramonoclorofenol canforado, paramonoclorofenol + furacin, e o creosoto de faia apresentaram ação antibacteriana apenas por contato, e, por fim, o eugenol e a cresatina, não atuaram à distância e apresentaram pequena ação antimicrobiana por contato.

Martins et al.⁸³ (1979), estudaram em 60 dentes de humanos, com necrose pulpar, a ação antibacteriana de alguns curativos empregados em tratamentos endodônticos: pasta de hidróxido de cálcio, paramonoclorofenol aquoso a 1%, e mistura de ambos, utilizados após a biomecânica, em períodos de 48 e 72h. Após a colheita, as amostras, foram submetidas a culturas em meio tioglicolato de Brewer, incubadas a 37°C, por 7 dias, após os quais foram feitos esfregaços corados pelo

método de Gram. Os melhores resultados da redução da microbiota foram atribuídos à associação hidróxido de cálcio/paramonoclorofenol aquoso a 1%, seguido da pasta de Ca(OH)_2 e paramonoclorofenol a 1% (aplicado em cone de papel).

Costa et al.²⁷ (1981), analisaram a evolução clínica de 13 canais radiculares em dentes de humanos portadores de extensas lesões periapicais, submetidas ao preparo biomecânico e preenchimento com hidróxido de cálcio associado ao paramonoclorofenol canforado. Após proservações de 2 a 10 meses, constataram reduções dimensionais das lesões e executaram as obturações definitivas. Sugeriram que o curativo à base de hidróxido de cálcio pode potencializar o processo de reparação de dentes com lesões periapicais.

Anthony et al.⁶ (1982), em estudo *in vitro*, utilizando dentes extraídos de humanos, avaliaram o pH de pastas de Ca(OH)_2 quando associado aos seguintes veículos: (a) cresatina, (b) PMCC e (c) soro fisiológico, nos períodos de 6, 24, 48 e 72 horas e 1 e 2 semanas. Concluíram que as pastas de Ca(OH)_2 veiculadas em PMCC e soro fisiológico apresentaram pH mais elevado que aquela veiculada em cresatina.

Di Fiore et al.³⁰ (1983), avaliaram a ação antibacteriana *in*

vitro de quatro pastas à base de hidróxido de cálcio utilizadas para indução de apicificação, tendo como veículos: paraclorofenol canforado, acetato de metacresil, metil celulose (Pulpdent) e água destilada esterilizada. Em placas de ágar-sangue inoculadas com *Streptococcus sanguis* foram aplicados cilindros contendo as pastas e selados com Cavit. Um cilindro vazio e selado com Cavit foi usado como controle. As placas foram incubadas e os halos de inibição registrados nos períodos de 2, 4, 6 e 8 dias. Mostraram ausência de halos de inibição para a pasta Ca(OH)_2 + água destilada e veiculada em metilcelulose (Pulpdent). Constataram a formação de halos de inibição para o Ca(OH)_2 + PMCC e para o Ca(OH)_2 + acetato de metacresil, para todos os períodos de tempo estudados, e também a redução de atividade com o tempo.

Stevens & Grossman¹³⁵ (1983), avaliaram o potencial antimicrobiano do hidróxido de cálcio (em forma de pasta, e o produto comercial - Pulpdent), em comparação com o clorofenol canforado, frente à *Serratia marcescens* e *Streptococcus faecalis*, tanto *in vivo* (dentes caninos de gatos) quanto *in vitro* (teste de difusão em ágar). Sobre o primeiro microrganismo notaram ação bactericida de todos os medicamentos utilizados, ao passo que para o *S. faecalis*, os produtos à base de hidróxido de cálcio não foram tão eficazes quando comparados ao clorofenol canforado.

Byström et al.²² (1985), em estudo utilizando 65 dentes de humanos, unirradiculados e portadores de reações periapicais radiograficamente evidentes, avaliaram pelo método bacteriológico o efeito dos curativos de demora: paramonoclorofenol canforado, fenol canforado e hidróxido de cálcio. Em 35 canais empregaram como soluções irrigadoras o líquido de Dakin (20 casos), hipoclorito de sódio a 5% (15 casos). Após a biomecânica, os canais foram secos e preenchidos com pasta Calasept. Os 30 dentes restantes foram irrigados com líquido de Dakin, e receberam curativo de paramonoclorofenol canforado (15 casos), e fenol canforado (15 casos). Amostras bacterianas foram coletadas após o preparo biomecânico e após os períodos de 15 dias (para os grupos dos curativos fenólicos) e 30 dias (para o Calasept). Uma terceira colheita foi realizada em 5 dentes medicados com a pasta Calasept, que foram esvaziados, assim permanecendo por 2 a 4 dias após a 2ª colheita. Todas as amostras foram cultivadas em anaerobiose. Como resultados, observaram bactérias em apenas 1 dos 35 casos tratados com o Calasept, e que nos outros grupos (fenólicos), observaram bactérias em 10 dos 30 casos, comprovando eficácia do medicamento na redução bacteriana de canais infectados.

Quackenbush (1986)¹⁰⁹, avaliou *in vitro* a atividade de 3 tipos de medicamentos endodônticos contra bactérias anaeróbias (monoclorofenol, iodo iodetado de potássio (IKI) e hidróxido de cálcio). As cepas de

Peptostreptococcus sp. (anaeróbio obrigatório) e *Streptococcus sanguis* (anaeróbio facultativo) cultivadas em ágar-chocolate em anaerobiose por 24h a 37°C foram inoculadas em canais. Os medicamentos testados foram colocados nos canais e incubados em jarras de anaerobiose por 48h a 37°C. Findo o período, os canais foram irrigados com 3mL de soro fisiológico, sendo que 0,1mL do irrigante removido foi semeado sobre placas de Petri contendo ágar-chocolate, incubados por 72h em jarra de anaerobiose. Constatou que o monoclorofenol e o iodo iodetado de potássio não foram eficazes *in vitro* contra anaeróbios, ao passo que o hidróxido de cálcio foi eficaz contra as duas espécies analisadas.

Byström et al.²³ (1987), utilizando técnicas bacteriológicas de anaerobiose, demonstraram que bactérias foram eliminadas de canais radiculares que receberam, entre sessões, curativos à base de hidróxido de cálcio, antes da etapa final do tratamento endodôntico, a obturação. A reparação das lesões periapicais dos dentes foi acompanhada por 2 a 5 anos. A maior parte das 79 lesões reparou completamente, ou decresceu dimensionalmente, compatível com quadro reparativo. Em 5 casos, encontraram ausência de regressão, ou diminuição insignificante da lesão. Duas destas lesões apresentaram espécies bacterianas do gênero *Actinomyces* ou *Arachnia*. Em outro caso, encontraram raspas de dentina presentes no tecido periapical. Concluíram que lesões periapicais refratárias ao tratamento, podem estar relacionadas ao estabelecimento de bactérias na região periapical, onde abrigam-se do tratamento

endodôntico convencional.

Sjogren et al.¹³⁰ (1991), utilizaram 30 dentes unirradiculados de humanos com polpas necrosadas e reação periapical radiograficamente visível, para avaliação do efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio. No preparo biomecânico, utilizaram como solução irrigadora o líquido de Dakin, e como curativo de demora a pasta Calasept. A monitoração do efeito antimicrobiano foi feita antes do preparo biomecânico e após os períodos de tempo de 10 minutos (12 casos) e 7 dias (18 casos), onde as amostras foram colhidas em condições de anaerobiose. Concluíram que a aplicação de pasta à base de hidróxido de cálcio por 10 minutos foi ineficaz, enquanto que o curativo por 7 dias eliminou as bactérias que sobreviveram ao preparo biomecânico.

Chong & Pitt Ford²⁵ (1992) reexaminaram o papel do uso de medicação endodôntica entre sessões. Na pulpectomia, ou em tratamentos que apresentem polpa com vitalidade, ressaltam que a necessidade de medicação intracanal é duvidosa. Em dentes portadores de infecções, o uso deste recurso terapêutico é indicado pelas seguintes questões; (I) elimina bactérias remanescentes ao preparo biomecânico; (II) reduz a resposta inflamatória dos tecidos apicais e periapicais; (III) promove neutralização dos resíduos presentes; (IV) age como barreira

contra a infiltração que ocorre quando do uso de restaurações; (V) seca os canais persistentemente úmidos. Concluíram que estes medicamentos devem ser usados como parte de uma biomecânica com criteriosa assepsia, e que testes bacteriológicos podem ser utilizados se o dente não responde ao tratamento, auxiliando na seleção da medicação mais apropriada.

Gencoglu & Kuleckçi⁴⁶ (1992), avaliaram a eficácia antibacteriana *in vitro* de quatro medicamentos de uso endodôntico: o Calasept, o paraclorofenol canforado, o Cresofene e o iodo iodetado de potássio (IKI), contra quatro espécies bacterianas anaeróbias: *Streptococcus mutans*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*. Constataram que o IKI foi ativo apenas contra o *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*. Enquanto que os outros foram eficazes contra todas as espécies bacterianas utilizadas.

Leonardo et al.⁷⁷ (1993), avaliaram *in vitro* a solubilidade, a concentração de íons Ca^{++} , e o pH do hidróxido de cálcio associado ao PMCC. Utilizaram as seguintes pastas à base de Ca(OH)_2 : (A) Calen; (B) Calen + 0,15mL de PMCC; e (C) Calen + 0,04g de paramonoclorofenol. Concluíram que: nas pastas à base de hidróxido de cálcio associadas ao PMC, a adição de cânfora é desnecessária; a formação de

paramonoclorofenolato de cálcio tornou mais prolongada a ação bactericida da pasta Calen + PMC; a solubilidade do paramonoclorofenol em associação com a pasta Calen, não sofreu influência da ausência da cânfora; o pH foi semelhante nas 3 pastas analisadas, independente da presença de paramonoclorofenol e que a liberação de íons Ca^{++} foi mais lenta nas pastas associadas ao paramonoclorofenol.

Nerwich et al.¹⁰⁰ (1993), avaliaram *in vitro* as alterações de pH na dentina de dentes extraídos de humanos, após a utilização do hidróxido de cálcio como medicação intracanal. Concluíram que esta substância alcança a dentina radicular externa entre 1 e 7 dias, e que no terço cervical, o pH atinge valores mais elevados, no entanto, no terço apical necessitou de duas a três semanas para alcançar na superfície externa da raiz um pH 9,0. Mostraram que o íon hidroxila derivados dos curativos se difundem através da dentina, sendo esta difusão mais rápida na porção cervical do canal radicular.

Safavi & Nichols¹¹⁵ (1993), analisaram *in vitro* a ação do hidróxido de cálcio sobre endotoxinas. Utilizaram no estudo suspensões de 30µL lipopolissacárides (LPS) de *Salmonella typhimurium*, com ou sem a adição de 25mg/mL de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. As suspensões foram incubadas a 37°C por 7 dias. Os produtos das suspensões foram analisados por cromatografia gasosa e espectrômetro de massa. Nas amostras tratadas

pelo Ca(OH)_2 , quantificaram ácidos graxos livres de hidroxila (ácidos mirístico e palmítico). Os resultados sugeriram que o hidróxido de cálcio medeia a degradação do LPS, podendo ser esta, uma razão importante para os efeitos benéficos obtidos com o uso desta substância na prática endodôntica.

Estrela et al.³⁸ (1994), estudaram o efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias, analisando diversos fatores entre os quais: concentração de íons H^+ , composição estrutural da membrana celular de bactérias gram-negativas, efeitos do pH sobre a atividade enzimática das bactérias gram-negativas, propriedades enzimáticas do hidróxido de cálcio - inativação das enzimas bacterianas e efeito mineralizante. Aventaram a hipótese de uma inativação enzimática irreversível em condições extremas de pH por longo período de tempo, e também, uma inativação enzimática temporária, quando do retorno do pH ideal à ação enzimática, atuando também de maneira reversível.

Safavi & Nichols¹¹⁶ (1994), estudaram a alteração das propriedades biológicas do lipopolissacáride bacteriano (LPS) pelo tratamento com o hidróxido de cálcio. Para isso, monitoraram a liberação de prostaglandinas E_2 secretadas por culturas de monócitos humanos, quando expostas à suspensão de LPS bacteriano puro (originário da *Prevotella intermedia* e da *Salmonella typhimurium*), ou tratado com

hidróxido de cálcio. A prostaglandina E_2 foi detectada no sobrenadante das suspensões expostas ao LPS, ao passo que naquelas suspensões de LPS tratadas pelo hidróxido de cálcio não detectaram PGE_2 . Concluíram que o tratamento com o hidróxido de cálcio pode alterar as propriedades biológicas do LPS bacteriano.

Kontakiotis et al.⁷⁰ (1995), estudaram *in vitro* os possíveis mecanismos envolvidos na ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio. Vinte cepas de bactérias anaeróbias obrigatórias e 20 cepas de facultativas colhidas de canais infectados, com espécies identificadas, foram utilizadas. Alíquotas de 0,1mL, contendo cepas específicas de inóculo foram distribuídas em placas de ágar-sangue, e incubadas em câmara de anaerobiose de 5 a 7 dias. Um grupo experimental e um grupo controle foram estudados: o primeiro incluiu uma placa com espécies bacterianas em contato com o hidróxido de cálcio, e o segundo apenas culturas dos microrganismos isolados. Ambas as placas foram incubadas em câmara de anaerobiose por 72h. Após este período o número de espécies bacterianas foi contado nos dois grupos. A análise estatística mostrou redução bacteriana significativa no grupo do hidróxido de cálcio. Concluíram que a propriedade do $Ca(OH)_2$ em absorver dióxido de carbono, pode contribuir na sua atividade antibacteriana.

Assed et al.⁹ (1996), avaliaram por meio de

imunofluorescência indireta, a presença de 4 espécies de bactérias anaeróbias (*Actinomyces viscosus*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*) em materiais colhidos de 25 canais radiculares de dentes de humanos, portadores de cáries, necrose pulpar e reação periapical radiograficamente visível, nas seguintes etapas: (I) antes do preparo biomecânico; (II) após o preparo biomecânico, utilizando como soluções irrigadoras o hipoclorito de sódio de 4 a 6% e água oxigenada 10 volumes, alternadamente, e, (III) após o uso de curativo de demora à base de hidróxido de cálcio + PMCC (Calen PMCC, S.S.White). Relataram a redução bacteriana após o uso de soluções bactericidas enérgicas ($\text{NaOCl} + \text{H}_2\text{O}_2$ 10vol), potencializada pelo uso do curativo de demora (Calen PMCC) com índice de redução de 57,1% (estatisticamente não significativos ($p < 0,05$), uma vez que o nível de significância estabelecido foi a 70%).

Gomes I.C. et al.⁵¹ (1996), investigaram *in vitro* a difusão de íons cálcio através da dentina até a superfície radicular, utilizando pastas de hidróxido de cálcio tendo como veículo a solução salina. Seis caninos de humanos, recém-extraídos, apresentando integridade, foram submetidos ao preparo biomecânico e aplicação de ácido cítrico por 30 segundos, para remoção da camada residual, irrigação final com soro fisiológico, e secos com pontas de papel absorvente. Selaram as extremidades apical e cervical. Dividiram o experimento em três etapas:

dissolução, dissolução e difusão I e, dissolução e difusão II. Na dissolução os canais permaneceram vazios, e estocados em 700mL de água deionizada, até que a liberação de cálcio pela estrutura dentária fosse estabilizada. Na dissolução e difusão I, os canais foram preenchidos com uma pasta de hidróxido de cálcio veiculada em soro fisiológico, e os dentes colocados em solução como a anterior. Na dissolução e difusão II, os dentes foram divididos em 3 subgrupos: I - contendo a pasta original, II - pasta original, diluída em 10mL de soro fisiológico, e III - pasta original com excesso de hidróxido de cálcio. Aferiram o pH de cada solução. Evidenciaram que a concentração iônica do cálcio alcançou picos 2 a 3 semanas após o preenchimento dos canais, tendendo à estabilização após este período, mostrando a ocorrência a difusão do hidroxila através da dentina, até alcançarem a superfície externa do canal radicular.

Alencar et al.³ (1997), para determinar a presença de paramonoclorofenol na pasta Calen (à base de hidróxido de cálcio)+ paramonoclorofenol, utilizada como curativo de demora, induziram lesões periapicais em 60 canais radiculares de pré-molares inferiores e superiores de quatro cães. Após o preparo biomecânico, aplicaram o curativo de demora, e removido do terço apical após os períodos de 2, 4, 7 e 14 dias para análise química por espectrofotometria. Demonstraram uma perda de paramonoclorofenol de aproximadamente 50% nos curativos

após 48h, sem perdas significantes nos períodos de tempo subseqüentes a 14 dias.

Barbosa et al.¹² (1997), avaliaram, em estudo clínico e laboratorial, as atividades antibacterianas do Ca(OH)_2 , clorexidina (0,12 e 0,2%) e PMCC como curativo de demora. No experimento clínico, canais com culturas positivas uma semana após o preparo biomecânico (com solução de NaOCl a 5,25% alternado com H_2O_2 a 3% e toilette final com ácido cítrico, seguido da colocação de um penso de algodão com PMCC na câmara coronária) foram submetidos a ação do curativo de demora. Amostras foram coletadas do canal após uma semana. No experimento laboratorial utilizaram o teste de difusão em ágar para avaliar a atividade inibitória dos medicamentos contra bactérias comumente isoladas de infecções endodônticas: 5 anaeróbias estritas: *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *A. israelii*, *F. nucleatum* e *P. acnes*; quatro anaeróbias facultativas: *A. naeslundii*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. mutans*; e uma espécie aeróbia: *P. aeruginosa*. Observaram que todos os curativos foram eficazes na redução ou eliminação da microbiota (demonstrada pelas culturas negativas). Não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os curativos de demora testados. Na avaliação laboratorial o PMCC mostrou os maiores halos de inibição bacteriana com ação sobre todas as cepas testadas.

Silveira¹¹⁹ (1997), com o objetivo de avaliar o tempo de ação de curativos de demora à base de hidróxido de cálcio, induziu formação de lesões periapicais crônicas em 80 raízes de dentes de cães. Realizou a primeira colheita bacteriana para determinação das ufc. Após o preparo biomecânico os canais receberam medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio associado ao PMCC. Decorridos os períodos de sete, 15 e 30 dias, removeu a medicação e as cavidades oclusais seladas. Após sete dias, efetuou a segunda colheita. Observou maior redução bacteriana e reparação tecidual para o período de 30 dias. Para o período de sete dias foram considerados insatisfatórios, e no de 15 dias intermediários, porém mais próximos do período de 30 dias.

Siqueira & Uzeda¹²² (1997), utilizando o teste de difusão em ágar, avaliaram a atividade antibacteriana de medicamentos intracanal: gel de clorexidina a 0,12%, gel de metronidazol a 10% e 3 pastas à base de hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2 associado a água destilada, PMCC e glicerina). Contra bactérias anaeróbias: *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *A. israelii*, *F. nucleatum*, *P. acnes* e *C. rectus* e bactérias aeróbias facultativas: *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. sanguis*, *A. viscosus*, *S. mutans* e *S. salivarius*. Obtiveram melhores resultados com o Ca(OH)_2 + PMCC. A clorexidina também inibiu o crescimento de todas as cepas estudadas. O metronidazol agiu contra todas espécies anaeróbias. Os medicamentos à base de hidróxido de cálcio, associados à água destilada

ou glicerina não apresentaram halos de inibição, resultado talvez relacionado à limitação quanto à difusão destes em ágar, além da natureza tampão do meio (neutralizando bases fortes).

Leonardo et al.⁷⁹ (1999), avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana de duas pastas à base de hidróxido de cálcio: o Calen, o Calasept e uma pasta de óxido de zinco misturado à água destilada frente a sete cepas bacterianas incluindo aeróbios estritos e facultativos, gram-negativos e gram-positivos, tidos como resistentes aos curativos de demora, utilizados no tratamento endodôntico: *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*. As pastas foram avaliadas pelas técnicas de difusão em ágar pelo método do poço e pela técnica da ponta de papel absorvente. Verificaram que a pré-incubação das placas, para a difusão das pastas e a otimização do meio de cultura pelo gel de TTC a 0,05% foram fatores importantes para a avaliação da atividade antibacteriana. Constataram que todas as cepas bacterianas foram inibidas por todos os materiais avaliados.

Siqueira & Lopes¹²⁰ (1999) realizaram uma revisão de literatura concernente aos mecanismos de atividade antimicrobiana de materiais à base de hidróxido de cálcio. Apontaram para as seguintes observações: o espectro antibacteriano limitado das preparações à base

de hidróxido de cálcio não afeta todos os membros da microbiota endodôntica; que devem ser usados em canais radiculares infectados como curativo de demora, embora apresentem a controvérsia a respeito de um tempo ideal de manutenção; que devem estar associados a outros medicamentos para que possam agir de forma sinérgica, aumentando o espectro de ação antimicrobiana frente às bactérias resistentes, enfatizando o uso do PMCC; e por fim que estes curativos parece atuar como uma barreira mecânica às reinfecções quando o curativo de demora entra em contato com a saliva. Concluíram enfatizando a necessidade da realização de mais estudos sobre mecanismos de ação e eficácia antibacteriana, da sua associação com outros medicamentos.

Nelson Filho⁹⁸ (2000), em estudo *in vivo*, radiográfico e histopatológico, utilizando dentes de cães, testou o efeito da endotoxina liofilizada de *Escherichia coli*, sobre os tecidos apicais e periapicais, LPS + PBS (Grupo I), LPS + PBS associado ao hidróxido de cálcio P.A. (Grupo II). Para controles negativo e positivo, respectivamente, utilizou dentes preenchidos com soro fisiológico (Grupo III) e dentes com lesões periapicais induzidas (Grupo IV). Após o período de 30 dias, efetuou tomadas radiográficas. Constatou lesões periapicais em dentes dos Grupos I e IV e integridade periapical para elementos dos Grupos II e III. O quadro histopatológico, evidenciou infiltrado neutrofílico/macrofágico intenso, reabsorção dos tecidos mineralizados, espessamento do espaço

periodontal para elementos do Grupo I e IV, ao passo que para aqueles dos Grupos II e III apresentaram integridade estrutural dos tecidos periapicais, infiltrado inflamatório suave e, em especial para o Grupo II observou massas basófilas, sugerindo mineralização ao redor do material extravasado. Concluiu que o LPS, por si só, ocasionou o desenvolvimento de reação periapical e que o Ca(OH)_2 foi capaz de detoxificar o LPS *in vivo*.

Han et al.⁵⁷ (2001), realizaram estudo com proposição de avaliar os efeitos antimicrobianos do hidróxido de cálcio contra bactérias presentes nos túbulos dentinários e sua relação com a presença de camada residual. Para tal, utilizaram 68 raízes padronizadas de dentes de humanos, que foram contaminadas por *Enterococcus faecalis* por 3 semanas após a remoção da camada residual. Passado este período, a camada residual foi recomposta e em metade das amostras, esta camada foi novamente removida. Utilizaram curativos à base de hidróxido de cálcio nas amostras que foram divididas em 4 grupos: (a) ausência de camada residual sob ação de pasta de Ca(OH)_2 em veículo aquoso; (b) ausência de camada residual sob ação de pasta de Ca(OH)_2 veiculada em óleo de silicone; (c) presença de camada residual sob ação de pasta de Ca(OH)_2 em veículo aquoso; (d) presença de camada residual sob ação de pasta de Ca(OH)_2 veiculada em óleo de silicone. As pastas medicamentosas foram colocadas nos canais radiculares por 7 dias. Após

a remoção destas, *chips* de dentina foram coletados e incubados para verificação da presença bacteriana. Concluíram que todas as pastas à base de Ca(OH)_2 foram eficazes na eliminação das bactérias nos túbulos dentinários, exceto no grupo D (presença de camada residual sob ação de pasta de Ca(OH)_2 veiculada em óleo de silicone).

Almyroudi et al.⁴ (2002), em estudo *in vitro*, utilizando dentes de humanos previamente contaminados com *Enterococcus faecalis* avaliaram a eficácia de 4 desinfetantes como medicação intra-canal em experimento: hidróxido de cálcio, gel de clorexidina, clorexidina na forma de liberação controlada (PerioChip) e uma combinação de gel de clorexidina com hidróxido de cálcio. Uma solução de soro fisiológico foi utilizada como controle. Os desinfetantes foram testados em 3 períodos distintos (3, 8 e 14 dias). Observaram que o Ca(OH)_2 foi eficaz na ação bactericida nos períodos de 3 e 8 dias, porém ineficaz para o período de 14 dias. As diferentes formulações à base de clorexidina foram eficazes para todos os períodos de tempo estudados. A combinação de gel de clorexidina apresentou ação ligeiramente melhor que a forma em chip, sem que fosse significativa a diferença entre estas medicações.

Berbert et al.¹⁴ (2002) avaliaram a resposta histopatológica de tecidos periapicais após o tratamento endodôntico de dentes de cães com polpas necróticas e com periodontite apical crônica, utilizando 2

curativos de demora à base de hidróxido de cálcio. Setenta e oito canais radiculares foram instrumentados utilizando como solução irrigadora o hipoclorito de sódio a 5,25%, e tendo seus interiores preenchidos com curativos de demora (Calen PMCC ou Calasept) que ali permaneceram por 30 dias. Os canais radiculares foram posteriormente obturados por condensação lateral ativa de cones de guta percha e cimento endodôntico (Sealapex ou AH Plus), após 360 dias, os animais foram mortos por sobre dose anestésica, e os dentes foram preparados histologicamente, seccionados e corados com hematoxilina e eosina para análise por microscopia óptica da reparação dos tecidos apicais e periapicais. A análise estatística mostrou que os resultados histopatológicos mais pobres foram observados no grupo Calasept/AH Plus, e que o cimento Sealapex para todos os casos em que foi utilizado, resultou em melhor reparo apical e periapical quando comparado ao grupo do cimento AH Plus. Os resultados histopatológicos do Calen PMCC tanto associado ao cimento AH Plus e Sealapex e a pasta Calasept associada apenas ao Sealapex, foram similares estatisticamente, porém diferentes dos resultados apresentados na associação Calasept com AH Plus. Concluíram que os resultados deste estudo em cães apresentou diferenças na reparação tecidual de dentes com periodontite apical crônica pelo uso de dois curativos de demora à base de hidróxido de cálcio e dois cimentos. Recomendaram novas pesquisas necessárias na determinação da melhor combinação entre curativo de demora e cimento

obturador.

Gomes, B.P. et al.⁴⁸ (2002), investigaram a susceptibilidade de alguns microrganismos comumente isolados de canais radiculares ao hidróxido de cálcio em combinação com vários veículos, pelo método de difusão em ágar. Cilindros de aço inoxidável foram posicionados em cada meio de ágar inoculado. Os medicamentos testados e seus controles foram colocados no interior dos cilindros. As zonas de inibição de crescimento foram medidas e registradas após o período de incubação para cada placa, e os resultados foram submetidos à análise estatística. *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana mais resistente, ao passo que *Porphyromonas endodontalis* foi mais suscetível a todos os medicamentos seguido de *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia/intermedia*. O hidróxido de cálcio+PMCC+ glicerina apresentou zonas de inibição com as médias mais elevadas quando comparado com as outras medicações. Concluíram que bactérias anaeróbias gram-negativas são mais suscetíveis às pastas de hidróxido de cálcio que microrganismos gram-positivos facultativos.

Holland et al.⁶¹ (2002), utilizaram 24 dentes de humanos, extraídos por finalidade ortodôntica e preparados biomecanicamente, submetidos à remoção de cimento e tratados por 5 minutos com EDTA. Preencheram os canais com pasta de hidróxido de cálcio em água

destilada, selando em seguida as aberturas coronárias. Os dentes foram mergulhados em água destilada e o pH avaliado diariamente. Observaram aumento gradativo do pH, que chegou a 8,6 aos 30 dias. Após a remoção do curativo, os canais foram submetidos à obturação com óxido de zinco ou Sealapex, e novamente mergulhados em água destilada e tendo o pH avaliado diariamente até 30 dias. Constataram neste período de tempo que o Sealapex apresentou um pH 8,40, ao passo que o óxido de zinco e eugenol apresentou pH 7,26. Concluíram que o aumento de pH da dentina é lento e progressivo, e que dentre os cimentos estudados, apenas o Sealapex manteve o pH alcançado pela pasta de hidróxido de cálcio.

Leonardo et al.⁸¹ (2002) avaliaram a reparação apical e periapical utilizando curativos de demora para canais radiculares à base de hidróxido de cálcio para diferentes períodos de tempo em dentes com lesões periapicais induzidas. Um total de 61 canais radiculares de pré-molares superiores e inferiores de 4 cães foram utilizados. Após o preparo biomecânico dos canais radiculares através de técnica coroa-ápice e solução irrigadora de hipoclorito de sódio a 5,25%, os forames apicais foram alargados em todos os casos. Foi aplicado curativo de demora à base de hidróxido de cálcio, sendo que o grupo não recebeu este medicamento. Os animais foram mortos após 7, 15 ou 30 dias. Após preparação histológica, secções seriadas foram coradas com hematoxilina e eosina e tricrômico de Mallory. Concluíram que os melhores resultados

histopatológicos ocorreram aos 15 e 30 dias, e os piores resultados aos 7 dias e com o grupo controle.

Nelson Filho et al.⁹⁹ (2002), avaliaram através de radiografias as regiões apical e periapical de dentes de cães submetidos à colocação intracanal de endotoxina bacteriana (lipopolissacáride, LPS), associada ou não ao hidróxido de cálcio. Após a remoção do tecido pulpar, dividiram 60 prémolares em 4 grupos distintos, que foram preenchidos com: toxina bacteriana (Grupo I), toxina bacteriana mais hidróxido de cálcio (Grupo II), solução salina (Grupo III), e lesões periapicais induzidas sem tratamento (Grupo IV) por um período de 30 dias. Lesões periapicais semelhantes foram observadas nos Grupos I e IV. A presença de lâmina dura intacta foi observada nos Grupos II e III. Concluíram que o LPS determinou a lesão periapical visível radiograficamente, entretanto, quando associada ao Ca(OH)_2 , esta substância foi detoxificada.

Peters et al.¹⁰⁷ (2002), avaliaram a reparação das lesões periapicais relacionadas a canais radiculares com culturas negativas ou positivas no momento da obturação, além da avaliação da reparação periapical de dentes tratados em apenas uma sessão, ou em duas sessões com a utilização de curativo de demora à base de hidróxido de

cálcio entre estas. Para tal, 39 pacientes foram submetidos à terapia endodôntica. Na primeira sessão os dentes foram instrumentados, e 18 destes dentes foram preenchidos com hidróxido de cálcio em veículo aquoso (solução salina), após coleta microbiana. Os outros 21 dentes restantes, foram obturados com cones de guta-percha e cimento AH-26, após coleta microbiana. Após quatro semanas, os dentes preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio foram novamente acessados e novamente foi realizada coleta microbiana, sendo em seguida obturados com guta-percha e cimento AH-26. A reparação da radiolucência periapical foi registrada ao longo de um período de até 4,5 anos. Observaram que todas as lesões periapicais reduziram dimensionalmente de maneira significativa quando da preservação. A reparação radiográfica completa foi observada em 81% dos casos executados em uma sessão, e 71% em casos onde foram executadas duas sessões intermediadas pelo curativo de demora à base de hidróxido de cálcio. Sete de 8 casos (87,5%) que apresentaram cultura positiva de material coletado dos canais radiculares, na hora da obturação, repararam. O número de unidades formadoras de colônias (ufc), em 6 de 8 casos positivos foi <102 ufc/mL. Concluíram que dentro das limitações deste estudo, não foram significativas as diferenças de reparação das lesões vistas radiograficamente entre grupos tratados em uma ou duas sessões. Segundo os autores a presença de culturas bacterianas positivas no momento da obturação dos canais radiculares, não influenciou no sucesso

do tratamento.

Tanomaru Filho et al.¹⁴³ (2002), avaliaram o reparo apical e periapical após o tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar e lesão periapical crônica em cães. Setenta e dois canais radiculares de quatro cães sem raça definida foram submetidos ao preparo biomecânico, utilizando as soluções irrigadoras: hipoclorito de sódio 5,25% ou digluconato de clorexidina 2%. Subseqüentemente os dentes foram divididos, naqueles obturados imediatamente com Sealapex e técnica de condensação ativa, e nos que foram submetidos à colocação de curativo à base de Ca(OH)_2 , Calen PMCC, e obturados após o período de 15 dias com Sealapex. Após 210 dias, os animais foram mortos e tiveram as secções removidas e processadas laboratorialmente para análise histológica. Observaram melhor reparo histológico nos grupos que receberam medicação intracanal ($p < 0.05$), e nos grupos que foram irrigados com solução de clorexidina.

▪ Biologia Molecular na Endodontia

Mullis et al.^{92,93,94}, do Departamento de Genética Humana (Cetus Corporation-Emeryville-CA), relataram o sistema de amplificação de DNA específico da β -globulina humana e para o diagnóstico pré-natal de anemia falciforme pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR-polymerase chain reaction). A patente da técnica foi registrada sob o número 4.683.202 (U.S. Patent) em 28 de julho de 1987. Em 1993 foi agraciado com o prêmio Nobel em Química pelo desenvolvimento da técnica PCR.

Joshi et al.⁶³ (1991), empregaram a técnica PCR em células bacterianas inteiras como material inicial. Até então, não havia estudos sistemáticos suficientes sobre a necessidade do isolamento do DNA como material inicial para a execução da técnica. A partir do uso de *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* cultivadas tanto em meios líquidos como em sólidos, propuseram uma metodologia onde estas podem ser usadas diretamente na técnica, sem quaisquer pré-tratamentos, eliminando assim a necessidade de isolamento prévio do DNA.

Menard & Mouton⁸⁴ (1993), investigaram aspectos taxonômicos de *Porphyromonas gingivalis*, de origem humana e de outras

espécies animais, pela técnica PCR com *primer* arbitrário (AP-PCR). Concluíram que este tipo de teste apresenta utilidade para estudos epidemiológicos de patógenos periodontais, pois identifica a heterogenicidade e biótipos e subtipos de diversas cepas.

Chen & Slots²⁴ (1994), em estudo similar, examinaram a utilidade do AP-PCR (PCR com *primers* arbitrários) para detecção genotípica por meio de amplicons de *Porphyromonas gingivalis*, possibilitando a distinção de cepas virulentas e não virulentas. O DNA foi extraído de acordo com método convencional. 10 *primers* (oligonucleotídeos), com seqüências arbitrárias foram utilizados na reação em cadeia da polimerase para amplificar o DNA genômico desta espécie. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Concluíram que o AP-PCR representa um método valoroso e de fácil execução para análise clonal de *P. gingivalis*.

Socransky et al.¹³³ (1994), introduziram um método para hibridação de várias amostras de DNA simultaneamente, cruzando-as com um grande número de sondas de DNA na superfície de uma membrana de nylon. A técnica denominada hibridação *checkerboard* DNA-DNA, consiste na desnaturação de DNA de até 43 amostras, que são dispostas em faixas horizontais. A membrana é girada a 90° no mesmo aparelho, em 43 faixas verticais são vertidas as sondas de DNA com marcadores. Onde

houver recombinação gênica do DNA, nas interseções amostra/sonda, evidencia a presença de determinada espécie. A técnica permite determinação simultânea da presença de múltiplas amostras em apenas um exame.

Conrads et al.²⁶ (1997) utilizaram o PCR direcionado ao gene 16S rDNA, para detecção e diferenciação de bactérias de amostras colhidas de canais radiculares necrosados. O exame priorizou espécies fastidiosas, ou que apresentassem dificuldade de identificação por métodos bioquímicos após técnica de cultura. Encontraram as espécies do gênero *Actinomyces*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus milleri*, e presumidamente, descrito pela primeira vez, *Bacteroides forsythus*. A identidade dos *amplicons* foi confirmada pelas seqüências geradas e comparação das informações com dados de bancos de genes.

Bogen & Slots¹⁷ (1999), avaliaram a presença de bacilos anaeróbios, gram-negativos pigmentados de negro (*Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*) em lesões periapicais fechadas, em dentes de humanos apresentando afecções endodônticas refratárias ao tratamento endodôntico convencional e com indicação cirúrgica. Utilizaram a reação em cadeia da polimerase (PCR) baseada no gene 16S rRNA, com alto grau de sensibilidade na identificação de espécies bacterianas de difícil

detecção por técnicas microbiológicas convencionais. Não identificaram *P. endodontalis*, *P. intermedia* nem *P. nigrescens* em nenhum dos casos. *P. gingivalis* foi isolada em apenas um dos casos (associado à dor moderada), mostrando a menor frequência neste tipo de lesão.

Gonçalves & Mouton⁵² (1999), avaliaram a prevalência de *Bacteroides forsythus* em 11 canais radiculares, de dentes com polpas necrosadas e lesões periapicais, empregando 4 técnicas, dentre as quais 2 baseadas na biologia molecular (o PCR e o *slot-blot*). Após a imunocaptura, com o método PCR (IM-PCR-DNA), evidenciaram a maior prevalência (6/11), enquanto o menor valor foi obtido pelo *slot-blot* (3/11), 5/11 pelo ELISA e 4/11 pela imunofluorescência. Concluíram que *Bacteroides forsythus* não são identificados nestes casos por técnicas de cultura por serem de difícil crescimento.

Gonçalves et al.⁵³ (1999), colheram amostras de canais radiculares infectados e de biofilme microbiano subgengival de dentes de 10 pacientes sem cáries ou restaurações profundas, por técnica em anaerobiose para anaeróbios pigmentados de negro. Destas amostras, colônias de *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella nigrescens*, isoladas de 4 pacientes, foram identificadas pela amplificação PCR espécie-específica. A técnica PCR com *primer* arbitrário (AP-PCR) foi realizada para examinar a diversidade genética dos microrganismos isolados,

revelando que *P. gingivalis* ou *P. nigrescens* tanto no sistema de canais radiculares como na placa subgengival, em todos os 4 pacientes, mostraram-se indistinguíveis. Concluíram que o endodonto e o periodonto podem ser colonizados pelos mesmos tipos clonais de anaeróbios pigmentados de negro.

Tran & Rudney¹⁴⁵ (1999), utilizaram a técnica PCR *multiplex* para detecção simultânea de três espécies de bactérias, envolvidas na etiologia da periodontite. Compararam *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus* e *Porphyromonas gingivalis*, isoladas de biofilmes bacterianos supra e subgengivais de pacientes com periodonto saudável, e do biofilme bacteriano subgengival de pacientes portadores de periodontite. Observaram que esta técnica é simples, rápida, econômica e eficaz na amplificação, *multiplex*, em única reação.

Baumgartner et. al.¹³ (2000) avaliaram a presença de *Candida albicans* em 24 amostras de canais radiculares infectados e de fluidos aspirados de processos patológicos periapicais (celulites/abscessos). As amostras foram submetidas à técnica PCR. Detectaram *C. albicans* em 5 das 24 amostras provenientes de canais radiculares (21%). Entretanto, não encontraram este fungo em quaisquer das amostras aspiradas da região periapical. Concluíram que o PCR é

uma técnica extremamente sensível na identificação de *C. albicans* em amostras coletadas de canais radiculares contaminados.

Siqueira et al.¹²⁸ (2000), verificaram a presença de espécies bacterianas em 28 amostras de canais radiculares usando 42 sondas de DNA e hibridação *checkerboard* DNA-DNA. Para confirmar a presença de DNA bacteriano nas amostras clínicas, foi executado um teste PCR com *primers* comuns à maioria das espécies bacterianas. Com hibridação *checkerboard* DNA-DNA, mostraram que 22 de 42 sondas utilizadas foram reativas com uma ou mais amostras. O número de espécies bacterianas nas amostras de canais, variaram de 1 a 17 (média 4,7). Dezesete de 28 amostras foram positivas ao menos para uma sonda. As espécies mais prevalentes foram as seguintes: *Bacteroides forsythus* (39,3%); *Haemophilus aphrophilus* (25%); *Corynebacterium matruchotii* (21,4%); *Porphyromonas gingivalis* (17,9%) e *Treponema denticola* (17,9%). Concluíram que os métodos baseados na biologia molecular podem propiciar conhecimento adicional significativo concernente à microbiota endodôntica pela detecção de bactérias que não desenvolvem em meios de cultura.

Oliveira et al.¹⁰³ (2000), avaliaram a ocorrência de *Porphyromonas endodontalis* em infecções endodônticas, sintomáticas ou assintomáticas, usando a técnica PCR gene-direcionado. Detectaram a

espécie em 39,5% dos casos (17 de 43 dentes). Quatro casos de seis com abscesso periapical agudo (66,7%) e em 13 de 37 outros casos (35,1%). A presença de *P. endodontalis* estava associada com lesão periapical assintomática em 6 casos (25%) e em 10 dentes sensíveis à percussão (52,6%). A espécie foi detectada em um caso assintomático, sem evidência de lesão periapical. Concluíram que apesar de ser comumente detectados em casos sintomáticos, *Porphyromonas endodontalis* pode estar presente em casos assintomáticos.

Sunde et al.¹³⁸ (2000), identificaram bactérias das lesões periapicais de dentes assintomáticos. Selecionaram 34 dentes com canais obturados, e portadores de lesões periapicais, divididos em dois grupos de 17 indivíduos. No Grupo I, executaram a técnica cirúrgica usando incisão marginal, até a exposição da lesão, e no Grupo II, realizaram uma incisão submarginal. As lesões foram removidas utilizando curetas esterilizadas, e imediatamente colocadas em recipientes contendo 10mL de meio para transporte, pré-reduzido para anaeróbios e esterilizados (PRAS). Executaram a técnica de hibridação checkerboard DNA-DNA, utilizando 40 diferentes sondas de DNA completo. A maioria das sondas evidenciou a presença de bactérias no Grupo I em relação ao Grupo II, sugerindo que na incisão marginal, bactérias da bolsa periodontal, podem alcançar os tecidos subjacentes por ação iatrogênica. Demonstraram que bactérias invadem os tecidos das lesões periapicais de dentes

assintomáticos. Concluíram que a detecção de mais espécies bacterianas, que escaparam às técnicas de cultura em anaerobiose, com a hibridação checkerboard DNA-DNA deve redefinir a evidenciação de microbiota por métodos moleculares.

Jung et al.⁶⁵ (2001), com o propósito de identificar espécies de espiroquetas originárias de infecções endodônticas e determinar a associação deste gênero com *Bacteroides forsythus* e *Porphyromonas gingivalis*, selecionaram 79 dentes portadores de periodontite apical. Com amostras de material coletadas de maneira asséptica de canais radiculares, executaram a técnica PCR para amplificação do gene 16 rRNA. Subseqüentemente, a hibridação *dot-blot* foi realizada com 8 sondas de oligonucleotídeos espécie-específicas. As associações microbianas foram analisadas através de razão de imparidade. Encontraram como espécie mais freqüente *Porphyromonas gingivalis* seguido de *Treponema maltophilum*, *Bacteroides forsythus* e *Treponema socranskii*. Outros treponemas, incluindo *Treponema denticola*, não foram detectados. Associações microbianas significantes foram identificadas entre *T. maltophilum*, *B. forsythus* e *P. gingivalis*. Concluíram que *Treponema maltophilum* deve ser incluído em estudos etiológicos das patologias endodônticas.

Rolph et al.¹¹³ (2001) usaram o PCR 16S rRNA, seguido por

clonagem e seqüenciamento de amplicons 16S rRNA em pequeno subconjunto de amostras, para averiguar a diversidade das bactérias presentes em canais radiculares infectados. Utilizaram um total de 41 amostras clínicas de 15 casos (DE NOVO) e 26 casos refratários de infecções endodônticas. Destas amostras, 44% foram positivas por cultura, e 68% positivas ao PCR. Oito amostras foram selecionadas para posterior análise. Destas, os dois casos portadores de gangrena pulpar e lesão periapical (DE NOVO) revelaram seqüências relacionadas aos gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* e *Streptococcus* e dois clones foram relacionados a bactérias previamente não cultivadas, enquanto o trajeto fistuloso associado dos casos revelaram seqüências para os gêneros *Lactobacillus*, *Pantoea*, *Prevotella* e *Selenomonas*. Os 5 casos refratários eram de clones relacionados aos gêneros *Capnocytophaga*, *Cytophaga*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Mogibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Selenomonas*, *Solobacterium*, *Streptococcus* e *Veillonella* e dois clones representando bactérias não cultivadas até então. As posições filogenéticas de vários clones associados aos subgrupos *Clostridiaceae* e *Sporumosa* do grupamento *Firmicutes*, também foram detectados. Este estudo demonstrou que técnicas moleculares podem detectar as bactérias em infecções endodônticas, quando técnicas de cultura revelaram resultados negativos e podem ser utilizadas para identificar um amplo espectro de bactérias relacionadas às infecções endodônticas, incluindo a presença de espécies jamais identificadas ou cultivadas.

Siqueira et al.¹²⁷ (2001) utilizaram o método PCR 16S

rDNA direcionado com o intuito de investigar a ocorrência de quatro bacilos anaeróbios pigmentados de negro (*Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*) em infecções endodônticas. Obtiveram amostras de 54 dentes infectados de humanos, dos quais 10 casos apresentaram afecção supurativa (abscesso dento-alveolar agudo). A técnica molecular empregada permitiu a detecção de bactérias anaeróbias pigmentadas de negro em 59,3% dos dentes. Doze casos apresentaram mais de uma espécie de bactéria pigmentada de negro. Quantificaram a presença das espécies, onde da totalidade dos casos 42,6% apresentaram *P. endodontalis*, 27,8% *P. gingivalis*, 7,4% *P. nigrescens* e 5,6% *P. intermedia*. Nos quadros de abscesso as espécies bacterianas foram encontradas nas seguintes proporções: *P. endodontalis* 70%, *P. gingivalis* 40% e *P. intermedia* 10%, sem evidenciar *P. nigrescens* para estes casos. Concluíram que a alta prevalência de *P. endodontalis* e *P. gingivalis* sugere que estas espécies podem desempenhar um importante papel na patogênese das alterações periapicais.

Fouad et al.⁴¹ (2002), utilizaram *primers* direcionados a genes 16S rRNA (à partir de genes provenientes do gênero *Enterococcus*) para identificar 10 supostos patógenos bacterianos em canais radiculares com polpas necrosadas. Adicionalmente, as associações destes microrganismos com sintomas e história de diabetes *mellitus* foi

investigada. Incluíram neste estudo amostras microbianas de canais radiculares de 24 dentes com polpas necróticas. A técnica PCR com *primers* universais identificaram DNA bacteriano em 22 espécimes, os 2 espécimes remanescentes eram de dentes intactos que sofreram traumatismo 6 meses antes do tratamento. A técnica PCR com *primers* específicos demonstrou que os sintomas pré-operatórios foram significativamente associados à presença de *Streptococcus* spp. Também notaram uma tendência não significativa de que casos sintomáticos estivessem associados à presença de *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*, e para uma relação da presença de *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis* associadas à diabetes *mellitus*. A clonagem e seqüenciamento dos produtos do PCR em uma amostra, revelou a presença de um microrganismo relacionado ao gênero *Olsenella*, jamais descrito em infecções endodônticas.

Molander et al.⁸⁸ (2002), desenvolveram protocolo para a detecção de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* de canais radiculares. Para este estudo usaram microrganismos provenientes de coleção de cultura e isolados clinicamente. Realizaram a reação em cadeia da polimerase (PCR), com *primers* específicos para região intergênica 16S/23S r DNA. A sensibilidade do PCR foi testada utilizando diluições em série de DNA bacteriano e de células de *E. faecalis*. Demonstraram o potencial favorável do uso de PCR na detecção de *E. faecalis* e *E. faecium* de amostras de canais radiculares. Com grande

especificidade a metodologia foi capaz de detectar 10 células de *E. faecalis*.

Moraes et al.⁹⁰ (2002), compararam a eficácia da cultura bacteriana, PCR dirigido ao gene 16S rDNA e hibridação checkerboard DNA-DNA para detecção de *Fusobacterium nucleatum* em dentes com canais radiculares infectados, associados à lesão periapical. Para isso, utilizaram 36 dentes unirradiculados de pacientes adultos, todos apresentando lesão cariosa, polpas gangrenadas e evidência radiográfica de perda óssea peri-radicular. Combinando todos os métodos, os resultados indicaram que *Fusobacterium nucleatum* estava presente em aproximadamente 31% (4 de 13) das amostras. A incidência de *F. nucleatum* em infecções de canais radiculares, objeto deste estudo mostrou os seguintes resultados: 15,4%, quando utilizado o PCR, 15,4% utilizando técnica de cultura e 10% quando do uso da hibridação checkerboard DNA-DNA. Concluíram que esses métodos utilizados não demonstraram superioridade quando comparado entre si na detecção de *F. nucleatum*, e que deve ser considerado o pequeno número de amostras examinadas e a baixa prevalência desta espécie nas observações realizadas.

Munson et al.⁹⁵ (2002), realizaram análises moleculares e de cultura em amostras de microrganismos, coletadas de 5 canais radiculares infectados. A sequência 16S rDNA de 261 material isolado e 624 clones foram identificados por comparação de sequências de bancos

de dados. Sessenta e cinco TAXAs foram identificadas, das quais 26 foram encontradas por métodos moleculares apenas. Uma média de 20,2 TAXAs foram encontradas em cada amostra. Uma nova espécie de *Dialister* foi o único microrganismo presente em todas as 5 amostras. Vinte e sete novas TAXAS foram detectadas, 18 das quais pertencentes ao Filo Firmicutes e 8 ao Filo Bacteroidetes. A análise molecular cultura-independente revelou uma microbiota mais diversa, associada às infecções endodônticas, que aquela evidenciada por técnicas de cultura em anaerobiose estrita.

Proposição

No presente estudo foi proposta a monitoração da microbiota de canais radiculares de dentes de humanos portadores de processos infecciosos e lesão periapical crônica, pela técnica PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) antes e após a instituição do tratamento endodôntico utilizando curativos de demora à base de hidróxido de cálcio: Calen, Calen PMCC e Calasept, como também verificar se a técnica PCR é exeqüível, rápida e eficaz na detecção de microrganismos específicos.

Material e método

▪ Comitê de Ética em Pesquisa

O presente projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Araraquara, tendo sido aprovado em sessão de 22.04.2002, de acordo com o Ofício CEP-FO/CAR nº 104/2002, sendo consentido de maneira livre e esclarecida pelos pacientes participantes como voluntários(Anexo).

▪ Seleção dos Pacientes

No presente estudo *in vivo*, foram triados 42 indivíduos, humanos, saudáveis, de ambos os sexos e com variação etária dos 13 aos 66 anos, que apresentavam casos de afecção endodôntica diagnosticada como gangrena pulpar e presença de reação periapical crônica radiograficamente visível. Destes, 28 participaram no estudo efetivamente, dos quais foi colhido material para análise de 30 casos. Os pacientes que colaboraram com o presente estudo, não estavam fazendo uso de antibióticos há pelo menos 3 meses. Os dentes envolvidos na pesquisa apresentavam também como requisito a não exposição do sistema de canais radiculares ao meio bucal (lesão fechada). Os casos triados foram divididos em 3 grupos de acordo com o curativo de demora utilizado na terapêutica endodôntica instituída: Grupo I-Calén (SSW-Artigos Dentários, Brasil); Grupo II-Calén/PMCC (SSW-Artigos dentários, Brasil) e Grupo III-Calasept (Nordiska Dental AB-Suécia).

As pastas medicamentosas à base de hidróxido de cálcio apresentam as seguintes composições, de acordo com seus fabricantes:

- **CALEN** (S.S. White Artigos Dentários Ltda.-Rio de Janeiro, Brasil)

Composição: Hidróxido de cálcio	2,5g
Óxido de zinco	0,5g
Colofônio	0,05g
Polietilenoglicol 400	2,0mL

- **CALEN/PMCC** (S.S. White Artigos Dentários Ltda.-Rio de Janeiro, Brasil)

Composição: Hidróxido de cálcio	2,5g
Óxido de zinco	0,5g
Colofônio	0,05g
Polietileno glicol 400	2,0mL
Paramonoclorofenol canforado (2,5/7,5)	0,15mL

- **CALASEPT** (Nordiska Dental-AB, Ängelholm, Suécia)

Composição: Hidróxido de cálcio	40 a 50%
Sulfato de bário	5 a 10%
Solução fisiológica	40 a 50%

▪ Procedimentos Clínicos e Coleta de Amostras

Para cada dente em estudo foi feito um controle microbiológico do canal radicular antes e após a intervenção clínica de preparo biomecânico e utilização do curativo de demora com as pastas à base de hidróxido de cálcio.

Os dentes utilizados foram radiografados. Nos casos onde foi

constatada a presença de gangrena pulpar e reação periapical crônica, radiograficamente visível, foi executado o tratamento denominado por Leonardo & Leal⁷³ (1998) de Necropulpectomia II. Os dentes foram submetidos a isolamento absoluto de campo operatório, profilaxia com escovas em baixa rotação que carrearam pasta à base de pedra-pomes e soro fisiológico, além da posterior aplicação de um penso de algodão com água oxigenada a 3% e desinfetados com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% (Farmácia Amazon - S.Carlos SP) sobre o dente por 1 minuto (Conrads²⁶,1997; Siqueira¹²⁵, 2001). Em seguida procedeu-se com a abertura coronária e escariação com brocas diamantadas esféricas (KG Sorensen) esterilizadas, compatíveis com a anatomia e dimensões dos dentes, sem refrigeração com água (evitando possível contaminação do campo operatório).

Para assegurar condições assépticas, e evitar a contaminação do material colhido, após a remoção de tecido cariado, foi utilizado novamente um penso de algodão esterilizado embebido em NaOCl a 2,5%, por 1 minuto em contato com as paredes da câmara pulpar (Conrads²⁶, 1997; Siqueira¹²⁵, 2001).

Os canais radiculares foram inundados com soro fisiológico esterilizado, e sofreram agitação com auxílio de lima endodôntica, com o objetivo de dessorção do material necrótico do endodonto, que permaneceu em suspensão. Em seguida o material foi colhido com pontas de papel esterilizadas (Tanariman do Brasil, São Paulo, Brasil), introduzidas na profundidade do comprimento aparente de trabalho e mantidas em posição por 1 minuto, sendo em seguida transferidas para um tubo de Eppendorf com aproximadamente 300µL de solução fisiológica, e estocado em freezer a -80°C

para posterior execução da técnica PCR (*polymerase chain reaction* ou reação em cadeia da polimerase) em sistema de mutirão, isto é, processamento na mesma ocasião.

A técnica de preparo biomecânico, baseada na instrumentação dos canais radiculares no sentido coroa-ápice sem pressão apical (*crown-down pressureless technique*) foi padronizada para todos os casos, e executada pelo mesmo operador, procurando reduzir a microbiota presente e evitar quadros de agudecimento da lesão periapical crônica. A solução de Labarraque foi utilizada para irrigação, alternando o ciclo de irrigação/aspiração e inundação a cada troca de instrumento, sendo utilizado volume de 5mL, entre os instrumentos.

Recorrendo-se a novas tomadas radiográficas, seguiram os passos de pré-odontometria e odontometria, determinado o instrumento apical foraminal (IAF) e o instrumento apical inicial (IAI). Após a confecção do batente apical, o canal foi irrigado copiosamente com a solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, sendo aspirado e seco com pontas de papel esterilizadas, compatíveis com o diâmetro dos canais radiculares.

Para o tratamento químico das paredes dos canais instrumentados, visando a eliminação da camada residual (*smear layer*), foi utilizada solução de EDTA, tamponado em pH 7,4 (ODHACAM, Brasil), por 3 minutos sob agitação com o instrumento memória, possibilitando desta forma a desobstrução dos túbulos dentinários e favorecendo a difusão e ação das pastas medicamentosas utilizadas (Nerwich¹⁰⁰, 1993; Nagaoka⁹⁶, 1995; Gomes⁴⁹, 1996; Han⁵⁷, 2001).

Novamente, foi executada a irrigação copiosa do canal com

solução de Labarraque, aspiração e secagem do canal radicular com pontas de papel absorventes esterilizadas.

Os canais radiculares receberam em seguida o curativo de demora, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição de grupos, dentes utilizados, amostras microbianas coletadas antes (*) e 30 dias após(**) o preparo biomecânico e a colocação de curativos de demora

GRUPO	MATERIAL UTILIZADO	DENTES	AMOSTRAS	TOTAL DE AMOSTRAS
I	Calen	10	10* + 10**	20
II	Calen PMCC	10	10* + 10**	20
III	Calasept	10	10* + 10**	20

* antes; ** 30 dias após

As técnicas de preenchimento dos canais radiculares com os medicamentos à base de hidróxido de cálcio variaram de acordo com a pasta utilizada: as pastas Calen e Calen PMCC, foram aplicadas com o auxílio de seringas modelo ML (S.S.White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, Brasil); enquanto que a pasta Calasept foi inserida com a própria seringa disponível no kit.

Os dentes foram então selados temporariamente pela técnica de duplo selamento, utilizando duas camadas de materiais distintos: uma camada interna de cimento provisório Cimpat (Septodont-França) e uma camada externa de óxido de zinco P.A. (S.S.White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, Brasil) e eugenol (S.S.White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, Brasil) manipulados em placa de vidro

com auxílio de uma espátula nº 24 (S.S.White Duflex, Rio de Janeiro, Brasil), até a obtenção de uma pasta consistente e modelável.

Para a execução da segunda sessão, os pacientes retornaram 30 dias (+ou-2) após a colocação do curativo de demora. Os dentes foram novamente submetidos aos passos clínicos de assepsia e anti-sepsia descritos na primeira sessão. O selamento provisório foi removido, procedendo-se à irrigação dos canais radiculares com solução fisiológica esterilizada, até que a pasta medicamentosa à base de hidróxido de cálcio fosse removida dos canais radiculares. Novamente os canais radiculares foram inundados com solução de EDTA, que foi agitada por 3 minutos, para remoção do resíduo dos curativos de demora, permitindo exposição dos túbulos dentinários e possível refluxo de bactérias ali alojadas. Posteriormente, os canais radiculares foram secos com pontas de papel esterilizadas, colocado na câmara coronária bolinhas de algodão esterilizadas e novamente selados (técnica de duplo selamento com uma camada de Cimpat coberta por uma segunda camada de cimento de OZE).

Os canais radiculares foram mantidos vazios por um intervalo de 7 dias para possibilitar o refluxo de microrganismos dos túbulos dentinários, que sobreviveram à ação dos medicamentos. Desta forma, para a 3ª sessão, os dentes passaram novamente por procedimentos clínicos de isolamento absoluto de campo operatório, assepsia e anti-sepsia da área (conforme realizada nas sessões

anteriores), remoção dos materiais seladores. Uma vez mais foram utilizadas as pontas de papel por 1 minuto nos canais radiculares, inundados com solução fisiológica esterilizada, sendo a ponta de papel colocada em um tubo Eppendorf contendo 300µL de soro fisiológico, e estocadas em freezer a -80°C para posterior análise pela técnica PCR. Após copiosa irrigação/aspiração com solução de hipoclorito de sódio a 2,5% e secagem, os canais radiculares foram finalmente obturados.

Técnica PCR

A Técnica PCR

A análise microbiológica foi processada utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase - PCR – Idealizada por Mullis^{34,92,93,94} e descrita por Saiki et al.^{117,118}, 1985, 1988.

Essa técnica baseia-se em reações enzimáticas termocíclicas de desnaturação pelo calor, hibridação dos oligonucleotídeos e síntese enzimática de DNA, resultando na amplificação exponencial da seqüência de DNA desejado, permitindo a identificação de seqüências de genes específicos, assim como genes de espécies bacterianas (Slots et al.¹³¹, 1995). Neste trabalho foram pesquisadas a presença das seguintes bactérias: *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Porphyromonas endodontalis*. Para detecção de bactérias nas amostras, foi utilizado o primer 16S rDNA, que comprova a presença

destes microrganismos.

Os tubos de Eppendorf com as amostras, contendo 300µL de soro fisiológico com a ponta de papel, foram descongelados à temperatura ambiente, submetidos ao vortex por um minuto, e na seqüência, a ponta foi removida com auxílio de uma pinça clínica esterilizada, comprimindo-o entre a tampa e o tubo. Submeteu-se então a um banho de fervura por 10 min para a extração do DNA bacteriano, finalizando a preparação da amostra.

Purificação do DNA

A etapa de purificação do DNA foi executada baseada no protocolo adaptado por Doyle & Doyle³¹ e utilizado pela Disciplina de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP (Apêndice 1).

Seleção e Síntese dos Oligonucleotídeos

Os pares de oligonucleotídeos (5'-3') – *primers* - específicos foram sintetizados pela Life Technologies do Brasil Ltda-SP, como apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Pares de *primers* para PCR usados

PARES DE PRIMER PARA	SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS	POSIÇÃO DA BASE (COMPRIMENTO DO AMPLICON)
<i>Porphyromonas gingivalis</i> *	5' AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG 3' 5' ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT 3'	729-1132 (404bp)
<i>Bacteroides forsythus</i> *	5' GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA 3' 5' TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T 3'	(641bp)
<i>Prevotella intermedia</i> *	5' TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG 3' 5' TAC ACA TCT CTG TAT CCT GCG T 3'	458-1032 (575bp)
<i>Prevotella nigrescens</i> **	5' TTA TGT TAC CCG TTA TGA TGG AAG 3' 5' ATG GCG AAA TAG GAA TGA AAG TTA 3'	(1100bp)
<i>Porphyromonas endodontalis</i> ***	5' GCT GCA GCT CAA CTG TAG TC 3' 5' CCG CTT CAT GTC ACC ATG TC 3'	618-1289 (672bp)
Primer 16S rDNA****	5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' 5' AAG GAG GTG ATC CAG CC 3'	

* seqüências propostas por Slots et al.¹³¹(1995) e Ashimoto et al.⁷ (1996)

** seqüência citada por Guillot & Mouton⁵⁵

*** seqüência descrita por Siqueira et al.¹²⁷ (2001)

**** de acordo com Weisburg et al.¹⁵¹

Amplificação de Fragmentos do DNA

Para a reação de PCR foram utilizados tubos de Eppendorf específicos (MicroAmp™ Reaction 100,0μL), onde foram previamente preparados 45,0μL de uma mistura de reagentes (“Master Mix”) contendo 31,2μL de água deionizada bi-destilada, 5,0μL de solução tampão (10X Reaction Buffer Taq/rTaq DNA Polymerase – Pharmacia Biotech), 0,4μL de DNTp (DNA Polymerization Mix– Pharmacia Biotech- San Francisco, CA. USA), 4,0μL do 1º oligonucleotídeo de uma bactéria específica (25μMol de concentração), 4,0μL do 2º oligonucleotídeo da mesma bactéria (25μMol de concentração), 0,4μL de Taq DNA Polymerase (Pharmacia Biotech). Os tubos com as amostras foram submetidos ao

vortex por 5s para a homogeneização do meio e, em seguida, foi obtida uma alíquota de 5,0 µL da amostra que foi adicionada à mistura de reagentes e submetida ao aparelho termociclador (GeneAmp® PCR System 2400, Perkin Elmer, New Jersey - USA) com ciclos de tempo e temperatura distintos para os diversos *primers* utilizados de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 - Ciclos térmicos e tempos determinados para os *primers* utilizados

ESPÉCIE	DESNATURAÇÃO	CICLOS	DESNATURAÇÃO	ANELAMENTO	EXTENSÃO	PASSO
BACTERIANA/PRIMER	INICIAL (TEMPO)		(TEMPO)	(TEMPO)	(TEMPO)	FINAL
<i>P. gingivalis</i>	95°C (2')	36	94°C (30")	60°C (1')	72°C (2')	72°C (10')
<i>B. forsythus</i>	95°C (2')	36	95°C (30")	60°C (1')	72°C (1')	72°C (2')
<i>P. intermedia</i>	94°C (30")	36	95°C (30")	55°C (1')	72°C (1')	72°C (10')
<i>P. nigrescens</i>	94°C (30")	36	95°C (30")	55°C (1')	72°C (1')	72°C (10')
<i>P. endodontalis</i>	95°C (2')	36	94°C (30")	60°C (1')	72°C (2')	72°C (10')
16S rDNA*	94°C (5')	36	94°C (1')	55°C (1')	72°C (1'30")	72°C (10')

* Rolph et al.¹¹³ (2001)

Eletroforese

Para evidenciação e registro fotográfico, os produtos de amplificação foram misturados a uma solução de marcador de peso

molecular (100bp DNA Ladder-Invitrogen life technologies), depositados em nichos de uma placa de gel de agarose a 2%, e submetidos à eletroforese, e em seguida corados em solução de brometo de etídio, sendo observados através de um transluminador de luz UV, podendo desta maneira determinar as dimensões moleculares destes produtos comparando-as com um marcador de dimensão molecular de DNA comercial.

Análise estatística

Para análise estatística, foi empregado o software GMC 8.1 (<http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc.html>).

A comparação entre prevalência inicial de microrganismos e a prevalência após a aplicação de curativo de demora foi efetuada com o emprego do teste dos sinais.

Para comparar a eficácia antimicrobiana entre os 3 curativos de demora, Calen, Calen/PMCC e Calasept, foi aplicado o teste exato de Fisher.

Resultado

Dos 42 pacientes triados, 10 não se apresentaram, e ainda, dos 32 pacientes, dois não retornaram e os dois restantes tinham perdido a obturação provisória, restando 28 pacientes (30 casos clínicos).

Das 30 amostras obtidas antes do tratamento submetidos a PCR, 26 (86,7%) foram positivas para *primer* 16S rDNA.

Assim, a análise da ocorrência das espécies de bactérias foi efetuada considerando os 26 casos com reação PCR positiva. Dentre as bactérias selecionadas *Bacteroides forsythus* e *Porphyromonas endodontalis* foram encontrados neste universo amostral em 15 (57,7%) de 26 casos. *Prevotella nigrescens* foi detectada em 5 (19,2%) dos casos *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* não foram detectados em nenhuma das 30 amostras avaliadas.

No que diz respeito a eficácia dos diferentes curativo de demora mantidos durante cerca de 30 dias foram avaliados considerando os casos positivos com *primer* 16S rDNA antes do tratamento. Ainda, este conceito foi aplicado para análise da eficácia de cada curativo na redução de cada uma das espécies bacterianas presentes na amostragem inicial.

Estes valores estão apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6 montadas baseados nos Protocolos 1, 2 e 3.

Protocolo 1 - Ficha de anotação dos resultados de PCR de 10 amostras obtidas antes e após o tratamento com Calen.

CASOS	CALEN (Grupo I)											
	inicial						final					
	16S	B.f.	P.e.	P.g.	P.i.	P.n.	16S	B.f.	P.e.	P.g.	P.i.	P.n.
3. Calen	+	-	-	-	-	+		-	-	-	-	
7. Calen	+	+	+	-	-	+				-	-	
21. Calen	+	+	-	-	-	+			-	-	-	
23. Calen	+	-	+	-	-	-		-		-	-	-
24. Calen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25. Calen	+	+	-	-	-	+			-	-	-	
26. Calen	+	-	+	-	-	-		-		-	-	-
27. Calen	+	+	+	-	-	-				-	-	-
32. Calen	+	-	-	-	-	+		-	-	-	-	
34. Calen	+	+	+	-	-	-				-	-	-

+ presença de banda; - ausência de banda;  eficácia;  ineficácia

16S = *primer* 16S rDNA; B.f. = *Bacteroides forsythus*; P.e. = *Porphyromonas endodontalis*; P.g. = *Porphyromonas gingivalis*; P.i. = *Prevotella intermedia*; P.n. = *Prevotella nigrescens*

Tabela 4 - Eficácia da pasta Calen na redução de espécies de bactérias em 9 amostras positivas para o *primer* 16S.

CONDIÇÃO	16S		B.f.		P.e.		P.g.		P.i.		P.n.	
(AMOSTRA)	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
Antes	9	90,0	5	55,6	5	55,6	...		...		5	55,6
Após	3	33,3	2	40,0	2	40,0	...		...		...	...
Eficácia	6	66,7*	3	60,0*	3	60,0*	...		...		5	100,0*

... = não detectado; * = significativo a 1%; 16S = *primer* 16S rDNA; B.f. = *Bacteroides forsythus*; P.e. = *Porphyromonas endodontalis*; P.g. = *Porphyromonas gingivalis*; P.i. = *Prevotella intermedia*; P.n. = *Prevotella nigrescens*

Protocolo 2 - Ficha de anotação dos resultados de PCR de 10 amostras obtidas antes e após o tratamento com Calen PMCC.

CASOS	CALEN PMCC (Grupo II)											
	inicial						final					
	16S	B.f.	P.e.	P.g.	P.i.	P.n.	16S	B.f.	P.e.	P.g.	P.i.	P.n.
8. Calen/P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10. Calen/P	+	+	-	-	-	-	■	■	-	-	-	-
18. Calen/P	+	+	+	-	-	-	■	■	■	-	-	-
19. Calen/P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20. Calen/P	+	+	+	-	-	-	■	■	■	-	-	-
28. Calen/P	+	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-
29. Calen/P	+	-	+	-	-	-	■	-	-	-	-	-
30. Calen/P	+	-	+	-	-	-	■	-	■	-	-	-
31. Calen/P	+	+	+	-	-	-	■	■	■	-	-	-
33. Calen/P	■	-	-	-	-	-	■	-	-	-	-	-

+ presença de banda; - ausência de banda; ■ eficácia; ■ ineficácia

16S = *primer 16S rDNA*; B.f. = *Bacteroides forsythus*; P.e. = *Porphyromonas endodontalis*; P.g. = *Porphyromonas gingivalis*; P.i. = *Prevotella intermedia*; P.n. = *Prevotella nigrescens*

Tabela 5 - Eficácia da pasta Calen PMCC na redução de espécies de bactérias em 9 amostras positivas para o *primer 16S*.

CONDIÇÃO	16S		B.f.		P.e.		P.g.		P.i.		P.n.	
(AMOSTRA)	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
Antes	8	80,0	4	50,0	5	62,5	...	...	...	...	...	...
Após	2	25,0	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Eficácia	6	75,0*	4	100,0*	5	100,0*	...	...	...	...	...	...

... = não detectado; * = significativo a 1%; 16S = *primer 16S rDNA*; B.f. = *Bacteroides forsythus*; P.e. = *Porphyromonas endodontalis*; P.g. = *Porphyromonas gingivalis*; P.i. = *Prevotella intermedia*; P.n. = *Prevotella nigrescens*

É interessante observar o caso 33 (azul) positivo para o *primer 16S rDNA* mesmo após o tratamento com o Calen PMCC. Este caso ilustra a importância do emprego do *primer 16S rDNA* e também, do uso grande elenco de *primers* específicos.

Protocolo 3 - Ficha de anotação dos resultados de PCR de 10 amostras obtidas antes e após o tratamento com Calasept.

CASOS	CALASEPT (Grupo III)											
	inicial						final					
	16S	B.f.	P.e.	P.g.	P.i.	P.n.	16S	B.f.	P.e.	P.g.	P.i.	P.n.
2. Calasept	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4. Calasept	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5. Calasept	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
6. Calasept	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9. Calasept	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11. Calasept	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13. Calasept	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
14. Calasept	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16. Calasept	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17. Calasept	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-

+ presença de banda; - ausência de banda; - eficácia; + ineficácia

16S = *primer 16S rDNA*; B.f. = *Bacteroides forsythus*; P.e. = *Porphyromonas endodontalis*; P.g. = *Porphyromonas gingivalis*; P.i. = *Prevotella intermedia*; P.n. = *Prevotella nigrescens*

Tabela 6 - Eficácia da pasta Calasept na redução de espécies de bactérias em 9 amostras positivas para o *primer 16S*.

CONDIÇÃO	16S		B.f.		P.e.		P.g.		P.i.		P.n.	
(AMOSTRA)	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Antes	9	90,0	6	66,7	5	55,5	...	...	...	...	...	...
Após	3	33,3	2	22,2	1	11,1	...	...	...	...	...	...
Eficácia	6	66,7*	4	44,4*	4	44,4	...	...	...	...	...	...

... = não detectado; * = significativo a 1%; 16S = *primer 16S rDNA*; B.f. = *Bacteroides forsythus*; P.e. = *Porphyromonas endodontalis*; P.g. = *Porphyromonas gingivalis*; P.i. = *Prevotella intermedia*; P.n. = *Prevotella nigrescens*

A aplicação do teste dos sinais demonstrou diferença estatisticamente significativa, ao nível de 1% entre as amostras obtidas antes do preparo biomecânico e após a utilização dos curativos de demora: Calen, Calen/PMCC e Calasept para os *primers 16S rDNA*, *B. forsythus*, *P. endodontalis* e *P. nigrescens*.

Tabela 7 – Comparação da eficácia entre as pastas Calen, Calen/PMCC e Calasept sobre microrganismos.

MATERIAL	16S	B.f.	P.e.	P.g.	P.i.	P.n.
	%	%	%	%	%	%
Calen	66,7	60,0	60,0	...	...	100,0
Calen/PMCC	75,0	100,0	100,0	...	...	...
Calasept	66,7	66,7	80,0	...	...	...

... = não detectado; 16S = *primer 16S rDNA*; B.f. = *Bacteroides forsythus*; P.e. = *Porphyromonas endodontalis*; P.g. = *Porphyromonas gingivalis*; P.i. = *Prevotella intermedia*; P.n. = *Prevotella nigrescens*

Nota: não foi detectada diferença estatisticamente significante entre os grupos ao nível de $\alpha = 0,05$

Com relação à eficácia das pastas Calen, Calen/PMCC e Calasept na eliminação de microrganismos dos canais radiculares, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre elas, de acordo com o teste exato de Fisher.

Discussão

No presente estudo foi proposta a monitoração da microbiota de canais radiculares de dentes de humanos portadores de processos patológicos de origem bacteriana: gangrena pulpar e reação periapical crônica visível radiograficamente, antes e após a instituição do tratamento endodôntico. Foram coletados dos canais radiculares o material a ser submetido à técnica PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), para avaliar a eficácia de 3 curativos de demora à base de hidróxido de cálcio utilizados por 30 dias, como medicação no combate a microrganismos: Calen (veículo viscoso), Calen PMCC (veículo viscoso) e Calasept (veículo aquoso).

Os casos selecionados para monitoração foram diagnosticados clínica e radiograficamente como dentes portadores de gangrena pulpar e lesão periapical crônica. A periodontite apical crônica representa um equilíbrio dinâmico entre agentes irritantes exógenos, usualmente a microbiota do canal radicular e seus bioprodutos, e os mecanismos de defesa do hospedeiro, quando este último não é capaz de destruir e/ou eliminar os fatores patogênicos, formando barreira circunscrita que eficazmente previne a invasão microbiana ao resto do organismo, gerado por resposta imunoinflamatória.

Segundo Kakehashi et al.⁶⁶ (1965) e Nair⁹⁷ (1987), um amplo espectro de agentes microbianos é responsável pela natureza das

lesões periapicais, entretanto, evidências clínicas e experimentais mostram que a periodontite apical é induzida por bactérias provenientes de canais radiculares infectados (Pitt Ford¹⁰⁸, 1982).

Apenas uma pequena parcela das estimadas 600 espécies bacterianas (Gilberto J. Debelian no 20º Congresso Internacional de Odontologia de São Paulo, SP, em janeiro de 2002) que colonizam a cavidade bucal de humanos saudáveis, têm sido consistentemente isolada dos canais radiculares de dentes que apresentam lesão periapical crônica.

Entre estas espécies, bactérias dos gêneros *Campylobacter*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Propionibacterium* e *Streptococcus*, têm sido isoladas com maior frequência de canais radiculares infectados (Haapasalo⁵⁶, 1989; Sundqvist et al.¹⁴², 1989).

As espécies bacterianas monitoradas neste estudo foram: *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella nigrescens*, pertencentes ao grupo dos bacilos pigmentados de negro, que apresentam evidência de sua participação nas patologias infecciosas do periápice (Sundqvist¹⁴¹, 1994; Haapasalo et al.⁵⁶ 1986; van Winkelhoff¹⁴⁹, 1988; Milsom et al.⁸⁷, 1996; Bae et al.¹¹, 1997; Drucker et al.³³, 1997; Stubbs et al.¹³⁷, 1999; Nissan et al.¹⁰¹, 2000) além de estarem envolvidas na indução de sinais e sintomas das infecções endodônticas, decorrente da interação sinérgica entre gêneros

e espécies microbianas (consórcio bacteriano). Neste estudo ainda foi incluída a monitoração de *Bacteroides forsythus*, por ser espécie fastidiosa, não descrita na literatura como participante da microbiota de canais radiculares, até o advento das novas técnicas moleculares (Conrads et al.²⁶, 1997; Gonçalves et al.⁵², 1999; Siqueira et al.¹²⁸, 2000; Sunde et al.¹³⁸, 2000; Jung et al.⁶⁵, 2001; Roças et al.¹¹², 2001; Siqueira et al.¹²⁶, 2001). Esta espécie bacteriana, atualmente é apontada por alguns autores como a mais freqüente em casos de dentes portadores de gangrena pulpar e lesão periapical crônica.

A investigação de populações microbianas por técnicas de cultura, ou por demais técnicas convencionais, é freqüentemente limitada, devido aos microrganismos terem de se desenvolver em laboratório para que sejam identificados (Tran & Rudney¹⁴⁵, 1999). Segundo Siqueira¹²⁷ (2000) bacilos anaeróbios pigmentados de negro, presentes na cavidade bucal, são fastidiosos ou altamente sensíveis ao oxigênio, o que pode levar a uma subestimação de sua presença por técnicas convencionais.

A utilização de novas técnicas moleculares para elucidação da microbiota endodôntica, tem demonstrado que inúmeras espécies bacterianas fastidiosas, até então nunca isoladas, podem estar presentes neste sítio (Xia et al.¹⁵⁰, 2000; Rolph et al.¹¹³, 2001; Munson et al.⁹⁵, 2002). O impacto causado pela biologia molecular (que atualmente dissemina-se por diversas áreas do conhecimento), sobre a Endodontia nos remonta à década de 70 do século XX, onde outrora, com o

incremento de técnicas microbiológicas em anaerobiose, atentou-se à presença predominante de bactérias anaeróbias gram-negativas em dentes portadores de lesão periapical crônica. Desta maneira, foram geradas discussões relacionadas à veracidade e validade de trabalhos até então publicados que, devido às suas limitações técnicas, não atinavam à presença destas espécies bacterianas nesses processos patológicos.

Atualmente, muitos são os relatos que apresentam evidências à luz destas novas tecnologias, de espécies bacterianas desconhecidas e ainda não isoladas de canais radiculares (Socransky et al.¹³³, 1994; Conrads et al.²⁶, 1999; Jung et al.¹⁵, 2001; Rolph et al.¹¹³, 2001; Fouad et al.⁴¹ 2002; Munson et al.⁹⁵, 2002), fato este, que está revolucionando o conhecimento das populações microbianas deste sítio, e gerando questionamento aos trabalhos até então publicados. Assim propusemo-nos a incluir neste estudo uma espécie bacteriana, que até o estudo de Conrads²⁶ (1997), não era relacionada à contaminação de canais radiculares: *Bacteroides forsythus*.

Uma das técnicas moleculares, o PCR, idealizada por Mullis^{92,93,94}, em 1983 (citada por Erlich³⁴, 1992), e por nós eleita para este estudo, permite a detecção de cepas não cultiváveis de algumas espécies bacterianas. Entretanto esta técnica apresenta limitações peculiares, pois para que um organismo seja elucidado por esta técnica, é necessário o prévio conhecimento, ao menos parcial, do seu

seqüenciamento genético, para que *primers* com seqüência de nucleotídeos sejam sintetizados possibilitando a hibridação (anelamento), na fase de termociclagem.

Para detecção de quaisquer células bacterianas pela técnica PCR (através da síntese de uma tira de matriz de DNA ou *amplicons*), possivelmente presentes nos canais radiculares aqui analisados ou controle positivo de presença bacteriana, foram utilizados *primers* para genes 16S rDNA que tornaram-se à luz das técnicas moleculares o padrão "ouro" para o estudo da taxonomia bacteriana (Weisburg et al.¹⁵¹, 1991).

Os resultados ora alcançados, podem ser analisados por partes: das espécies selecionadas para monitoração contabilizam-se 30 amostras (pré terapêutica endodôntica) mais 30 amostras (pós terapêutica endodôntica com utilização de curativo de demora à base de hidróxido de cálcio). Na verificação inicial, sem a instituição da terapêutica endodôntica, com a análise de controle positivo de presença de bandas de origem bacteriana, através da utilização de *primers* 16S rDNA, foram constatadas presença destas em 26 (86,7%) de 30 casos. Com relação à ausência de bandas nos 4 casos clínicos (8, 16, 19 e 24), alguns questionamentos podem ser apontados: condição de necrose asséptica, presença de outras espécies microbianas (ex. fungos), produtores de fatores de antibiose; limitações ou falhas relacionadas à técnica. Para todas estas indagações novas investigações devem ser

realizadas.

Entretanto, a presença de bandas quando se utiliza a técnica PCR não pode ser considerada como comprovação da presença de bactérias viáveis. No caso, bandas do DNA preservado dos microrganismos mortos, puderam ser capturadas pelos reagentes do PCR, amplificadas e detectadas pela eletroforese. Por outro lado, a não evidenciação de bandas, devido à elevada sensibilidade desta técnica, pode-se inferir com alto grau de precisão a ausência de espécie bacteriana.

A análise da ocorrência das espécies de bactérias nas amostras foram efetuadas considerando os 26 casos com reação PCR positiva para o *primer* 16S rDNA.

Dentre as bactérias estudadas, *Bacteroides forsythus* e *Porphyromonas endodontalis* foram encontradas com maior predomínio neste universo amostral em 15 (57,7%) de 26 casos (para cada espécie), corroborando com estudos de Gonçalves & Mouton⁵² (1999), que relatam ser *Bacteroides forsythus* a espécie bacteriana predominante em casos de dentes portadores de gangrena pulpar e lesão periapical crônica.

Bandas de *Prevotella nigrescens* foram detectadas em 5 (19,2%) dos casos. É interessante observar o caso 33 positiva para *primer* 16S rDNA mesmo após o tratamento com o curativo de demora. Este caso ilustra a importância do emprego do *primer* 16S rDNA e também do uso de maior número de *primers* específicos. Não foram constatadas

em nenhum dos casos a presença de bandas para *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis*.

Em estudo sobre a presença de bacilos anaeróbios pigmentados de negro da microbiota de canais radiculares com quadro de abscesso periapical agudo, van Winkelhoff et al.¹⁴⁹ (1992) utilizando técnicas de cultura, encontraram predomínio de *Prevotella intermedia* (63% dos casos), seguido de *Porphyromonas endodontalis* (53% dos casos) e *Porphyromonas gingivalis* (em 12% dos casos). Sundqvist et al.¹⁴² (1989) encontraram para estes casos, *Prevotella intermedia* em 10 de 17 casos, *Porphyromonas gingivalis* (1 de 17 casos) e *Porphyromonas endodontalis* (4 em 17 casos). Segundo alguns autores, fatores geográficos podem estar envolvidos na diferença de populações microbianas nas pulpo periapicopatias (Siqueira et al.¹²³, 2000). Em virtude dos critérios de seleção, de dentes assintomáticos, pode ser possível explicar a ausência de bandas de *Porphyromonas gingivalis*, espécie bacteriana relacionada a casos sintomáticos⁵⁰.

No que diz respeito a eficácia dos diferentes curativos de demora mantidos durante cerca de 30 dias, para avaliação foram considerados os casos positivos com *primer* 16S rDNA para cada grupo de pastas. Ainda, este conceito foi aplicado para análise da eficácia de cada pasta na eliminação de cada uma das espécies bacterianas presentes na amostragem inicial (obtidos antes do tratamento).

No Grupo I (Calen), apenas na amostra 24 não se detectou

presença de bandas bacterianas iniciais no controle positivo (*primers* 16S rDNA), assim o universo a ser monitorado teve como amostra 9 (90,0%) casos. Seis de 9 casos foram negativos ao controle com os *primers* para o gene, ou seja, a eficácia de 66,7%. No que tange a eficácia na eliminação de *Bacteroides forsythus* e *Porphyromonas endodontalis* foram de 60,0% e de 100,0% para a espécie *Prevotella nigrescens*.

No Grupo II (Calen PMCC), 2 casos (8 e 19), foram negativos aos *primers* 16S rDNA. Seis (75,0%) de 8 casos foi negativa para o *primer* 16S rDNA. Entretanto para todas bactérias aqui monitoradas foi constatada ausência de bandas (eficácia de 100,0%) após o uso deste material por 30 dias, mostrando uma atividade mais pronunciada deste material frente a estas espécies tão intimamente relacionadas às pulpo periapicopatias.

No grupo III (Calasept) com o controle positivo processado com *primers* 16S rDNA, foi constatada ausência de bandas bacterianas em 6 de 9 casos, portanto a eficácia deste material foi de 66,7%. Quanto a eficácia na eliminação de *Bacteroides forsythus* foi de 4 (66,7%) de 6 casos iniciais positivos e de *Porphyromonas endodontalis* de 4 (80,0%) de 5 casos.

De acordo com Leonardo et al.⁸¹ (2002), o uso de curativos de demora entre sessões endodônticas em dentes portadores de lesão periapical crônica é importante para redução bacteriana, além dos níveis obtidos por meio do preparo biomecânico, particularmente em virtude da

penetração em áreas inalcançáveis pela instrumentação ou soluções irrigadoras, como túbulos dentinários e suas ramificações. Estes curativos devem ser escolhidos baseados em dados como difusão, toxicidade e potencial antiinflamatório.

Há muito tempo tem sido reconhecido que os efeitos antibacterianos dos procedimentos biomecânicos podem ser aumentados pela subsequente aplicação de medicação antimicrobiana intracanal, dentre estas, destaca-se o hidróxido de cálcio (Heithersay⁵⁹, 1975; Bystrom et al.²² 1985; Gomes et al.⁵¹, 1996).

O hidróxido de cálcio é uma substância biologicamente compatível com os tecidos vivos. Segundo Bystrom et al.²² (1985), a atividade antibacteriana está relacionada ao seu alto pH (12,5). Seus mecanismos de ação, segundo Siqueira & Lopes¹²⁰ (1999), ocasiona: dano à membrana citoplasmática bacteriana, desnaturação protéica e dano à estrutura do DNA. Ainda, segundo Kontakiotis et al.⁷⁰ (1995), o Ca(OH)_2 absorvendo dióxido de carbono de canais radiculares, pode ser letal a espécies dependentes desta substância como: *Capnocytophaga*, *Eikenella* e *Actinomyces* spp. podendo interferir em todas as demais espécies dependentes destas dentro da cadeia alimentar. A detoxicação de LPS bacteriano (lípide A), componente altamente tóxico e imunoinflamatório da parede celular de bactérias gram-negativas, também é um importante trunfo relacionado ao hidróxido de cálcio no combate à microbiota endodôntica, especialmente gram-negativa (Safavi &

Nichols^{115,116}, 1993, 1994; Nelson Filho⁹⁸, 2000; Nelson Filho et al.⁹⁹, 2002). Porém, de acordo com Leonardo et al.^{77,78,79} (1993, 1993, 2000), Estrela et al.³⁵ (1998) e Holland et al.⁶¹ (2002), esta substância utilizada como curativo de demora do canal radicular requer um tempo de ação para a destruição de microrganismos, agindo em contato direto ou indireto. Entretanto, devido às propriedades físico-químicas não satisfatórias, existe grande dificuldade para utilização clínica, fato que pode desencorajar seu uso pelo clínico. Com o objetivo de melhorar estas propriedades sem contudo alterar suas propriedades biológicas, o hidróxido de cálcio tem sido utilizado associado à diversas substâncias e veículos como: água, anestésicos, óleos, vernizes, originando diversas formulações (Silveira¹¹⁹, 1997).

A importância clínica relacionada ao veículo selecionado para formulação de materiais à base de hidróxido de cálcio é de fundamental importância. Anthony et al.⁶ (1982), estudaram três diferentes veículos, associados ao hidróxido de cálcio, concluindo que os valores mais altos de pH foram obtidos quando esta substância estava associada ao PMCC ou à solução salina. Veículos aquosos geram um efeito alcalinizante e uma velocidade de ação mais rápidas que os demais veículos, entretanto, sua ação é extremamente fugaz, tendo perda de eficácia quando mantidos nos canais radiculares por períodos mais prolongados (Almyroudi et al.⁴, 2002).

De acordo com Holland et al.⁶¹ (2002), algumas espécies

bacterianas podem resistir por até 10 dias à ação do hidróxido de cálcio, por outro lado, segundo Nerwich et al.¹⁰⁰ (1993), para que esta substância alcalinize a dentina em profundidade, são necessárias 2 a 3 semanas, opinião corroborada por Silveira¹¹⁹ (1997), que recomendam a manutenção destes curativos para casos de dentes portadores de lesão periapical crônica entre 15 e 30 dias. Assim foi estabelecido no presente trabalho, um período de 30 dias de manutenção dos curativos de demora nos canais radiculares a serem monitorados.

Com relação aos veículos utilizados nas formulações à base de hidróxido de cálcio, foram escolhidos o Calen e Calen PMCC (veículo viscoso), e o Calasept (veículo aquoso). Outros estudos também relatam o maior poder de alcalinização do meio quando o hidróxido de cálcio é utilizado em veículo aquoso (Staehle et al.¹³⁴, 1989). Entretanto, o efeito da liberação de íons cálcio e hidroxila, quando do uso de veículos aquosos defronta-se com a questão da fugacidade, pois a rápida liberação destes íons, determina também uma rápida neutralização deste produto e, por conseguinte, uma perda precoce de atividade.

No presente estudo foi constatada a eficácia dos curativos de demora utilizados na redução bacteriana de canais radiculares. Com relação à eficácia entre as pastas utilizadas, Calen, Calen/PMCC e Calasept na eliminação de microrganismos dos canais radiculares, não foi possível encontrar diferenças estatisticamente significantes entre elas quando da análise pelo teste exato de Fisher.

O presente estudo, abre desta maneira uma nova linha de pesquisa relacionada ao controle de qualidade dos tratamentos endodônticos pela utilização de medicações à base de hidróxido de cálcio e da monitoração da microbiota endodôntica, por meio de técnicas moleculares. De acordo com os resultados, ora encontrados, enfocando a utilização de pastas à base de hidróxido de cálcio associadas ao PMCC, é recomendada a utilização da metodologia empregada para os demais curativos de demora, incluindo a associação de hidróxido de cálcio/clorexidina, medicamento estudado atualmente, de maneira enfática, que vem apresentando, a luz de outras metodologias, resultados também promissores.

No entanto, outros trabalhos devem ser realizados para monitoração das diversas etapas de tratamentos, bem como a eficácia de agentes medicamentosos, através de métodos moleculares como PCR e/ou hibridização *checkerboard* DNA-DNA.

Conclusão

- Os resultados evidenciaram diminuição das espécies microbianas, monitoradas de forma indireta, à partir da presença de bandas, ou *amplicons* (produtos do PCR), quando do uso de curativos de demora à base de hidróxido de cálcio.
- Com relação à eficácia antimicrobiana não houve diferença estatisticamente significativa entre as pastas estudadas.
- O uso do *primer* 16S rDNA foi um método satisfatório para evidenciação da presença bacteriana.
- A técnica PCR mostrou-se exeqüível, por ser simples, rápida, econômica e eficaz na detecção de microrganismos específicos.

Referências*

1. ABOU-RASS, M.; BOGEN, G. Microorganisms in closed periapical lesions. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.31, n.1, p.39-47, Jan. 1998.
2. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294p.
3. ALENCAR, A.H.G.; LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B.; ITO, I.Y. Determination of the p-monochlorophenol residue in the calcium hydroxide + p-monochlorophenol combination used as an intracanal dressing in pulpless teeth of dogs with induced chronic periapical lesion. **J. Endod.**, Baltimore, v.23, n.8, p.522-524, Aug. 1997.
4. ALMYROUDI, A.; MACKENZIE, D.; McHUGH, S.; SAUNDERS, W.P. The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an *in vitro* study. **J. Endod.**, Baltimore, v.28, n.3, p.163-167, Mar. 2002.
5. ANDO, N.; HOSHINO, E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentin. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.23, n.1, p.20-27, Jan. 1990.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2002. 24p.

6. ANTHONY, D.R.; GORDON, T.X., Del RIO, C.E. The effect of three vehicles on the pH of calcium hydroxide. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.54, n.5, p.560-565, Nov. 1982.
7. ASHIMOTO, A.; CHEN,C.; BAKKER, I.; SLOTS, J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.11, n.4, p.266-273, Aug. 1996.
8. ASSED, S. **Prevalência de microrganismos em canais radiculares de dentes humanos com reação periapical crônica. Efeito do preparo biomecânico e do curativo de demora. Imunofluorescência indireta e cultura.** 1993. 110f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
9. ASSED, S.; LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B.; ITO, I.Y. Prevalência de microrganismos em canais radiculares de dentes com necrose pulpar e reação periapical crônica. Imunofluorescência indireta-efeito do preparo biomecânico e do curativo de demora pela cultura. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v.53, n.1, p.24-28, jan.-fev. 1996.
10. ASSED, S.; ITO, I.Y.; LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B., LOPATIN, D.E. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.12, n.2, p.66-69, Apr. 1996.

11. BAE, K-S.; BAUMGARTNER, J.C.; SHEARER, T.R.; DAVID, L.L.
Occurrence of *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* in infections of endodontic origin. **J.Endod.**, Baltimore, v.23, n.10, p.620-623, Oct. 1997.

12. BARBOSA, C.A.; GONÇALVES, R.B.; SIQUEIRA Jr., J.F.; UZEDA, M.
Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. **J. Endod.**, Baltimore, v.23, n.5, p.297-300, May, 1997.

13. BAUMGARTNER, J.C.; WATTS, C.M.; XIA, T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. **J. Endod.**, Baltimore, v.26, n.12, p.695-698, Dec. 2000.

14. BERBERT, F.L.C.V.; LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B.; TANOMARU FILHO, M.; BRAMANTE, C.M. Influence of root canal dressings and sealers on repair of apical periodontitis after endodontic treatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.93, n.2, p.184-189, Feb. 2002.

15. BERG, J.O.; NORD, C.E. A method for isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.81, n.2, p.163-166, Feb. 1973.

16. BINNIE, W.H.; ROWE, A.H. A histological study of the periapical tissues of incompletely formed pulpless teeth filled with calcium hydroxide. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.52, n.5, p.1110-1116, Sept.-Oct. 1973.
17. BOGEN, G.; SLOTS, J. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.32, n.3, p.204-210, May, 1999.
18. BOHORQUES-AVILA, S.P. **Avaliação da presença e localização de bactérias nos canais radiculares e nas lesões periapicais crônicas pelo método de coloração de Brown e Brenn e da *Prevotella intermedia* pela imunofluorescência indireta.** 1994. 125f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, 1994.
19. BONIFÁCIO, K.C. **MEV - Avaliação do ápice radicular em dentes de humanos com e sem vitalidade pulpar.** 2000. 169f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.
20. BROWN, L.R.; RUDOLPH, C.E. Isolation and identification of microorganisms from unexposed canals of pulp-involved teeth. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.10, n.10, p.1094-1099, Oct. 1957.

21. BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.89, n.4, p.321-328, Aug. 1981.
22. BYSTRÖM, A.; CLAEISSON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.1, n.5, p.170-175, Oct. 1985.
23. BYSTRÖM, A.; HAPPONEN, R-P; SJÖGREN, U.; SUNDQVIST, G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.3, n.2, p.58-63, Apr. 1987.
24. CHEN, C.; SLOTS, J. Clonal analysis of *Porphyromonas gingivalis* by the arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.9, n.2, p.99-103, Apr. 1994.
25. CHONG, B.S.; PITT FORD, T.R. The role of intracanal medication in root canal treatment. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.25, n.2, p.97-106, Mar. 1992.
26. CONRADS, G.; GHARBIA, S.E.; GULABIVALA, K.; LAMPERT, F.; SHAH, H.N. The use of a 16S rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. **J. Endod.**, Baltimore, v.23, n.7, p.433-437, Jul. 1997.

27. COSTA, A.D.; ANZAI, A.; NETO, J.B.; IKEDA, J. Uso do hidróxido de cálcio no tratamento de dentes com lesões periapicais: relato clínico de 13 casos. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v.35, n.3, p.220-226, maio/jun. 1981.
28. CVEK, M.; HOLLENDER, L.; NORD, C.E. Treatment of non vital permanent incisors with calcium hydroxide. A clinical, microbiological and radiological evaluation of treatment in one sitting of teeth with mature or immature root. **Odontol. Revy.**, Lund, v.27, n.1, p.93-108, Jan. 1976.
29. DEBELIAN, G.J.; OLSEN, I.; TRONSTAD, L. Anaerobic bacteremia and fungemia in patients undergoing endodontic therapy: an overview. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v.3, n.1, p.281-287, July, 1998.
30. Di FIORE, P.M.; PETERS, D.D.; SETTERSTROM, J.A.; LORTON, L. The antibacterial effects of calcium hydroxide apexification pastes on *Streptococcus sanguis*. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.55, n.1, p.91-94, Jan. 1983.
31. DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-18, 1990.
32. DRAKE, D.R.; WIEMANN, A.H.; RIVERA, E.M.; WALTON, R.E. Bacterial retention in canal walls *in vitro*: effect of smear layer. **J. Endod.**, Baltimore, v.20, n.6, p.78-82, June, 1994.

33. DRUCKER, D.B.; GOMES, B.P.; LILEY, J.D. Role of anaerobic species in endodontic infections. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.25, suppl.2:S, p.220-221, Sept. 1997.
34. ERLICH, H.A. **PCR technology principles and applications for DNA amplification**. New York: W.H. Freeman and Company, 1992.
35. ESTRELA, C. **Eficácia antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio**. 1997. 140f. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1997.
36. ESTRELA, C.; PIMENTA, F.C.; ITO, I.Y.; BAMMANN, L.L. *In vitro* determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. **J. Endod.**, Baltimore, v.24, n.1, p.15-17, Jan. 1998.
37. ESTRELA, C.; PIMENTA, F.C.; ITO, I.Y.; BAMMANN, L.L. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. **J. Endod.**, Baltimore, v.25, n.6, p.416-418, June, 1999.
38. ESTRELA, C.; SYDNEY, G.B.; BAMMANN, L.L.; FELIPPE Jr., O. Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. **Rev. Fac. Odont. Bauru**, Bauru, v.2, n.4, p.31-38, out./dez. 1994.

39. FAVA, L.R.G. Efeito antibacteriano das pastas de hidróxido de cálcio. Revisão. **Rev. Paul. Odontol.**, São Paulo, v.15, n.1, p.10-16, jan./fev. 1993.
40. FERRARESI, A.; ITO, I.Y. **Avaliação de concentração inibitória mínima (CIM) de pasta de hidróxido de cálcio e de pasta de hidróxido de cálcio com paramonoclorofenol canforado, de paramonoclorofenol canforado e de para-monoclorofenol.** 1990. (Relatório de Iniciação Científica) - Faculdade de Odontologia, Fundação Educacional, Barretos, 1990.
41. FOUAD, A.F.; BARRY, J.; CAIMANO, M.; CLAWSON, M.; ZHU, Q.; CARVER, R.; HAZLETT, K.; RADOLF J.D. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.40, n.9, p.3223-3231, Sept. 2002.
42. FOREMAN, P.C.; BARNES, I.E. A review of calcium hydroxide. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.23, n.6, p.283-297, Nov. 1990.
43. FRANK, A.L. Therapy for the divergent pulpless tooth by continued apical formation. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.72, n.1, p.87-93, Jan. 1966.
44. FREDRICKS, D.N.; RELMAN, D.A. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.29, n.3, p.475-488, Sep. 1999.

45. GATTI, J.J.; DOBECK, J.M.; SMITH, C.; WHITE, R.R.; SOCRANSKY, S.S.; SKOBE, Z. Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA - DNA hybridization. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.16, n.5, p.197-204, Oct. 2000.
46. GENCOGLU, N.; KULEKÇI, G. Antibacterial efficacy of root canal medicaments. **J. Nihon Univ. Sch. Dent.**, Tokyo, v.34, n.4, p.233-236, Dec. 1992.
47. GODOY, V.L. **Distribuição de bactérias planctônicas, colônias bacterianas e biofilmes microbianos em dentes decíduos com pulpite e ou necrose pulpar.** 1999. 151f. Tese (Doutorado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, 1999.
48. GOMES, B.P.F.A., FERRAZ, C.C.R. GARRIDO, F.D., ROSALEN, P.L., ZAIA, A. A., TEIXEIRA, F.B., SOUZA-FILHO, F.J. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. **J. Endod.**, Baltimore, v.28, n.11, p.758-761, Nov. 2002.
49. GOMES, B.P.F.A.; LILLEY, J.D.; DRUCKER, D.B. Clinical significance of dental root canal microflora. **J. Dent.**, Guildford, v.24, n.1-2, p.47-55, Jan.-Mar. 1996.
50. GOMES, B.P.F.A.; LILLEY, J.D.; DRUCKER, D.B. Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.29, n.2, p.69-75, Mar. 1996.

51. GOMES, I.C.; CHEVITARESE, O.; ALMEIDA, N.S.; SALLES, M.R.; GOMES, G.C. Diffusion of calcium through dentin. **J. Endod.**, Baltimore, v.22, n.11, p.590-595, Nov. 1996.
52. GONÇALVES, R.B.; MOUTON, C. Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in infected root canals. **J. Endod.**, Baltimore, v.25, n.5, p.336-340, May, 1999.
53. GONÇALVES, R.B.; ROBITAILLE, M.; MOUTON, C. Identical clonal types of *Porphyromonas gingivalis* or *Prevotella nigrescens* recovered from infected root canals and subgingival plaque. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.14, n.3, p.197-200, June, 1999.
54. GONÇALVES, R.B.; VAISANEN, M.L.; van STEENBERGEN, T.J.; SUNDQVIST, G.; MOUTON, C. Genetic relatedness between oral and intestinal isolates of *Porphyromonas endodontalis* by analysis of random amplified polymorphic DNA. **Res. Microbiol.**, Paris, v.150, n.1, p.61-68, Jan./Feb. 1999.
55. GUILLOT, E.; MOUTON, C. A CR-DNA probe assay specific for *Bacteroides forsythus*. **Moll. Cell Probes.**, New York, v.10, n.6, p.413-421, Dec. 1996.
56. HAAPASALO, M. **The genus Bacteroides in human dental root canal infection.** 1986. 87f. Thesis (Ph.D) - University of Helsinki - Finland, Helsinki, 1986.

57. HAN, G.Y.; PARK, S. H.; YOON, T.C. Antimicrobial activity of Ca(OH)_2 containing pastes with *Enterococcus faecalis in vitro*. **J. Endod.**, Baltimore, v.27, n.5, p. 328-332, May, 2001.
58. HARPER-OWEN, R.; DYMOC, D.; BOOTH, V.; WEIGHTMAN, A.J.; WADE, W.G. Detection of unculturable bacteria in periodontal health and disease by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.37, n.5, p.1469-1473, May, 1999.
59. HEITHERSAY, G.S. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. **J. Br. Endod. Soc.**, London, v.8, n.2, p.74-93, July, 1975.
60. HOLLAND, R.; SOUZA, V.; NERY, M.J.; BERNABÉ, P.F.E.; MELLO, W.; OTOBONI FILHO, J.A. The effect of calcium hydroxide in dentine. **Rev. Fac. Odontol. Araçatuba.**, Araçatuba, v.7, n.2, p.177-183, jul.-dez. 1978.
61. HOLLAND, R.; SOUZA, V.; BERNABÉ, P.F.E.; NERY, M.J.; OTOBONI FILHO, J.A.; DEZAN JR., E.; MURATA, S.S. Uso do hidróxido de cálcio nos canais radiculares. **RGO**, Porto Alegre, v.50, n.3, p.129-132, jul./ago./set. 2002.
62. HORIBA, N.; MAEKAWA, Y.; MATSUMOTO, T., NAKAMURA, H. A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. **J. Endod.**, Baltimore, v.16, n.7, p.331-334, July 1990.

63. JOSHI, A.K.; BAICHWAL, V.; AMES, G.F. Rapid polymerase chain reaction amplification using intact bacterial cells. **Biotechniques**, Westborough, v.10, n.1, p.44-45, June, 1991.

64. JUNG, I.Y.; CHOI, B.K.; KUM, K.Y.; ROH, B.D.; LEE, S.J.; PARK, D.S. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. **J. Endod.**, Baltimore, v.26, n.10, p.599-604, Oct. 2000.

65. JUNG I.Y.; CHOI, B.K.; KUM, K.Y.; YOO, Y. J.; YOON, T.C.; LEE, S.J.; LEE, C.Y. Identification of oral spirochetes at the species level, and their association with other bacteria in endodontic infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol Endod.**, St. Louis, v.92, n.3, p.329-334, Sept. 2001.

66. 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, n.3, p.340-349, Sept. 1965.

67. KANTZ, W.E.; HENRY, C.A. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non-vital teeth in man. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.19, n.1, p.91-96, Jan. 1974.

68. KAWAHARA, C.M.; REGAN, P.F.; TENCA, J.I.; PELLEU Jr., G.B. Antimicrobial efficacy of reduced concentrations of parachlorophenol in extracted teeth. **J. Endod.**, Baltimore, v.1, n.2, p.48-52, Feb. 1975.

69. KEUDELL, K.; CONTE, M.; FUJIMOTO, L.; ERNEST, M.; BERRY, H.G. Microorganisms isolated from pulp chambers. **J. Endod.**, Baltimore, v.2, n.5, p.146-148, May, 1976.
70. KONTAKIOTIS, E.; NAKOU, M.; GEORGOPOULOU, M. *In vitro* study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.28, n.6, p.285-289, Nov. 1995.
71. LEONARDO, M.R. Considerações bacteriológicas do canal radicular - Relações com o tratamento endodôntico. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v.25, n.148, p.489-496, jul./ago. 1967.
72. LEONARDO, M.R. Reparação apical e periapical pós-tratamento endodôntico: relações com o teste bacteriológico. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v.29, n.5, p.17-22, set./out. 1975.
73. LEONARDO, M.R., LEAL, J.M. **Endodontia:** tratamento dos canais radiculares. 3 ed. São Paulo: Ed. Panamericana, 1998. 908p.

74. LEONARDO, M.R.; ALMEIDA, W.A.; ITO, I.Y.; SILVA, L.A.B. Radiographic and microbiologic evaluation of post treatment apical and periapical repair of root canals of dogs' teeth with experimentally induced chronic lesion. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.78, n.2, p.232-238, Aug. 1994.
75. LEONARDO, M.R.; REIS, R.T.; SILVA, L.A.B.; LOFREDO, L.C.M. Hidróxido de cálcio em endodontia. **RGO**, Porto Alegre, v.40, n.1, p.69-72, jan./fev. 1992.
76. LEONARDO, M.R.; ROSSI, M.A.; SILVA, L.A.B.; ITO, I.Y.; BONIFÁCIO, K.C. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. **J. Endod.**, Baltimore, v.28, n.12, p.815-818, Dec. 2002.
77. LEONARDO, M.R.; SILVA, R.S.; SILVA, L.A.B.; ASSED, S. Determinação de íons Ca, pH e solubilidade de pastas a base de hidróxido de cálcio contendo PMC e PMCC. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v.50, n.1, p.5-10, jan./fev. 1993.
78. LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B.; LEONARDO, R.T.; UTRILLA, L.S.; ASSED, S. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. **J. Endod.**, Baltimore, v.19, n.7, p.348-352, July 1993.

79. LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B.; TANOMARU FILHO, M.; BONIFÁCIO, K.C.; ITO, I.Y. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de pastas utilizadas em endodontia. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v.53, n.5, p.367-370, maio 1999.
80. LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B.; TANOMARU FILHO, M.; BONIFÁCIO, K.C.; ITO, I.Y. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity sealers and pastes used in endodontics. **J. Endod.**, Baltimore, v.26, n.7, p.391-394, July, 2000.
81. LEONARDO, M.R.; SILVEIRA, F.F.; SILVA, L.A.B.; TANOMARU FILHO, M.; UTRILLA, L.S. Calcium hydroxide root canal dressing. Histopathological evaluation of periapical repair at different time periods. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v.13, n.1, p.17-22, Jan. 2002.
82. MARTIN, D.M.; CRABB, H.S.M. Calcium hydroxide in root canal therapy. A review. **Br. Dent. J.**, London, v.142, n.9, p.277-283, May, 1977.
83. MARTINS, J.B.; BERNARDINELI, N.; BERBERT, A.; BRAMANTE, C.M.; MARQUES, A.L.; LOPES, E.S. Efeitos da biomecânica e de curativos de demora com hidróxido de cálcio, paramonoclorofenol a 1% ou associação de ambos na redução da flora microbiana de canais radiculares infectados. **Ars. Curandi Odontol.**, São Paulo, v.6, n.7, p.44-57, out. 1979.

84. MENARD, C., MOUTON, C. Randomly amplified polymorphic DNA analysis confirms the biotyping scheme of *Porphyromonas gingivalis*. **Res. Microbiol.**, Paris, v.144, n.6, p.445-455, July/Aug. 1993.
85. MEURMAN, J.H.; WAHLFORS, J.; KORHONEN, A.; ALAKUIJALA, P.; VAISANEN, P.; TORKKO, H.; JANNE, J. Identification of *Bacteroides forsythus* in subgingival dental plaque with aid of a rapid PCR method. **J. Dent. Res.** Alexandria, v.76, n.7, p. 1376-1380, July, 1997.
86. MILLER, W.D. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. **Dent. Cosmos**, Philadelphia, v.36, n.7, p.505-528, July, 1894
87. MILSOM, S.E.; SPRAGUE, S.V.; DYMOCK, D.; WEIGHTMAN, A.J.; WADE, W.A. Rapid differentiation of *Prevotella intermedia* & *Prevotella nigrescens* by 16Sr DNA PCR-RFLP. **J. Med. Microbiol.**, Andover, v.44, n.1, p.41-53, Jan. 1996.
88. MOLANDER, A.; LUNDQUIST, P.; PAPAPANOU, P.N.; DAHLEN, G.; REIT, C. A protocol for polymerase chain reaction detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from the root canal. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.35, n.1, p.1-6, Jan. 2002.
89. MOLVEN, O.; OLSEN, I.; KEREKES, K. Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.7, n.5, p.226-229, Oct. 1991.

90. MORAES, S.R.; SIQUEIRA Jr., J.F.; COLOMBO, A.P.; ROÇAS, I.S.; DOMINGUES, R. Comparison of the effectiveness of bacterial culture, 16SrDNA directed polymerase chain reaction, and checkerboard DNA-DNA hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic infections. **J. Endod.**, Baltimore, v.28, n.2, p.86-89, Feb. 2002.
91. MORSE, D.R. Endodontic microbiology in the 1970's. **Int Endod. J.**, Oxford, v.14, n.2, p.69-79, May, 1981.
92. MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, Plaonview, v.51, n.pt1, p.263-273, 1986.
93. MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. 1986. **Biotechnology**, v.24, p.17-27, 1992.
94. MULLIS, K.B. Process for amplifying nucleic acid sequences U.S Patent Documents n.4.683.202, 1987.
95. MUNSON, M.A.; PITT FORD, T.; CHONG, B.; WEIGHTMAN, A.; WADE,

- W.G. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.81, n.11, p.761-766, Nov. 2002.
96. NAGAOKA, S.; MIYAZAKI, Y.; LIU, H.J.; IWAMOTO, Y.; KITANO, M.; KAWAGOE, M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. **J. Endod.**, Baltimore, v.21, n.2, p.70-73, Feb. 1995.
97. NAIR, P.N.R. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. **J. Endod.**, Baltimore, v.13, n.1, p.29-39, Jan. 1987.
98. NELSON FILHO, P. **Efeito da endotoxina (LPS), associada ou não ao hidróxido de cálcio, sobre os tecidos apicais e periapicais de dentes de cães. Avaliação histopatológica.** 2000. 107f. Tese (Doutorado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.
99. NELSON FILHO, P., LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B., ASSED, S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. **J. Endod.**, Baltimore, v.28, n.10, p.694-696, Oct. 2002.
100. NERWICH, A.; FIGDOR, D.; MESSER, H.H. pH changes in root dentine

over a 4 week period following root canal dressing with calcium hydroxide.

J. Endod., Baltimore, v.19, n.6, p.302-306, June 1993.

101. NISSAN,R.; MAKKAR, S.R.; SELA, M.N.; STEVENS, R. Whole genomic DNA probe for detection of *Porphyromonas endodontalis*. **J. Endod.**, Baltimore, v.26, n.4, p.217-220, Apr. 2000.

102. NYGREN, J.A. **Rådgivare angående bästa sättet att vårda och bevara tändernas friskhet, osv.** Stockholm, 1838.

103. OLIVEIRA, J.C.M.; SIQUEIRA Jr., J.F.; ALVES, G.B.; HIRATA Jr., R.; ANDRADE, A.F.B. Detection of *Porphyromonas endodontalis* in infected root canals by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. **J. Endod.**, Baltimore, v.26, n.12, p.729-732, Dec. 2000.

104. ØRSTAVIK, D. Antibacterial properties of root canal sealers, cements and pastes. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.14, n.2, p.125-133, May, 1981.

105. PETERS, L.B.; WESSELINK, P.R. Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms. **Int. Endod. J.**, v.35, n.8, p.660, Aug. 2002.

106. PETERS, L.B.; WESSELINK, P.R.; MOORER, W.R. The fate and the

- role of bacteria left in root dentinal tubules. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.28, n.2, p.95-99, Mar. 1995.
107. 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.
108. PITT FORD, P.R. The effects on the periapical tissues of bacterial contamination of the filled root canal. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.15, n.1, p.16-22, Jan. 1982.
109. QUACKENBUSH, L. *In vitro* testing of 3 types of endodontic medicaments against anaerobic bacteria. **J. Endod.**, Baltimore, v.12, n.3, p.132, Mar. 1986. Abstract.
110. RHONER, A. Calxyl als wurzelfüllungsmaterial nach pulpextirpation. **Schweiz**, v.13, p.903-948, 1940.
111. RIBEIRO, F.C. **Distribuição das bactérias nas estruturas mineralizadas de dentes com necrose pulpar e granuloma apical**. 1997. 172f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, 1997.
112. ROÇAS, I.N.; SIQUEIRA Jr., J.F.; SANTOS, K.R.; COELHO, A.M. "Red

- complex" (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.91, n.4, p.468-471, Apr. 2001.
113. ROLPH, H.J.; LENNON, A.; RIGGIO, M.P.; SAUNDERS, W.P.; MacKENZIE, D.; COLDERO, L.; BAGG, J. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.39, n.9, p.3282-3289, Sept. 2001.
114. SACHS, K.; HOTZEL, H. Classification of isolates by DNA-DNA hybridization. **Methods Mol. Biol.**, Totowa, v.104, p.189-195, 1998.
115. SAFAVI, K.E.; NICHOLS, F.C. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. **J. Endod.**, Baltimore, v.19, n.2, p.76-78, Feb. 1993.
116. SAFAVI, K.E.; NICHOLS, F.C. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. **J. Endod.**, Baltimore, v.20, n.3, p.127-129, Mar. 1994.
117. SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; EHRLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, DC, v.230, n.4732, p.1350-1354, Dec. 1985.
118. SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.;

- HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; EHRLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, DC, v.239, n.4839, p.487-491, Jan. 1988.
119. SILVEIRA, F.F. **Efeito do tempo de ação do “curativo de demora” à base de hidróxido de cálcio, utilizado em canais radiculares de dentes de cães com lesão periapical crônica induzida. Análise histológica e microbiológica.** 1997. 218f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.
120. SIQUEIRA Jr., J.F.; LOPES, H.P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.32, p.361-369, 1999.
121. SIQUEIRA Jr., J.F.; UZEDA, M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. **J. Endod.**, Baltimore, v.22, n.12, p.674-676, Dec. 1996.
122. SIQUEIRA Jr., J.F.; UZEDA, M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. **J. Endod.**, Baltimore, v.23, n.3, p.167-169, Mar. 1997.

123. SIQUEIRA Jr., J.F.; ROÇAS, I.N.; OLIVEIRA, J.C. Prevalence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in infected root canals from a Brazilian population. **Aust. Endod. J.**, Sydney, v.26, n.3, p.110-112, Dec. 2000.
124. SIQUEIRA Jr., J.F.; ROÇAS, I.N.; FAVIERI, A.; SANTOS, K.R. Detection of *Treponema denticola* in endodontic infections by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.15, n.5, p.335-337, Oct. 2000.
125. SIQUEIRA Jr., J.F.; ROÇAS, I.N.; FAVIERI, A.; OLIVEIRA, J.C.; SANTOS, R.R. Polymerase chain reaction detection of *treponema denticola* in endodontic infections within root canals. **Int. Endod. J.**, v.34, n.4, p.280-284, June, 2001.
126. SIQUEIRA Jr., J.F.; ROÇAS, I.N.; OLIVEIRA, J.C.; SANTOS, K.R. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA-directed polymerase chain reaction. **J Endod.**, Baltimore, v.27, n.3, p.164-167, Mar. 2001.
127. SIQUEIRA Jr, J.F.; ROÇAS, I.N.; OLIVEIRA, J.C.; SANTOS, K.R. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origins. **J. Endod.**, Baltimore, v.27, n.9, p.563-566, Sept. 2001.

128. SIQUEIRA Jr., J.F.; ROÇAS, I.N.; SOUTO, R.; UZEDA, M.; COLOMBO, A.P. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.89, n.6, p.744-748, June, 2000.
129. SIREN, E.K.; HAAPASALO, M.P.; RANTA, K.; SALMI, P.; KEROSUO, E.N. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.30, n.2, p.91-95, Mar. 1997.
130. SJÖGREN, U.; FIGDOR, D.; SPANGBERG, L.; SUNDQVIST, G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.24, n.3, p.119-125, May 1991.
131. SLOTS, J.; ASHIMOTO, A.; FLYNN, M.J.; LI, G.; CHEN, C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.20, suppl.2, p.S304-7, June 1995.
132. SOCRANSKY, S.S.; GIBBONS, R. J., DALE, A.C., BORTNICK, L., ROSENTHAL, E. MACDONALD, J.B. The microbiota of gengival crevice area of man I. Total microscopic and viable counts and counts of specific organisms. **Arch.Oral Biol.**, Oxford, v.8, n.3, p.275-80, May/Jun. 1963.

133. SOCRANSKY, S.S.; SMITH, C.; MARTIN, L.; PASTER, B.J.; DEWHIRST, F.E.; LEVIN, A.E. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. **Biotechniques**, Natick, v.17, n.4, p.788-892, Oct. 1994.
134. STAEHLE, H.J.; SPIEN, V.; HEINECKE, A.; MÜLLER, H.P. The effect of root canal filling materials containing calcium hydroxide on the alkalinity of root dentin. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.11, n.4, p.163-168, Aug. 1995.
135. STEVENS, R.H.; GROSSMAN, L.I. Evaluation of the antimicrobial potential of calcium hydroxide as an intracanal medicament. **J. Endod.**, Baltimore, v.9, n.9, p.372-374, Sept. 1983.
136. STUART, K.G.; MILLER, C.H.; BROWN, C.E.; NEWTON, C.W. The comparative antimicrobial effect of calcium hydroxide. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.72, n.1, p.101-104, July, 1991.
137. STUBBS, S.; PARK, S.F.; BISHOP, P.A.; LEWIS, M.A. Direct detection of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in suppurative oral infection by amplification of 16S rRNA gene. **J. Med. Microbiol.**, Andover, v.48, n.11, p.1017-1022, Nov. 1999.
138. SUNDE, P.T.; TRONSTAD, L.; ERIBE, E.R.; LIND, P.O.; OLSEN, I. Assessment of periradicular microbiota by DNA - DNA hybridization. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.16, n.5, p.191-196, Oct. 2000.

139. SUNDQVIST, G. **Bacteriological studies of necrotic dental pulps.** 1976. Tese (PhD)- Universidade de Umea, Umea, Suécia.
140. SUNDQVIST, G. Associations between microbial species in dental root canal infections. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.7, n.5, p.257-262, Oct. 1992.
141. SUNDQVIST, G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.78, n.4, p.522-530, Oct. 1994.
142. SUNDQVIST, G.; JOHANSSON, E.; SJÖGREN, U. Prevalence of black pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. **J. Endod.**, Baltimore, v.15, n.1, p.13-19, Jan. 1989.
143. TANOMARU FILHO, M.; LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B. Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. **J. Endod.**, Baltimore, v.28, n.4, p.295-299, Apr. 2002.
144. TANOMARU FILHO, M.; LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B.; UTRILLA, L.S. Effect of different root canal sealers on periapical repair of teeth with chronic periradicular periodontitis. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.31, n.2, p.85-89, Mar. 1998.

145. TRAN, S.D.; RUDNEY, J.D. Improved multiplex PCR using conserved and species specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, and *Porphyromonas gingivalis*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.37, n.11, p.3504-3508, Nov. 1999.
146. TRONSTAD, L.; KRESHTOOL, D.; BARNETT, F. Microbiological monitoring and results of treatment of extraradicular endodontic infection. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.6, n.3, p.129-136, June, 1990.
147. TRONSTAD, L.; BARNETT, F.; RISO, K.; SLOTS, J. Extraradicular endodontics infections. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.3, n.2, p.86-90, Apr. 1987.
148. TRONSTAD, L.; ANDREASEN, J.O.; HASSELGREN, G.; KRISTERSON, L.; RIIS, I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. **J. Endod.**, Baltimore, v.7, n.1, p.17-21, Jan. 1980.
149. van WINKELHOFF, A.J.; van STEENBERGEN, T.J.; de GRAAFF, J. *Porphyromonas (Bacteroides) endodontalis*: its role in endodontal infections. **J Endod.**, Baltimore, v.18, n.9, p.431-434, Sept. 1992.
150. XIA, T.; BAUMGARTNER, J.C.; DAVID, L.L. Isolation and identification of *Prevotella tannerae* from endodontic infections. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.15, n.4, p.273-275, Aug. 2000.

151. WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol.**, Washington, DC, v.173, n.2, p.697-703, Jan. 1991.
152. WINKLER, K.C.; van AMERONGEN, J. Bacteriologic results from 4000 root canal cultures. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.12, n.7, p.857-875, July, 1959.

Anexo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por este instrumento particular declaro, para os devidos fins éticos e legais, que eu, _____ nacionalidade, _____, portador de RG nº _____, residente à _____

_____,
na cidade de _____ Estado de _____, concordo voluntariamente em participar de pesquisa "Técnica de Hibridação *Checkerboard* DNA-DNA & PCR: Monitoração do Efeito de Curativos de Demora à Base de Hidróxido de Cálcio, na Redução Bacteriana de Canais Radiculares em Dentes de Humanos, Portadores de Gangrena Pulpar e Lesões Periapicais", desenvolvida pelo cirurgião dentista Marcos Jacobovitz, e declaro que tomei ciência e que fui esclarecido de maneira a não restarem quaisquer dúvidas sobre a minha participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

1. Fui esclarecido que a referida pesquisa tem por objetivo analisar espécies de bactérias presentes no interior do canal radicular do meu dente, antes e após a ação do curativo de demora que será utilizado neste tratamento. Para isso, serei submetido a exame clínico de rotina, e deverei responder questionários, através dos quais, fornecerei informações pessoais referentes ao meu estado geral de saúde. Serei submetido a tratamento endodôntico com o C.D. Marcos Jacobovitz, que estará responsável pelos passos técnicos, culminando na obturação final, e restauração provisória do dente.

Estou ciente, que a finalização do tratamento reabilitador definitivo, por meio de restaurações diretas ou protéticas, não será de responsabilidade do referido cirurgião dentista, devendo eu, procurar para tal finalidade outro profissional de minha livre escolha.

Para este empreendimento, estou ciente que não receberei qualquer remuneração como compensação.

- 2.** Fui esclarecido que a realização da pesquisa implica em riscos aos participantes, inerentes à própria condição patológica que se encontra os dentes objetos deste estudo, podendo haver no decorrer do tratamento o aparecimento de reações dolorosas ou sinais de inchaço e vermelhidão da região que será manipulada, além de possibilidade de febre. Tais riscos, não estão relacionados a testes de novos medicamentos ou técnicas clínicas (que não são objetos deste estudo) sendo de baixa ocorrência, e serão minimizados pelo uso de materiais e técnicas próprias para este fim. Além dos riscos acima citados, existem ainda aqueles que podem decorrer de acidentes operatórios, que serão minimizados com o emprego das normas biossegurança preconizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Fui esclarecido que caso ocorram tais complicações, poderei contar com o pronto atendimento de urgência com o C.D. Marcos Jacobovitz.

O exame clínico e execução do tratamento dar-se-á em três fases:

- A** - Consulta para exame clínico e radiográfico. Execução da coleta de material do canal radicular (amostra do conteúdo interno), limpeza do canal radicular e colocação de curativo de demora, que ficará ali por um período ao redor de 30 dias, sob obturação provisória.
- B** - Retorno após o período de 30 dias para esvaziamento do curativo do interior do canal radicular, devendo este ficar sem ação do curativo de demora por 3 a 4 dias. (possibilitando o possível desenvolvimento de cepas resistentes ao curativo)
- C** - Novo retorno, após 3 ou 4 dias da sessão anterior, onde a 2ª amostra do conteúdo do interior do canal radicular será coletada. Após este procedimento, o canal será novamente desinfetado com soluções irrigadoras e o dente estará pronto para receber a obturação do canal radicular e selamento provisório, passos técnicos finais deste tratamento.

Estou ciente que receberei informações, orientações e encaminhamentos necessários em casos de alterações significativas no curso deste tratamento.

3. Estou ciente que serei esclarecido durante todo o decorrer da pesquisa sobre quaisquer dúvidas relacionadas à metodologia e, que possuo plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhuma penalização.
4. Estou ciente que os dados e resultados obtidos na pesquisa serão utilizados para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras; porém, será garantido o sigilo da minha identidade, assegurando a minha privacidade.
5. Fui informado também que tenho total liberdade para deixar de participar da presente pesquisa a qualquer momento e sem a necessidade de justificar minha decisão, retirando meu consentimento para a utilização dos dados obtidos, ou deixando de responder ao questionário, sem que isso resulte em prejuízos de qualquer natureza ao meu atendimento.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, dato e assino este termo de consentimento, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Araraquara ____ de _____ de 2002

Assinatura do paciente

Pesquisador responsável

Apêndice

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA

1. Preparo do material a ser processado:

- Amostra clínica de bolsa periodontal e de canal:
 - a. Vortexar, e remover o cone de papel com auxílio de pinça clínica.
 - b. Centrifugar e remover o sobrenadante (solução transporte).
- Amostra clínica de saliva, placa dental ou de dorso de língua:
 - a. Vortexar, centrifugar e remover o sobrenadante (solução transporte).
- Isolado clínico (cepa) de: levedura, bactéria Gram-positiva ou Gram-negativa:
 - a. Vortexar, centrifugar e remover o sobrenadante (meio de cultura líquido ou solução tampão).

2. Adicionar 700mL de tampão de extração, vortexar e deixar 30 minutos à 65°C num Banho-Maria (a cada 10 minutos homogeneizar 20 vezes suavemente).

3. Adicionar 650mL de CIA, homogeneizar até formar uma emulsão (20 vezes) e centrifugar a 12.000-15.000 rpm, durante 7 minutos. (NÃO VORTEXAR)
4. Transferir a fase aquosa para tubo novo de 1,5mL, adicionar 200mL de tampão de extração sem proteinase K, homogeneizar, adicionar 650mL de CIA, homogeneizar e novamente centrifugar a 12.000-15.000rpm, durante 7 minutos (NÃO VORTEXAR).
5. Transferir a fase aquosa para outro tubo novo, adicionar 650mL de CIA, centrifugar a 12.000-15.000rpm, durante 7 minutos (repetir por mais duas vezes se for preciso).
6. Precipitar o DNA com 1 volume de isopropanol à temperatura ambiente, homogeneizar (20 vezes) e centrifugar a 12.000-15.000rpm, durante 7 minutos.
7. Lavar a superfície do precipitado (não precisa ressuspender) 1 vez com 50mL de etanol 70% preparado pouco tempo antes do uso, centrifugar por 2 minutos.
8. Secar o precipitado: deixar o tubo aberto sobre bancada, ao lado de bico de Busen. Após, ressuspender em 40mL de TE (10mM Tris-HCl, pH

8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0) + 10mg/mL de RNase e deixar em Banho-Maria à 37°C por 30 minutos.

9. Utilizar de 5mL da amostra para checar a qualidade e estimar a quantidade do DNA, num gel de agarose 0,8-1,0%. Correr junto um padrão de massa conhecida (pGEM).

SOLUÇÕES UTILIZADAS:

- Tampão de Extração (para 12 amostras)
- NaCl 1.4M (3.36mL de 5M)
- Tris-HCl, pH 8,0, 100mM (1,2mL de 1M)
- EDTA, pH 8,0, 20mM (0,48mL de 500mM)
- Polivinilpirrolidona (PVP-40), 1% (120mg)
- CTAB, 2% (2,4mL de 10%)
- Proteinase K, 100 mg/mL (60mL de 20mg/mL)
- b-Mercaptanol, 0,2% (24mL)
- Água Milli-Q (4,476mL)
- CIA (24:1)(Clorofórmio: álcool isoamílico)
- 48 mL de clorofórmio 2mL de álcool isoamílico
- ETANOL 70%
- 7mL de etanol
- Água Milli-Q autoclavada

SOLUÇÕES PARA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA

1. NaCl 5M

Peso Molecular (PM) = 58,44g/mol

Molaridade (M) = 5M (mol/L)

Volume que quero preparar = 250mL = 0,250L

Massa (m) = ? quantos gramas devo adicionar?

Preparo: adicionar 73,05g de NaCl em 200mL de água. Misturar. Acertar o volume final para 250mL com água. Conservar em geladeira.

2. Tris-HCl, pH 8,0, 1M

Peso Molecular (PM) = 121,14g/mol

Molaridade (M) = 1M (mol/L)

Volume que quero preparar = 250mL = 0,250L

Massa (m) = ? quantos gramas devo adicionar?

Preparo: adicionar 73,05g de Tris em 200mL de água. Misturar. Acertar o pH para 8,0 e, o volume final para 250mL com água. Conservar em geladeira.

3. EDTA, pH 8,0, 500mM

Peso molecular (PM) = 372,24g/mol

Molaridade (M) = 500mM (mol/L)

Volume que quero preparar = 250mL = 0,250L

Massa (m) = ? quantos gramas devo adicionar?

Preparo: adicionar 46,53g de EDTA em 200mL de água. Misturar. Acertar o pH para 8.0 e, o volume final para 250mL com água. Conservar em geladeira.

4. PVP 40

Adicionar 120mg na hora de usar o tampão para 12 amostras.

5. CTAB 10%

10g _____ 100mL

xg _____ 250mL

X = 25g

Misturar 25 g de CTAB com 250mL de água. Conservar em geladeira.

6. PROTEINASE K 20mg/mL

Solução para preparar a proteinase K: 50mM Tris-HCl (pH 8,0) e 10 mM

CaCl₂ - volume = 20mL

Tris-HCl 50mM

m = ?

M=50mM = $50 \times 10^{-3} \text{M}$

V(L)=20mL= 0,02L

PM = 121,14g/mol

CaCl₂ 10mM

m = ?

M=10mM = $10 \times 10^{-3} \text{M}$

V(L)=20mL= 0,02L

PM = 110,99g/mol

Misturar 0,12114g de Tris e 0,022198g de CaCl₂ em 15mL de água.

Acertar o pH para 8,0 com HCl. Adicionar água para completar volume de 20mL.

Adicionar 20mg de proteinase K com 1mL da solução acima (50mM Tris-HCl (pH 8,0) e 10mM CaCl_2) em um eppendorf de 1,5mL. Aliquotar 60mL em eppendorf de 200mL para armazenar no freezer (-20°C).

7. CLOROFÓRMIO : ÁLCOOL ISOAMÍLICO (24: 1) - Conservar em geladeira

Volume final = 250mL

8. ETANOL 70% (álcool etílico)

- pegar 250mL de etanol e medir com um alcoometro qual a %. Se o etanol estiver a 98%, calcular o volume de água a ser adicionado para obtermos etanol 70%.

250mL 98%

X 70%

$X = 350\text{mL}$, portanto, adicionar 100mL de água destilada aos 250mL de álcool, medir novamente com o alcoometro, para verificar se ficou à 95%.

9. Preparo de RNase A 20mg/mL

a. preparar 10mM Tris e 15mM NaCl juntos (solução de Sambrook).

Volume final 20mL.

Tris 10mM

$m = ?$

$M = 10\text{mM} = 10 \times 10^{-3}\text{M}$

$V(L) = 20\text{mL} = 0,02\text{L}$

$PM = 121,14 \text{ g/mol}$

NaCl 15mM

$m = ?$

$M = 15\text{mM} = 15 \times 10^{-3}\text{M}$

$$V(L) = 20\text{mL} = 0,02\text{L}$$

$$PM = 58,44\text{g/mol}$$

Depois de preparada a solução de Tris com NaCl, ajustar o pH com HCl até 7,5.

b. Misturar 20 mg de RNase A com 1mL da solução de Sambrook.

Aquecer à 100°C por 15 min. Deixar esfriar à temperatura ambiente.

Aliquotar em eppendorf de 200mL. Conservar à -20°C.

JACOBOWITZ, M. *Técnica PCR na monitoração do efeito de curativos de demora à base de hidróxido de cálcio na microbiota de canais radiculares em dentes de humanos portadores de lesão periapical crônica*. Araraquara, 2003. 146 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Câmpus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Resumo

No presente estudo foi monitorada a microbiota do canal radicular de 30 dentes de humanos portadores de lesão periapical crônica. Foram utilizados curativos de demora à base de hidróxido de cálcio entre sessões: Calen (Grupo I), Calen PMCC (Grupo II) e Calasept (Grupo III), que foram mantidos nos canais radiculares por aproximadamente 30 dias. O material colhido dos canais radiculares, antes e após a realização da terapêutica endodôntica, foi submetido a teste laboratorial baseado na biologia molecular: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Como controle positivo da presença bacteriana, foi utilizado primer 16S rDNA. As seguintes espécies bacterianas foram monitoradas: *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* (bacilos pigmentados de negro), e *Bacteroides forsythus*, microrganismos marcantes na patologia de processos infecciosos dos tecidos pulpoperiapicais. Os resultados evidenciaram diminuição das espécies microbianas, aqui monitoradas de forma indireta à partir da presença de bandas, ou *amplicons* (produtos do PCR), quando do uso de curativos de demora à base de hidróxido de cálcio. Com relação à eficácia particular a cada material, os Grupos I, II e III não demonstraram entre si diferenças estatisticamente significantes.

Palavras-chave: Biologia molecular; reação em cadeia da polimerase; hidróxido de cálcio; periodontite periapical.

JACOBOWITZ, M. PCR technique on monitoring the effect of temporary dressing based on calcium hydroxide on microbiota of the root canals of human teeth with chronic periapical periodontitis. Araraquara, 2003. 146 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Câmpus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Abstract

In the present study the root canal flora of 30 human teeth with chronic periapical lesion was monitored. Dressing pastes based on calcium hydroxide were used, among sessions namely: Calen (Group I), Calen/PMCC (Group II) and Calasept (Group III) that were used as a temporary dressings in root canals for approximately 30 days. The microbial material was collected from root canals, before and after the root canal treatment and submitted to laboratorial test based on molecular biology assay: Polymerase Chain Reaction (PCR). As a positive control of bacterial presence, a primer 16S rDNA was utilized. The following bacterial strains were monitored: *Porphyromonas endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* (black pigmented rods) and *B. forsythus*, a microorganism with an important role on pulpoperiapical pathosis. The results showed a decrease of bacterial strains population indirectly, based on bands presence (amplicons) where the calcium hydroxide dressing pastes were applied. Concerning the intrinsic efficacy of each material, the Groups I, II and III didn't show significant statistical differences among them.

Keywords: Molecular biology; polymerase chain reaction; calcium hydroxide; periapical periodontitis.