



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

NÁDIA DE SOUZA FERREIRA

**MONITORAMENTO DO PERFIL MICROBIOLÓGICO DE
DENTES COM INFECÇÃO ENDODÔNTICA PRIMÁRIA
DURANTE TERAPIA COM DIFERENTES MEDICAÇÕES
INTRACANAL**

2014

NÁDIA DE SOUZA FERREIRA

**MONITORAMENTO DO PERFIL MICROBIOLÓGICO DE DENTES COM
INFECÇÃO ENDODÔNTICA PRIMÁRIA DURANTE TERAPIA COM
DIFERENTES MEDICAÇÕES INTRACANAL**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade Endodontia.

Orientadora: Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera
Co-orientador: Prof. Dr. Frederico Canato Martinho

São José dos Campos
2014

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático
para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José
dos Campos: ICT/UNESP; 2013.

F413m Ferreira, Nádia de Souza
Monitoramento do perfil microbiológico de dentes com infecção endodôntica primária durante terapia com diferentes medicações intracanal / Nádia de Souza Ferreira. - São José dos Campos : [s.n.], 2014.
109 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) – Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2014.
Orientador: Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera
Co-Orientador: Prof. Dr. Frederico Canato Martinho

1. Endodontia. 2. Bactérias. 3. Hibridização In Situ. 4. Hidróxido de Cálcio. 5. Gengibre. 6. Clorexidina. I. Valera, Marcia Carneiro. II. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". IV. UNESP – Univ Estadual Paulista. V. Título

tD 24

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP

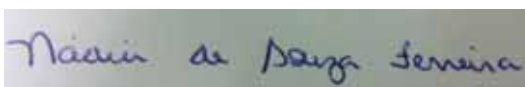
AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 27 de junho de 2014.

E-mail: na.soufer@hotmail.com

Assinatura:



BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Adj. Cláudio Antônio Talge Carvalho

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Assoc. Ezilmara Leonor Rolim de Sousa

Faculdade de Odontologia de Pelotas
UFPEL - Universidade Federal de Pelotas

Prof. Adj. Caio Cezar Randi Ferraz

Faculdade de Odontologia de Piracicaba
UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

Profa. Adj. Ana Paula Martins Gomes

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 27 de junho de 2014.

DEDICATÓRIA

À Deus por permitir que eu realizasse mais esse sonho. Por colocar tudo o que eu precisava para o meu crescimento no meu caminho. Por iluminar todas as minhas decisões.

Aos meus pais, Nelson e Sandra, por serem um exemplo de casal que se respeita e de pais. Por me mostrarem o valor do amor e da família. Por permitirem que eu fizesse tudo o que desejava e acreditarem sempre na minha capacidade. Pelas broncas nas horas necessárias que fizeram com que eu crescesse com a certeza que não se alcança nada sem muita dedicação. Por fazerem de tudo para que eu tivesse o melhor na minha vida. Cada vez mais admiro vocês. Tudo que sou hoje e consegui, devo a vocês.

Ao Pedro pela companhia e principalmente pela paciência nos momentos de dificuldade. Por ser uma das pessoas que mais me incentiva na busca pelos meus sonhos e me apoia nas minhas decisões. Mesmo distantes, morando em cidades diferentes, você se fez presente e nunca mediu esforços para estar comigo. Nunca vou esquecer o seu cuidado, carinho e companheirismo quando eu mais precisei.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A toda minha família que torce por mim. Especialmente minha tia Cláudia (*in memorian*), meu tio Manuel, minha avó Lacir (*in memorian*) e minha irmã Natália por me incentivarem sempre.

A toda a família do Pedro, especialmente seus pais Marcos e Marize e sua tia Myrthes por me receberem de braços abertos em suas casas, pelo apoio e carinho.

À minha orientadora Professora Titular Marcia Carneiro Valera, também orientadora de Iniciação Científica, que me despertou o interesse pelo ensino e pela pesquisa. Por confiar no meu trabalho e na minha capacidade, me dando a oportunidade de aprender a orientar também. Pela dedicação ao corrigir todos os meus trabalhos e me orientar nas minhas aulas. Por toda a compreensão e carinho. Com certeza aprendi muito com a senhora.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Frederico Canato Martinho por todo o incentivo e atenção dispensados a mim.

À Profa. Adj. Ana Paula Martins Gomes, minha orientadora de Mestrado, pela confiança e pelo carinho. Por sempre me receber com um sorriso. Eu a admiro muito.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia – UNESP na pessoa do Diretor, Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli e do Vice-Diretor, Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora na pessoa da Coordenadora do Programa, Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera.

Ao Professor Carlos Henrique Ribeiro Camargo pela experiência e conhecimentos passados principalmente durante a clínica. Por sempre ser tão prestativo sempre que pedi sua ajuda.

Ao Prof. Adj. Cláudio Antônio Talge Carvalho pela agradável companhia, por sempre ter um sorriso no rosto ao nos encontrar e sempre coisas boas e positivas para nos dizer.

Ao Prof. Dr. Bruno das Neves Cavalcanti por nos inspirar a sempre querer fazer o melhor. Pela disposição em nos ajudar e nos fazer crescer.

A Profa. Dra. Marcia Campos Sampaio pela disposição em me explicar Biologia Molecular.

Ao Prof. Renato Miotto Palo pela amizade e pelo carinho. Pelo incentivo, pelos conselhos e conversas.

À querida amiga Rafaela, por se tornar uma pessoa tão presente na minha vida, pelo companheirismo em todas as horas e pelos conselhos.

À querida amiga Maria Tereza, uma grande amizade que fiz durante o Doutorado. Com certeza sua companhia não só na realização dos trabalhos, mas na vida pessoal fez com que eu aprendesse muito com você.

Às queridas amigas Heleine, Claudia Bin, Fernanda Feitosa e Sabrina Feitosa, pela companhia, por serem como uma família pra mim em São José dos Campos, tornando tudo um pouco mais fácil.

À Flavia Cardoso por toda a parceria durante a realização não só da Tese, mas de todos os trabalhos realizados durante o curso de Doutorado. Por ter tido paciência e boa vontade ao me ensinar tudo o que sabia sobre as metodologias envolvendo Microbiologia.

À Lilian Maekawa pelas conversas, pelos conselhos, pela agradável companhia nos almoços, no laboratório e sempre que foi preciso.

Aos colegas do Mestrado, Flavia Teixeira, Flavia Leal, Luciana, Monique, Rose, Emanuel, e do Doutorado, Camila, Rafael, Ana Cláudia, Gleyce e Ivany pelo agradável convívio durante o curso.

Às alunas da Pós-graduação da Dentística por sempre me encaminharem os pacientes que encontravam nas clínicas.

À secretária do Departamento de Odontologia Restauradora, Rosângela por sua colaboração sempre que foi preciso.

À Profa. Luciene Figueiredo e à técnica de laboratório Izilvânia Barreto por toda a ajuda na realização da parte prática do trabalho e por me receber em seu laboratório da Universidade de Guarulhos.

A todos os Professores do Departamento de Odontologia Restauradora pelo agradável convívio.

Às técnicas do laboratório de Odontologia Restauradora Josiana e Fernanda e aos técnicos do laboratório de Microbiologia Sérgio e Domingos por toda atenção e ajuda.

Ao Doutorando da Universidade Federal de Pelotas, Gustavo Nascimento pelo auxílio para realização da Estatística.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação Rosemay, Bruno e Ivan pela colaboração e informações prestadas durante o curso.

A Capes pelo auxílio financeiro prestado durante os cursos de Mestrado e Doutorado.

Aos pacientes que foram fundamentais para a realização desta pesquisa.

E a todos aqueles que de qualquer maneira colaboraram na execução deste trabalho.

Muito Obrigada

"O que você faz com amor e cuidado tem uma chance de fazer diferença, tanto para você como para a vida de outras pessoas. Tudo o que se faz sem amor e sem convicção é fadado ao fracasso e à perda de tempo, para você e para os outros."

(Wim Wenders)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Microrganismos detectados nos canais radiculares	19
2.2 Métodos moleculares de identificação dos microrganismos ...	24
2.3 Complexos bacterianos	32
2.4 Desinfecção dos canais radiculares	35
2.5 Zingiber officinale	41
3 PROPOSIÇÃO	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Seleção de pacientes	45
4.2 Intervenção Odontológica	46
4.3 Coletas do canal radicular	47
4.4 Preparo biomecânico	48
4.5 Medicação intracanal por 14 dias	50
4.6 Obturação dos canais radiculares	51
4.7 Análises Microbiológicas	52
4.7.1 Cultura dos microrganismos.....	52
4.7.2 Análise por checkerboard.....	53
4.7.2.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento.....	54
4.7.2.2 Isolamento do DNA e preparo das sondas.....	57
4.7.2.3 <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	57
4.8 Análise estatística	61
5 RESULTADOS	63
5.1 Correlação de características clínicas e radiográficas com a	

microbiota presente e complexos bacterianos.....	63
5.2 Monitoramento do perfil microbiano após o preparo biomecânico e uso de medicação intracanal.....	66
5.3 Susceptibilidade de diferentes complexos microbianos a diferentes medicações intracanaís.....	77
6 DISCUSSÃO.....	80
6.1 Da metodologia.....	80
6.2 Dos resultados.....	82
7 CONCLUSÃO.....	91
8 REFERÊNCIAS.....	92
APÊNDICE.....	104
ANEXO.....	107

Ferreira NS. Monitoramento do perfil microbiológico de dentes com infecção endodôntica primária durante terapia com diferentes medicações intracanal [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2014.

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram: 1. Correlacionar características clínicas e radiográficas com a microbiota presente no canal radicular de dentes com infecção primária; 2. Monitorar o perfil microbiológico após o preparo biomecânico e uso de diferentes medicações intracanal; 3) Verificar a susceptibilidade de complexos microbianos a diferentes medicações intracanal. Trinta dentes unirradiculares com necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente foram submetidos ao tratamento endodôntico utilizando hipoclorito de sódio 2,5% como solução irrigadora e divididos em 3 grupos de acordo com a medicação intracanal utilizada: hidróxido de cálcio P.A. + solução salina fisiológica; hidróxido de cálcio P.A. + *Zingiber officinale* (extrato glicólico de gengibre); hidróxido de cálcio P.A. + gel de clorexidina 2%. Foram realizadas coletas do canal radicular com cones de papel absorvente após a abertura coronária, após a instrumentação e após 14 dias de ação da medicação intracanal. Para análise do conteúdo microbiológico dos canais radiculares, as amostras foram analisadas a partir de sondas de DNA pelo método de hibridização DNA-DNA *checkerboard*. Além disso, foi realizado teste de avaliação da atividade antimicrobiana do tratamento clínico por cultura microbiológica. Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo teste de tendência linear, teste exato de Fisher, teste pareado de Wilcoxon e teste de Mann-Whitney, valor de $p < 0,05$. Houve associação entre dor à palpação e complexos roxo, verde e laranja. Fístula foi associada ao complexo vermelho. Maiores áreas de reabsorção foram associadas à presença de *Capnocytophaga ochracea*. Foi observada redução de bactérias após o tratamento endodôntico. Ao utilizar o método de hibridização DNA-DNA *checkerboard*, as bactérias mais prevalentes foram *Streptococcus anginosus*, *Veillonella parvula*, *Parvimonas micra*, *Enterococcus faecium* e *Capnocytophaga ochracea*, tanto inicialmente quanto após o preparo biomecânico. Todos os tratamentos diminuíram número de espécies bacterianas comparado à coleta inicial. O uso de hidróxido de cálcio sozinho foi o que apresentou piores resultados para diminuição do número de espécies e carga bacteriana total. O uso do hidróxido de cálcio associado à clorexidina foi mais eficaz contra os diferentes complexos bacterianos. Pôde-se concluir que houve associação de características clínicas e radiográficas tanto com bactérias

isoladas quanto com complexos bacterianos. A medicação intracanal, especialmente as associações, exerceu efeito sobre o perfil microbiológico das infecções endodônticas. O uso de hidróxido de cálcio associado à clorexidina é mais efetivo sobre os complexos microbianos.

Palavras-chave: Endodontia. Bactérias. Hibridização *In situ*. Hidróxido de Cálcio. Gengibre. Clorexidina.

Ferreira NS. Monitoring the microbiological profile of teeth with primary endodontic infection during therapy with different intracanal medications [thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

ABSTRACT

The objectives of this study was: 1. Correlate clinical and radiographic features and microbiota present in root canal of teeth with primary infection; 2 Monitoring the microbiological profile after biomechanical preparation and use of different intracanal medications; 3) Verify the microbial susceptibility of bacterial complexes of different intracanal medications. Thirty single-rooted teeth with pulp necrosis and periapical lesion are undergoing treatment using 2.5% sodium hypochlorite as irrigating solution and divided into 3 groups according to the intracanal medication used: calcium hydroxide + saline solution, calcium hydroxide + 20% ginger glycolic extract, calcium hydroxide + 2 % chlorhexidine gel. Samples of the root canal were taken with absorbent paper cones after the coronal opening, after instrumentation and 14 days after medication. For analysis of the microbial content of the root canal the samples were analyzed from DNA probes using the method of DNA-DNA hybridization checkerboard. In addition, tests of antimicrobial activity of clinical treatment were performed by microbiological culture. The results were statistically analyzed with linear trend test, Fisher's exact test, Wilcoxon matched pairs test and Mann-Whitney post hoc Dunn test. For all performed tests, a P-value < 0.05 was set as statically significant. There was an association between pain on palpation and purple, green and orange complex. Sinus tract was associated with the red complex. Bone resorptions were associated with the presence of Capnocytophaga ochracea. The reduction of bacteria was observed after endodontic treatment. By using the method of checkerboard DNA-DNA hybridization, the more prevalent bacteria were Streptococcus anginosus, Veillonella parvula, Parvimonas micra, Enterococcus faecium and Capnocytophaga ochracia, both initially and after biomechanical preparation. All treatments reduced the number of bacterial species compared to the initial collection. The use of calcium hydroxide alone showed the worst results for reducing the number of species and total bacterial load. The use of calcium hydroxide associated with chlorhexidine was more effective against different bacterial complex. It was concluded that there was an association of clinical and radiographic features with bacterial species and bacterial complex. The intracanal medications, especially associations, have an

effect on the microbiological profile of endodontic infections. The use of calcium hydroxide with chlorhexidine is more effective on the microbial complexes.

Keywords: Endodontics. Bacteria. In situ Hybridization. Calcium Hydroxide. Ginger. Chlorhexidine.

1 INTRODUÇÃO

A periodontite apical se desenvolve após a necrose da polpa dentária e infecção como resultado de cárie, trauma ou procedimentos clínicos iatrogênicos. As condições ambientais no canal radicular com polpa necrosada são propícias para o estabelecimento de uma microbiota dominada por bactérias anaeróbias, principalmente Gram-negativas. Cada canal radicular abriga uma microbiota única, indicando que a periodontite apical tem uma etiologia heterogênea, com várias combinações de microrganismos que podem desempenhar um papel na etiologia da doença (Leonardo et al., 2004; Rôças, Siqueira, 2008).

Embora a carga microbiana seja um fator importante para o desenvolvimento de periodontite apical, algumas associações de bactérias também podem estar envolvidas na etiologia das doenças periapicais, compondo complexos bacterianos (Ozbek SM, Ozbek A, 2010).

Socransky et al. (1998), descreveram a presença de 5 complexos microbianos de amostras de placa subgingival. Embora a microbiota encontrada nos canais radiculares não seja tão complexa quanto de bolsas periodontais, espécies bacterianas encontradas em canais infectados podem ser consideradas como subpopulação dos microrganismos encontrados em bolsas periodontais (Ozbek SM, Ozbek A, 2010).

Porphyromonas gingivalis, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*, microrganismos Gram-negativos que formam o “complexo vermelho” (Holt, Ebersole, 2005) têm sido isolados associados ou não a infecções endodônticas primárias. Essas espécies são consideradas agentes patogênicos para o periodonto, contribuindo para a

formação de lesão periapical e relacionadas a sinais e sintomas clínicos (Rôças et al., 2001; Gomes et al., 2007; Blome et al., 2008; Ozbek SM, Osbek A, 2010).

Tradicionalmente, a identificação de bactérias inclui os métodos de crescimento em meios de cultura e identificação por meio de métodos bioquímicos. A realização destes métodos é complexa quando as infecções são mistas, como a infecção dos canais radiculares, devido à grande diversidade de microrganismos (Moraes et al., 2002), uma vez que alguns microrganismos são difíceis ou impossíveis de serem detectados por cultura (Rôças et al., 2001; Gomes et al., 2006a). Dessa maneira os métodos moleculares têm sido utilizados para confirmar as espécies detectadas por cultura e também, complementar esses achados, redefinindo a microbiota associada à periodontite apical (Siqueira, Rôças, 2005; Ito et al., 2011).

O método denominado hibridização DNA-DNA *checkerboard*, introduzido inicialmente para detecção de microrganismos em Periodontia, permite a detecção de uma grande variedade de microrganismos em múltiplas amostras, sendo considerado também um método semiquantitativo (Socransky et al., 1994; Siqueira, Rôças, 2005). Desta maneira, muitos estudos tem utilizado esse método para detecção de microrganismos envolvidos em infecções endodônticas, já que permite que seja traçado um perfil da infecção (Moraes et al., 2002; Sassone et al., 2008a; Rôças et al., 2011a).

Os microrganismos presentes nas infecções endodônticas podem ser significativamente reduzidos com o preparo biomecânico dos canais radiculares, utilizando diferentes soluções irrigadoras (Blome et al., 2008; Valera et al., 2009). A solução irrigadora mais utilizada é o hipoclorito de sódio em diferentes concentrações, principalmente por sua ação antimicrobiana e capacidade de dissolução tecidual (Haapasalo et al., 2005; Vianna et al., 2006; Valera et al., 2009). Entretanto, o preparo biomecânico não elimina completamente a microbiota presentes nos

canais, sendo necessária a utilização de medicação intracanal (Menezes et al., 2004; Valera et al., 2010a; Maekawa et al., 2011).

O hidróxido de cálcio tem sido a substância de escolha para medicação intracanal por sua capacidade antimicrobiana, capacidade de dissolver tecido e induzir a mineralização (Camargo et al., 2006; Maekawa et al., 2011). A sua ação antimicrobiana está associada a sua dissociação em íons cálcio e hidroxila, o que produz um pH alcalino, causando efeito destrutivo na membrana celular bacteriana (Mori et al., 2009).

A clorexidina pode ser utilizada tanto como substância química auxiliar quanto como medicação intracanal e apresenta ação antimicrobiana, efeito residual e é biocompatível (Tanomaru Filho et al., 2002; Mohammadi, Abbott, 2009).

O estudo dos extratos naturais tem recebido grande atenção em diferentes áreas da saúde, inclusive na Odontologia, entretanto, ainda são necessários estudos clínicos para comprovar sua eficácia (Aguiar et al., 2009; Valera et al., 2010a; Maekawa et al., 2013; Valera et al., 2013).

O *Zingiber officinale*, popularmente conhecido como gengibre, é largamente utilizado na medicina popular e apresenta atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética, efeito antioxidante, antiapoptótico, imunomodulador, antitumorogênico, anti-hiperglicêmico, antitrombótico e antiemético (Chrubasik et al., 2005; Kim et al., 2007; Lantz et al., 2007; Shukla, Singh, 2007; Ali BH et al., 2008; Lee et al., 2008; van Breemen et al., 2011). Além disso, possui comprovada capacidade antibacteriana e antifúngica (Grégio et al., 2006; Park et al., 2008), sendo efetivo em canais radiculares como medicação intracanal *in vitro* (Aguiar et al., 2009; Maekawa et al., 2013, Valera et al., 2013) e substância química auxiliar *in vivo* (Cardoso, 2011; Chung, 2011).

Neste contexto, a avaliação *in vivo* do *Zingiber officinale* e da clorexidina gel associados ao hidróxido de cálcio, como medicação

intracanal (MIC), poderá mostrar resultados satisfatórios para o seu uso na clínica.

Ainda, o método de hibridização DNA-DNA *checkerboard* pode fornecer informações não só a respeito do perfil bacteriano presente nos canais com necrose pulpar, mas também sobre o perfil das bactérias resistentes aos tratamentos empregados, podendo auxiliar no melhor emprego das substâncias disponíveis.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microrganismos detectados nos canais radiculares

Como marco inicial no estudo da microbiota dos canais radiculares pode-se destacar o estudo de Miller (1894) que observou a associação entre bactérias e alterações pulpares. Para isto realizou coletas de canais radiculares e analisou através de microscopia o esfregaço dessas amostras. O autor teve dificuldade no cultivo das bactérias, entretanto relatou três tipos morfológicos de células bacterianas: cocos, bacilos e espirilos.

A relação entre as bactérias e as alterações pulpares e periapicais somente foi confirmada anos mais tarde por Kakehashi et al. (1965). Os pesquisadores realizaram exposição pulpar em molares superiores de ratos convencionais e *germ-free* e analisaram histologicamente o tecido pulpar. Nos ratos convencionais houve a necrose do tecido pulpar com formação de granuloma e abscesso em todas as amostras, sem nenhuma evidência de reparo deste tecido. Nos ratos *germ-free* além de não ser observada a necrose pulpar ou formação de alterações periapicais, observou-se a formação de uma ponte de dentina.

O estudo conduzido por Möller et al. (1981) confirmou esses achados induzindo asépticamente polpas de 78 dentes de macacos à necrose. Vinte e seis cavidades pulpares foram mantidas assépticas e 52 infectadas com microbiota da cavidade bucal. Após 6 ou 7 meses da ocorrência de necrose foi realizada análise histológica. Os autores mostraram que as polpas não infectadas não induziram reação

inflamatória nos tecidos periapicais. Os dentes infectados apresentaram sinais clínicos e radiográficos de reações inflamatórias, bem como histologicamente. Os microrganismos encontrados com maior frequência foram anaeróbios facultativos e estritos

Wayman et al. (1992) examinaram 58 casos com necessidade de cirurgia periapical; os métodos de análise foram histológico e microbiológico para avaliar a presença de microrganismos através de cultura. As culturas foram positivas para bactérias em 51 casos, entretanto os microrganismos só foram visualizados histologicamente em 8 casos. Das 133 colônias isoladas, 87 eram anaeróbios estritos, 37 anaeróbios facultativos e 9 aeróbios. Os autores concluíram que as bactérias podem contribuir para formação e manutenção de lesões periapicais crônicas.

Desta maneira, pode-se estabelecer que a microbiota é o principal fator causador de alterações pulpares e periapicais. Entretanto, o estudo desta microbiota e da prevalência das bactérias só foi possível após o desenvolvimento de técnicas que permitiram a coleta, transporte e cultura de diferentes microrganismos, especialmente os anaeróbios.

Kantz e Henry (1974) coletaram amostras de 24 canais radiculares necrosados e realizaram contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e identificaram os microrganismos através da morfologia e análise do produto final do metabolismo a partir da fermentação da glicose. Foram encontrados microrganismos em 92% das amostras e os anaeróbios identificados como *Actinomyces israelii*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Campylobacter sputorum*, *Eubacterium alactolyticum*, *Fusobacterium fusiforme*, *Fusobacterium varium*, *Peptococcus morbillorum*, *Propionibacterium acnes*, *Veillonella parvula* e outras espécies de *Actinomyces*. Entretanto, os autores não conseguiram identificar alguns microrganismos.

Em um estudo clássico Sundqvist (1976) analisou microbiologicamente 32 canais radiculares de dentes hígidos e polpas

necrosadas em decorrência de trauma e constatou que 90% das cepas bacterianas isoladas eram anaeróbias estritas.

Em 1977, Goodman coletou amostras de 55 canais radiculares com presença de necrose e identificou microrganismos através da morfologia microscópica e da colônia, reação à coloração de Gram e reações bioquímicas usando API, um kit que engloba vários testes bioquímicos. Oito casos apresentaram somente bactérias anaeróbias e os outros 36 mostraram infecções mistas com presença de bactérias aeróbias e anaeróbias. Metade dos microrganismos isolados foi identificada como bactérias anaeróbias e destes, quase metade eram bactérias Gram-negativas.

Dougherty et al. (1998) realizaram cultura e identificação de bactérias produtoras de pigmento negro através de métodos bioquímicos nos terços coronário e apical de 18 dentes com lesão periapical. Doze dentes tiveram crescimento de alguma bactéria produtora de pigmento negro, sendo que 7 dentes apresentaram crescimento de *Prevotella nigrescens* nos dois terços. Seis dentes apresentaram a presença de duas espécies de bactérias produtoras de pigmento negro, sendo uma delas *P. nigrescens*.

Alguns estudos, além de identificar a microbiota dos canais radiculares, também promoveram uma correlação entre estes e os sinais e sintomas clínicos.

Sundqvist et al. (1979) inocularam combinações de bactérias de canais radiculares necrosados sintomáticos e assintomáticos em subcutâneo de porcos. Os cortes histológicos demonstraram que todas as combinações de bactérias induziram inflamação aguda com acúmulo de polimorfonucleares e formação de abscessos. Entretanto as combinações de bactérias de casos sintomáticos foram capazes de induzir infecção transmissível, sendo que todas as combinações que resultaram em infecções transmissíveis continham cepas de *Bacteroides melaninogenicus* ou *Bacteroides asaccharolyticus*. Ainda, os resultados

indicam que outras cepas, como *Peptostreptococcus micros* também se mostraram essenciais para atingir a patogenicidade.

Yoshida et al. (1987) também correlacionaram a presença de bactérias com sinais e sintomas clínicos. Os autores avaliaram 36 casos de dentes com necrose pulpar e lesão periapical e observaram nos casos de sintomatologia clínica a presença de bactérias anaeróbias em 79% dos casos, principalmente do gênero *Bacteroides* e *Peptococcus magnus*. Já nos casos assintomáticos a maior parte das bactérias encontradas foram facultativas como *Streptococcus* do grupo D e enterobactérias. Da mesma maneira, Hashioka et al. 1992 avaliaram 28 dentes com periodontite apical e sugeriram que *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Porphyromonas* e *Bacteroides* foram relacionados a dor à percussão e *Porphyromonas* e *Bacteroides* relacionados a odor em canais radiculares infectados.

Gomes et al. (1994) avaliaram a microbiota de 30 canais radiculares com infecção primária e observaram correlação entre dor e microrganismos anaeróbios. Microrganismos anaeróbios foram isolados em 93% dos casos de dor e apenas 53% dos casos que não apresentavam dor. Os autores ainda concluíram que existe uma associação significativa entre a dor e a presença de espécies de *Prevotella* e *Peptostreptococcus spp.*

Jacinto et al. (2003) investigaram a relação da microbiota de dentes com lesão periapical com a presença de sinais e sintomas clínicos e testaram a susceptibilidade antibiótica de 5 bactérias anaeróbias encontradas comumente nos canais radiculares (*Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus prevotii* e *Prevotella intermedia/nigrescens*). Foram coletadas amostras de 29 dentes sintomáticos e 19 assintomáticos e os microrganismos identificados através de características das colônias formadas e testes de API, fluorescência e fermentação de lactose. Os canais sintomáticos

apresentaram mais bactérias anaeróbias e um número maior de espécies. Mais de 70% das bactérias isoladas eram anaeróbias estritas. Os autores sugeriram relação entre microrganismos específicos, especialmente anaeróbios Gram-negativos, e a presença de sinais e sintomas clínicos. Amoxicilina, amoxicilina associada ao clavulanato e cefaclor foram efetivos contra as bactérias testadas.

Em 2004, Gomes et al. investigaram a microbiota de canais radiculares com infecções primária e secundária e a associação de diferentes espécies com sinais e sintomas clínicos. Foram coletadas amostras de 60 canais radiculares, destes 41 com tecido pulpar necrosado e 19 com necessidade de retratamento endodôntico. As amostras foram incubadas e os microrganismos identificados a partir das características das colônias e através de testes de API, fluorescência e fermentação da lactose. Das bactérias isoladas, 70% eram anaeróbias estritas ou microaerófilas. As anaeróbias mais frequentemente isoladas foram: *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis*. Os autores encontraram que a microbiota dos dentes necrosados é mista, com a maioria dos microrganismos anaeróbios e contém 3 ou mais espécies de bactérias por canal, diferentes dos dentes com infecção secundária que apresentam predominância de anaeróbios facultativos com 1 ou 2 espécies por canal. Os autores ainda sugeriram correlação das bactérias anaeróbias, especialmente as Gram-negativas, com a presença de sinais e sintomas clínicos.

As pesquisas utilizando cultura e métodos de identificação bioquímicos mostram uma microbiota mista no canal radicular, com o predomínio de anaeróbios estritos principalmente Gram-negativos. Entretanto, algumas espécies de difícil cultivo podem ter sido subestimadas. Dessa maneira as pesquisas utilizando métodos moleculares começaram a ser realizadas para definir a microbiota

presente nos canais radiculares necrosados e causadora de lesões periapicais.

2.2 Métodos moleculares de identificação dos microrganismos

O processo de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi idealizado em 1983 por Kary Mullis e revolucionou o campo da biologia molecular por ser um método capaz de amplificar uma cópia de um gene em milhares de cópias. A PCR tem gerado um número crescente de tecnologias associadas para diversas aplicações. É um dos avanços mais difundidos é a detecção de agentes patogênicos microbianos (Siqueira, Rôças, 2005).

Jung et al. (2000) investigaram a microbiota de 18 canais sintomáticos e 20 assintomáticos através de PCR e “*dot-blot hybridization*” procurando associação de patógenos e da microbiota com sinais e sintomas. Foram pesquisadas 36 bactérias presentes na microbiota bucal e foram encontradas com mais frequência: *Fusobacterium* sp. (68,4%), *P. micros* (44,7%) e *P. gingivalis* (26,3%). *B. forsythus* e *Treponema* sp. foram detectadas em 8 e 6 casos, respectivamente. Foram encontradas associações significativas entre *B. forsythus* / *P. gingivalis* e *P. gingivalis*/*Treponema*. Nenhuma espécie foi associada pelos autores a sinais e sintomas clínicos.

Rolph et al. (2001) utilizaram cultura e PCR para detectar a diversidade de bactérias presentes nos canais radiculares com infecções primária ou secundária. Das amostras estudadas, foram detectadas bactérias por cultura em 44% e por PCR em 68%. Além disso, 8 amostras foram selecionadas para clonagem e sequenciamento. Dois casos de infecção primária produziram sequências relacionadas a bactérias do gênero *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* e

Streptococcus e cinco casos de infecção secundária foram relacionados a bactérias do gênero *Capnocytophaga*, *Cytophaga*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Mogibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Selenomonas*, *Solobacterium*, *Streptococcus* e *Veillonella*.

Baumgartner et al. (2003) identificaram bactérias do gênero *Treponema* em 54 canais radiculares necrosados assintomáticos e 84 casos de abscessos sintomáticos de origem endodôntica através de nested PCR. Bactérias do gênero foram encontradas em 60,7% dos casos de abscesso e em 37% dos casos assintomáticos, sendo *T. socranskii* mais frequentemente identificado (44,9%) seguido por *T. maltophilum* (29,75), *T. denticola* (13,7%) e *T. vincentii* (5,1%). Os autores ainda relataram associação entre *T. maltophilum* e *T. socranskii* e entre *T. maltophilum* e *T. denticola*.

Também pesquisando bactérias do gênero *Treponema* através de nested PCR, Montagner et al. (2010) encontraram *T. socranskii* mais frequentemente, seguido por *T. denticola*, *T. medium* e *T. amylovorum*. Desta maneira a grande incidência de espécies de *Treponema* indica a sua importância em infecções endodônticas agudas.

Siqueira e Rôças (2003) utilizaram nested PCR para detectar a presença de *Propionibacterium propionicus* e *Actinomyces radicidentis* em canais radiculares com infecção primária e secundária. Foram utilizadas amostras coletadas de 62 pacientes divididos em: 21 casos com lesão periapical crônica assintomática; 10 casos de periodontite apical aguda; 19 casos de abscesso periapical agudo e 10 casos de dentes endodonticamente tratados e lesão periapical crônica. *P. propionicus* foi detectado em 29% das amostras do canal radicular em dentes com lesões periapical crônica, em 50% dos casos com periodontite apical aguda, em 37% das amostras de abscesso periapical agudo e em 58% dos casos com necessidade de retratamento. *A. radicidentis* foi detectada em 1 das amostras de canais com lesões

peripicais crônicas, em 1 caso de periodontite apical aguda e em 1 caso em que o tratamento endodôntico havia falhado.

Siqueira et al. (2004) utilizaram a porção apical de 23 dentes extraídos com exposição pulpar por cárie e lesão periapical para investigar através de nested PCR a presença de 11 patógenos. Todos os casos tiveram DNA bacteriano detectado e 17 casos foram positivos para pelo menos uma das espécies pesquisadas. *P. alactolyticus* ocorreu em 10 casos (44%), *T. denticola* em 6 (26%), *F. nucleatum* em 6 (26%), *P. endodontalis* em 4 (17%), *F. alocis* em 2 (9%), *D. pneumosintes* em 1 (4%), *P. gingivalis* em 1 (4%) e *T.forsythensis* em 1 (4%). Os autores concluíram que a ocorrência dessas bactérias no terço apical de canais infectados pode estar envolvida na causa de lesões periapicais.

Foschi et al. (2005) pesquisaram, através de PCR, a presença de bactérias em 62 canais radiculares, sendo 71% casos de infecção primária e 29% de infecção secundária. *T. denticola* e *E. faecalis* foram detectados em 24% dos casos, *P. gingivalis* em 13%, *P. intermedia* em 8% e *T. forsythensis* em 7%. Os autores observaram *T. denticola* em 56% dos casos de periodontite apical exacerbada e reabsorção óssea periapical, e de *E. faecalis* estava presente em 72% dos dentes com infecção secundária, mostrando correlação com falhas no tratamento endodôntico.

Em 2005, Gomes et al. pesquisaram a presença de quatro bactérias produtoras de pigmento negro em 50 dentes com presença de necrose pulpar e 50 dentes com necessidade de retratamento endodôntico através de métodos de cultura e PCR. *P. gingivalis* foi identificado em 38% dos casos por PCR e apenas 1% por cultura, *P. endodontalis* foi detectado apenas por PCR em 25% dos casos, *P. intermedia* foi detectado em 33% dos casos por PCR e 13% por cultura e *P. nigrescens* foi detectado em 22% dos casos por PCR e 13% dos casos por cultura. As bactérias pesquisadas foram mais frequentemente encontradas em infecções primárias.

Gomes et al. (2006a) também pesquisaram a presença de *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* em infecções primárias e secundárias utilizando nested PCR. *F. alocis* foi identificado em 23/50 casos de infecção primária e 12/50 de infecção secundária. *T. forsythia* foi detectado em 12/50 de infecção primária e 3/50 de infecção secundária. *T. denticola* foi identificado em 19/50 canais com infecção primária e 12/50 canais com infecção secundária. Foi encontrada associação entre: presença de dor e inchaço com *F. alocis*; dor à percussão e *T. forsythia*; mobilidade com *T. forsythia* e *T. denticola*; canais “úmidos” com *F. alocis*, *T. forsythia* e *T. denticola*; exsudato purulento com *F. alocis*, *T. forsythia* e *T. denticola* e abscesso com *F. alocis*, *T. forsythia* e *T. denticola*. Os autores concluíram que *F. alocis* e *T. forsythia* foram detectados com maior frequência em dentes com infecção primária.

Tomazinho e Avila-Campos (2007) também pesquisaram a prevalência de bactérias produtoras de pigmento negro em 100 pacientes utilizando técnicas de cultura e PCR. Através dos métodos de cultura, foram encontrados *P. nigrescens* – *P. intermedia* em 75,8%, *P. gingivalis* em 27,3% e *P. endodontalis* em 9,1%. O método de PCR identificou os seguintes microrganismos: *P. gingivalis* (43.3%), *P. nigrescens* (43.3%), *P. intermedia* (31.7%) e *P. endodontalis* (23.3%). Os autores encontraram diferenças estatisticamente significantes entre os métodos utilizados. Concluíram que bactérias produtoras de pigmento negro, sozinhas ou em associação, parecem ser frequentes em casos de infecções endodônticas crônicas.

Gomes et al. (2006b) fizeram um estudo para detectar *E. faecalis* em casos de infecção primária e secundária através de cultura e PCR. A bactéria foi identificada nas infecções primárias em 2/50 casos através do método de cultura e 41/50 casos pelo método PCR. Nas infecções secundárias foi detectada em 21/50 casos por cultura e 38/50 casos por PCR. Mostrando que *E. faecalis* é detectado tanto em infecções

primárias quanto secundárias quando é usado o PCR para sua identificação.

Para pesquisar a prevalência de *E. faecalis* em outros sítios da boca (saliva, língua e sulco gengival) e canais radiculares de pacientes submetidos a tratamento endodôntico, Sedgley et al. (2006a) utilizaram métodos de cultura e PCR. Pelo método da cultura *E. faecalis* foi detectado em apenas 4/41 pacientes. Já pelo método de PCR foi detectado em 70% dos casos em algum sítio da boca: na saliva (29%), na língua (55%), no sulco gengival (22%) e canal radicular (9%). Mostrando que o método PCR foi considerado mais sensível para detecção de *E. faecalis* em amostras de diferentes sítios da boca.

Em 1992, Higuchi et al. desenvolveram uma variação da técnica de PCR convencional, a PCR em tempo real ou qPCR. Este método não aponta apenas a presença ou ausência dos patógenos, mas também pode realizar uma quantificação em números absolutos da presença de uma bactéria na amostra (Siqueira, Rôças, 2005; Zhang, Fang, 2006). A PCR em tempo real tem sido bastante utilizada em estudos na área de microbiologia para o estudo de diversos processos infecciosos (Kubista et al., 2006).

Sedgley et al. (2006b) compararam os métodos de cultura e qPCR na identificação e quantificação de *E. faecalis* em amostras coletadas de infecções primárias (n=40) e secundárias (n=48). *E. faecalis* foi identificado em 10,2% das amostras por cultura e em 79,5% das amostras por qPCR. A quantificação através de qPCR variou de $1,1 \times 10^3$ até $1,7 \times 10^6$ células/100 μ l de amostra (média de $8,7 \times 10^4$). Pela cultura houve uma variação desde nenhum crescimento até um crescimento muito grande; desta maneira não pode ser feita uma quantificação através deste método. Além disso, *E. faecalis* foi identificado em mais casos de retratamento (89,6%) do que casos de tratamento endodôntico (67,5%).

Blome et al. (2008) quantificaram o número de bactérias total e de espécies específicas em dentes com necrose pulpar e com

necessidade de retratamento utilizando qPCR. Os autores também avaliaram a redução microbiana após preparo e medicação intracanal. O número de bactérias em casos de infecção primária foi significativamente maior do que nos casos de infecção secundária e o preparo e medicação intracanal reduziram esse número, entretanto não foram capazes de eliminar os microrganismos. *P. micros* e *P. endodontalis* foram os microrganismos mais frequentemente encontrados tanto em infecções primárias quanto secundárias.

Saito et al. (2009) utilizaram o método qPCR para quantificar *P. gingivalis* e *T. forsythia* e também o número total de bactérias em dentes necrosados. *P. gingivalis* e *T. forsythia* e a associação de ambos foram encontrados em 28%, 66% e 22% do casos respectivamente. *T. forsythia* foi considerado mais prevalente que *P. gingivalis*. A quantidade de *P. gingivalis* foi de $5,65 \times 10^{-6}$ a $1,20 \times 10^{-2}$ e de *T. forsythia* foi de $5,76 \times 10^{-6}$ a $1,35 \times 10^{-1}$. Os autores concluíram que não há relação destas bactérias com manifestação de sintomas em casos de necrose pulpar.

O método *checkerboard DNA-DNA hybridization* foi introduzido em 1994 por Socransky et al. para hibridizar uma grande quantidade de amostras de DNA com um grande número de sondas de DNA em uma única membrana. Este método permite a determinação simultânea de múltiplas espécies de bactérias em múltiplas amostras, se mostrando útil para pesquisas clínicas de infecções polimicrobianas. Este método apresenta um excelente custo-benefício, entretanto é um método menos sensível, pois necessita de uma maior quantidade de DNA bacteriano comparada às outras técnicas moleculares.

Em 2000, Siqueira et al. utilizaram este método para pesquisar 42 bactérias em canais radiculares. Das bactérias pesquisadas, 21 foram encontradas em pelo menos uma amostra. As espécies mais prevalentes foram: *Bacteroides forsythus* (39,3%); *Haemophilus*

aphrophilus (25%); *Corynebacterium matruchotii* (21,4%); *Porphyromonas gingivalis* (17,9%) e *Treponema denticola* (17,9%).

Siqueira et al. (2002b) pesquisaram através do método *checkerboard* a prevalência de espécies de Actinomyces, Estreptococos e *Enterococcus faecalis* em 53 infecções endodônticas primárias, dos quais 27 casos foram diagnosticados como abscesso perirradicular agudo. Ocorreu a detecção de espécies de Estreptococos em 22,6% das amostras, de Actinomyces em 9,4% e *E. faecalis* em 7,5%. A espécie mais prevalente foi *Streptococcus anginosus*. Nas lesões assintomáticas, as espécies mais prevalentes foram *S. intermedius*, *E. faecalis* e *S. anginosus*. A única espécie associada positivamente com abscesso perirradicular agudo foi *S. constellatus*.

Sassone et al. (2007) fizeram estudo da microbiota de 111 canais necrosados pesquisando 40 espécies bacterianas. Como o método pode ser considerado semiquantitativo, os autores também realizaram a quantificação destas espécies. Os microrganismos encontrados em maior número foram: *F. nucleatum* ssp. *Vincentii*; *E. saburreum*; *E. faecalis*; *N. mucosa*; *V. parvula*; *C. gracilis*; *Treponema socranskii*; *Porphyromonas endodontalis*; *Porphyromonas gingivalis*; *Micromonas micros*; *Prevotella nigrescens* e *Fusobacterium nucleatum* ssp. *Nucleatum*.

Sassone et al. (2008b) pesquisaram 40 espécies bacterianas com a intenção de correlacioná-las com casos sintomáticos através de *checkerboard*. A quantidade de bactérias total e de *T. forsythia* foi maior em casos sintomáticos, enquanto o número de *P. acnes* foi reduzido neste grupo. Os autores sugeriram que há uma relação entre *T. forsythia* e presença de dor.

Sassone et al. (2008a) também correlacionaram a presença de 40 bactérias com a presença de fístula. As bactérias presentes em maior número foram *Fusobacterium nucleatum* sp. *vincentii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Veillonella parvula*, *Enterococcus faecalis*, *Campylobacter gracilis* e *Neisseria mucosa*. A contagem de bactérias não

diferiu entre casos com ou sem fistula. Nos casos que apresentavam fístula foram observados maiores níveis de *P. gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* sp. *Nucleatum*. *Leptotrichia buccalis* e *Porphyromonas endodontalis* foram associados com uma maior chance de desenvolver fístula.

Rôças e Siqueira (2008) avaliaram através do método *checkerboard* as amostras de canais radiculares infectados de 43 dentes com periodontite apical crônica. As bactérias mais prevalentes foram *Olsenella uli* (74%), *Eikenella corrodens* (63%), *Porphyromonas endodontalis* (56%), *Peptostreptococcus anaerobius* (54%) e *Bacteroidetes oral clone X083* (51%).

Rôças et al. (2011a) utilizaram o método *checkerbord* para pesquisar a presença de 50 bactérias e sua relação com casos sintomáticos. Nos casos assintomáticos as bactérias mais encontradas foram *Dialister invisus* (71%), *Fusobacterium nucleatum* (62%) e *Porphyromonas endodontalis* (62%). Nos abscessos periapicais crônicos foram *P. endodontalis* (100%), *D. invisus* (89%), *Parvimonas micra* (78%) e *Solobacterium moorei* (78%). Nas periodontites apicais sintomáticas foram *D. invisus*, *P. endodontalis*, *S.moorei*, *Propionibacterium acnes* e espécies de *Estreptococos*. Os autores não observaram relação de bactérias com sintomas, entretanto observaram que algumas bactérias formam associações que podem formar comunidades mais virulentas e responsáveis por sintomas clínicos.

Sassone et al., 2012 pesquisaram através do método de hibridização DNA-DNA *checkerboard* a composição da microbiota de infecções endodônticas primárias em casos de exposição da câmara pulpar ou não. Os autores encontraram diferenças na composição da microbiota. As contagens de *F. nucleatum* ssp. *vincentii*, *Campylobacter sputigena*, *Capnocytophaga showae*, *Treponema socranskii*, *Porphyromonas endodontalis*, *Eikenella corrodens* e *Capnocytophaga ochracea* foram maiores em casos de câmara pulpar não exposta.

2.3 Complexos bacterianos

Socransky et al. (1998) utilizando o método de hibridização DNA-DNA *Checkerboard* para avaliar amostras de placa subgengival descreveram a presença de 5 complexos microbianos. O complexo vermelho composto pelas espécies *Bacteroides forsythus/Tanerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* foi associado ao sangramento à sondagem e aumento da profundidade de sondagem. O complexo laranja foi dividido em dois subgrupos: um principal, composto por *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Parvimonas micra*; e outro subgrupo periférico composto por *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis* e *Streptococcus constellatus*. Os autores relataram que o complexo laranja parece preceder a colonização do complexo vermelho. Ainda foram descritos os complexos amarelo, verde e roxo que apresentam grande associação entre si e menor associação com os complexos vermelho e laranja. O complexo verde é composto por *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Eikenella corrodens* e *Agregatibacter actinomycetemcomitans*. O complexo amarelo é formado por um grupo de estreptococos: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus intermedius*. O complexo roxo inclui *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*.

Após a introdução de métodos moleculares para pesquisar a microbiota dos canais radiculares, alguns patógenos conhecidos na Periodontia foram identificados em dentes necrosados com presença de lesão periapical. A partir disso, alguns estudos foram realizados com o objetivo de identificar nos canais radiculares bactérias

que compõem os complexos descritos por Socransky et al. (1998) especialmente o complexo vermelho.

Rôças et al. (2001) pesquisaram a ocorrência do complexo vermelho em 50 dentes necrosados com lesão radicular periapical sem a presença de doença periodontal através da técnica de PCR. Ao menos uma das espécies pesquisadas foi encontrada em 33 casos, sendo que *T. denticola* em 44%, *P. gingivalis* em 30% e *T. forsythia* em 26%. O complexo vermelho foi encontrado em apenas 4 casos e nenhum sinal ou sintoma foi associado a presença dos patógenos. Entretanto, os autores não descartaram a possibilidade de estes patógenos desenvolverem doenças perirradiculares.

Foschi et al. (2006) avaliaram infecções endodônticas causadas em ratos comuns ou com imunodeficiência. Os pesquisadores induziram infecções endodônticas com *T. denticola* sozinho ou associado às outras espécies pertencentes ao complexo vermelho e avaliaram por PCR a presença destas bactérias no cérebro, coração e baço dos ratos. Além disso, avaliaram a reabsorção óssea causada pelos patógenos através de micro-CT. Os pesquisadores observaram que a infecção produzida apenas com *T. denticola* em ratos com imunodeficiência produziu maior incidência de infecções orais severas (cinco em 10 animais exibiram abscesso). Nos outros grupos foi observado apenas um caso de abscesso em cada. Apenas DNA de *T. denticola* foi encontrado no coração, cérebro ou baço. Todos os ratos apresentaram reabsorção periapical óssea, entretanto nos casos de monoinfecção com *T. denticola* houve maior reabsorção. Os autores concluíram que *T. denticola* tem grande patogenicidade, incluindo disseminação em outros órgãos, justificando sua importância nas infecções orais.

Ozbek et al. (2009) também pesquisaram a relação da presença de *T. denticola* com casos sintomáticos de periodontite e abscesso apical. Este patógeno foi identificado em 71,6% dos casos, sugerindo sua associação com a patogênese das alterações periapicais.

Gomes et al. (2007) investigaram através de nested PCR a presença do complexo vermelho em 50 dentes necrosados com periodonite ou abscesso periapical. Foi possível detectar a *P. gingivalis*, *T. forsythia*, e *T. denticola* em 22, 12 e 19 canais, respectivamente. Foram encontradas relações entre *P. gingivalis* e inchaço, mobilidade e lesão periapical. Foram encontradas associações significativas entre a presença de *P.gingivalis* / *T. denticola* e *T. forsythia* / *T. denticola*. A associação *P. gingivalis* / *T. denticola* teve relações estatisticamente significativas com dor espontânea, sensibilidade à percussão, dor à palpação, edema e lesões periapicais. A simultânea presença de *T. forsythia* e *T. denticola* estava relacionada com dor à percussão, dor à palpação, dor espontânea e inchaço. O complexo vermelho foi encontrado em 16% (7/42) dos casos com abscesso. A presença do complexo vermelho estava relacionada principalmente à mobilidade e também lesões periapicais. Os autores concluíram que a alta prevalência de *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia* nas amostras examinadas sugere que estas bactérias estão relacionadas com a etiologia de doenças perirradiculares sintomáticas.

Ozbek SM e Ozbek A (2010) investigaram pelo método qPCR a presença do complexo vermelho em 32 casos de abscesso periapical agudo através da aspiração do exsudato. O complexo com a presença das 3 bactérias foi encontrado em 15,6% das amostras. Ao menos uma das bactérias foi encontrada em 84% dos casos. *T. denticola*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* foram detectados em 65,6%, 43,7% e 40,6% dos casos, respectivamente. Os autores concluíram que o “complexo vermelho” pode participar da patogênese dos abscessos periapicais agudos.

Buonavoglia et al. (2013) pesquisaram, através de PCR, a associação do complexo vermelho com periodontite apical aguda, crônica e “abscesso fênix”. Os autores associaram o complexo vermelho a casos de periodontite apical aguda e “abscesso fênix”. Ainda relataram que os microrganismos estudados foram esporadicamente encontrados em

casos de periodontite apical crônica. Os autores concluíram que o envolvimento de bactérias do complexo vermelho pode ser esperado quando há ocorrência de dor e drenagem de pus.

Didilescu et al. (2012) avaliaram a presença de bactérias dos complexos laranja e verde em casos de lesões endo-periodontais. Foram coletadas amostras dos canais radiculares e das bolsas periodontais. Os autores encontraram grande quantidade de *P. micra*, *F. nucleatum* e *C. sputigena* nas amostras dos canais radiculares. Nas amostras das bolsas periodontais foram encontradas as mesmas espécies e *C. rectus*. Os autores ainda correlacionaram presença de *P. micra* à dor a percussão.

2.4 Desinfecção dos canais radiculares

A limpeza mecânica do conteúdo necrótico dos canais radiculares associada a uma solução irrigadora é de extrema importância para o sucesso do tratamento endodôntico. A solução de Hipoclorito de Sódio é a mais utilizada durante o preparo biomecânico, devido a sua baixa tensão superficial, capacidade de dissolver matéria orgânica e ação antimicrobiana (Ercan et al., 2004; Vianna et al., 2006). Seu uso foi relatado pela primeira vez em Endodontia por Walker em 1936 e mais tarde foi difundido através dos estudos de Grossman, em 1943.

Devido a ação citotóxica do Hipoclorito de Sódio (Tanomaru Filho et al., 2002), foi proposto o uso de outras substâncias químicas auxiliares, como por exemplo, a clorexidina. Entretanto, Okino et al. (2004) pesquisaram a capacidade de dissolução tecidual da clorexidina (solução e gel) e observaram que a capacidade de dissolver matéria orgânica da clorexidina, tanto a solução como em gel, foram similares à capacidade da água destilada.

Vianna et al. (2006) determinaram a redução da carga microbiana de dentes necrosados após irrigação com Hipoclorito de Sódio ou Clorexidina gel através de qPCR utilizando os reagentes TaqMan e SYBRGreen. Para comparação, também foi realizada análise através dos métodos de cultura. A redução da carga microbiana no grupo Hipoclorito de Sódio foi de 99,99% utilizando SYBRGreen e 99,63% usando TaqMan e no grupo Clorexidina foi 96,62% utilizando SYBRGreen e 96,6% utilizando TaqMan. Pelo método de cultura 75% dos dentes preparados com Hipoclorito de Sódio e 50% dos dentes irrigados com Clorexidina se apresentaram livres de bactérias. Os resultados mostraram que o Hipoclorito de Sódio tem maior capacidade bactericida e de remoção de células dos canais radiculares.

Martinho e Gomes (2008) quantificaram endotoxinas e bactérias cultiváveis de canais radiculares com polpa necrosada antes e após o preparo biomecânico utilizando Hipoclorito de sódio 2,5%. O uso do Hipoclorito de Sódio diminuiu moderadamente o número de bactérias cultiváveis e foi menos efetivo para erradicação de endotoxinas. Houve correlação entre quantidade de endotoxinas e sintomatologia clínica.

A complexidade do sistema de canais radiculares, a associação das bactérias em biofilme e sua penetração dos túbulos dentinários fazem com que apenas o preparo biomecânico associado a uma substância química auxiliar não seja efetivo na eliminação de toda a microbiota dos canais radiculares (Menezes et al., 2004; Valera et al. 2009). Desta maneira, torna-se necessária a utilização de medicação intracanal na tentativa de eliminar a presença dos microrganismos.

Pastas a base de hidróxido de cálcio têm sido utilizadas como medicação intracanal por possuírem ação antibacteriana e por induzir a mineralização (Siqueira, Lopes, 1999; Leonardo et al., 2002). A ação antimicrobiana está associada a sua dissociação em íons cálcio e hidroxila, o que produz um pH alcalino, causando efeito destrutivo na membrana celular bacteriana (Siqueira, Lopes, 1999; Mori et al., 2009).

Entretanto o hidróxido de cálcio não é efetivo contra todas as bactérias encontradas nos canais radiculares e a associação com outras medicações pode aumentar a sua eficácia em eliminar bactérias do sistema de canais radiculares (Siqueira, Lopes, 1999; Sathorn et al. 2007; Balto, 2007). Muitos dos veículos utilizados não apresentam nenhuma ação antibacteriana, como por exemplo, o soro fisiológico, soluções anestésicas, propilenoglicol, glicerina e água destilada.

Xavier et al. (2013) compararam a efetividade do uso do preparo biomecânico associado ou não a medicação intracanal com hidróxido de cálcio em remover bactérias cultiváveis e endotoxinas dos canais radiculares. Os autores concluíram que sessão única ou sessões múltiplas são capazes de reduzir bactérias e endotoxinas, mas não eliminá-las.

A clorexidina pode ser utilizada como veículo para medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio e apresenta ação antimicrobiana, efeito residual e é biocompatível (Tanomaru Filho et al., 2002; Mohammadi, Abbott, 2009). A clorexidina age sobre a parede celular das bactérias através de interação eletrostática, provocando um desequilíbrio osmótico e consequente ruptura da parede bacteriana, causando o escoamento dos componentes intracelulares (Ferraz et al., 2001).

Desta maneira, a associação de hidróxido de cálcio a clorexidina para uso como medicação intracanal pode ser considerada mais eficaz contra microrganismos do canal radicular. Evans et al., 2003 mostraram em seu estudo que a associação de hidróxido de cálcio a clorexidina foi mais eficaz contra *E. faecalis* nos túbulos dentinários comparado ao hidróxido de cálcio com água.

Gomes et al. (2006c) avaliaram a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio associado à clorexidina e do hidróxido de cálcio e da clorexidina separados. Foram utilizados dois métodos: o teste de difusão em ágar e o teste de contato direto. A associação do hidróxido de

cálcio com clorexidina mostrou melhor atividade antimicrobiana que o hidróxido de cálcio ou a clorexidina separados.

Como a ação antibacteriana do hidróxido de cálcio depende da concentração de íons hidroxila, o mecanismo de dissociação nos diferentes veículos pode ser importante.

Mori et al. (2009) avaliaram a difusão do hidróxido de cálcio em diferentes veículos pelos túbulos dentinários e concluíram que água destilada e solução de clorexidina 2% apresentam melhor difusão que propilenoglicol e solução de clorexidina 0,2%. Safavi e Nakayama (2000) também encontraram uma menor difusão da medicação quando utilizados veículos não aquosos como o propilenoglicol e a glicerina. Murad et al. (2008) observaram em seu estudo uma maior infiltração de bactérias através da coroa quando utilizada a glicerina como veículo.

Camargo et al. (2006) compararam o pH e a liberação de íon cálcio após o uso de pastas de hidróxido de cálcio em diferentes veículos. Os autores verificaram que após um período de 14 dias houve maior liberação de íons comparado a 7 dias, o que pode justificar a utilização da medicação intracanal pelo período de 14 dias.

Para ser eficaz, a medicação intracanal deve atuar no interior do canal radicular e a distância nos túbulos dentinários alcançando a superfície radicular externa. Gomes et al. (2009) avaliaram a ação antimicrobiana de diferentes medicações intracanal na superfície radicular externa. A clorexidina gel 2% apresentou a maior ação antimicrobiana na superfície radicular externa, seguida por sua associação com hidróxido de cálcio, sua associação com hidróxido de cálcio e óxido de zinco e a associação de hidróxido de cálcio e solução salina.

Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* buscam avaliar a ação do preparo biomecânico e da medicação intracanal sobre a microbiota presente nos canais radiculares.

Menezes et al. (2004) compararam a ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio 2,5% e da solução de clorexidina 2% e de algumas medicações intracanal. Contra *E. faecalis* a solução de clorexidina se mostrou mais eficaz que hipoclorito de sódio e a medicação intracanal mais eficaz foi a associação do hidróxido de cálcio e paramonoclorofenol canforado. Em um estudo clínico, Siqueira et al. (2007) também avaliaram a ação de hidróxido de cálcio e paramonoclorofenol canforado sobre a microbiota através do sequenciamento das bactérias encontradas. Foi observado que após o preparo com hipoclorito de sódio 2,5% havia bactérias em metade dos casos e que a medicação intracanal foi capaz de aumentar o número de canais livres de bactérias, confirmando os achados dos estudos *in vitro*.

Sakamoto et al. (2007) utilizaram qPCR para avaliação da redução de carga microbiana de 15 canais radiculares após os procedimentos endodônticos (preparo utilizando NaOCl como irrigante e medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio). Cinco dentes não apresentaram microrganismos após irrigação e medicação intracanal. Nos outros casos, a instrumentação promoveu redução de 99,67% e a instrumentação + medicação promoveu 99,85% de redução da carga microbiana.

Valera et al. (2009) avaliaram a ação do hipoclorito de sódio 1% e diferentes medicações intracanal (hidróxido de cálcio, clorexidina gel 2% e a associação hidróxido de cálcio e clorexidina) sobre *Candida albicans* e *E. faecalis*. Os autores observaram que não houve presença de microrganismos após o preparo biomecânico nem após a medicação intracanal.

Valera et al. (2010b) fizeram avaliação da clorexidina gel 2% como substância química auxiliar e de algumas medicações intracanal (hidróxido de cálcio, clorexidina gel 2% e a associação hidróxido de cálcio e clorexidina) também sobre *C. albicans* e *E. faecalis*. O preparo biomecânico diminuiu o número de bactérias, entretanto a eliminação

completa dos microrganismos só foi possível após o uso das medicações intracanal de hidróxido de cálcio sozinho ou associado a clorexidina.

Rôças e Siqueira (2011b) utilizaram o método de PCR e *checkerboard* para avaliar a eficiência do preparo utilizando hipoclorito de sódio e das medicações intracanal de hidróxido de cálcio utilizando glicerina ou paramonoclorofenol canforado como veículo. Na segunda coleta não foi encontrado DNA bacteriano em 46% dos casos e na terceira coleta em 62,5% dos casos. No grupo hidróxido de cálcio + glicerina não foram encontradas bactérias em 58% dos casos e no grupo que utilizou paramonoclorofenol canforado como veículo 67% dos casos apresentaram-se livres de DNA bacteriano. Das bactérias encontradas após preparo e medicação as mais prevalentes foram: *P. acnes* e espécies de *Streptococcus*.

Vianna et al. (2008) fizeram um estudo através do método *checkerboard* para comparação da microbiota após preparo utilizando clorexidina gel e diferentes medicações intracanal (hidróxido de cálcio, clorexidina e a associação deles). Das 40 bactérias pesquisadas as mais encontradas na primeira coleta foram: *Fusobacterium nucleatum* ssp. *polymorphum*, *Treponema socranskii* ssp. *socranskii*, *Parvimonas micra* e *Enterococcus faecalis*. Nas segunda e terceira coletas foram identificados 8 espécies bacterianas, entretanto no grupo onde foi utilizada clorexidina sozinha não foi encontrado nenhum microrganismo.

de Souza et al. (2005) avaliaram por *checkerboard* a microbiota de canais radiculares necrosados e o efeito do hidróxido de cálcio sobre a microbiota. Foram pesquisadas 44 espécies de bactérias e as mais encontradas foram: *F. nucleatum* ss. *vincentii*, *C. sputigena*, *C. ochracea*, *S. constellatus*, *V. parvula*, *P. gingivalis*, *P. melaninogenica* e *S. sanguis*. A maior parte dos microrganismos foi reduzida após medicação com hidróxido de cálcio, entretanto *A. actinomycetemcomitans*, *C. sputigena* e *E. corrodens* aumentaram após medicação intracanal. Os

autores concluíram que o uso de hidróxido de cálcio tem o uso limitado por não eliminar toda a microbiota.

Teles et al. (2014) utilizaram o método qPCR e de cultura para quantificar a carga microbiana inicial, após preparo biomecânico e medicação intracanal com hidróxido de cálcio ou clorexidina. Após preparo biomecânico foi observada redução da carga microbiana de 99,1% pelo método de qPCR e 98,5% pela contagem de UFC. As medicações intracanal não foram consideradas efetivas na eliminação de microrganismos, entretanto a medicação clorexidina apresentou piores resultados, não apresentando diferenças entre os achados utilizando as duas metodologias.

2.5 *Zingiber officinale*

O *Zingiber officinale*, popularmente conhecido como gengibre, é um constituinte comum da dieta e amplamente utilizado na medicina popular. Seus compostos são extensivamente estudados e apresentam ação antioxidante, antiemética, gastroprotetiva e anti-inflamatória (Baliga et al., 2011). Os constituintes do gengibre são numerosos e variam dependendo do local de origem e se os rizomas são frescos ou secos. A pungência do gengibre fresco é atribuída principalmente aos gingeróis, sendo o mais abundante o [6]-gingerol. A pungência do gengibre seco resulta principalmente dos shogaóis, por exemplo, [6]-shogaol, que são formas desidratadas dos gingeróis (Ali et al., 2008).

Lantz et al. (2007) testaram a propriedade anti-inflamatória destes componentes do gengibre. Extratos contendo gingerol ou shogaol foram capazes de inibir a produção de prostaglandina E2 induzida pela endotoxina de *E. coli*. Os extratos contendo gingerol ainda

foram capazes de inibir a expressão de COX-2 induzida pela endotoxina enquanto o shogaol não teve efeito sobre a COX-2. Aimbire et al. (2007) também demonstraram um efeito anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico do *Zingiber officinale*. O extrato reduziu os níveis de prostaglandina e tromboxana e a atividade de mieloperoxidase em pulmões de ratos com inflamação induzida por endotoxinas.

Dugasani et al. (2010) compararam os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios dos componentes do *Zingiber officinale* e concluíram que os componentes apresentaram efeito anti-inflamatório e antioxidante, sendo o [6]-shogaol o mais potente.

Por suas propriedades o *Zingiber officinale* tem sido interesse de estudos, inclusive na Odontologia. Grégio et al. (2006) estudaram a ação dos extratos glicólico e hidroalcoólico de gengibre sobre *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Ambos apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica relevante para a Odontologia, podendo contribuir para o tratamento de doenças causadas por esses microrganismos presentes na cavidade bucal.

Ao avaliar a atividade dos compostos do *Zingiber officinale* sobre bactérias causadoras de doença periodontal Park et al. (2008) observaram que o [10]-gingerol e o [12]-gingerol foram capazes de inibir o crescimento de *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *P. intermedia*.

Aguiar et al. (2009) avaliaram *in vitro* a ação do extrato glicólico de gengibre sobre *C. albicans* comparando com o hipoclorito de sódio. Foram obtidas as concentrações de diluição inibitória mínima e diluição fungicida mínima. O extrato de gengibre apresentou atividade fungicida a partir da concentração de 12,5% e atividade fungistática em 6,25%. O hipoclorito de sódio apresentou atividade fungicida desde a concentração 6,25%, sendo equivalente à concentração de diluição inibitória mínima. Desta maneira, o extrato de gengibre e o hipoclorito de sódio apresentam efeito fungicida sobre *C. albicans*.

Pode-se verificar que o *Zingiber officinale* apresenta ação anti-inflamatória e antimicrobiana, por essa razão foram realizadas pesquisas sobre sua atividade na Endodontia como medicação intracanal e substância química auxiliar.

Maekawa et al. (2013) avaliaram *in vitro* os extratos de gengibre e própolis, hidróxido de cálcio e clorexidina gel como medicação intracanal sobre *C. albicans*, *E. faecalis*, *E. coli* e endotoxinas. As medicações foram capazes de eliminar os microrganismos dos canais radiculares e reduzir a quantidade de endotoxinas. Entretanto, hidróxido de cálcio foi considerado mais efetivo em neutralizar endotoxinas e menos efetivo contra *C. albicans*. Os autores sugeriram a associação de medicações para maior sucesso do tratamento endodôntico.

Valera et al. (2013) também observaram eficácia sobre *C. albicans* e *E. faecalis* do extrato glicólico de gengibre como substância química auxiliar *in vitro*, entretanto hipoclorito de sódio 2.5% e clorexidina gel 2% mostraram melhores resultados.

Chung (2011) avaliou *in vivo*, através do método PCR, o extrato glicólico de gengibre 20%, o hipoclorito de sódio 1% e a clorexidina gel 2% como substâncias químicas auxiliares em dentes com necrose pulpar e lesão periapical. Os resultados mostraram presença de DNA bacteriano em todas as amostras, sendo *Parvimonas micra* a espécie mais frequente. A instrumentação com as substâncias testadas reduziram significativamente microrganismos e endotoxinas dos canais radiculares. O preparo biomecânico utilizando extrato glicólico de gengibre foi eficiente tanto em reduzir microrganismos quanto endotoxinas dos canais radiculares. Cardoso (2011) também observou redução de microrganismos e endotoxinas em casos de infecção secundária após preparo biomecânico utilizando extrato glicólico de gengibre como substância química auxiliar.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

- a) Correlacionar características clínicas e radiográficas com a microbiota presente e complexos bacterianos;
- b) Monitorar o perfil microbiológico durante o preparo biomecânico e uso de medicação intracanal;
- c) Verificar a susceptibilidade de diferentes complexos microbianos ao preparo biomecânico e medicações intracanal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP, parecer nº 179.380 (Anexo A).

4.1 Seleção de pacientes

Para a realização da presente pesquisa foram selecionados 30 pacientes encaminhados para a Clínica de Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos (UNESP) com necessidade de tratamento endodôntico em dentes unirradiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical (Figura 1). Foi realizada anamnese, selecionando pacientes com condições favoráveis de saúde, local e sistêmica. Os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A), aceitando fazer parte do estudo e também em cumprir as condições estabelecidas para a pesquisa.

Os pacientes foram selecionados seguindo critérios de inclusão e exclusão pré-estabelecidos. Foram excluídos da pesquisa dentes com doença periodontal, fratura radicular, exposição da câmara pulpar, pacientes que fizeram utilização de antifúngicos e/ou antibióticos (<3 meses), dentes com impossibilidade de isolamento absoluto e de inserção do cone de papel no canal radicular em seu comprimento pré-odontométrico (CPO = comprimento aparente radiográfico subtraído em 3 mm).

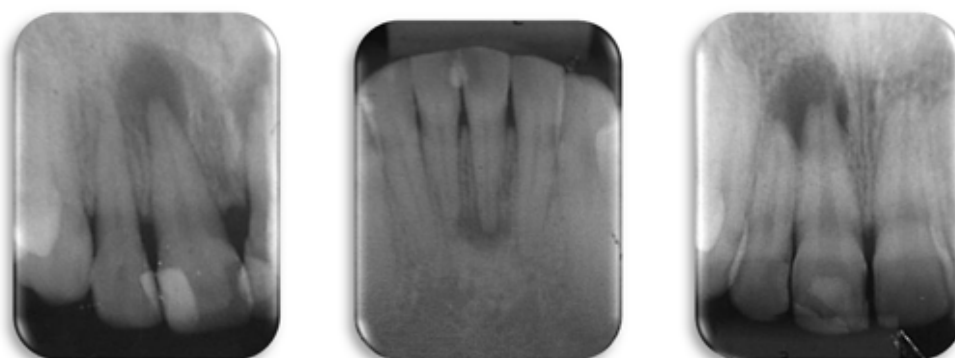


Figura 1 – Radiografias iniciais de dentes selecionados para o estudo onde podem ser observadas lesões periapicais primárias.

4.2 Intervenção Odontológica

Todos os instrumentais utilizados nesta pesquisa foram submetidos à esterilização por radiação gama com cobalto 60 (dose 20 KGy por 6 horas) pela Embrarad (Empresa Brasileira de Radiação, Cotia, SP, Brasil) e todos os passos subsequentes foram realizados de forma asséptica. Inicialmente os pacientes foram submetidos à anestesia, isolamento absoluto e vedamento da interface coroa / lençol foi feito utilizando uma barreira física de resina fotopolimerizável (Top Dam - FKG Dentaire – Labordental) seguido de profilaxia com pasta profilática (Vigodent S/A Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e escova de Robinson (Microdont – Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Então, os dentes foram lavados com solução salina fisiológica (Laboratório Sanobiol, Pouso Alegre, MG, Brasil) para remoção do excesso de pasta profilática. Em seguida, foi realizada desinfecção do campo operatório utilizando *swabs* (Jiangsu Medical Materials Co. Ltd., Jiangsu, China) estéreis umedecidos em água oxigenada 30 volumes (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) seguido de hipoclorito de

sódio 5,25% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) e neutralização do hipoclorito de sódio com tiosulfato de sódio 5% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil). Foi realizada abertura coronária com auxílio de brocas acionadas em alta rotação, sob refrigeração com solução salina fisiológica apirogênica (Figura 2). Terminada a abertura coronária, foi realizada a 1ª coleta do conteúdo do canal radicular.

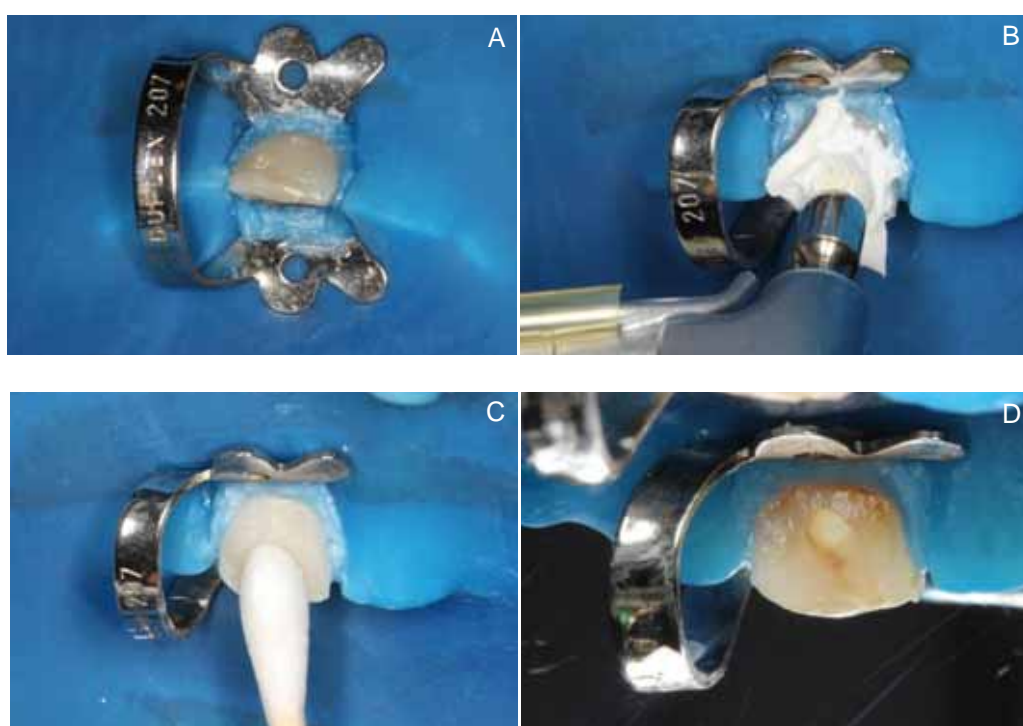


Figura 2 – Sequência da intervenção odontológica. A) isolamento absoluto; B) profilaxia; C) desinfecção do campo operatório; D) abertura coronária.

4.3 Coletas do canal radicular

Para a coleta de amostras do canal radicular, 3 cones de papel absorvente (Dentsply Maillefer Ind. E Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil) apirogênicos foram introduzidos um de cada vez no interior do

canal radicular respeitando-se o comprimento pré-odontométrico (CPO = comprimento aparente radiográfico subtraído em 3 mm) permanecendo nesta posição por 60 segundos. Os 3 cones de papel foram armazenados em tubo tipo eppendorf (1,5 mL) esterilizado contendo 1 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III - Viability Medium Goteberg Agar (Möller, 1966; Dahlén et al., 1993) para posterior análise microbiológica (Figura 3).

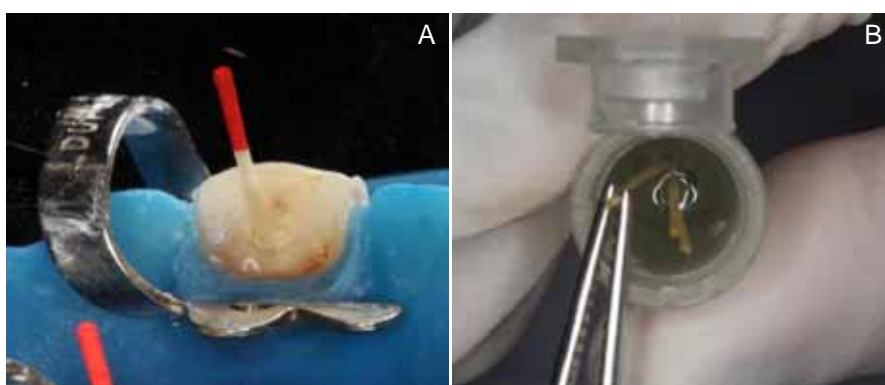


Figura 3 - Coleta do conteúdo do canal radicular. A) Cone de papel no interior do canal radicular; B) 3 cones de papel armazenados em 1 mL de VMGA III.

4.4 Preparo biomecânico

Após a primeira coleta, foi realizada neutralização do conteúdo séptico do canal radicular e posterior preparo biomecânico utilizando hipoclorito de sódio 2,5% como solução irrigadora. O comprimento de trabalho (CT) foi determinado radiograficamente e com o uso do localizador apical (RomiApex A-15 – Romidan Dental Solution, Israel) (Figura 4).

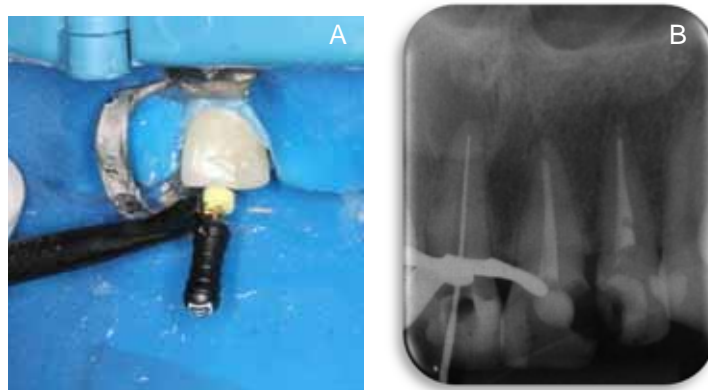


Figura 4 – Realização da odontometria. A) Uso do localizador apical; B) Confirmação radiográfica.

Após a obtenção do comprimento do dente, foi realizado desbridamento foraminal até uma lima K 30 (no comprimento real do dente) e preparo apical (1 mm aquém do ápice radiográfico) com a utilização dos kits 701 e 702 do Sistema Rotatório Mtwo (VDW, München, Alemanha). Durante todo o preparo, o canal foi irrigado com 5 mL de hipoclorito de sódio 2,5% a cada troca de instrumento (Figura 5). Ao final do preparo biomecânico, para neutralização da solução de NaOCl, os dentes foram irrigados com 5 mL tiosulfato de sódio 5% (Moller A, 1966). Após, todos os dentes receberam irrigação final com 10 mL de solução salina fisiológica estéril e apirogênica e, em seguida, a 2ª Coleta foi realizada de forma semelhante, entretanto, neste momento o cone de papel foi inserido no comprimento de trabalho (CT).

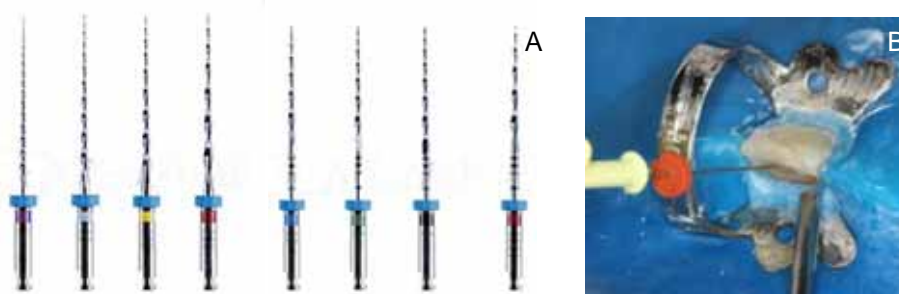


Figura 5 – Preparo biomecânico. A) Instrumentos utilizados para o preparo biomecânico do Sistema Rotatório Mtwo (Kits 701 e 702); B) Irrigação/aspiração do canal radicular.

4.5 Medicação intracanal por 14 dias

Após a segunda coleta, os canais foram preenchidos com solução de EDTA 17% (Inodon, Porto Alegre, RS, Brasil) durante 3 minutos e lavados com 10 mL de solução salina fisiológica aprotogênica para posterior colocação da medicação intracanal (MIC). Os dentes foram divididos de acordo com a MIC utilizada (Quadro 1).

Quadro 1 - Divisão dos grupos experimentais

Grupos	n	Solução irrigadora	Medicação intracanal
HC+SS	10	Hipoclorito de Sódio 2,5%	Hidróxido de Cálcio (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda, Ibiporã, PR, Brasil) + Solução Salina
HC+G	10		Hidróxido de Cálcio + Extrato Glicólico de Gengibre 20% (Apis Flora, Ribeirão Preto, SP, Brasil)
HC + CLX	10		Hidróxido de Cálcio + Clorexidina Gel 2% (Consepsis V – Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA)

A associação das medicações Ca(OH)_2 + solução salina e Ca(OH)_2 + extrato glicólico de gengibre foram realizadas na proporção 0,1g de Ca(OH)_2 para 100 μl de solução salina ou extrato glicólico de gengibre. A associação Ca(OH)_2 + clorexidina gel 2% foi realizada na proporção 1:1 em volume, na consistência de pasta de dente. Todas as associações foram levadas ao canal radicular com o auxílio de limas K30 e lentulo (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland) até completo preenchimento do canal. Em seguida, os dentes foram selados inserindo uma camada de coltosol (Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)

seguido de restauração provisória com cimento de ionômero de vidro (S.S. White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Figura 6).

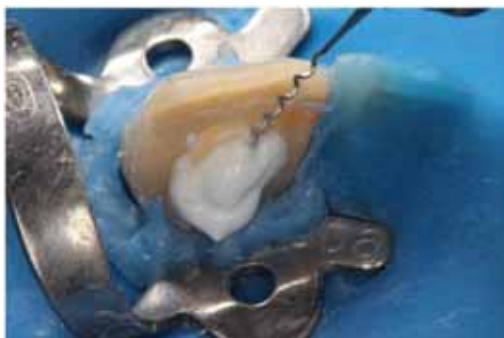


Figura 6 – Preenchimento do canal com medicação intracanal com auxílio de lentulo.

Transcorrido o período de 14 dias, o paciente foi novamente submetido à anestesia, isolamento e antissepsia do campo operatório (semelhante à primeira sessão de atendimento), remoção do selamento coronário, remoção da MIC com lima K30 (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland) e irrigação com 20 mL de solução salina fisiológica aprotínica. Em seguida, foi realizada a 3ª coleta de forma semelhante às coletas anteriormente descritas.

4.6 Obturação dos canais radiculares

Terminada a 3ª coleta, os casos que não apresentaram dor, odor e estavam secos, foram obturados com cones de guta-percha (Dentsply Maillefer Ind. Com. Ltda. Petrópolis, RJ, Brasil) e cimento obturador AH Plus (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz). Os dentes foram radiografados para comprovação de adequado preenchimento em lateralidade da obturação do canal radicular (Figura 7).



Figura 7 – Obturação dos canais radiculares. A) Radiografia de prova do cone; B) Radiografia de comprovação de adequado preenchimento em extensão e lateralidade da obturação do canal radicular; C) Radiografia final.

4.7 Análises Microbiológicas

4.7.1 Cultura dos microrganismos

Para todas as coletas, a viabilidade antimicrobiana foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de microrganismos remanescentes no canal radicular. Imediatamente após a coleta, o eppendorf contendo os 3 cones de papel (amostra matriz) armazenados em 1 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III foi agitado até a dessorção do conteúdo para facilitar a dispersão dos microrganismos. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas até 1000 vezes.

Foram semeados 50 μ L da amostra matriz (sem diluição) e 50 μ L da diluição 1/1000 em placas de petri contendo *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA – Neogen Corporation, Michigan, USA), acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro suplementados por hemina (5 mg/L) e vitamina K1 (1 mg/L). Essas placas foram incubadas em jarras de anaerobiose (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos LTDA., São

Paulo, SP, Brasil) a 37 °C por 14 dias, para permitir a detecção de microrganismos anaeróbios estritos.

As unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foram determinadas a partir da contagem do número de colônias nas placas analisadas. Para a obtenção do número de UFC presentes na amostra por mL (amostra inicial) foi necessário multiplicar por 20 ou 20.000 o número de UFC observadas nas contagens das placas, dependendo da diluição utilizada. A escolha da placa para contagem de UFC estava relacionada à possibilidade de contar de forma individual o número de UFC presentes. Quando não foi possível a contagem da amostra matriz, foi utilizada a diluição 10^{-3} .

Assim, a alíquota plaqueada foi de 50 µL, ou seja, 20 vezes menor que 1 mL. Portanto o fator de multiplicação do número de UFC obtido foi 20 quando a amostra matriz foi utilizada. Entretanto, quando a diluição 10^{-3} foi escolhida, o valor correspondente a essa diluição é 1000 vezes menor que o inicial. Como a alíquota plaqueada foi de 50 µL o fator de multiplicação do número de UFC obtido foi 20.000.

Todos os tubos tipo Eppendorf contendo as amostras em VMGA III e cones de papel absorvente, imediatamente após a retirada da alíquota para diluição e para o plaqueamento no meio de cultura, foram estocados em freezer a -20 °C para análise através de técnica molecular.

4.7.2 Análise por *checkerboard*

As amostras obtidas foram avaliadas pelo método *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, utilizado para estudar a diversidade microbológica dos canais radiculares com necrose pulpar e lesão periapical investigando 40 espécies bacterianas. O método foi

realizado no Laboratório de Pesquisa em Odontologia II – Microbiologia, Imunologia e Biologia Molecular da Universidade de Guarulhos (UnG).

Os tubos eppendorf contendo os 3 cones de papel (amostra matriz) armazenados em 1 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III foram agitados até a dessorção do conteúdo para facilitar a dispersão dos microrganismos e 300 µl de cada amostra foram transferidos para outro tubo eppendorf. Após esse procedimento, os tubos foram centrifugados a 8.000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante neles contido foi então descartado e o pellet ressuspendido com 150 µL de solução TE (10 Mm Tris-HCL, 1 Mm EDTA pH 7,6). A cada tubo plástico contendo amostras e solução tampão TE foram acrescentados 100 µl de NaOH (Labsynth) a 0,5M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por um longo período de tempo. Em seguida, as amostras foram armazenadas sob refrigeração a -20 °C até que fossem analisadas.

4.7.2.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento

A lista das 40 cepas bacterianas utilizadas neste estudo para o preparo das sondas de DNA está apresentada no Quadro 2. As espécies avaliadas foram selecionadas devido à sua associação as infecções endodônticas ou a sua presença em outras infecções orais e saliva. Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA) ou do Forsyth Institute (Boston, MA, EUA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de Mycoplasma (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e cultivado em Agar-triptose de soja (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) contendo 5% de sangue desfibrinado de ovelha (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, EUA) a 35 °C sob condição de

anaerobiose. Algumas bactérias foram cultivadas em meios de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais. *T. forsythia*, por exemplo, foi cultivada em ágar-triptose de soja com 5% de sangue desfibrinado de ovelha e 10 µg/mL de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA); enquanto *P. gingivalis* cresceu em um meio similar, suplementado com 5% de sangue desfibrinado de ovelha, 0,3 µg/mL de menadiona e 5 µg/mL de hemina. As espécies *T. denticola* e *Treponema socranskii* foram cultivadas em caldo para crescimento de Mycoplasma suplementado com 1 mg/mL de glicose (Sigma), 400 µg/mL de niacinamida (Sigma), 150 µg/mL de espermina tetraidroclorídrica (Sigma), 20 µg/mL de isobutirato de sódio (ICN, Costa Mesa, CA, EUA), 1mg/mL de L-cisteína (Sigma), 5 µg/mL de tiamina pirofosfato (Sigma) e 0,5% de soro bovino (Laborclin, São José dos Pinhais, PR, Brasil).

Quadro 2 - Relação das cepas empregadas para o desenvolvimento das sondas de DNA bacteriano. As espécies estão agrupadas por complexos bacterianos

Espécies	Cepas	Gram	Metabolismo
Complexo vermelho			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 ^a	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Tannerella forsythia</i>	43037 ^a	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Treponema denticola</i>	B1 ^b	Gram -	Anaeróbio estrito
Complexo roxo			
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929 ^a	Gram +	Anaeróbio facultativo
<i>Veillonella parvula</i>	10790 ^a	Gram -	Anaeróbio estrito
Complexo verde			
<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans (a+b)</i>	43718 ^a e 29523 ^a	Gram -	Anaeróbio facultativo
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 ^a	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 ^a	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 ^a	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Eikenella corrodens</i>	23837 ^a	Gram -	Anaeróbio facultativo
Complexo laranja principal			
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>nucleatum</i>	25586 ^a	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>polymorphum</i>	10953 ^a	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>vincentii</i>	49256 ^a	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 ^a	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Parvimonas micra</i>	33270 ^a	Gram +	Anaeróbio estrito
<i>Prevotella intermedia</i>	25611 ^a	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 ^a	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 ^a	Gram +	Anaeróbio facultativo
Complexo laranja periférico			
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 ^a	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 ^a	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Campylobacter showae</i>	51146 ^a	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 ^a	Gram +	Anaeróbio estrito
Complexo Amarelo			
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 ^a	Gram +	Anaeróbio facultativo
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 ^a	Gram +	Anaeróbio facultativo
<i>Streptococcus mitis</i>	49456 ^a	Gram +	Anaeróbio facultativo
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 ^a	Gram +	Anaeróbio facultativo
Outras espécies			
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 ^a	Gram +	Anaeróbio facultativo
<i>Actinomyces oris</i>	43146 ^a	Gram +	Anaeróbio facultativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212 ^a	Gram +	Anaeróbio facultativo
<i>Enterococcus faecium</i>	6569 ^a	Gram +	Anaeróbio facultativo
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271 ^a	Gram +	Anaeróbio estrito
<i>Gemella morbillorum</i>	27824 ^a	Gram +	Anaeróbio estrito
<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201 ^a	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Neisseria mucosa</i>	19696 ^a	Gram -	Anaeróbio facultativo
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406 ^a	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 ^a	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Propionibacterium acnes (I+II)</i>	11827 ^a e 11282 ^a	Gram +	Anaeróbio aerotolerante
<i>Seimonas noxia</i>	43541 ^a	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 ^a	Gram +	Anaeróbio facultativo
<i>Treponema socranskii</i>	S1 ^b	Gram -	Anaeróbio estrito

^a ATCC (American Type Culture Collection); ^b Forsyth Institute

4.7.2.2 Isolamento do DNA e preparo das sondas

As cepas bacterianas foram cultivadas anaerobicamente e as colônias foram raspadas e depositadas em tubos plásticos para microcentrífuga de 1,5 mL contendo 1 mL de solução TE (pH 7,6). As células foram lavadas 2 vezes por centrifugação na solução TE a 3500xg por 10 minutos. Em seguida, as cepas Gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas em SDS (dodecilsulfato de sódio, Labsynth) a 10% e proteinase K (Sigma) em uma concentração de 20 mg/mL. As cepas de bactérias Gram-positivas foram lisadas em 150 µL de uma mistura enzimática contendo 15 mg/mL de lisozima (Sigma) e 5 mg/mL de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão TE (pH 8,0).

O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith et al. (1989). As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1 µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *random primer digoxigenin labeling kit* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA), de acordo com o método descrito por Feinberg e Vogelstein (1983).

4.7.2.3 Checkerboard DNA-DNA hybridization

As suspensões contendo as amostras coletadas foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 mL de acetato de amônia (C₂H₇NO₂) a 5 M. Com isto, as células bacterianas foram lisadas e o DNA ficou suspenso na solução.

Uma membrana de nylon (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences, Chicago, IL- USA) foi montada em Minislot 30® (Immunitics, Cambridge, MA – USA) (Figura 8).



Figura 8 - Acomodação da membrana de nylon com carga positiva na placa metálica Minislot 30 para processamento das amostras.

Suspensão de cada amostra contendo DNA livre foi depositada nas fendas do Minislot 30® e o DNA permaneceu depositado na membrana de *nylon*. As duas últimas canaletas do *Minislot* 30® foram reservadas para a colocação dos controles, contendo uma mistura das espécies dos microrganismos que foram investigados pelas sondas de DNA, em duas concentrações, 10^5 e 10^6 células bacterianas, ou seja, 0,001 μg e 0,01 μg de cada espécie, respectivamente.

A membrana foi removida do aparato e o DNA, previamente depositado na mesma, foi fixado por intermédio de aquecimento em forno a 120 °C, por 20 minutos.

A membrana contendo o DNA fixado foi pré-hibridizada a 42 °C, por uma hora, em uma solução de 50% formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% caseína (Vetec), 5 x solução salina citrada (SSC) (1 x SSC = 150 mM NaCl) (Vetec), 15M de citrato de sódio (pH 7,0) (J.T.Baker, Edo. Fr Méx., México), 25 mM de fosfato de sódio (pH 6,5) (Labsynth) e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Sigma). Em seguida a membrana foi posicionada no *Miniblotter* 45® (Immunetics, Cambridge, MA – USA) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles perpendiculares às canaletas do aparato (Figura 9).



Figura 9 – Membrana acomodada no Miniblotter 45 para aplicação das sondas.

Cada sonda de DNA contida numa solução de hibridização (45% formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/mL de RNA levedura, 10% de sulfato de dextrano, 1% de caseína e 20 mg/mL de sonda de DNA) foi colocada em uma canaleta do *Miniblotter 45*[®], de modo que cada canaleta foi preenchida com 135 μ L de uma determinada sonda. As sondas hibridizaram perpendicularmente às linhas contendo o DNA bacteriano fixado, propiciando um formato xadrez, uma vez que as linhas de DNA horizontais se cruzaram com as verticais correspondente às canaletas contendo as sondas de DNA. O aparato *Miniblotter 45*[®] e a membrana com as sondas e o DNA das amostras bacterianas fixadas, foram colocados dentro de um saco plástico umedecido para evitar a desidratação das mesmas e incubado a 42 °C para que a hibridização ocorresse. A hibridização das membranas com as sondas ocorreu durante um período mínimo de 12 horas

(*overnight*).

Após a hibridização com as sondas, as membranas foram removidas do *Miniblotter 45*® e lavadas por 40 minutos a 65 °C, numa solução adstringente composta por 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20 mM de Na₂HPO₄, a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por 1 hora, sob agitação, em uma solução bloqueadora contendo 1% de ácido maleico (Vetec), 3 M NaCl, 0,2 M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína (pH 8,0) e, logo após, por 30 minutos na mesma solução contendo anticorpo anti-digoxigenina (*Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments* – Roche Diagnostics GmbH, Mannheim – Germany) conjugado à fosfatase alcalina (Roche), em uma concentração de 1:10000. As membranas foram, então, lavadas 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1 M ácido maleico, 3 M NaCl, 0,2 M NaOH, 0,3% Tween 20, pH 8,0, e uma vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1 M de Tris HCl, 0,1 M de NaCl (pH 9,5). Para detecção dos sinais as membranas foram incubadas por 45 minutos a 37 °C em uma solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina, *CDP-Star Detection Reagent* ®(Amershan Biosciences UK Limited, Buckinghamshire – UK). Em seguida, as membranas foram colocadas em um cassete, Chassi Radiográfico 30 x 40 cm (Konex, São Paulo, SP, Brasil) sob um filme radiográfico (Kodak® X-OMAT Kodak Brasileira Com. E Ind. Ltda, São José dos Campos, SP) por aproximadamente 40 minutos (Figura 10). Os filmes foram posteriormente revelados manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com as orientações do fabricante.



Figura 10 - Cassete de exposição para revelação e detecção dos sinais de hibridização das membranas.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, calibrado e cego para as terapias empregadas. A leitura foi realizada 2 vezes, em dias diferentes, para conferência de resultados. Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra dos canais radiculares foi comparado, em intensidade, ao sinal produzido pela mesma sonda nas 2 linhas de controles contendo 10^5 e 10^6 células bacterianas. A intensidade de hibridização foi dividida em 6 classes diferentes em relação aos níveis observados de contagem: (0) não detectado; (1) $<10^5$ células, (2) cerca de 10^5 células, (3) entre 10^5 e 10^6 células; (4) cerca de 10^6 células; (5) superior a 10^6 células.

4.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram digitados em uma planilha do Excel, e analisados com o software Stata 12.0 (StataCorp., College

Station, TX, EUA). Inicialmente, a análise descritiva foi realizada a fim de ver a distribuição de dados. A relação entre as características clínicas e complexo bacteriano na 1ª coleta foi testada com o teste de tendência linear. A associação de espécies de bactérias específicas e características clínicas foi testada com o teste exato de Fisher.

Para monitorar a eficácia do tratamento endodôntico sobre o número de UFC/mL, o número de espécies de bactérias e carga bacteriana separada por complexos, foi utilizado o teste pareado de Wilcoxon. Finalmente, o teste de Mann-Whitney foi usado para observar os efeitos de cada medicação intracanal nas variáveis citadas acima.

Para todos os testes realizados, um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Correlação de características clínicas e radiográficas com a microbiota presente e complexos bacterianos

Foram realizados neste estudo o tratamento endodôntico de 30 dentes com necrose pulpar e rarefação periapical visível radiograficamente. Durante a anamnese, 11/30 relataram dor em algum momento previamente ao início do tratamento endodôntico. Durante o exame clínico, foi observado que 5/30 pacientes apresentaram dor à percussão vertical, 4/30 pacientes relataram dor à palpação apical, 10/30 pacientes apresentavam fístula e 2/30 pacientes apresentaram presença de exsudato. Dez dos 30 dentes encontravam-se com restaurações provisórias, 6/30 apresentavam restaurações definitivas deficientes, 6/30 apresentavam restaurações definitivas adequadas, 2/30 estavam íntegros e 6/30 apresentavam cárie. Considerou-se restauração deficiente quando as mesmas apresentavam fraturas, fendas nas margens ou recidiva de cárie.

As características clínicas e radiográficas podem ser observadas no Quadro 3.

Quadro 3 – Características clínicas e radiográficas dos dentes submetidos ao tratamento endodôntico

Caso	Dente	Pe	Pa	Previa	F	E	Condição do dente	Lesão (mm)
1	35	Não	Sim	Não	Sim	Não	Cariado	10
2	32	Não	Sim	Sim	Não	Não	Rest. Deficiente	9
3	15	Não	Não	Não	Sim	Não	Cariado	7
4	12	Não	Não	Não	Sim	Não	Cariado	7
5	11	Não	Não	Não	Não	Não	Íntegro	10
6	11	Não	Não	Não	Não	Não	Rest. Provisória	3
7	12	Não	Não	Não	Sim	Não	Rest. Adequada	9
8	21	Sim	Não	Sim	Não	Não	Rest. Adequada	6
9	11	Sim	Não	Não	Sim	Não	Rest. Adequada	10
10	12	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Rest. Deficiente	9
11	22	Não	Não	Sim	Não	Não	Rest. Provisória	2
12	11	Não	Não	Não	Não	Não	Cariado	8
13	21	Não	Não	Não	Não	Não	Cariado	5
14	23	Sim	Não	Sim	Não	Não	Rest. Deficiente	5
15	15	Não	Não	Sim	Sim	Não	Rest. Provisória	5
16	31	Não	Não	Sim	Sim	Não	Íntegro	5
17	25	Não	Não	Não	Sim	Não	Rest. Adequada	6
18	22	Não	Não	Sim	Não	Não	Rest. Provisória	4
19	21	Não	Não	Não	Não	Não	Rest. Adequada	4
20	13	Não	Não	Sim	Não	Não	Rest. Provisória	6
21	25	Não	Não	Não	Não	Não	Rest. Provisória	7
22	11	Não	Não	Não	Não	Sim	Rest. Provisória	8
23	12	Não	Não	Não	Não	Não	Rest. Provisória	8
24	11	Não	Não	Sim	Não	Não	Rest. Adequada	3
25	44	Não	Não	Não	Sim	Não	Rest. Deficiente	6
26	21	Não	Não	Não	Sim	Não	Rest. Deficiente	10
27	22	Não	Não	Não	Não	Não	Rest. Provisória	7
28	13	Não	Não	Não	Não	Não	Rest. Provisória	9
29	35	Sim	Não	Sim	Não	Não	Cariado	3
30	25	Não	Sim	Não	Não	Não	Rest. Deficiente	7

Pe: Dor a percussão; Pa: Dor a palpação; Previa: Dor prévia; F: Fístula; E: Exsudato

O teste de tendência linear mostrou que houve associação positiva entre dor à palpação e maior carga dos complexos: roxo ($p = 0,017$), verde ($p = 0,007$) e laranja ($p = 0,018$). Já a presença de fístula esteve associada à maior carga bacteriana do complexo vermelho ($p = 0,038$).

O teste exato de Fisher mostrou que, isoladamente, *P. gingivalis* ($p = 0,043$) e *T. denticola* ($p = 0,02$) estiveram associados à

presença de dor à percussão. Dor à palpação esteve associada com *T. denticola* ($p = 0,009$) e *E. corrodens* ($p = 0,039$). A presença de fístula foi associada a *P. gingivalis* ($p = 0,04$), *F. nucleatum ssp vincentii* ($p = 0,045$), *T. socranskii* ($p = 0,043$), *V. parvula* ($p = 0,004$) e *P. intermedia* ($p = 0,44$).

A extensão da reabsorção óssea periapical (lesão maior que 5 mm) foi associada à presença de *C. ochracea* ($p = 0,042$).

O Quadro 4 mostra um resumo das associações de sinais e sintomas clínicos e radiográficos com complexos bacterianos e espécies de microrganismos.

Quadro 4 – Associação positiva entre sinais e sintomas clínicos e complexos bacterianos e espécies de microrganismos

Sinais e sintomas	Associação positiva	
	Complexos bacterianos	Espécies de microrganismos
Dor à palpação	Roxo Verde Laranja	<i>T. denticola</i> <i>E. corrodens</i>
Fístula	Vermelho	<i>P. gingivalis</i> <i>F. nucleatum ssp vincentii</i> <i>T. socranskii</i> <i>V. parvula</i> <i>P. intermedia</i>
Dor à percussão	_____	<i>P. gingivalis</i> <i>T. denticola</i>
Tamanho de lesão	_____	<i>C. ochracea</i>

5.2 Monitoramento do perfil microbiano após o preparo biomecânico e uso de medicação intracanal

Para todas as coletas foi realizada a semeadura das amostras em placas de petri contendo meio de cultura.

A quantidade de microrganismos em UFC/mL obtida nas 1^a, 2^a e 3^a coletas está expressa no Quadro 5, podendo-se verificar prevalência de microrganismos na coleta inicial, mostrando uma redução nas etapas subsequentes.

Após o preparo biomecânico (2^a coleta) não houve crescimento microbiano em 19 casos e após a medicação intracanal não houve crescimento microbiano em 14 casos. Dos casos em que ocorreu crescimento após medicação intracanal (16 casos), 13 foram casos em que na 2^a coleta não havia ocorrido crescimento microbiano. Dez casos apresentaram redução ou eliminação dos microrganismos somente após a medicação intracanal.

Quadro 5 - Quantidade de microrganismos em UFC/mL obtidos nas 1ª, 2ª e 3ª coletas nos diferentes grupos experimentais

Grupo	Microrganismos anaeróbios estritos e/ou facultativos		
	1ª C	2ª C	3ª C
HC + SS	1680000	0	40
HC + SS	160000	0	60
HC + SS	740000	0	1000
HC + SS	1160000	2200	480
HC + SS	8500	80	0
HC + SS	0	0	0
HC + SS	11800	1020	0
HC + SS	320	0	0
HC + SS	6580000	20	0
HC + SS	2880000	1220	40
HC + G	160000	0	0
HC + G	7680	20	0
HC + G	8640	0	20
HC + G	920000	0	940
HC + G	2720000	40	0
HC + G	700000	40	0
HC + G	8160000	0	80
HC + G	760000	0	1280
HC + G	2220000	0	0
HC + G	2160000	0	20
HC + CLX	1480	0	220
HC + CLX	2840000	500	0
HC + CLX	1160	0	2520
HC + CLX	840	300	380
HC + CLX	4400	0	0
HC + CLX	2180000	0	520
HC + CLX	1800	0	0
HC + CLX	5120000	0	120
HC + CLX	13040	5920	0
HC + CLX	120000	0	2000

Pôde-se observar que os tratamentos (preparo biomecânico e medicações intracanal) diminuíram número de UFC/mL quando comparado com a coleta inicial. Não tendo diferença entre os resultados finais (Tabela 1).

Tabela 1 – Média do número de UFC/mL em cada grupo inicialmente e após o tratamento (Letras maiúsculas indicam diferenças nas colunas, letras minúsculas indicam diferenças nas linhas)

Grupos	Inicial	Após PBM	Após medicação
HC	4.5×10^5 (0- 6.6×10^6) ^{Aa}	10 (0-220) ^{Ab}	20 (0-100) ^{Ab}
HC + CLX	8.4×10^5 (7680- 8.2×10^6) ^{Aa}	7.5 (0-40) ^{Ab}	10 (0-1280) ^{Ab}
HC + GENG	8720 (840- 5.1×10^6) ^{Aa}	40 (0-5920) ^{Ab}	170 (0-2520) ^{Ab}

Todas as bactérias pesquisadas através do método de hibridização DNA-DNA *checkerboard* foram encontradas em pelo menos uma das amostras na primeira coleta. O número de espécies bacterianas detectadas na primeira coleta variou de 0 a 37, com uma média de 12 espécies. As espécies mais prevalentes foram *V. parvula* (63,33%), *S. anginosus* (63,33%), *E. faecium* (56,67%), *C. ochracia* (56,67%) e *P. micra* (56,67%) (Figura 11).

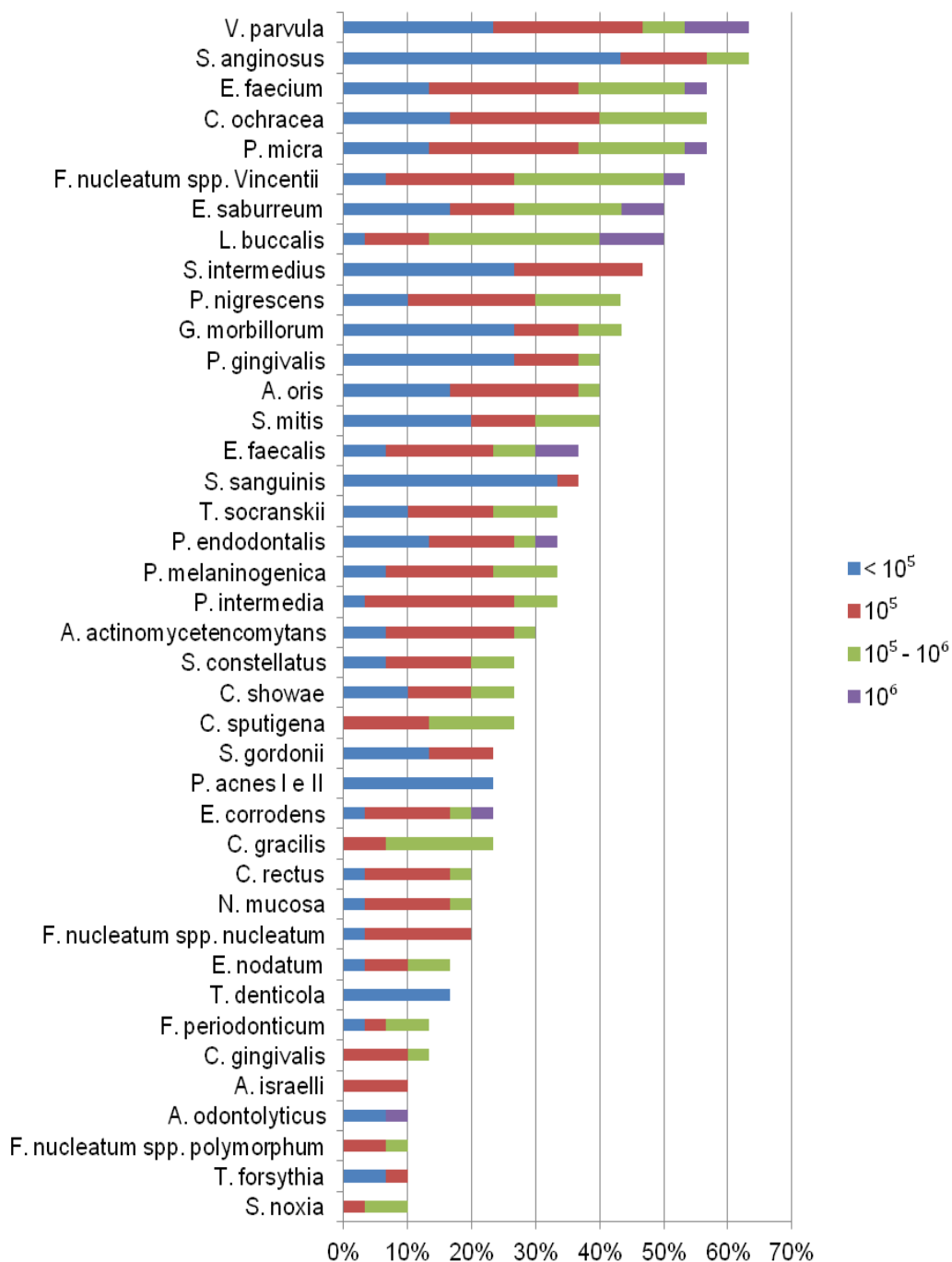


Figura 11 - Gráfico de barras de frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano em amostras de canais radiculares necrosados. O comprimento total de cada barra indica porcentagem de amostras positivas. Cores diferentes no interior de cada barra indicam porcentagem de amostras contendo diferentes concentrações de DNA bacteriano.

Nas amostras coletadas após o preparo biomecânico o número de espécies variou de 0 a 28, com uma média 7,6 espécies. Assim como na primeira coleta, as espécies mais prevalentes foram *E. faecium* (60%), *V. parvula* (53,33%), *S. anginosus* (50%), *C. ochracea* (50%) e *P. micra* (43,33%) (Figura 12).

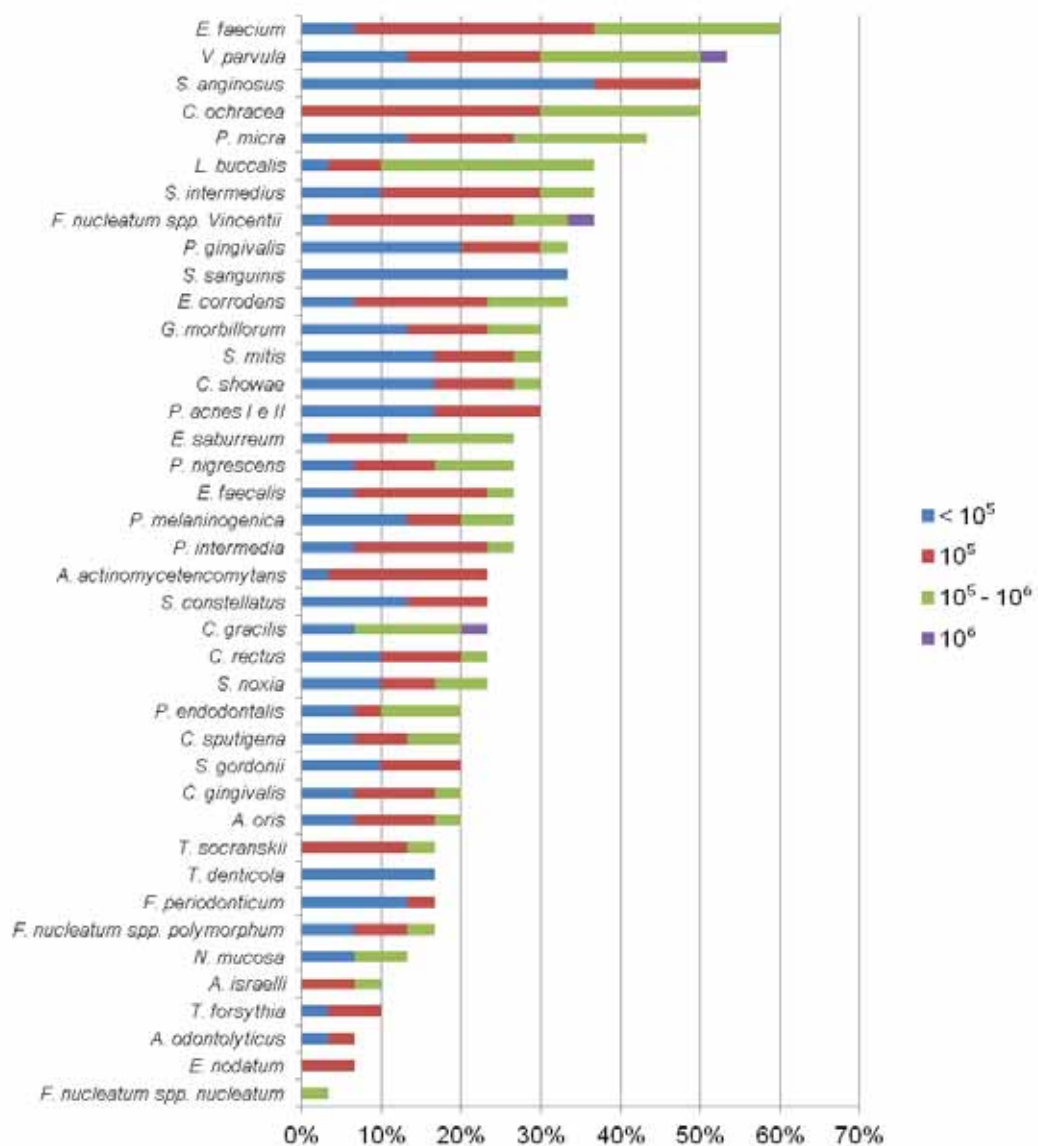


Figura 12 - Gráfico de barras de frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano em amostras de canais radiculares necrosados após o preparo biomecânico. O comprimento total de cada barra indica porcentagem de amostras positivas. Cores diferentes no interior de cada barra indicam porcentagem de amostras contendo diferentes concentrações de DNA bacteriano.

As Figuras 13, 14 e 15 mostram a frequência de detecção e concentração de DNA das espécies estudadas após a utilização das diferentes medicações intracanal.

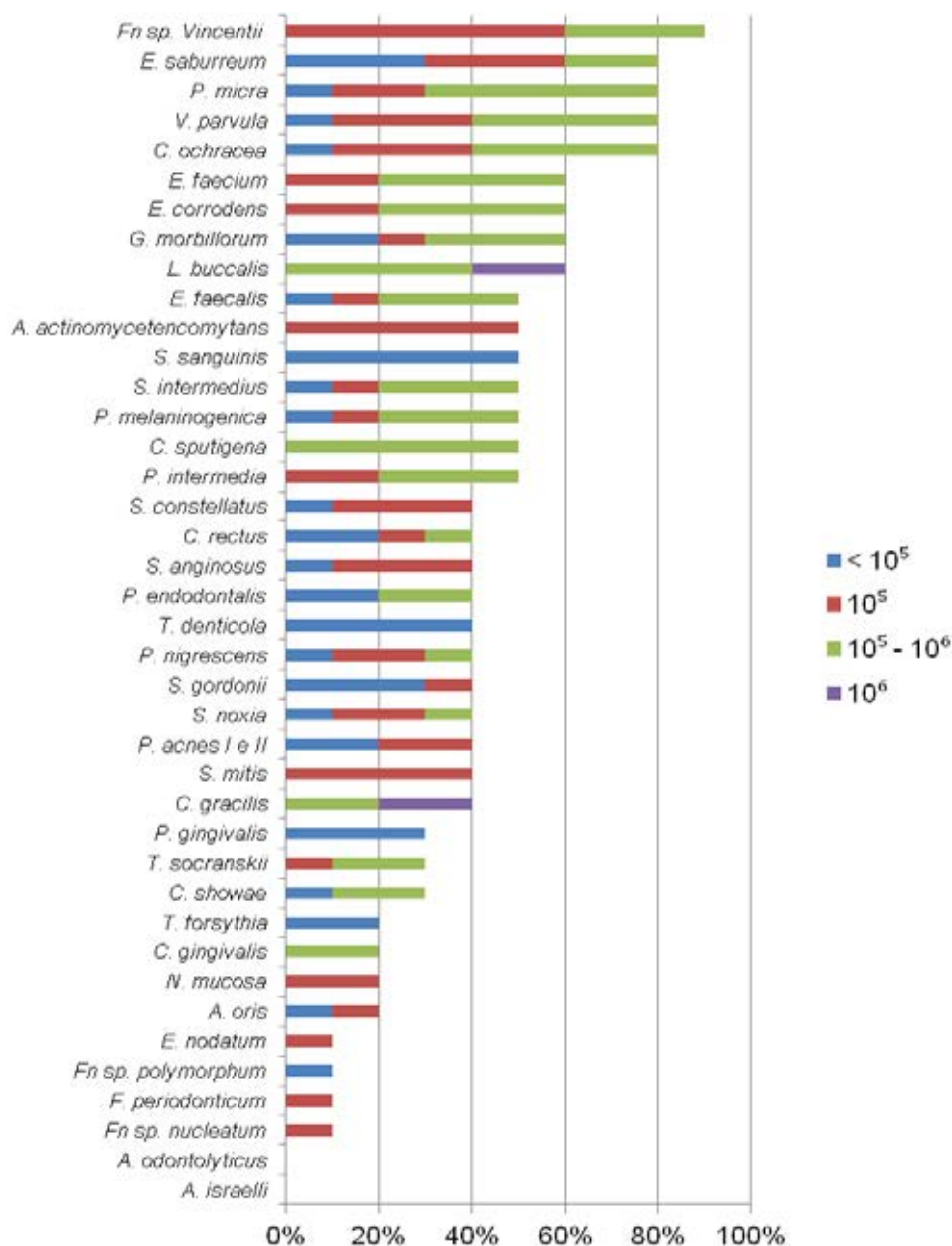


Figura 13 - Gráfico de barras de frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano em amostras de canais radiculares necrosados após medicação intracanal hidróxido de cálcio associado à solução salina. O comprimento total de cada barra indica porcentagem de amostras positivas. Cores diferentes no interior de cada barra indicam porcentagem de amostras contendo diferentes concentrações de DNA bacteriano.

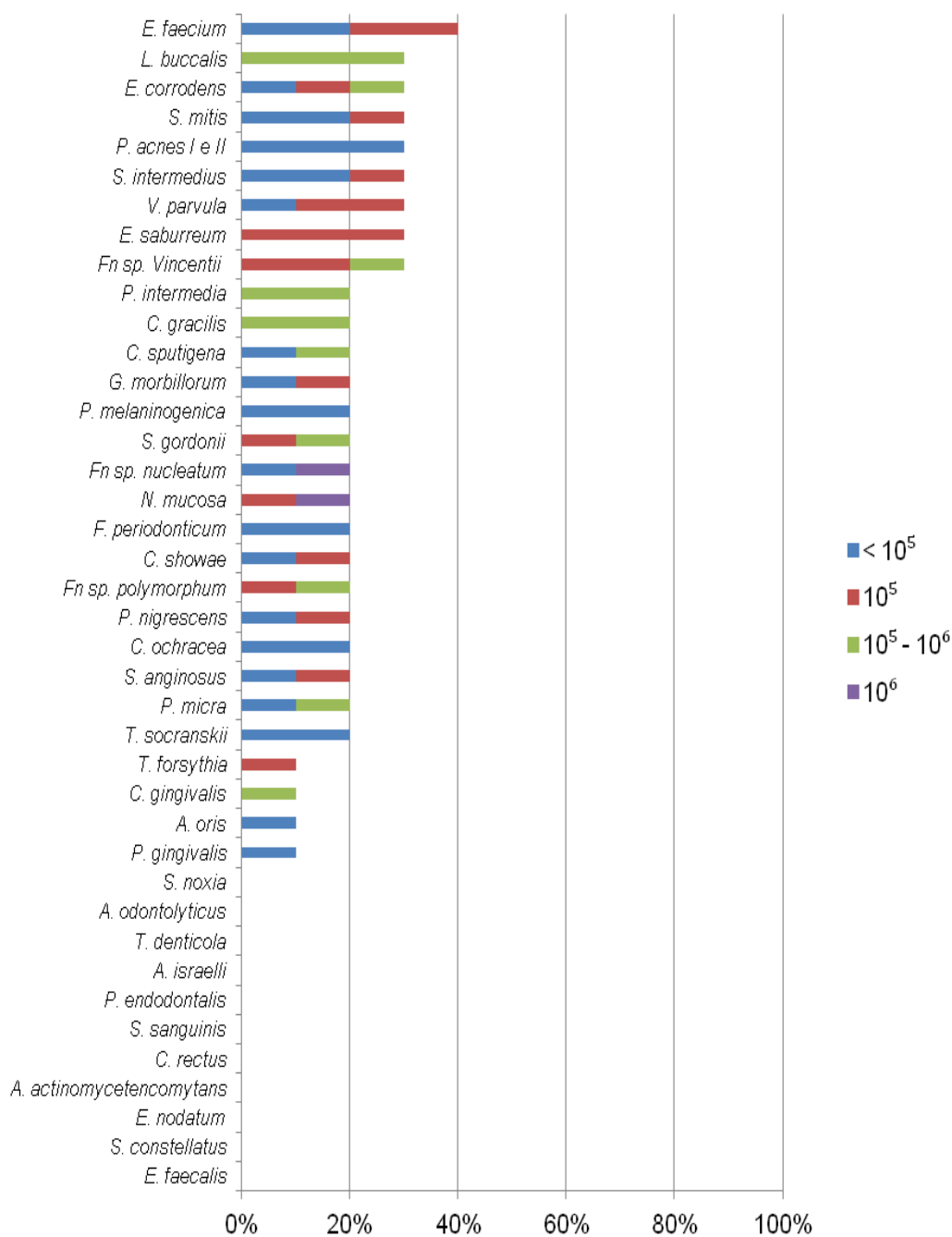


Figura 14 - Gráfico de barras de frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano em amostras de canais radiculares necrosados após medicação intracanal hidróxido de cálcio associado a clorexidina. O comprimento total de cada barra indica porcentagem de amostras positivas. Cores diferentes no interior de cada barra indicam porcentagem de amostras contendo diferentes concentrações de DNA bacteriano.

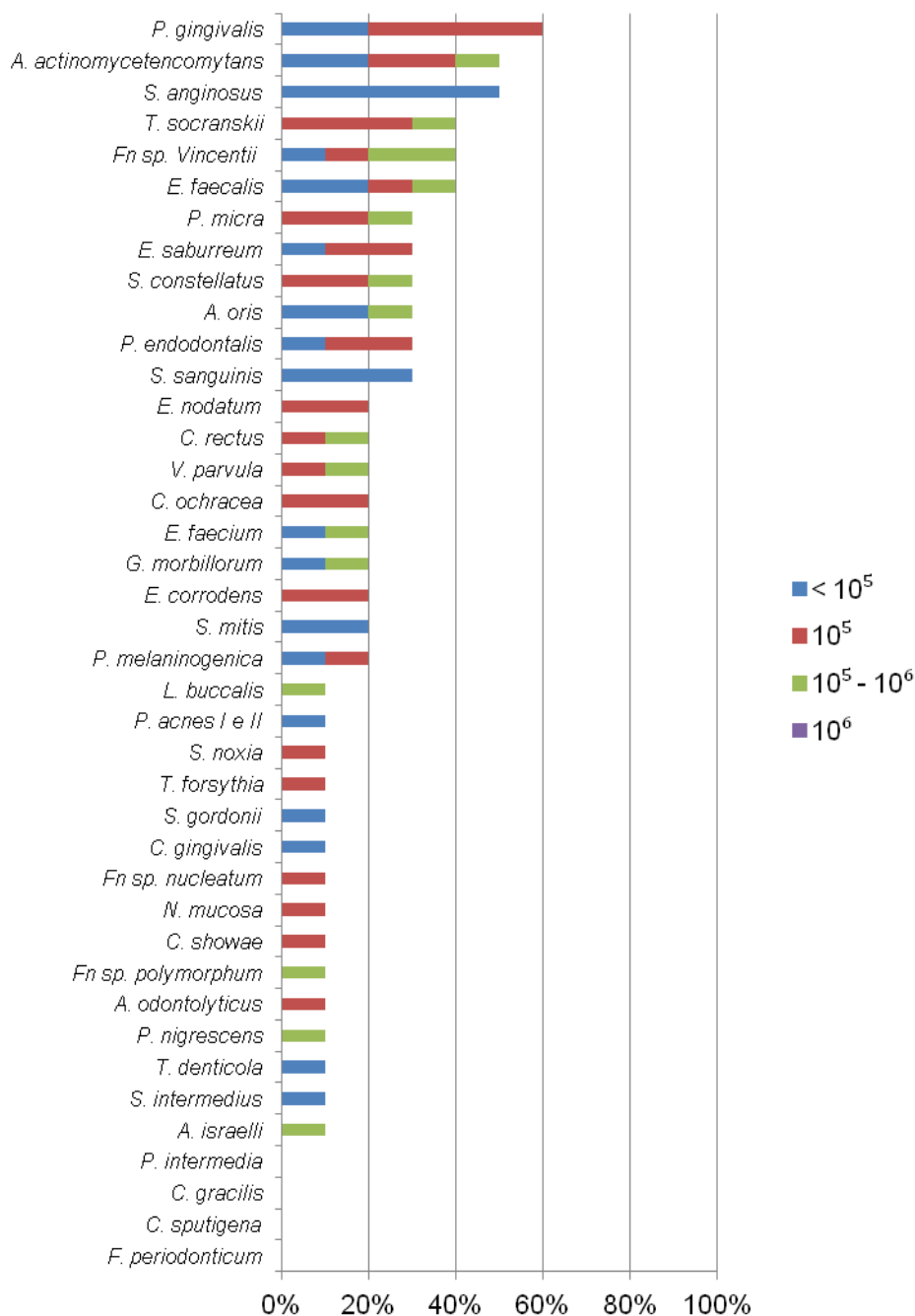


Figura 15 - Gráfico de barras de frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano em amostras de canais radiculares necrosados após medicação intracanal hidróxido de cálcio associado ao extrato glicólico de gengibre. O comprimento total de cada barra indica porcentagem de amostras positivas. Cores diferentes no interior de cada barra indicam porcentagem de amostras contendo diferentes concentrações de DNA bacteriano.

Nas amostras coletadas após o uso de medicação intracanal o número de espécies variou de 1 a 34 no Grupo HC, de 0 a 14 no Grupo HC + CLX e de 0 a 30 no Grupo HC + GENG.

No Grupo HC todos os casos apresentaram a presença de pelo menos uma bactéria pesquisada. Duas espécies não foram encontradas em nenhuma amostra.

No grupo HC + CLX, 2 casos não apresentaram presença de bactérias. Onze espécies não foram encontradas em nenhuma amostra. Mostrando que a medicação foi mais efetiva na diminuição do número de espécies bacterianas no canal radicular.

No grupo HC + GENG, 1 caso não apresentou presença de bactérias. Quatro espécies não foram encontradas em nenhuma amostra.

O Quadro 6 mostra a redução da frequência de detecção dos microrganismos pesquisados durante o tratamento endodôntico utilizando diferentes medicações intracanal.

Quadro 6 – Frequência em número de casos de detecção dos microrganismos pesquisados durante o tratamento endodôntico

Microrganismo	Início	Após PBM	Após MIC		
			HC + SS	HC + CLX	HC + GENG
<i>V. parvula</i>	19	16	8	3	2
<i>S. anginosus</i>	19	15	4	2	5
<i>E. faecium</i>	17	18	6	4	2
<i>C. ochracea</i>	17	15	8	2	2
<i>P. micra</i>	17	13	8	2	3
<i>F. nucleatum spp. Vincentii</i>	16	11	9	3	4
<i>E. saburreum</i>	15	8	8	3	3
<i>L. buccalis</i>	15	11	6	3	1
<i>S. intermedius</i>	14	11	6	3	1
<i>P. nigrescens</i>	13	8	4	2	1
<i>G. morbillorum</i>	13	9	6	2	2
<i>P. gingivalis</i>	12	10	3	1	6
<i>A. oris</i>	12	6	2	1	3
<i>S. mitis</i>	12	9	4	3	2
<i>E. faecalis</i>	11	8	5	0	4
<i>S. sanguinis</i>	11	10	5	0	3
<i>T. socranskii</i>	10	5	3	2	4
<i>P. endodontalis</i>	10	6	4	0	3
<i>P. melaninogenica</i>	10	8	5	2	2
<i>P. intermédia</i>	10	8	5	2	0
<i>A. actinomycetencomytans</i>	9	7	5	0	5
<i>S. constellatus</i>	8	7	4	0	3
<i>C. showae</i>	8	9	3	2	1
<i>C. sputigena</i>	8	6	5	2	0
<i>S. gordonii</i>	7	6	4	2	1
<i>P. acnes</i>	7	9	4	3	1
<i>E. corrodens</i>	7	10	6	3	2
<i>C. gracilis</i>	7	7	4	2	0
<i>C. rectus</i>	6	7	4	0	2
<i>N. mucosa</i>	6	4	2	2	1
<i>F. nucleatum spp. Nucleatum</i>	6	1	1	2	1
<i>E. nodatum</i>	5	2	1	0	2
<i>T. denticola</i>	5	5	4	0	1
<i>F. periodonticum</i>	4	5	1	2	0
<i>C. gingivalis</i>	4	6	2	1	1
<i>A. israelii</i>	3	3	0	0	1
<i>A. odontolyticus</i>	3	2	0	0	1
<i>F. nucleatum spp. Polymorphum</i>	3	5	1	2	1
<i>T. forsythia</i>	3	3	2	1	1
<i>S. noxia</i>	3	7	4	0	1

A figura 16 mostra a diferença entre o valor médio da carga bacteriana balanceado pelo número de pacientes para todas as espécies pesquisadas após o uso de diferentes medicações intracanal.

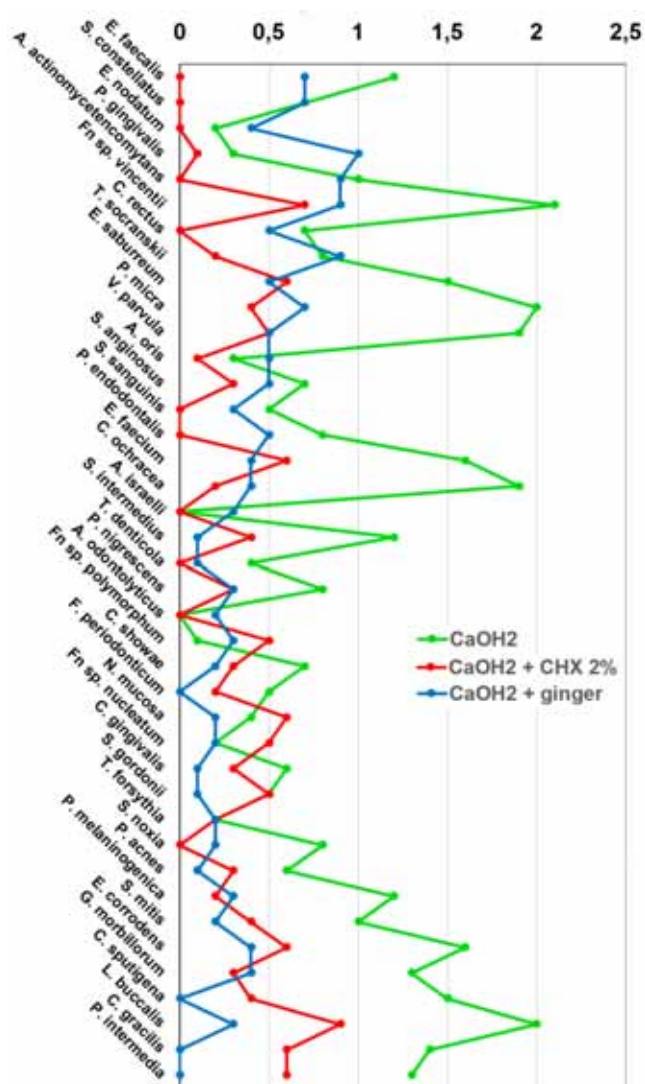


Figura 16 – Gráfico de linhas mostrando a diferença entre o valor médio da carga bacteriana balanceado pelo número de pacientes para todas as espécies pesquisadas após o uso de diferentes medicações intracanal.

A maior parte dos tratamentos diminuiu o número de espécies bacterianas comparado à coleta inicial. Entretanto, esta redução foi significativamente menor no grupo hidróxido de cálcio sozinho (Tabela

2). Esta diferença também foi observada quando avaliada a carga bacteriana total (Tabela 3).

Tabela 2 – Média do número de espécies bacterianas encontradas em cada grupo inicialmente e após o tratamento (Letras maiúsculas indicam diferenças nas colunas, letras minúsculas indicam diferenças nas linhas)

Grupos	Inicial	Após PBM	Após medicação
HC	16 (5-36) ^{Aa}	8,5 (12-28) ^{Aa}	15,5 (1-34) ^{Ab}
HC + CLX	7,5 (0-16) ^{Aa}	8 (1-21) ^{Aa}	4,5 (0-14) ^{Bb}
HC + GENG	12,5 (13-37) ^{Aa}	6,5 (0-28) ^{Ab}	5 (0-30) ^{Bb}

Tabela 3 – Carga bacteriana total encontrada em cada grupo inicialmente e após o tratamento (Letras maiúsculas indicam diferenças nas colunas, letras minúsculas indicam diferenças nas linhas)

Grupos	Inicial	Após PBM	Após medicação
HC	26,5 (7-72) ^{Aa}	18 (4-64) ^{Aa}	16,5 (2-41) ^{Ab}
HC + CLX	16 (3-42) ^{Aa}	11,5 (2-49) ^{Aa}	11 (0-26) ^{Bb}
HC + GENG	25 (6-99) ^{Aa}	10 (0-56) ^{Ab}	8,5 (0-58) ^{Bb}

5.3 Susceptibilidade de diferentes complexos microbianos a diferentes medicações intracanal

Quando observada a ação do tratamento endodôntico nos diferentes complexos bacterianos foi possível observar que o uso de hidróxido de cálcio sozinho ou associado à clorexidina foi capaz de diminuir a carga de DNA bacteriano do complexo vermelho quando comparados com a coleta inicial. No entanto, o uso de hidróxido de cálcio com clorexidina apresentou melhor resultado (Tabela 4).

Tabela 4 – Carga de DNA bacteriano do complexo vermelho encontrada em cada grupo inicialmente e após o tratamento (Letras maiúsculas indicam diferenças nas colunas, letras minúsculas indicam diferenças nas linhas)

Grupos	Inicial	Após PBM	Após medicação
HC	1 (0-3) ^{Aa}	3 (1-5) ^{Aa}	0,5 (0-3) ^{Ab}
HC + CLX	1 (0-3) ^{Aa}	0,5 (0-3) ^{Ba}	0 (0-2) ^{Bb}
HC + GENG	1(0-3) ^{Aa}	0,5 (0-4) ^{Ba}	1,5 (0-4) ^{Aa}

O uso de hidróxido de cálcio associado à clorexidina diminuiu a carga de DNA bacteriano do complexo roxo quando comparados com a coleta inicial. Entretanto, o uso de hidróxido de cálcio sozinho permitiu uma maior carga bacteriana do complexo roxo ao fim do tratamento (Tabela 5).

Tabela 5 - Carga de DNA bacteriano do complexo roxo encontrada em cada grupo inicialmente e após o tratamento (Letras maiúsculas indicam diferenças nas colunas, letras minúsculas indicam diferenças nas linhas)

Grupos	Inicial	Após PBM	Após medicação
HC	1,5 (0-4) ^{Aa}	2 (1-3) ^{Aa}	2 (0-3) ^{Ab}
HC + CLX	1(0-4) ^{Aa}	0,5 (0-4) ^{Aa}	0 (0-2) ^{Bb}
HC + GENG	0,5 (0-8) ^{Aa}	0,5 (0-5) ^{Aa}	0 (0-5) ^{Ba}

Todos os tratamentos diminuiram carga bacteriana dos complexos verde e laranja, entretanto, a menor diminuição foi com o uso de hidróxido de cálcio sozinho (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 - Carga de DNA bacteriano do complexo verde encontrada em cada grupo inicialmente e após o tratamento (Letras maiúsculas indicam diferenças nas colunas, letras minúsculas indicam diferenças nas linhas)

Grupos	Inicial	Após PBM	Após medicação
HC	4,0 (0-12) ^{Aa}	2 (1-3) ^{Aa}	2 (0-3) ^{Ab}
HC + CLX	0,5 (0-8) ^{Aa}	0,5 (0-4) ^{Ba}	0 (0-2) ^{Bb}
HC + GENG	2,5 (0-14) ^{Aa}	0,5 (0-5) ^{Bb}	0 (0-5) ^{Bb}

Tabela 7 - Carga de DNA bacteriano do complexo laranja encontrada em cada grupo inicialmente e após o tratamento (Letras maiúsculas indicam diferenças nas colunas, letras minúsculas indicam diferenças nas linhas)

Grupos	Inicial	Após PBM	Após medicação
HC	8,5 (1-23) ^{Aa}	3,5 (0-17) ^{Aa}	5 (0-14) ^{Ab}
HC + CLX	5,5 (0-18) ^{Aa}	3,5 (0-9) ^{Ba}	2,5 (0-9) ^{Bb}
HC + GENG	8,5 (0-29) ^{Aa}	3 (0-17) ^{Ba}	2,0 (0-13) ^{Bb}

O uso de hidróxido de cálcio sozinho não foi capaz de diminuir a carga bacteriana do complexo amarelo, e foi o pior resultado para este complexo (Tabela 8), uma vez que as demais medicações intracanal reduziram a carga bacteriana deste complexo.

Tabela 8 - Carga de DNA bacteriano do complexo amarelo encontrada em cada grupo inicialmente e após o tratamento (Letras maiúsculas indicam diferenças nas colunas, letras minúsculas indicam diferenças nas linhas)

Grupos	Inicial	Após PBM	Após medicação
HC	2,5 (0-7) ^{Aa}	1,5 (0-7) ^{Aa}	2,5 (0-8) ^{Aa}
HC + CLX	1 (0-5) ^{Aa}	1 (0-6) ^{Aa}	0 (0-5) ^{Bb}
HC + GENG	1 (0-9) ^{Aa}	0,5 (0-5) ^{Aa}	0 (0-4) ^{Bb}

6 DISCUSSÃO

6.1 Da metodologia

A desinfecção do campo operatório e a utilização de solução salina fisiológica estéril durante a abertura coronária foram realizadas a fim de evitar contaminação externa ao canal radicular. Este método apresenta bons resultados para controle da assepsia e está bem estabelecido na literatura (Gomes et al., 2004; Rôças et al., 2011a).

O meio de transporte utilizado, VMGA III (Viability Medium Göteborg Ágar), permite a sobrevivência de organismos anaeróbios estritos e aeróbios, sem que ocorra o seu crescimento. A composição do meio e sua consistência em gel permite a manutenção de um potencial de redução baixo, assim, o azul de metileno presente em sua composição consome o oxigênio presente (Dahlén et al., 1993). Porém, as amostras devem ser processadas o mais rápido possível, pois após 24 horas pode haver a multiplicação de microrganismos entéricos, o que pode alterar as proporções originais da amostra (Ali RW et al., 1995). No presente estudo, as amostras foram semeadas em placas contendo meios de cultura imediatamente após as coletas e armazenadas a -20 °C.

A semeadura das amostras em placas de petri contendo meio de cultura FAA foi realizada com a finalidade de detectar microrganismos anaeróbios estritos e/ou facultativos viáveis presentes nos canais radiculares logo após a abertura coronária, após o preparo biomecânico e após a utilização de medicação intracanal.

No entanto, mesmo utilizando o meio de transporte VMGA III, alguns microrganismos podem não sobreviver. Além disso, os métodos

de cultura podem não detectar microrganismos de difícil crescimento, sendo necessária a utilização de metodologias envolvendo biologia molecular.

A metodologia de hibridização DNA-DNA utiliza sondas de DNA (segmentos de DNA de cadeia simples) marcadas com uma enzima, isótopos radioativos ou um componente quimiluminescente, que podem localizar e ligar-se às suas sequências de ácido nucléico complementares. Sondas de oligonucleotídeos baseadas em genes específicos podem apresentar limitada reatividade cruzada, podendo diferenciar espécies intimamente relacionadas ou mesmo subespécies (Siqueira, Rôças, 2005). Além disso, o método permite a detecção de até 40 microrganismos em 28 amostras por membrana, sendo bastante útil para avaliar a composição da microbiota das amostras, bem como avaliar mudanças de composição desta microbiota após diversos tratamentos (do Nascimento et al., 2014).

A tecnologia de hibridização ainda apresenta a vantagem sobre outros métodos moleculares por não amplificar a amostra (Gatti et al., 2000), desta maneira pode-se supor que, se presentes, contaminantes microbianos estariam em número abaixo dos limites de detecção do método (10^3 a 10^4 células) (Siqueira, Rôças, 2005). No entanto, microrganismos presentes em pequeno número na amostra também não são detectados.

A preservação do material genético das amostras é uma condição primordial para a realização de análises moleculares. Degradação do DNA e contaminações podem ocorrer durante o período de armazenamento, o que pode ter impacto relevante na identificação de microrganismos. do Nascimento et al. (2014) mostraram que a temperatura e o tempo de armazenamento das amostras têm impacto na detecção de microrganismos e fungos na realização da metodologia de hibridização DNA-DNA *checkerboard*. Para evitar resultados falso negativos, os autores sugerem que as amostras devem ser processadas

imediatamente após a coleta ou até 6 meses após, desde que conservadas em baixas temperaturas. No presente estudo, diante da impossibilidade de realizar a análise das amostras imediatamente após a coleta, as amostras foram armazenadas por no máximo 6 meses a -20 °C.

Ainda, como qualquer outro método, os métodos moleculares têm suas limitações. A habilidade de detectar DNA de células bacterianas que foram mortas recentemente parece ser a sua maior limitação, prejudicando a avaliação imediata de tratamentos antibacterianos. Entretanto, o Hipoclorito de Sódio e os íons hidroxila liberados pelo hidróxido de cálcio além de causarem a morte celular podem causar danos ao DNA de bactérias mortas, fazendo com que seu DNA não seja detectado (Sakamoto et al., 2007).

6.2 Dos resultados

Foi realizado neste estudo um delineamento do perfil microbiano envolvido nas infecções endodônticas primárias e sua correlação com sinais e sintomas clínicos. É bem estabelecido na literatura que as doenças perirradiculares são causadas por microrganismos, entretanto é necessário definir o papel específico desempenhado por patógenos endodônticos na etiologia de cada tipo de doença perirradicular e determinar as melhores medidas terapêuticas para a erradicação destes patógenos (Siqueira, 2002a).

Estudos que avaliam a diversidade microbiana intracanal apontam para a necessidade de relacionar os sinais e sintomas clínicos a um grupo de microrganismos, uma vez que a interação entre estes microrganismos pode resultar em sintomas clínicos diferentes dos obtidos por espécies bacterianas sozinhas (Gomes et al., 2004). As infecções endodônticas primárias são caracterizadas por comunidades

multiespécies (Jacinto et al., 2003; Gomes et al., 2004) e os sinais e sintomas clínicos podem ser resultante desta interação (Sundqvist et al., 1979; Hashioka et al., 1992; Gomes et al., 2006a).

Verificou-se que dor à palpação e fístula estavam associadas aos complexos bacterianos. Fístula foi associada ao complexo vermelho, enquanto dor a palpação foi relacionada aos complexos roxo, verde e laranja.

O complexo vermelho é descrito como patogênico aos tecidos periodontais e as bactérias pertencentes a esse complexo, sozinhas ou associadas, podem provocar respostas no hospedeiro que levam a destruição tecidual (Holt, Ebersole, 2005). Socransky et al. (1998) observaram associação do complexo vermelho a maiores profundidades de sondagem e sangramento a sondagem em casos de periodontite. Gomes et al. (2007) estudando o complexo vermelho em infecções endodônticas primárias e abscessos verificaram sua associação a casos sintomáticos, mobilidade, lesões periapicais, dor e presença de pus.

A associação dos complexos com sintomatologia pode ser explicada pela associação sinérgica entre algumas bactérias. Por exemplo, a associação de *T. denticola* e *P. gingivalis*, membros do complexo vermelho, permite um melhor crescimento das duas espécies (Grenier, 1992). Certas proteínas extracelulares produzidas por *P. gingivalis* podem atuar como fatores de crescimento para *T. denticola* (Nilius et al., 1993).

O complexo laranja também foi associado a maiores profundidades de sondagem por Socransky et al. (1998). Didilescu et al. (2012) associaram bactérias pertencentes ao complexo laranja a sintomatologia em casos de lesão endo-periodontal. Neste complexo, bactérias que apresentam pouca atividade proteolítica, por exemplo *F. nucleatum*, podem se associar a bactérias como *P. micra* para favorecer sua sobrevivência e garantir a invasão nos tecidos do hospedeiro (Didilescu et al., 2012). Assim, interações bacterianas podem aumentar a

capacidade de sobrevivência das bactérias e permitir que diferentes espécies coexistam em ambientes onde não poderiam sobreviver sozinhas, aumentando a patogenicidade por efeitos sinérgicos (Rôças, Siqueira, 2008).

Além da associação de bactérias que formam o complexo, pode haver uma relação entre os complexos. Um padrão de colonização pode ser observado no desenvolvimento da placa subgingival. As espécies de *Streptococcus* (complexo amarelo) são colonizadores iniciais, seguido por espécies de *Capnocytophaga* e *E. corrodens* (complexo verde). *A. odontolyticus* e *V. parvula* (complexo roxo) formam uma ponte que levam a colonização pelo complexo laranja e finalmente ao complexo vermelho (Socransky et al., 1998). Assim, o complexo vermelho é associado a casos de periodontites avançadas (Holt, Ebersole, 2005). Não se observam trabalhos que avaliam essa associação na Endodontia. Entretanto, o mesmo padrão de colonização pode ocorrer em casos de infecções endodônticas. No presente estudo, o complexo vermelho foi associado à presença de fístula, que por manter comunicação com o meio bucal, pode apresentar padrão similar às periodontites avançadas.

As razões para esta inter-relação entre os complexos não são claras, mas pode-se especular que exista um relacionamento antagonista ou que o ambiente seletivo para um grupo pode ser menos hospitaleiro para um segundo grupo de microrganismos.

Quando observada a relação das espécies isoladas com características clínicas e radiográficas verificou-se associação de presença de fístula com *F. nucleatum*, *T. socranskii*, *V. parvula*, *P. intermedia* e *P. gingivalis*, bactérias anaeróbias estritas e Gram-negativas. Outros autores também associaram presença de *P. gingivalis* e *F. nucleatum* à ocorrência de fístula (Sassone et al., 2008a; Cao et al., 2012). Também foi observada a relação entre a presença de *P. gingivalis* e *T. denticola* e dor a percussão. Estas espécies bacterianas também foram associadas à sensibilidade à percussão por Gomes et al. (2007).

P. gingivalis apresenta uma ampla gama de fatores de virulência que participam de diversos estágios da doença promovendo a coagregação de bactérias e adesão aos tecidos do hospedeiro formando biofilme, a manutenção das necessidades fisiológicas de crescimento e sobrevivência da microbiota, a invasão dos tecidos do hospedeiro propagando a infecção e a evasão de defesas do hospedeiro, causando dano tecidual (Siqueira et al., 2008).

T. denticola é uma espiroqueta, proteolítica e móvel por flagelos internos. O peptidoglicano presente na sua parede celular ativa vias de sinalização intracelular, que conduz a um aumento da produção de mediadores inflamatórios (Tanabe et al., 2009). Assim, apresenta uma grande patogenicidade e sua associação com a patogênese das lesões periapicais e associação com sintomatologia clínica foi reportada por outros autores (Foschi et al., 2005; Foschi et al., 2006; Gomes et al., 2007; Ozbek et al., 2009).

Dor a palpação foi associada à presença de *T. denticola* e *E. corrodens*, microrganismo Gram-negativo, anaeróbio facultativo. Maiores áreas de reabsorção estiveram associadas a maiores cargas de *C. ochracea*, uma bactéria anaeróbia estrita, Gram-negativa e produtora de pigmento amarelo-laranja.

De maneira geral, os sinais e sintomas clínicos e radiográficos estiveram associados a bactérias Gram-negativas ou associação de bactérias. As bactérias Gram-negativas, além de possuírem diversos fatores de virulência, apresentam em sua parede celular a endotoxina ou LPS. Quando liberada durante a morte ou multiplicação celular a endotoxina desencadeia uma reação inflamatória e reabsorção óssea (Leonardo et al., 2004). Assim, grande quantidade de endotoxina está associada à sintomatologia clínica e maiores áreas de reabsorção óssea (Leonardo et al., 2004; Jacinto et al., 2005; Martinho, Gomes, 2008).

Durante a análise microbiológica por cultura das coletas iniciais, apenas um caso não apresentou microrganismos cultiváveis, este caso corresponde a um paciente que não apresentava dor ou cárie. Entretanto este caso apresentou DNA bacteriano durante a realização do método de hibridização. Assim, provavelmente as bactérias presentes neste caso eram anaeróbias estritas e durante o processamento da amostra pode ter ocorrido sua morte. Resultados semelhantes onde não houve crescimento de colônias em meios de cultura, mas foi encontrado DNA bacteriano através de métodos moleculares, foram obtidos por outros autores (Jacinto et al., 2003; Gomes et al., 2005). Isto ocorre pois microrganismos anaeróbios são sensíveis a presença de oxigênio e são fastidiosos requerendo condições especiais para seu cultivo (Siqueira et al., 2000).

Ainda, dois casos das coletas iniciais não apresentaram o DNA de nenhuma das espécies investigadas pelo método de hibridização, mas houve crescimento de colônias nos meios de cultura. Esse resultado nos indica que os microrganismos presentes nestes casos não estavam entre os pesquisados. Entretanto, na segunda coleta dos mesmos casos houve a presença de DNA bacteriano. Assim, uma possibilidade para explicar esse fato é que as bactérias pesquisadas estavam em áreas de difícil acesso, como o interior dos túbulos dentinários e após o preparo biomecânico migraram para a luz do canal, permitindo sua coleta. Outra possibilidade para explicar esse fato é que pode ter ocorrido dano ao DNA, mesmo estando armazenado em meio adequado. Além disto, deve haver certo número de microrganismos para que ocorra a identificação com as sondas de DNA. O método de hibridização DNA-DNA *checkerboard* tem um limite de detecção de 10^3 a 10^4 células (Socransky et al, 1998). Assim, microrganismos que estavam presente em limites inferiores a 10^4 , que foi o nível de sondas de DNA utilizadas neste estudo, não foram detectados.

Pelo método de hibridização foi observada uma média de 12 espécies por canal na coleta inicial, suportando a característica polimicrobiana das infecções endodônticas primárias, reportada por outros autores (Jacinto et al., 2003; Gomes et al., 2004).

Dentre as bactérias pesquisadas as mais prevalentes na primeira coleta foram *V. parvula*, *S. anginosus*, *E. faecium*, *C. ochracea* e *P. micra*. A prevalência destes microrganismos foi descrita por outros autores em casos de infecções endodônticas primárias (Siqueira et al., 2002b; Sassone et al., 2007; Sassone et al., 2008a; Rôças et al., 2011a; Sassone et al., 2012).

Embora bactérias Gram-negativas sejam descritas com mais frequência como causadoras dos sinais e sintomas clínicos de infecções endodônticas, bactérias Gram-positivas do gênero *Enterococcus* e *Streptococcus* são associadas a infecções persistentes. Desta maneira a investigação de sua prevalência em infecções primárias é de suma importância (Siqueira et al., 2002b). Estudo utilizando clonagem e sequenciamento observou bactérias do gênero *Enterococcus* e *Streptococcus* em casos de canais radiculares necrosados com lesão periapical (Rolph et al., 2001). No presente estudo também verificou-se alta prevalência de *Enterococcus*.

O presente estudo avaliou o efeito do preparo biomecânico utilizando Hipoclorito de Sódio 2,5% como substância química auxiliar, suplementado por uso de medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio em diferentes veículos. Este efeito foi avaliado através de cultura e método molecular.

Ao levar em conta o número de UFC/mL verificou-se que houve redução na quantidade de microrganismos após o preparo biomecânico. Ao comparar a redução após o uso de diferentes medicações intracanal não houve diferença estatisticamente significativa, ou seja, o preparo biomecânico bem como a medicação intracanal com diferentes substâncias foram capazes de reduzir os microrganismos.

Desta maneira, quando observado redução de UFC/mL não houve diferença entre preparo biomecânico sozinho ou associado à medicação intracanal. Resultado semelhante foi observado por Xavier et al. (2013) onde não houve diferença entre redução de microrganismos cultiváveis após preparo biomecânico sozinho ou associado a medicação intracanal.

Em alguns casos foi observado aumento de bactérias cultiváveis entre o preparo biomecânico e medicação intracanal o que sugere migração de bactérias que estavam em áreas inacessíveis para a luz do canal imediatamente após o preparo. Resultados semelhantes foram encontrados por Teles et al. (2014).

Quando observados os resultados do método de hibridização, pôde-se observar que após o preparo biomecânico utilizando o Hipoclorito de Sódio 2,5% como substância química auxiliar houve diminuição da média de espécies bacterianas por canal de 12 para 7,6 espécies. As espécies mais prevalentes foram as mesmas encontradas na primeira coleta (*E. faecium*, *V. parvula*, *S. anginosus*, *C. ochracia* e *P. micra*).

Ao utilizar medicação intracanal encontrou-se uma média de 8,3 espécies por canal, sendo que o uso das associações de hidróxido de cálcio à clorexidina e ao extrato glicólico de gengibre foi mais efetivo, levando a uma redução do número de espécies bacterianas para 4,5 e 5, respectivamente. Ainda, após o uso de medicação intracanal, dependendo da substância utilizada houve a predominância de microrganismos diferentes, sugerindo que medicações diferentes promovem a seleção de uma microbiota diferente.

Desta maneira, fica evidenciada a capacidade das referidas medicações intracanal de provocar mudanças no perfil microbiano. Quando considerada a carga bacteriana total e os complexos microbianos as associações também foram consideradas mais eficazes, especialmente a associação de hidróxido de cálcio à clorexidina.

Os resultados do presente estudo concordam com Sathorn et al. (2007) que ao realizar uma revisão sistemática da literatura concluiu que o hidróxido de cálcio apresentou-se limitado em eliminar a microbiota resistente ao preparo biomecânico.

A adição de outras substâncias, como a clorexidina, tem sido frequentemente sugerida para melhorar a desinfecção dos canais radiculares. Entretanto, ainda é um assunto controverso, pois a clorexidina se mantém estável em pH de 5 a 7, então em valores altos de pH poderá haver uma grande proporção de moléculas de clorexidina não-ionizadas (Zerella et al., 2005).

Alguns autores relatam eficácia superior da associação de hidróxido de cálcio a clorexidina comparado ao hidróxido de cálcio sozinho (Evans et al., 2003; Gomes et al., 2006c; Gomes et al., 2009). Paiva et al. (2013) encontrou boa ação antibacteriana *in vivo* do hidróxido de cálcio com clorexidina concordando com os resultados do presente estudo. Assim, mesmo que ocorra a perda de ação antimicrobiana da clorexidina em alto pH, seu uso na clínica ainda deve ser considerado, uma vez que o gluconato de clorexidina é um agente antimicrobiano de amplo espectro e ao ser mantido no canal por tempo prolongado pode favorecer sua ação residual na dentina (White et al., 1997).

Apesar de comprovada ação antimicrobiana, o real mecanismo de ação do extrato glicólico de gengibre não é completamente elucidado na Literatura. De acordo com Park et al. (2008) o principal princípio ativo do gengibre é o gingerol e os autores demonstraram que esses compostos foram capazes de inibir o crescimento de *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *P. intermedia*. Valera et al. (2014) observaram resultados satisfatórios quando o extrato glicólico de gengibre foi utilizado como medicação intracanal *in vitro*. Maekawa et al. (2013) também observaram ação antimicrobiana *in vitro* do extrato glicólico de gengibre utilizado como medicação intracanal, entretanto os autores sugeriram que o gengibre fosse associado a outras substâncias, como o hidróxido de

cálcio, para uma melhor eficácia. No presente estudo, realizou-se esta associação utilizando o extrato glicólico de gengibre como veículo para o hidróxido de cálcio obtendo-se resultados satisfatórios, entretanto estes resultados não foram superiores ao hidróxido de cálcio associado à clorexidina.

Quando o tratamento endodôntico não promove uma erradicação completa dos microrganismos do canal radicular pode ocorrer uma seleção de um segmento mais resistente da microbiota (Sakamoto et al., 2007). Assim, o uso da medicação intracanal bem como seu estudo não devem ser desconsiderados, uma vez que, microrganismos persistem no sistema de canais radiculares após o preparo biomecânico e, principalmente em dentes com reabsorção apical, pode haver comunicação dos túbulos dentinários com o periápice, mantendo a inflamação pericapical. Sendo assim, a medicação intracanal ainda é de fundamental importância nestas condições.

O protocolo de irrigação com Hipoclorito de sódio 2,5% e medicação intracanal com hidróxido de cálcio associado à clorexidina promoveu diminuição do número de espécies e da carga bacteriana da maior parte dos complexos microbianos. Assim, diminuindo a carga bacteriana a níveis que podem ser tolerados pelos tecidos periapicais, o que pode contribuir para o sucesso do tratamento endodôntico. Ainda, por exercer efeito sobre os complexos microbianos pode interferir na patogenicidade dos mesmos, resultando em sucesso do tratamento endodôntico.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- a) Houve associação de características clínicas e radiográficas tanto com bactérias isoladas quanto com complexos bacterianos;
- b) O preparo biomecânico com Hipoclorito de Sódio 2,5% reduz quantidade de microrganismos e carga de DNA microbiano, entretanto não altera o perfil da microbiota; a medicação intracanal, especialmente as associações, exerce efeito sobre o perfil microbiológico das infecções endodônticas;
- c) O uso de Hipoclorito de Sódio 2,5% e hidróxido de cálcio associado à clorexidina é mais efetivo sobre os complexos microbianos.

8 REFERÊNCIAS*

Aguiar APS, Caires LP, Maekawa LE, Valera MC, Koga-Ito CY. Avaliação in vitro da ação do extrato glicólico de gengibre sobre *Candida albicans*. Rev Odontol Univ Cid São Paulo. 2009 Mai-Ago;21(2):144-9.

Aimbire F, Penna SC, Rodrigues M, Rodrigues KC, Lopes-Martins RA, Sertié JA. Effect of hydroalcoholic extract of *Zingiber officinalis* rhizomes on LPS-induced rat airway hyperreactivity and lung inflammation. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2007 Oct-Nov;77(3-4):129-38.

Ali BH, Blunden G, Tanira MO, Nemmar A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research. Food Chem Toxicol. 2008 Feb;46(2):409-20.

Ali RW, Bancescu G, Nielsen O, Skaug N. Viability of four putative periodontal pathogens and enteric rods in the anaerobic transport medium VMGA III. Oral Microbiol Immunol. 1995 Dec;10(6):365-71.

Baliga MS, Haniadka R, Pereira MM, D'Souza JJ, Pallaty PL, Bhat HP, et al. Update on the chemopreventive effects of ginger and its phytochemicals. Crit Rev Food Sci Nutr. 2011 Jul;51(6):499-523.

Balto KA. Calcium hydroxide has limited effectiveness in eliminating bacteria from human root canal. Evid Based Dent. 2007;8(1):15-6.

Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections. J Endod. 2003 Dec;29(12):794-7.

Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol. 2008 Oct;23(5):384-90.

Buonavoglia A, Latronico F, Pirani C, Greco MF, Corrente M, Prati C. Symptomatic and asymptomatic apical periodontitis associated with red

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

complex bacteria: clinical and microbiological evaluation. *Odontology*. 2013 Jan;101(1):84-8.

Camargo CH, Bernardineli N, Valera MC, de Carvalho CA, de Oliveira LD, Menezes MM, et al. Vehicle influence on calcium hydroxide pastes diffusion in human and bovine teeth. *Dent Traumatol*. 2006 Dec;22(6):302-6.

Cao H, Qi Z, Jiang H, Zhao J, Liu Z, Tang Z. Detection of *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in primary endodontic infections in a Chinese population. *Int Endod J*. 2012 Aug;45(8):773-81.

Cardoso FGR. Detecção da ação antimicrobiana e antiendotóxica do extrato glicólico de gengibre utilizado como substância química auxiliar durante o retratamento endodôntico [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2011.

Chrubasik S, Pittler MH, Roufogalis BD. *Zingiberis rhizoma*: a comprehensive review on the ginger effects and efficacy profiles. *Phytomedicine*. 2005 Sep;12(9):684-701.

Chung A. Detecção de microrganismos, quantificação de endotoxinas e ação in vivo do *Zingiber officinale* em dentes com necrose pulpar e lesão periapical [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – univ Estadual Paulista; 2011.

Dahlén G, Pipattanagovit P, Rosling B, Moller AJ. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol*. 1993;8(6):375-82.

de Souza CA, Teles RP, Souto R, Chaves MA, Colombo AP. Endodontic therapy associated with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiologic evaluation by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. *J Endod*. 2005 Feb;31(2):79-83.

Didilescu AC, Rusu D, Anghel A, Nica L, Iliescu A, Greabu M, et al. Investigation of six selected bacterial species in endo-periodontal lesions. *Int Endod J*. 2012 Mar;45(3):282-93.

do Nascimento C, dos Santos JN, Pedrazzi V, Pita MS, Monesi N, Ribeiro RF, et al. Impact of temperature and time storage on the microbial detection of oral samples by Checkerboard DNA-DNA hybridization method. *Arch Oral Biol*. 2014 Jan;59(1):12-21.

Dougherty WJ, Bae KS, Watkins BJ, Baumgartner JC. Black-pigmented bacteria in coronal and apical segments of infected root canals. *J Endod.* 1998 May;24(5):356-8.

Dugasani S, Pichika MR, Nadarajah VD, Balijepalli MK, Tandra S, Korlakunta JN. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *J Ethnopharmacol.* 2010 Feb 3;127(2):515-20.

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

Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod.* 2003 May;29(5):338-9.

Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 1983 Jul;132(1):6-13.

Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as a endodontic irrigant. *J Endod.* 2001 Jul;27(7):452-5.

Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol.* 2005 Oct;20(5):289-95.

Foschi F, Izard J, Sasaki H, Sambri V, Prati C, Müller R, et al. *Treponema denticola* in disseminating endodontic infections. *J Dent Res.* 2006 Aug;85(8):761-5.

Gatti JJ, Dobeck JM, Smith C, White RR, Socransky SS, Skobe Z. Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA-DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol.* 2000 Oct;16(5):197-204.

Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Associations of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J.* 1994 Nov;27(6):291-8.

Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod.* 2006a Oct;32(10):937-40.

Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, et al. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol*. 2005 Aug;20(4):211-5.

Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, et al. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent*. 2009 Jan;37(1):76-81.

Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Polymerase chain reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. *J Endod*. 2007 Sep;33(9):1049-52.

Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Apr;19(2):71-6.

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

Gomes BP, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006c Oct;102(4):544-50.

Goodman AD. Isolation of anaerobic bacteria from the root canal systems of necrotic teeth by the use of a transport solution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1977 May;43(5):766-70.

Grégio AMT, Fortes ESM, Rosa EAR, Simeoni RB, Rosa RT. Ação antimicrobiana do *Zingiber officinale* frente à microbiota bucal. *Estud Biol*. 2006 Jan/Mar;28(62):61-6.

Grenier D. Nutritional interactions between two suspected periodontopathogens, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 1992 Dec;60(12):5298-301.

Grossman LI. Irrigation of root canals. *J Amer Dent Ass*. 1943;30:1915-7.

Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil J. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endod Top*. 2005 Aug;10:71-102.

Hashioka K, Yamasaki M, Nakane A, Horiba N, Nakamura H. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. *J Endod.* 1992 Nov;18(11):558-61.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y).* 1992 Apr;10(4):413-7.

Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2005 Apr;38:72-122.

Ito IY, Junior FM, Paula-Silva FW, Da Silva LA, Leonardo MR, Nelson-Filho P. Microbial culture and checkerboard DNA-DNA hybridization assessment of bacteria in root canals of primary teeth pre and post-endodontic therapy with a calcium hydroxide/chlorhexidine paste. *Int J Paediatr Dent.* 2011 Sep;21(5):353-60.

Jacinto RC, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2003 Oct;18(5):285-92.

Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol.* 2005 Aug;54(Pt 8):777-83.

Jung IY, Choi BK, Kum KY, Roh BD, Lee SJ, Lee CY, et al. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *J Endod.* 2000 Oct;26(10):599-604.

Kakehashi S; Stanley HR; Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965 Sep;20(3):340-9.

Kantz WE, Henry CA. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non-vital teeth in man. *Arch Oral Biol.* 1974 Jan;19(1):91-6.

Kim JK, Kim Y, Na KM, Surh YJ, Kim TY. [6]-Gingerol prevents UVB-induced ROS production and COX-2 expression in vitro and in vivo. *Free Radic Res.* 2007 May;41(5):603-14.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125.

Lantz RC, Chen GJ, Sarihan M, Solyom AM, Jolad SD, Timmermann BN. The effect of extracts from ginger rhizome on inflammatory mediator production. *Phytomedicine.* 2007 Feb;14(2-3):123-8.

Lee HS, Seo EY, Kang NE, Kim WK. [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *J Nutr Biochem.* 2008 May;19(5):313-9.

Leonardo MR, Silva RA, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *J Appl Oral Sci.* 2004 Jun;12(2):93-8.

Leonardo MR, Silveira FF, Silva LA, Tanomaru Filho M, Utrilla LS. Calcium hydroxide root canal dressing. Histopathological evaluation of periapical repair at different time periods. *Braz Dent J.* 2002;13(1):17-22.

Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CA, Camargo CH, Jorge AO. Effect of *Zingiber officinale* and propolis on microorganisms and endotoxins in root canals. *J Appl Oral Sci.* 2013 Jan-Feb;21(1):25-31.

Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Jorge AO. In vitro evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on *Escherichia coli* and its endotoxin in root canals. *J Appl Oral Sci.* 2011 Apr;19(2):106-12.

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

Menezes MM, Valera MC, Jorge AO, Koga-Ito CY, Camargo CH, Mancini MN. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J.* 2004 May;37(5):311-9.

Miller WD. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. *Dental Cosmos.* 1894 Jul;36(7):505-28.

Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J.* 2009 Apr;42(4):288-302.

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

Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr*. 1966 Dec;74(5):Suppl:1-380.

Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, Gomes BP. *Treponema* species detected in infected root canals and acute apical abscess exudates. *J Endod*. 2010 Nov;36(11):1796-9.

Moraes SR, Siqueira JF Jr, Colombo AP, Roças IN, Ferreira MC, Domingues RM. Comparison of the effectiveness of bacterial culture, 16S rDNA directed polymerase chain reaction, and checkerboard DNA-dNA hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic infections. *J Endod*. 2002 Feb;28(2):86-9.

Mori GG, Ferreira FC, Batista FR, Godoy AM, Nunes DC. Evaluation of the diffusion capacity of calcium hydroxide pastes through the dentinal tubules. *Braz Oral Res*. 2009 Apr-Jun;23(2):113-8.

Murad C, Fariniuk LF, Fidel S, Fidel RA, Sassone LM. Bacterial leakage in root canals filled with calcium hydroxide paste associated with different vehicles. *Braz Dent J*. 2008;19(3):232-7.

Nilius AM, Spencer SC, Simonson LG. Stimulation of in vitro growth of *Treponema denticola* by extracellular growth factors produced by *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res*. 1993 Jun;72(6):1027-31.

Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J*. 2004 Jan;37(1):38-41.

Ozbek SM, Ozbek A, Erdogan AS. Detection of *Treponema denticola* in symptomatic apical periodontitis and in symptomatic apical abscesses by real-time PCR. *Eur J Dent*. 2009 Apr;3(2):107-13.

Ozbek SM, Ozbek A. Real-time polymerase chain reaction of "red complex" (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*) in periradicular abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Nov;110(5):670-4.

Paiva SS, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC, et al. Clinical antimicrobial efficacy of NiTi rotary instrumentation with NaOCl

irrigation, final rinse with chlorhexidine and interappointment medication: a molecular study. *Int Endod J*. 2013 Mar;46(3):225-33.

Park M, Bae J, Lee DS. Antibacterial activity of [10]-gingerol and [12]-gingerol isolated from ginger rhizome against periodontal bacteria. *Phytother Res*. 2008 Nov;22(11):1446-9.

Rôças IN, Siqueira JF Jr, Debelian GJ. Analysis of symptomatic and asymptomatic primary root canal infections in adult Norwegian patients. *J Endod*. 2011a Sep;37(9):1206-12.

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

Rôças IN, Siqueira JF Jr. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *J Clin Microbiol*. 2008 Nov;46(11):3599-606.

Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR, Coelho AM. "Red complex" (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 Apr;91(4):468-71.

Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L, et al. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol*. 2001 Sep;39(9):3282-9.

Safavi K, Nakayama TA. Influence of mixing vehicle on dissociation of calcium hydroxide in solution. *J Endod*. 2000 Nov;26(11):649-51.

Saito D, Coutinho LL, Borges Saito CP, Tsai SM, Höfling JF, Gonçalves RB. Real-time polymerase chain reaction quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. *J Endod*. 2009 Nov;35(11):1518-24.

Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Feb;22(1):19-23.

Sassone L, Fidel R, Figueiredo L, Fidel S, Faveri M, Feres M. Evaluation of the microbiota of primary endodontic infections using checkerboard DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Dec;22(6):390-7.

Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, Figueiredo L, Fidel SR, Feres M. A microbiological profile of unexposed and exposed pulp space of primary

endodontic infections by checkerboard DNA-DNA hybridization. J Endod. 2012 Jul;38(7):889-93.

Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, Guerra R, Figueiredo L, Fidel SR, et al. A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infections. J Endod. 2008b May;34(5):541-5.

Sassone LM, Fidel R, Faveri M, Fidel S, Figueiredo L, Feres M. Microbiological evaluation of primary endodontic infections in teeth with and without sinus tract. Int Endod J. 2008a Jun;41(6):508-15.

Sathorn C, Parashos P, Messer H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. Int Endod J. 2007 Jan;40(1):2-10.

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

Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. J Endod. 2006b Mar;32(3):173-7.

Shukla Y, Singh M. Cancer preventive properties of ginger: a brief review. Food Chem Toxicol. 2007 May;45(5):683-90.

Siqueira JF Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002a Sep;94(3):281-93.

Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. Int Endod J. 1999 Sep;32(5):361-9.

Siqueira JF Jr, Magalhães KM, Rôças IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. J Endod. 2007 Jun;33(6):667-72.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Alves FR, Santos KR. Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: a molecular investigation. J Endod. 2004 Sep;30(9):638-43.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. J Endod. 2005 Jun;31(6):411-23.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radicidentis* in primary and persistent endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Aug;96(2):215-22.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Silva MG. Prevalence and clonal analysis of *Porphyromonas gingivalis* in primary endodontic infections. *J Endod.* 2008 Nov;34(11):1332-6.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. *Actinomyces* species, streptococci, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. *J Endod.* 2002b Mar;28(3):168-72.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000 Jun;89(6):744-8.

Smith GL, Socransky SS, Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol.* 1989 Mar;4(1):47-51.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998 Feb;25:134-44.

Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques.* 1994 Oct;17(4):788-92.

Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps [dissertation]. Michigan: University of Umea;1976.

Sundqvist GK, Eckerbom MI, Larsson AP, Sjögren UT. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infect Immun.* 1979 Aug;25(2):658-93.

Tanabe SI, Bodet C, Grenier D. *Treponema denticola* peptidoglycan induces the production of inflammatory mediators and matrix metalloproteinase 9 in macrophage-like cells. *J Periodontal Res.* 2009 Aug;44(4):503-10.

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

Teles AM, Manso MC, Loureiro S, Silva R, Madeira IG, Pina C, et al. Effectiveness of two intracanal dressings in adult Portuguese patients: a

qPCR and anaerobic culture assessment. *Int Endod J.* 2014 Jan;47(1):32-40.

Tomazinho LF, Avila-Campos MJ. Detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in chronic endodontic infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Feb;103(2):285-8.

Valera MC, da Rosa JA, Maekawa LE, de Oliveira LD, Carvalho CA, Koga-Ito CY, et al. Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010a Oct;110(4):e70-4.

Valera MC, Maekawa LE, Chung A, Cardoso FG, Oliveira LD, Oliveira CL, et al. The effect of sodium hypochlorite and ginger extract on microorganisms and endotoxins in endodontic treatment of infected root canals. *Gen Dent.* 2014 May-Jun;62(3):25-9.

Valera MC, Maekawa LE, de Oliveira LD, Jorge AO, Shygei E, Carvalho CA. In vitro antimicrobial activity of auxiliary chemical substances and natural extracts on *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Appl Oral Sci.* 2013 Mar-Apr;21(2):118-23.

Valera MC, Salvia AC, Maekawa LE, Camargo SE, Carvalho CA, Camargo CH, et al. Antimicrobial analysis of chlorhexidine gel and intracanal medicaments against microorganisms inoculated in root canals. *Minerva Stomatol.* 2010b Jul-Aug;59(7-8):415-21.

Valera MC, Silva KC, Maekawa LE, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Camargo CH, et al. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. *J Appl Oral Sci.* 2009 Nov-Dec;17(6):555-9.

van Breemen RB, Tao Y, Li W. Cyclooxygenase-2 inhibitors in ginger (*Zingiber officinale*). *Fitoterapia.* 2011 Jan;82(1):38-43.

Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BP. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Aug;23(4):282-90.

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

Walker AA. Definitive and dependable therapy for pulpless teeth. *J Am Dent Assoc.* 1936;23(8):1418-24.

Wayman BE, Murata SM, Almeida RJ, Fowler CB. A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. *J Endod.* 1992 Apr;18(4):152-5.

White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod.* 1997 Apr;23(4):229-31.

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

Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, Ogawa K, Sagawa H. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canal of teeth with periapical pathosis. *J Endod.* 1987 Jan;13(1):24-8.

Zerella JA, Fouad AF, Spångberg LS. Effectiveness of a calcium hydroxide and chlorhexidine digluconate mixture as disinfectant during retreatment of failed endodontic cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Dec;100(6):756-61.

Zhang T, Fang HH. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006 Apr;70(3):281-9.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Caro(a) Senhor(a)

Eu, Marcia Carneiro Valera, professora Titular da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, portadora do CPF 039.137.548-22, estabelecido à Avenida Eng. Francisco José Longo, 777, na cidade de São José dos Campos-SP, telefone para contato (12) 3947 9048, sou responsável pela pesquisa cujo título é **“Detecção *in vivo* de microrganismos e quantificação de endotoxinas em dentes com necrose pulpar utilizando *Zingiber Oficinalis* como medicação intracanal”**.

O objetivo deste estudo é avaliar a eficácia de soluções (Hipoclorito de sódio 2,5%) e medicamentos (hidróxido de cálcio e extrato glicólico de gengibre 20%), que serão utilizados durante o tratamento endodôntico (tratamento de canal) com a finalidade de eliminar microrganismos e produtos destes microrganismos (neutralização de endotoxinas), responsáveis pelas falhas no tratamento endodôntico. Para esta avaliação, será coletado material do interior do canal dos dentes a serem tratados e, em seguida, em laboratório, o material coletado será submetido a análise, avaliando os microrganismos e seus produtos presentes nos canais radiculares; estes serão identificados e quantificados antes do tratamento endodôntico e após o uso dos medicamentos anteriormente citados.

O projeto não acarretará risco algum para o paciente uma vez que será realizado dentro das normas de biossegurança. Além disso, o protocolo de conduta adotado é o mesmo já utilizado na prática clínica odontológica desta faculdade. Serão necessários de 2 a 4 atendimentos (3 horas cada atendimento) até a conclusão do tratamento de canal. O paciente receberá número de telefone para entrar em contato em caso de dor e será atendido imediatamente. Os pacientes serão chamados para acompanhamento radiográfico após 1 ano do tratamento finalizado.

Se houver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética (CEP) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, situada na Av. Eng^o Francisco José Longo, 777 – CEP 12245000, em São José dos Campos-SP, fone 012-3947-9076, e-mail *janete@fosjc.unesp.br* e comunique-se com a Coordenadora Profa. Dra. JANETE DIAS ALMEIDA. Informo que será garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela colaboração.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Acredito ter sido esclarecido(a) a respeito das informações que leram para mim, descrevendo o estudo a ser realizado e concordo em receber atendimento em consultório odontológico. Declaro conhecer os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, e que minha participação não implicará em nenhuma despesa.

NOME/RESPONSÁVEL _____

RG _____ CPF _____

ENDEREÇO COMPLETO _____

Assinatura Responsável

Assinatura Pesquisador

ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE SÃO JOSÉ
DOS CAMPOS-UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETECÇÃO IN VIVO DE MICROORGANISMOS E QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINAS EM DENTES COM NECROSE PULPAR UTILIZANDO Zingiber officinalis COMO MEDICAÇÃO INTRACANAL

Pesquisador: Marcia Carneiro Valera

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 09994512.8.0000.0077

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 179.380

Data da Relatoria: 11/12/2012

Apresentação do Projeto:

Trinta dentes unirradiculares com necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente serão submetidos a tomografia de feixe único (CT). Após, será realizado o tratamento endodôntico utilizando hipoclorito de sódio 2,5% como solução irrigadora e divididos em 3 grupos de acordo com a medicação intracanal (MIC) utilizada: hidróxido de cálcio P.A. + solução salina fisiológica; extrato glicólico de gengibre 20% e hidróxido de cálcio P.A. + extrato glicólico de gengibre 20%. Serão realizadas coletas do canal radicular com cones de papel absorvente após a abertura coronária, após a instrumentação e, após 14 dias de ação da medicação intracanal. Para análise do conteúdo

microbiológico dos canais radiculares, será extraído o DNA de cada amostra e as mesmas serão analisadas a partir de sondas de DNA pelo método checkerboard e será realizada quantificação de microrganismos pelo método PCR em tempo Real. Além disso, 10 amostras serão clonadas e também seqüenciadas. Serão realizados os testes de avaliação da atividade antimicrobiana por cultura microbiológica e análise da quantidade de endotoxina verificada pelo lisado de amebócitos de Limulus. Serão ainda realizadas medidas das lesões periapicais com CT e o tamanho das lesões bem como os outros sinais e sintomas serão correlacionados com os níveis de endotoxinas. Os resultados serão submetidos à análise descritiva e estatística.

Objetivo da Pesquisa:

1) Conhecer o perfil microbiano envolvido nos canais radiculares de dentes com necrose pulpar e

Endereço: Av. Eng.º Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

Telefone: (12-)3947-9078

Fax: (12-)3947-9010

E-mail: cep@focj.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE SÃO JOSÉ
DOS CAMPOS-UNESP



lesão periapical, utilizando a técnica γ multiplex + checkerboard hibridização DNA-DNA γ , para detecção de 40 espécies bacterianas; 2) Monitoramento genético do perfil infeccioso envolvido em dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical através da técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA nas diferentes fases da terapia endodôntica: coleta inicial (1ª coleta); após o preparo biomecânico com uso de hipoclorito de sódio 2,5% (2ª coleta) e após ação da medicação intracanal de hidróxido de cálcio (3ª coleta); 3) Quantificar as espécies e determinar a efetividade do preparo biomecânico (PBM) e medicações intracanaís (MIC) na redução microbiana das espécies pertencentes ao complexo nos canais radiculares através da técnica de PCR em Tempo Real (RT-PCR); 4) Avaliar a efetividade do preparo biomecânico e do uso de diferentes MIC na redução da carga microbiana infecciosa inicial presente nos canais radiculares através de contagem de colônias (UFC/mL); 5) Investigar e quantificar endotoxinas nas infecções endodônticas primárias; realizando monitoramento dos níveis de endotoxinas antes do tratamento, após o PBM e após o uso das MIC. 6) Correlacionar os níveis de endotoxinas com os níveis de destruição óssea periapical através do uso de tomografias de feixe único.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não existe nenhum tipo de risco para os pacientes participantes da pesquisa, a não ser os riscos inerentes a realização de tratamento endodôntico.

Benefícios:

Ao paciente que se disponibilizar em participar da pesquisa será conferido o benefício de realização de tratamento endodôntico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Demonstra ser uma pesquisa de relevância para a área da endodontia, considerando o detalhamento apresentado, a bibliografia apresentada e a metodologia proposta, bem como os critérios de inclusão e exclusão, além do benefício de tratamento aos participantes da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE encontra-se adequado, com utilização de termos técnicos seguidos de esclarecimentos de forma que o candidato consiga compreender o teor da pesquisa.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de pesquisa aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
 Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000
 UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS
 Telefone: (12)-3947-9078 Fax: (12)-3947-9010 E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE SÃO JOSÉ
DOS CAMPOS-UNESP



Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Colegiado concorda com o parecer do relator, aprovando o projeto.

SAO JOSE DOS CAMPOS, 20 de Dezembro de 2012

Assinador por:
Denise Nicodemo
(Coordenador)