



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): **FREDERICO MARQUES LIMA DOS SANTOS**



Ano de Conclusão do Curso: 2003

TCC 029



**Avaliação *in vitro* de diferentes protocolos de
descontaminação da coroa dental e câmara pulpar, antes do
tratamento endodôntico e da coleta de microrganismos do
canal radicular.**

Frederico Marques Lima dos Santos.

ORIENTADORA: Prof. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao departamento de
Odontologia Restauradora-Endodontia da
Faculdade de Odontologia de Piracicaba
FOP- UNICAMP.

Piracicaba

Estado de São Paulo – Brasil

Novembro de 2003



**Avaliação *in vitro* de diferentes protocolos de
descontaminação da coroa dental e câmara pulpar, antes do
tratamento endodôntico e da coleta de microrganismos do
canal radicular.**

Frederico Marques Lima dos Santos.

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao departamento de
Odontologia Restauradora–Endodontia da
Faculdade de Odontologia de Piracicaba
FOP- UNICAMP.

Piracicaba

Estado de São Paulo – Brasil

Novembro de 2003

Dedicatória

Aos meus pais pelos ensinamentos que
me tornaram capaz de fazer um mundo
melhor para todos.

Amo muito vocês

Agradecimentos

Quero aqui expressar minha gratidão por todos que me ajudaram diretamente ou indiretamente neste momento fundamental para minha formação.

À minha orientadora Prof. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes pela boa convivência ensinamentos prestados .

A todos os professores que fizeram parte da minha vida e puderam tornar este momento possível para mim.

Aos meus pais pelo amor, felicidade e carinho dados ao longo da minha vida.

Aos meus irmãos pelo companheirismo, carinho e amizade (amo vocês...muito)

Aos meus tios ,avós, primos, pela confiança depositada e alegria de sempre

Aos meus amigos da turma 44 pela amizade durante esse anos.

Aos meus grandes amigos de república (Cueca, Daí , Severino , Yoko , Tauba e Piu) pelos momentos de alegria e felicidade.

Aos meus grandes amigos das repúblicas Oráculo (Κρυα, Bomba, Urso e Diamante), Satangos (Cabral, Krusty e Pônei) pelas boas quintas na calçada que nunca esquecerei.

À minhas amigas Gisele (Panda) , Morgana (Cotoco) pelas besteiras que falei o tempo todo e amizade que fizemos... obrigado.

Aos amigos do departamento de endodontia, principalmente o Rogério e a Morgana pelo companheirismo e ajuda.

Aos cadernos da Fernanda, Thalita e Aline sem eles eu não sei o que seria de mim

A todos os funcionários da Faculdade por promover um ambiente organizado para todos.

Aos meus amigos de infância pelos anos de alegria.

Especiais agradecimentos a minha avó Nair que o tempo não permitiu estar aqui presente, mas quero que saiba o quanto sou grato por seus ensinamento e muito mais TE AMO. Ao meu Tio Gil por acreditar em mim.

Sumário

1	Resumo	6
2.	Introdução	7
3.	Propósito.....	9
4.	Materiais e método.....	10
4.1.	Coletas microbiológicas.....	12
5.	Análise estatística.....	14
6.	Resultados.....	15
7.	Discussão.....	17
8.	Conclusão.....	20
9.	Referências Bibliográficas.....	21

1.RESUMO

Este trabalho teve como objetivo testar alguns protocolos de descontaminação da coroa dental e câmara pulpar antes do tratamento endodôntico e coleta microbiológica do canal radicular e avaliar a influência destes protocolos na microbiota inicial dos canais radiculares. Para isso, foram utilizados 50 dentes monorradiculares humanos, recém-extraídos, com canais únicos. Os mesmos foram montados em aparatos próprios para contaminação com saliva de doador único, misturada ao meio de cultura (BHI caldo). Após a contaminação dos dentes e coleta inicial da coroa dental e câmara pulpar, os dentes foram submetidos a diferentes protocolos de descontaminação da coroa e câmara pulpar: Grupo I - hipoclorito de sódio 5,25% + H₂O₂ 30%, Grupo II - hipoclorito de sódio 5,25% + H₂O₂ 3%, Grupo III - tintura de iodo 5% + H₂O₂ 30%, Grupo IV - tintura de iodo 5% + H₂O₂ 3%. Finalizada esta fase, foram feitas novas coletas da coroa, câmara pulpar e canal radicular. As amostras foram diluídas, plaqueadas, contadas e identificadas. Os microrganismos mais encontrados foram *Staphylococcus schleiferi* e *Staphylococcus xilosus*. Os quatro protocolos de descontaminação foram eficientes, reduzindo de 90% a 100% a contaminação da superfície dental, e a descontaminação da câmara pulpar não impediu a coleta de microrganismos viáveis do canal radicular.

2. INTRODUÇÃO

Já foram identificadas na cavidade oral 509 espécies de microrganismos pertencentes a 30 gêneros diferentes, constituindo uma microbiota diversificada e que sobrevive normalmente em equilíbrio (**Motta et al, 2002**). A placa dental constitui um local adequado para a proliferação e manutenção de microrganismos (**Burnett et al., 1970**) que irão contaminar o canal radicular durante o tratamento endodôntico, caso não seja feita a descontaminação adequada da coroa dental.

A descontaminação ou não da coroa dental previamente ao tratamento endodôntico pode influenciar nos resultados de pesquisas envolvendo culturas microbiológicas dos canais radiculares (**Morse et al., 1970**), podendo acarretar em resultados falso-positivos, quando em virtude da não-descontaminação do campo operatório, coletamos microrganismos da coroa ou câmara pulpar; ou falso-negativos quando os agentes utilizados para descontaminação penetram no canal radicular.

Para descontaminação efetiva da coroa dental e câmara pulpar, peróxido de hidrogênio tem sido usado em concentrações até 30%. No entanto estas concentrações mais elevadas são cáusticas e podem afetar o dique de borracha. Soluções usadas para descontaminação da superfície dental incluem álcool, tintura de mercúrio, tintura de iodo, hipoclorito de sódio em diversas concentrações e clorexidina (**Morse et al, 1971**).

Moller et al. em 1966 mostrou que a aplicação de tintura de iodo por dois minutos é efetiva, no entanto na presença de esporos é necessária uma aplicação de quinze minutos.

Griffie et al. (1980) fizeram coletas microbiológicas de dentes com necrose pulpar, usando para a desinfecção da superfície coronária o protocolo desenvolvido por **Moller et al.**(1966). Depois do isolamento absoluto, o dente o grampo e o dique de borracha foram limpos com H₂O₂ 30% por dois minutos. Após o acesso coronário, swab embebido em H₂O₂ foi passado novamente na coroa por 15 segundos, seguido por uma aplicação de tintura de iodo 5% por 2 minutos. Tiosulfato de sódio 5% foi utilizado em seguida para neutralizar o iodo. **Sundqvist et al.**(1989) em trabalho envolvendo cultura de microrganismos do canal radicular também utilizaram o protocolo de **Moller** para descontaminação do dente e dique de borracha, assim como **Hashioka et al.** (1992) e **Baumgartner et al.** (1999). Já **Horiba et al.** (1991) desinfetaram o dente e o dique de borracha com tintura de iodo 5% e álcool etílico 70%.

Dougherty et al. (1998) utilizaram algodão embebido em hipoclorito de sódio 5,25% durante 30 segundos para descontaminação da coroa dental, em seguida aplicaram tiosulfato de sódio 5% para neutralizar o NaOCl e fizeram uma lavagem final com solução salina.

O objetivo deste trabalho foi investigar a eficácia de associações de agentes antimicrobianos mais frequentemente utilizados na descontaminação da coroa dental e câmara pulpar previamente ao tratamento endodôntico e cultura de microrganismos do canal radicular.

3. PROPÓSITO

O presente trabalho teve como objetivos:

- Avaliar a eficácia do hipoclorito de sódio 5,25% + H₂O₂ 30%, hipoclorito de sódio 5,25% + H₂O₂ 3%, Tintura de Iodo 5% + H₂O₂ 30%, Tintura de Iodo 5% + H₂O₂ 3%, na descontaminação da coroa dental e câmara pulpar previamente ao tratamento endodôntico e coleta de microrganismo do canal radicular.
- Avaliar a influência destes protocolos na microbiota inicial dos canais radiculares.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 50 pré-molares recém-extraídos selecionados para este estudo. Estes foram autoclavados, armazenados em uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (Líquido de Dakin) e então submetidos ao preparo de abertura coronária convencional. Para isso, utilizamos pontas diamantadas 1011, 1012 e 1013. Para a remoção do teto da câmara pulpar foi utilizada a broca 3082.

Após o preparo, os dentes foram divididos em 4 grupos de acordo com o protocolo adotado:

Grupo I (10 dentes): hipoclorito de sódio 5,25% + H₂O₂ 30%

Grupo II (10 dentes): hipoclorito de sódio 5,25% + H₂O₂ 3%

Grupo III (10 dentes): tintura de iodo 5% + H₂O₂ 30%

Grupo VI (10 dentes): tintura de iodo 5% + H₂O₂ 3%

Grupo V: (10 dentes): dentes com coroa intacta serviram como controle negativo da metodologia.

O controle positivo da metodologia correspondem aos próprios dentes de cada grupo.

Para este estudo, um modelo para contaminação dos dentes similar ao de **Siqueira et al.**(1999) foi utilizado. Os aparatos foram compostos por frascos de vidro acoplados a "stoppers" (tampas) de borracha. Acima destes adaptou-se cilindros de seringas plásticas de 10ml devidamente preparados, de modo que se ajustassem à superfície externa dos "stoppers", criando uma câmara onde foi depositada a saliva com o meio de cultura BHI caldo (Brain Heart Infusion Broth, Oxoid, Basingstoke, UK).

Uma peça de mão de alta rotação foi utilizada para a confecção de orifícios circulares no centro dos "stoppers" (Torabinejad *et al.*, 1990). Nesta abertura os dentes foram inseridos e pressionados até a junção cimento-esmalte, de modo que a porção coronária fique em contato com o interior do frasco. A interface dente-stopper foi selada com cianocrilato (Super Bonder; Loctite, SP) (Imura *et al.*, 1997).

Distribuiu-se o BHI caldo nos frascos. Os conjuntos frasco, "stopper" e as seringas foram esterilizados em autoclave a 121° C por 15 minutos e logo após levados à câmara de fluxo laminar, previamente submetida à luz ultra-violeta (Imura *et al.*, 1997). Nesta câmara os aparatos montados, ou seja, o conjunto frasco + "stopper" foram acoplado as seringas. Na interface entre o frasco e o "stopper" foi colocado um filme de parafina (PARAFILM). Com o auxílio de uma pipeta, colocamos 1 ml de azul de metileno no interior dos stoppers, para verificar se o vedamento da interface dente- stopper foi eficiente (Malone & Donnelly, 1997). Os aparatos foram incubados a 37° C por 4 dias para assegurar a esterilização. Os cilindros de seringa foram acoplados novamente ao conjunto. Saliva de doador único (30 ml por grupo) recém coletada no período da manhã após 12 horas de jejum e ausência de escovação, foi adicionada ao BHI caldo estéril na proporção de 3:1. Esta mistura foi depositada na câmara formada pelo cilindro da seringa, sendo renovada a cada três dias durante uma semana. Os conjuntos foram monitorados diariamente para verificar o aparecimento de turbidez do meio, que é indicativo da contaminação do canal.

COLETAS MICROBIOLÓGICAS

Após uma semana de contaminação dos dentes, foi realizada nos grupos I e II a coleta inicial da coroa e câmara pulpar, friccionando uma bolinha de algodão estéril com auxílio de uma pinça também estéril.

A bolinha de algodão com a coleta inicial da coroa foi colocado imediatamente em tubos tipo eppendorf contendo 1.0 ml de meio de transporte RTF (Dahlén *et al.*, 1993).

A diluição e plaqueamento das amostras foram feitas no interior da cabine de fluxo laminar da seguinte forma: o tubo de eppendorf contendo RTF e a bolinha de algodão foram colocados no Agitador (MA 162-MARCONI, São-Paulo, Brasil) por 60 segundos. A seguir, realizou-se diluições seriadas a 1/10, 1/100, 1/1.000 e 1/10.000 utilizando BHI caldo. Cinquenta ul das diluições 1/100 e 1/10.000 foram inoculados em placas BHI ágar enriquecido com 5% de sangue de carneiro que foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por dois dias. Após este período foi feita a contagem das colônias utilizando um contador de colônias e a identificação dos microrganismos através de testes bioquímicos padronizados (bioMeurieux S.A , Marcy – l' Etoile, França). O próximo passo foi a descontaminação da coroa dental e câmara pulpar através da fricção de bolinhas de algodão estéril presas a uma pinça, embebidas em:

- GI: água oxigenada 30% + NaOCl 5,25%
- GII: água oxigenada 3% + NaOCl 5,25%
- GIII: Tintura de iodo 5% + água oxigenada 30%
- GIV: Tintura de iodo 5% + água oxigenada 3%

A seguir, utilizou-se tiosulfato de sódio 5% para neutralização química das soluções empregadas na descontaminação para realização de coletas microbiológicas.

A coleta microbiológica do canal foi realizada introduzindo um cone de papel #25# por 60 segundos e colocado para agitação. O crescimento e a identificação dos microrganismos foi realizado da mesma forma feita para a coleta inicial.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram analisados com relação à normalidade através do programa GMC (Ribeirão Preto, SP) e estatisticamente analisados o Programa estatístico BioEstat.

6. RESULTADOS

Em todos os grupos (GI, GII, GIII, GIV), nas coletas iniciais, houve um crescimento de mais de 500 ufc (100%) em todas as diluições realizadas tanto da coroa quanto da câmara pulpar. De acordo com as características morfológicas das colônias, coloração de Gram, testes da catalase e testes bioquímicos, todas as unidades formadoras de colônia (ufc) pertenciam ao gênero dos *Staphylococcus* (cocos, Gram positivos, catalase positivos, facultativos), sendo que as espécies mais freqüentemente isoladas foram *Staphylococcus schleiferi* e *Staphylococcus xilosus*.

Após a descontaminação da coroa e câmara pulpar houve uma redução de 90% a 100% do crescimento em todos os grupos (Tabela I). Não houve diferença estatística entre a utilização do peróxido de hidrogênio 30% ou 3% quando estas substâncias foram associadas ao NaOCl 5,25% (Grupos I e II, respectivamente). A tintura de iodo 5% associada ao peróxido de hidrogênio 30% (Grupo III) apresentou melhores resultados, seguida do grupo que utilizou tintura de iodo 5% associado ao peróxido de hidrogênio 3% e (Grupo IV). (Tabela 1)

A descontaminação da coroa e da câmara pulpar não inviabilizou a coleta de microrganismos do canal radicular, tendo sido encontrados microrganismos viáveis em todas as amostras (Tabela 1)

Tabela 1. Atividade antimicrobiana dos diferentes protocolos de descontaminação das coroas dentais.

Grupos	UFC inicial	UFC após desinfecção	% de crescimento inicial	% de crescimento após desinfecção	% de inibição de crescimento	UFC coletadas do canal após desinfecção
GI	500	5	100%	10%	90%	14
GII	500	2	100%	0,4%	99,6%	74,3
GIII	500	0	100%	0%	100%	0,4
GIV	500	1	100%	0,2%	99,8%	7,4

7. DISCUSSÃO

Existem muitas pesquisas que examinaram microbiologicamente a região apical de canais radiculares indicados para o tratamento endodôntico (**Möller et al, 1966; Griffee et al, 1980; Sundqvist et al, 1989; Hashioka et al, 1992; Gomes et al, 1994; Dougherth et al, 1998; Baumgartner, 1999; Ng et al, 2003; Siqueira et al 2003; Jacinto et al 2003**). Em todas elas pode ser observado um cuidado especial em relação a descontaminação do campo operatório previamente à coleta. No entanto poucos estudos se preocuparam em investigar um protocolo adequado, sendo que o mais conhecido e utilizado ainda nas pesquisas mais atuais foi o protocolo proposto por **Moller et al** em 1966, onde este autor recomendava a limpeza do campo com peróxido de hidrogênio 30% seguida da descontaminação com tintura de iodo 5% ou 10% previamente à coleta de amostras microbiológicas do canal.

Curiosamente, os agentes propostos por **Moller et al, 1966** não são favoráveis para o debridamento intracanal, e nem fazem parte das substâncias utilizadas como irrigantes do canal radicular. Por outro lado o NaOCl, substância comumente utilizada como irrigante intracanal, tem um comprovado efeito antimicrobiano, ainda possui a habilidade de desintegrar tecido orgânico (**Hand et al, 1978**), e conseqüentemente pode ser capaz de romper a integridade da placa bacteriana da superfície da coroa dental.

Por ser uma substância disponível com facilidade na clínica é um obvio candidato a ser usado como descontaminante do campo operatório. De fato, o NaOCl 5,25% ou 2,5% foi a substância de escolha para descontaminação da coroa dental e dique de borracha em vários estudos que investigaram a

microbiota do canal radicular (**Siqueira et al 2003; Jacinto et al 2003.**). Neste estudo as soluções empregadas para a desinfecção do campo operatório apresentaram uma grande redução dos microrganismos inicialmente encontrados, sendo que NaOCl 5,25% e tintura de iodo 5% foram eficientes para a descontaminação da coroa e da câmara pulpar quando associadas ao peróxido de hidrogênio. A utilização de um aparato para contaminação com saliva é vantajosa porque se aproxima da realidade clínica e previne a contaminação por agentes externos que poderiam ocorrer com outros métodos de contaminação.

A descontaminação do campo operatório é fundamental para que não se obtenham resultados falso-positivos durante a análise microbiológica da região periapical. Ou seja, deve-se tomar este cuidado para que a coleta da região apical não seja contaminada com microrganismos presentes no campo operatório.

Em vista disto, alguns protocolos recomendam que se faça também uma segunda descontaminação após a abertura coronária (**Ng et al 2003; Siqueira et al 1999**), previamente à coleta microbiológica, porque a remoção do material restaurador e da dentina cariada podem recontaminar o campo operatório. Neste estudo pudemos observar que a descontaminação da câmara pulpar não inviabilizou a coleta de microrganismo do canal radicular. Nos protocolos utilizados por **Siqueira et al 2003** e por **Jacinto et al 2003** foi realizada a limpeza do dente e do campo operatório com peróxido de hidrogênio 3% e 30% respectivamente e descontaminação com NaOCl 2,5%. Após a abertura coronária, o campo operatório, incluindo a câmara pulpar, foi descontaminado com NaOCl 2,5%. Conforme constatado nesta pesquisa, foi possível realizar a coleta de microrganismos viáveis do canal radicular após a descontaminação da câmara pulpar.

No presente estudo a descontaminação com hipoclorito ou tintura de iodo foram eficazes. O mesmo foi observado por **Ng et al.** 2003 quando utilizaram método de cultura para comprovar a eficiência dos protocolos de descontaminação. No entanto observaram diferenças em algumas áreas quando utilizaram o método do PCR. PCR detectou contaminação das amostras das superfícies dos dentes tratados com tintura de iodo numa maior frequência em relação as amostras das superfícies tratadas com NaOCl, isto porque o NaOCl não apenas elimina as bactérias mas também degrada o seu DNA, impossibilitando que este seja detectado pelo PCR, o que previne a ocorrência de resultados falso-positivos.

Com base nas condições experimentais do presente estudo, pode ser observado que tanto o hipoclorito de sódio 5,25% quanto a tintura de iodo 5% foram eficazes na descontaminação, embora a tintura de iodo 5% tenha sido mais eficaz quando associada ao peróxido de hidrogênio 30%. Por outro lado o peróxido de hidrogênio 3% também foi efetivo e pode ser utilizado por ser menos agressivo ao dique de borracha.

8. CONCLUSÃO

Através do presente estudo, e dentro das condições experimentais da pesquisa, pode-se concluir que:

1. As soluções empregadas para a descontaminação do campo operatório (H_2O_2 30% + NaOCl 5,25%, H_2O_2 3% + NaOCl 5,25%, H_2O_2 30% + tintura de Iodo 5%, H_2O_2 3% + tintura de Iodo 5%) foram eficazes reduzindo consideravelmente o número de microrganismos iniciais.
2. Tintura de Iodo 5% + H_2O_2 30% foi o protocolo mais eficaz para eliminar os microrganismos presentes na coroa dental e câmara pulpar,
3. Após a descontaminação da coroa dental e câmara pulpar foi possível realizar a cultura de microrganismos viáveis dos canais radiculares.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baumgartner J.C. Association of Black-Pigmented Bacteria with Endodontic Infections. *J. Endodon.*v.25,n.6,p.413-415, 1999.
2. Burnnet, G.W. The microbiology of dental infections. *Dent Clin North Am*,v.14,n.4,p.681-695,1970.
3. Dahlén G., Pipattanogovit P., Rosling B. and Moller A.J.R. (1993) A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol*, 8, 375-382.
4. Dougherty W.J. Black-Pigmented Bacteria in Coronal and Apical Segments of Root Canals. *J. Endodon*,v.24,n.5,1998.
5. Gomes B.P.F.A. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J*,v.27,p.291-298,1994.
6. Griffe M.B.The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. *Oral Surg*,v.50,n.5,p.457-461,1980.
7. Hand RE, Smith ML, Harrison JW. Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. *J Endodon* v.4,p.60-64,1978.

8. Hashioka K. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. *J. Endodon* .v.18,n.11,p.558-561,1992.
9. Horiba N.Maekawa Y.Abe Y.Ito M .Matsumoto T. Nakamura H . Correlation between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in root canals. *Oral Surg* v.71.492-495,1991.
- 10.Imura,N. Otani S.M, Campos M.J.^a, Jardim Jr E.G., Zuolo M.L. Bacterial penetration through temporary restorative materials in root canal-treated teeth in vitro. *Int Endod J*.v.30,p.1-5,1997.
- 11.Jacinto R.C, Gomes B.P.F.A, Ferraz C.C.R, Zaia A.A, Souza Filho F.J. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some anaerobic bacteria isolated. *Oral Microbiol Immunol* v.18, p.1-8 (in press)
- 12.Malone III, Donnely C. In vitro evaluation of coronal microleakage in obturated root canals without coronal restorations. *J Endodon*.v.23,n.1,p.35-38, 1997.
- 13.Möller AJR. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of teeth [Thesis].*Odontol Tidskr* ,v.74(special issue):1-380, 1966
- 14.Morse D.R. The endodontic culture technique: A critical evaluation.*Oral Surg*,v.30,n.4,p.540-544,1970.

15. Morse D.R. The endodontic culture technique: An impractical and Unnecessary Procedure. *Dental Clin North America*,v.15,n.4,p.793-806, 1971.
16. Motta, RHL, Resistência a antimicrobianos de microrganismos colhidos em artigos e equipamentos odontológicos [Tese], Faculdade de Odontologia de Piracicaba 2002.
17. Ng Y, Spratt D, Gulabivala K. Evaluation of protocols for field decontamination before bacterial sampling of root canals for contemporary microbiology techniques. *J Endodon.*,v29,n.5,p.317-320,2003.
18. Siqueira JR J.F., Roças I.N., Lopes H.P., Uzeda M. Coronal leakage of two root canal sealers containing calcium hydroxide after exposure to human saliva. *J Endodon.*,v25,n.1,p.14-16,1999.
19. Sundqvist.G. Prevalence of Black-pigment Bacteroides Species in Root Canal Infections *J Endodon* v.15,n.1, 13-19, 1989.
20. Torabinejad M, Ung B, Kettering JD. In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *J Endodon* v.16, p.566-569, 1990.