

VANESSA BELLOCCHIO BERBER

Identificação da microbiota das lesões endo-periodontais
por cultura e PCR e sua suscetibilidade ao preparo
químico-mecânico e a medicações intracanaís entre
sessões de atendimento.

**Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, da Universidade Estadual de
Campinas, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Clínica
Odontológica – Área de Endodontia**

Orientadora: Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Co-orientadora: Profa. Dra. Morgana Eli Vianna

PIRACICABA

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

B45i	<p>Berber, Vanessa Bellocchio. Identificação da microbiota das lesões endo-periodontais por cultura e PCR e sua suscetibilidade ao preparo químico-mecânico e a medicações intracanaís entre sessões de atendimento. / Vanessa Bellocchio Berber. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientadores: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Morgana Eli Vianna. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Clorexidina. 2. Hidróxido de cálcio. 3. Microrganismos. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Vianna, Morgana Eli. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.</p> <p>(mg/fop)</p>
------	--

Título em Inglês: Identification of endodontic-periodontal lesions microbiota by culture and PCR and their susceptibility to chemo-mechanical preparation and intracanal dressings between appointments

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Chlorhexidine. 2. Calcium hydroxide. 3.

Microorganisms

Área de Concentração: Endodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Caio Cezar Randi Ferraz, Rogério Castilho Jacinto, Poliana Mendes Duarte, Márcia Carneiro Valera

Data da Defesa: 17-02-2009

Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 17 de Fevereiro de 2009, considerou a candidata VANESSA BELLOCCHIO BERBER aprovada.

PROFa. DRa. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

PROFa. DRa. MÁRCIA CARNEIRO VALERA

PROFa. DRa. PÓLIANA MENDES DUARTE

PROF. DR. ROGÉRIO DE CASTILHO JACINTO

PROF. DR. CAIO CEZAR RANDI FERRAZ

Dedico este trabalho a ...

...Georges, meu marido, pela compreensão, companheirismo, carinho e paciência nesses momentos tão importantes da minha vida.

...meus pais, José Carlos e Léa, e minha irmã Andressa, pelo amor, carinho e incentivo.

Agradeço ...

A Deus, pois se hoje percorro este caminho é porque vós trilhastes, deste-me sabedoria para aprender a discernir, alegria e entusiasmo para transmitir aos que estiveram ao meu lado, coragem para lutar e força para vencer mais esta etapa em minha vida. Peço sua benção para a nova jornada que se inicia.

À minha Orientadora, Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, pelo exemplo de competência e dedicação. Agradeço pelos ensinamentos transmitidos, pela confiança, pelo estímulo a pesquisa, por sua disponibilidade e pelo agradável convívio ao longo de tantos anos.

Ao Prof. Dr. Haroun N Shah, orientador no estágio de doutoramento no laboratório do MISU do HPA (Health Protection Agency), em Londres e pelo exemplo de excelente pesquisador e bom coração. Fez do meu tempo em Londres um dos mais memoráveis de minha vida.

A minha amiga e co-orientadora, Profa. Dra. Morgana Eli Vianna, pelo exemplo de determinação e força de trabalho. Por estar presente em todas as fases da minha escalada. Do início ao fim, presente. Na alegria e na tristeza.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do diretor Prof. Dr. Francisco Haiter Neto e do diretor associado Prof. Dr. Marcelo de Castro Meneghim.

Ao Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior, coordenador geral dos cursos de Pós-Graduação e à Prof. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia, coordenadora do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

Ao Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, responsável pela área de Endodontia da FOP UNICAMP, pela oportunidade da realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco José de Souza-Filho, Prof^a. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz e Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida, professores da disciplina de Endodontia da FOP -UNICAMP, pelos conhecimentos transmitidos e agradável convivência.

Ao Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz, Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida e Prof. Dr. Rogério Castilho Jacinto, componentes da banca examinadora do Exame de Qualificação, pela importante contribuição a este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo para o doutorado (Processo n°04/13234).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento de parte do material utilizado neste trabalho através de verba para Auxílio à Pesquisa, processo n° 05/ 55.

Ao Adailton dos Santos, pela amizade em tantos anos de convivência e sua disponibilidade em nos ajudar em todas as situações possíveis.

À Geovânia Caldas Almeida, estagiária do laboratório de Endodontia, pela disposição em colaborar com todos e pela agradável convivência.

À Wanderly Lima de Almeida, funcionária da área de Endodontia, pela disponibilidade em ajudar e por estar com a porta de sua casa sempre aberta para memoráveis confraternizações.

Aos colegas de doutorado, Adriana, Cláudio, Egas, Helena, José Flávio, Juliana, Luciano, Neylla e Thais pelo companheirismo e amizade construída durante nosso convívio.

Às diversas gerações de alunos da pós-graduação em Endodontia, pela convivência agradável ao longo destes anos e que certamente deixará muitas saudades.

Às minhas queridas roommates e amigas Poliana, Juliana, Luciana e Thais que estarão sempre no meu coração.

Às minhas queridas amigas Juliana, Neylla, Maraísa, Carol e Danna, pela grande amizade, momentos de descontração e alegrias. Vocês fizeram isso aqui ficar muito melhor!

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho; ***Meus sinceros agradecimentos!!!***

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram: identificar a microbiota dos canais radiculares (CR) e bolsas periodontais (BP) de dentes com polpas necrosadas, lesões periapicais, sangramento gengival e bolsas periodontais pelos métodos de cultura microbiológica e PCR; verificar a capacidade do preparo químico-mecânico (PQM) e do uso de medicação intracanal por 7 (clorexidina gel 2%) e 14 dias (hidróxido de cálcio e associação entre hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2%) em reduzir a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) no canal radicular e na bolsa periodontal associada e investigar possíveis associações entre as espécies bacterianas detectadas e entre microrganismos e sinais e sintomas clínicos. Amostras foram coletadas de CR (E1) e BP (P1) antes e após o PQM (E2, P2) e após o uso de medicação (E3, P3). Foram utilizados meio de transporte, cultura e incubação adequados e os microrganismos identificados por testes bioquímicos. O DNA bacteriano das amostras foi extraído e “primers” específicos para *Treponema denticola*, *Treponema socranskii*, *Gemella morbillorum* (*Gm*), *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Prevotella intermedia* (*Pi*), *Prevotella tanneriae* (*Pt*), *Prevotella nigrescens* (*Pn*), *Fusobacterium nucleatum*, *Filifactor alocis*, *Parvimonas micra* (*Pm*) foram utilizados para detecção destas espécies por PCR. Os resultados mostraram que as UFC/mL iniciais médias foram $17,33 \times 10^6$ nos CR e $17,93 \times 10^8$ nas BP, após o PQM foram $15,25 \times 10^4$ nos CR e $8,53 \times 10^8$ nas BP e após o uso das medicações intracanaís $7,6 \times 10^4$ nos CR e de $3,88 \times 10^8$ nas BP. Pela cultura, os microrganismos mais encontrados nos CR foram *Pi/Pn/Pt* e *Fn* em 45% de E1, *Pi/Pn/Pt* (5%), *P propionicum* (5%), *S salivarius* (5%), *M varians* (5%) em E2, *A naeslundii* e *P propionicum* em 36,6% de E3. Nas BP, os mais encontrados foram *Pg* e *Gm* em 50% dos casos de P1, *Pm* em 62,5% de P2 e *Fn* em 73,3% de P3. Por PCR, nos CR e nas BP, em todos os momentos da terapia endodôntica, *Pm* foi o microrganismo mais frequente. Verificou-se que *Pm*, *Td* e *Tf* foram encontrados em maior número em P2 que em E2 e que *Pe* e *Fn* estavam mais

presentes em P3 que em E3. Nas primeiras coletas não houve diferenças estatisticamente significantes. Concluiu-se que, os canais radiculares e as bolsas periodontais de dentes com comprometimento pulpar e bolsa periodontal apresentaram-se infectados com uma combinação de espécies de microrganismos formada principalmente por bactérias anaeróbias estritas e facultativas, gram-positivas, o PQM foi o grande responsável pela redução dos microrganismos dos CR, correlações estatísticas positivas foram observadas entre a presença de sinais e sintomas de origem endodôntica e periodontal e algumas espécies bacterianas, e também entre as espécies, quaisquer das medicações intracanal testadas não foram capazes de alterar ou reduzir a microbiota da bolsa periodontal associada no período de 7 ou 14 dias, não houve diferenças de eficiência antimicrobiana entre as medicações intracanal utilizadas tanto no canal radicular como na bolsa periodontal no período estudado.

PALAVRAS-CHAVES: lesão endo-perio, microrganismos, medicação intracanal, preparo químico- mecânico, PCR, cultura microbiológica, hidróxido de cálcio, clorexidina.

ABSTRACT

The aims of this study were to investigate the microbiota of root canals (RC) and periodontal pockets (PP) from teeth with pulp necrosis, periapical lesion, gingival bleeding and periodontal pockets by culture and PCR; to verify the ability of chemo-mechanical preparation (CMP) and intracanal dressings (2% chlorhexidine, calcium hydroxide and association of both medications) on reducing colony forming unit (CFU/mL) counting in the period of 7 or 14 days in the root canal and periodontal pocket; and to investigate possible associations among detected bacterial species and microorganisms and between signs and symptoms. Samples were collected from RC (E1) and PP (P1) before and after CMP (E2 and P2) and after the use of intracanal dressings (E3, P3). Adequate transport medium, culture, incubation and biochemical tests were used. DNA of samples was extracted and primers species-specific to *Treponema denticola*, *Treponema socranskii*, *Gemella morbillorum* (*Gm*), *Tannerella forsythia* (*Tf*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Porphyromonas endodontalis* (*Pe*), *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Prevotella intermedia* (*Pi*), *Prevotella tanneriae* (*Pt*), *Prevotella nigrescens* (*Pn*), *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*), *Filifactor alocis* (*Fa*), *Parvimonas micra* (*Pm*) were used to detect these species by PCR. The results showed that the average of initial CFU/mL was 17.33×10^6 in RC and 17.93×10^8 in PP, after CMP 15.25×10^4 in RC and 8.53×10^8 in PP and after the use of intracanal medications 7.6×10^4 in RC and 3.88×10^8 in PP. By culture, the most frequent microorganisms in RC were: *Pi/Pn/Pt* and *Fn* in 45% of the E1, *Pi/Pn/Pt* (5%), *P propionicum* (5%), *S salivarius* (5%), *M varians* (5%) in E2, *A naeslundii* and *P propionicum* in 36.6% of the E3. In PP, *Pg* and *Gm* were in 50% of P1 while *Pm* was the most isolated in P2 (62.5%) and *Fn* in P3 (73.3%). By PCR, in both sites, in all moments of the endodontic therapy, *Pm* was the mostly found microorganism. It was verified that *Pm*, *Td* and *Tf* were found in greater number in P2 than in E2; and *Pe* and *Fn* were more presented in P2 than in E2. There were no statistic differences in the initial samples. It was concluded that, RC and PP from teeth with endo-perio lesion were infected with a combination of

microorganisms species, mainly strict and facultative anaerobe bacteria, gram-positives; CMP was responsible for the mainly microbial reduction in root canals and the use of intracanal dressings in the established time did not achieve any antimicrobial effect in adjacent periodontal pockets, positive statistic correlations were noted between detected bacterial species and microorganisms and signs and symptoms, there were no statistic differences in the antimicrobial efficacy among the intracanal dressings in RC and PP in the studied period.

Keywords: endo-perio lesion, microorganisms, intracanal medication, chemo-mechanical preparation, PCR, culture, calcium hydroxide, chlorhexidine.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1.	Interações endodonto-periodonto	5
2.2.	Comunicações fisiológicas	8
2.3.	Comunicações não-fisiológicas	13
2.4	Patogênese	14
2.5	Classificações das lesões endo-periodontais	28
2.6	Microbiota endodôntica e periodontal	42
2.7	Redução bacteriana do preparo químico-mecânico e após o uso de medicações intracanais	64
2.8	Substâncias químicas auxiliares ao preparo químico-mecânico	70
2.9	Medicação intracanal	73
3.	PROPOSIÇÃO	83
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	85
4.1	Seleção da amostra	85
4.2	Aspectos clínicos, radiográficos e análise por cultura microbiológica	86
4.3	Análise por PCR	98
	ANALISE ESTATÍSTICA	105
5.	RESULTADOS	107
5.1	Características Clínicas	107
5.2	Método Clássico de Cultura	108
5.3	PCR	134
6	DISCUSSÃO	143

6.1	Características clínicas das lesões endo-pério	143
6.2	Microbiologia das lesões endo-periodontais	145
7.	CONCLUSÃO	159
	REFERÊNCIAS	161
	ANEXO I	191
	ANEXO II	193
	APÊNDICE I	197
	APÊNDICE II	199
	APÊNDICE III	220
	APÊNDICE IV	245

1 INTRODUÇÃO

Desde 1964, quando Simring and Goldberg descreveram primeiramente a relação entre a doença periodontal e a endodôntica, o termo endo-pério se tornou parte do vocabulário odontológico.

A polpa dentária e o periodonto são duas estruturas anatomicamente distintas, porém inter-relacionadas funcionalmente, visto que ambas as estruturas têm a mesma origem embriológica e formação concomitante (Chilton, 1972).

Anatomicamente existem 3 vias de comunicação entre o espaço pulpar e o periodonto: forame apical, ramificações do canal principal e túbulos dentinários (Prichard, 1982, Gomes *et al.*, 1996a). O forame apical é a maior e a mais importante via de comunicação com o periodonto, permitindo a passagem dos vasos e nervos mais calibrosos do meio externo para o interior do dente, viabilizando a manutenção do tecido pulpar e neoformação dentinária.

A literatura confirma a capacidade da doença pulpar iniciar e perpetuar uma doença periodontal. Contudo, não há consenso na justificativa das alterações patológicas da polpa como extensão da doença periodontal (Harrington *et al.*, 2002). Seltzer *et al.* (1963), Rubach & Mitchell (1965), Kipioti *et al.* (1984), verificaram associação entre doença periodontal e pulpar e concordaram que a hipótese da doença periodontal resultar em necrose pulpar é menos freqüente que o contrário e depende da severidade da doença periodontal, presença de canais laterais e história de tratamento periodontal neste dente. A direta extensão inflamatória da inflamação periodontal através do forame apical ou canais laterais em direção à polpa, incluindo subsequente necrose pulpar foram demonstradas por Seltzer *et al.* (1967), Langeland *et al.* (1974) e Gao *et al.* (1984). Entretanto, polpas normais também foram observadas em dentes com avançada doença periodontal (Mazur & Massler, 1964, Czarnecki & Shilder, 1979).

Recentes publicações sugerem que a doença periodontal é uma causa direta de atrofia e necrose pulpar, sendo mais deletéria à polpa do que cáries ou restaurações (Petka, 2000). Além disso, a doença periodontal e os tratamentos

periodontais deveriam ser lembrados como uma causa potencial de pulpite e necrose pulpar (Wang & Glickman, 2002).

Vários estudos demonstram a importância do uso de uma medicação intracanal com o objetivo de potencializar a sanificação do sistema de canais e túbulos dentinários e impedir que os microrganismos se multipliquem no intervalo entre sessões de tratamento (Byström & Sundqvist, 1981, 1983; Byström, 1985).

É sabido que a eficácia de uma medicação intracanal depende da vulnerabilidade das espécies envolvidas (Gomes *et al.*, 1996 c). Tradicionalmente, o hidróxido de cálcio têm sido utilizado como medicação intracanal pelas suas destacadas propriedades físicas e antimicrobianas. A lenta difusão de íons hidroxila desta medicação, através da dentina infectada, dos túbulos dentinários, ou mesmo a capacidade tampão da dentina, podem impedir sua ação (Haapasalo *et al.*, 2000). Assim, o uso de medicações alternativas como a clorexidina seria uma opção de tratamento quando na presença de microrganismos resistentes (Siqueira & Uzeda, 1996, Haapasalo *et al.*, 2000, Dametto *et al.*, 2005, Gomes *et al.* 2003 a,b, c, Síren *et al.*, 2004).

A clorexidina apresenta atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Greenstein *et al.*, 1986). Além disso, apresenta substantividade (White *et al.*, 1997). Na terapia endodôntica tem sido utilizada como substância química-auxiliar (Ferraz *et al.*, 2001) e como medicação intracanal (Siqueira & Uzeda, 1997).

Através da associação da clorexidina com o hidróxido de cálcio busca-se uma medicação com as seguintes propriedades: capacidade de induzir mineralização aos tecidos, barreira física, amplo espectro antibacteriano, ação residual, baixa toxicidade aos tecidos e difusão pelos túbulos dentinários.

O canal radicular pode funcionar como um compartimento de liberação lenta para difusão de drogas para o periodonto e as medicações acondicionadas nele, na tentativa de se difundirem em direção à superfície radicular externa poderiam, assim, exercer ação na dentina radicular contaminada por microrganismos alojados no interior dos túbulos e conseqüentemente resultar em

um efeito antimicrobiano complementar à terapêutica periodontal (Gomes *et al.*, 2008).

O PCR (técnica da reação em cadeia da polimerase) é um método *in vitro* de replicação de seqüências específicas de DNA, podendo detectar uma célula bacteriana isolada em uma amostra de amplificação de DNA. O PCR apresenta a mais alta sensibilidade quando comparado a qualquer outro método de detecção de microrganismos (Zambon & Haraszthy, 1995). Na literatura, poucos estudos avaliaram através deste método amostras de canais radiculares e bolsas periodontais além das semelhanças entre as microbiotas (Rupf *et al.*, 2000).

Em contrapartida, a técnica clássica de cultura microbiológica, é um método que permite identificar uma gama maior de microrganismos viáveis ao mesmo tempo, além de possibilitar sua quantificação.

Espécies bacterianas encontradas em polpas infectadas são usualmente as mesmas isoladas de bolsas periodontais (Kipioti *et al.*, 1984, Gonçalves *et al.*, 1999) Algumas delas são frequentemente obtidas pelo método de cultura microbiológica como *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*. Entretanto, outros patógenos como *Prevotella nigrescens*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* são de difíceis identificações (Siqueira *et al.*, 2000). Nestes casos, o método de PCR é o mais indicado para detecção.

Não há estudo *in vivo*, na literatura, que avaliaram o efeito da medicação intracanal, microbiologicamente, em bolsas periodontais através da cultura e do PCR.

Neste estudo avaliamos a presença de microrganismos normalmente encontrados em bolsas periodontais no interior do canal radicular. Também investigamos a suscetibilidade destes microrganismos ao preparo químico-mecânico e trocas de medicação intracanal em ambos os locais: endodonto e periodonto, por dois métodos de identificação: cultura microbiológica e PCR.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INTERAÇÕES ENDODONTO-PERIODONTO

O tecido pulpar e os tecidos periodontal periapical e o marginal são embriologicamente semelhantes (Chacker, 1974; Christie & Holthuis, 1990). Durante todo o desenvolvimento dental, a área de tecido mesenquimal é dividida por elementos epiteliais em: folículo dentário, que formará as estruturas periodontais de suporte (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar), e papila dentária que formará o complexo dentina-polpa. A papila dentária é circundada pela bainha epitelial de Hertwig que cresce em direção basal entre o folículo dentário e a papila dentária, mantendo uma abertura em sua base, conhecida como forame apical primário. A confluência contínua desses tecidos na região apical permanece após o completo desenvolvimento dental. Sendo assim, é natural que, estruturalmente, o tecido pulpar próximo ao ápice se assemelhe mais ao tecido do ligamento periodontal naquela área, do que propriamente ao tecido conjuntivo pulpar (Stallard, 1972; Osborn & Ten Cate, 1988).

No processo de formação da região da raiz dental, a projeção apical da bainha epitelial de Hertwig pode ser interrompida por vasos sanguíneos ou nervos passando através dos tecidos mesodérmicos. A indução do desenvolvimento odontoblástico e subsequente deposição de dentina e cimento falha nas áreas onde o tecido indutor, a bainha epitelial radicular, é penetrada por vasos ou nervos. Portanto, um vaso sanguíneo, nervo, ou outro tecido passando através da bainha radicular resulta no desenvolvimento de um canal através do cimento e da dentina, promovendo uma comunicação direta entre o ligamento periodontal e a polpa. O suprimento sanguíneo do aparato de inserção periodontal ganha acesso ao tecido pulpar através de algumas comunicações: canais acessórios, canais laterais, canais da furca, e uma variedade de foraminas apicais (Chacker, 1974; Ten Cate, 1994; Walton & Torabinejad, 1997; Aguiar, 1999). Seltzer *et al.* (1963)

também destacaram que à medida que o germe dentário se desenvolve, estabelecem-se vias anatômicas que comunicam o endodonto e o periodonto, tais como o forame apical (principal delas), os canais laterais e acessórios e áreas permeáveis da dentina e do cimento radicular.

A existência de canais laterais e sua distribuição têm sido estabelecidas e demonstradas por inúmeros métodos. Estes canais contêm células pulpares, substância fundamental, fibras capilares e tecido conjuntivo frouxo, que conectam os sistemas circulatórios da polpa e do ligamento periodontal, provendo um caminho para que as bactérias e toxinas possam se deslocar através da dentina (Santiago & Fonseca, 1983). Tais anastomoses são formadas durante as primeiras fases do desenvolvimento dental, e geralmente são bloqueadas e reduzidas em espessura por deposição contínua de dentina e cimento radicular. Comunicações patentes de diversos tamanhos, números e localizações na raiz, podem, no entanto, permanecer e mediar lesões endodônticas na dentição adulta (Bender & Seltzer, 1972; Santiago & Fonseca, 1983; Lindhe *et al.*, 1999).

A intercomunicação existente entre o dente e as estruturas de suporte permite que processos patológicos dentais possam causar alterações no periodonto e que a presença de doença periodontal possa provocar alterações na normalidade pulpar, sendo estas últimas menos freqüentes (Souza & Machado, 1995).

Em seu estudo de 2004, Carrote concorda que o exame da anatomia dos dentes mostra que existem muitos caminhos entre a polpa e o ligamento periodontal, a serem atingidos por bactérias e seus produtos tóxicos.

Os túbulos dentinários não podem ser excluídos do grupo de comunicações entre a polpa e o periodonto pois atravessam toda a espessura da dentina e, em saúde, são preenchidos com prolongamentos odontoblásticos, fluido tecidual e fibras nervosas (Stallard, 1972; Walton & Torabinejad, 1997). Esses

túbulos podem ser expostos ao meio oral através de lesões cariosas, procedimentos odontológicos, e instrumentação periodontal (Stallard, 1972).

O diâmetro dos túbulos dentinários é inteiramente compatível com o da maior parte das bactérias encontradas na cavidade oral, variando de 2,5 µm próximo à polpa, 1,2 µm na dentina mediana, e 0,4 µm próximo ao cimento (Garberoglio & Brannström, 1976). Os microrganismos capazes de colonizar os canais radiculares possuem tamanho aproximado de 1/3 do diâmetro dos túbulos dentinários, o que facilita a invasão, proliferação e colonização destes no interior da dentina. Entretanto, bactérias irão multiplicar nos túbulos dentinários, no sistema de canais radiculares e nos tecidos periapicais somente se estes ambientes oferecerem condições favoráveis ao seu crescimento (Gomes *et al.*, 1996 d).

Lindhe *et al.* (1999) afirmam que ainda não há uma evidência concreta que indique que um dente despolpado possa afetar de alguma maneira os tecidos periodontais através da parede normal da dentina e do cimento. Complementam que, mesmo que a largura dos túbulos dentinários seja bastante ampla para a passagem das bactérias e seus subprodutos, uma camada intacta de cimento evidentemente atua como uma barreira efetiva para tal penetração nas estruturas periodontais.

Stallard (1972) também revela que comunicações adicionais existem, mas são seladas pela formação de cimento sobre a superfície radicular. Porém estes canais “selados” não são sem importância, pois o cimento muitas vezes é removido durante a doença periodontal e sua terapia, resultando em uma renovada comunicação direta entre a polpa e o ligamento periodontal.

Walton & Torabinejad (1997), afirmam que a remoção do cimento, que forma uma camada impermeável protetora sobre a dentina, durante o tratamento periodontal, profilaxia, ou danos durante lesão traumática podem abrir numerosos canalículos, resultando em comunicação entre o periodonto e a polpa através dos

túbulos dentinários expostos. Do mesmo modo, Carrote (2004) ressalta que, na reabsorção externa, a camada de cimento é perdida em uma porção da superfície radicular, o que permite uma comunicação através dos túbulos dentinários entre o canal radicular e os tecidos periodontais. Os túbulos dentinários podem ser diretamente expostos ao meio oral quando a doença periodontal expõe o colo desprotegido de cimento, após a desorganização do cimento radicular na presença de bolsas periodontais e cárie do cimento, ou após procedimentos periodontais em que camadas do cimento são removidas.

Dessa forma, fica evidente a existência de diferentes tipos de comunicações anatômicas entre a polpa dentária e o periodonto. Essas comunicações são muito importantes quando se referem à inter-relação entre a Periodontia e a Endodontia, pelo papel desempenhado na etiopatogenia das lesões endo-periodontais (Pilatti & Toledo, 2000; Toledo & Rosetti, 2005).

2.2 COMUNICAÇÕES FISIOLÓGICAS

2.2.1 Túbulos Dentinários

Os túbulos dentinários além de servirem para a manutenção da doença periapical como depósitos bacterianos, podem ser considerados uma das principais vias de contaminação pulpar quando expostos às bactérias do meio oral, principalmente após a perda de esmalte ou de cimento. Esses túbulos se estendem da polpa até as junções dentina-esmalte e cimento-dentina. Embora não tenha sido realizada uma quantificação real dos túbulos dentinários, eles são em grande quantidade: aproximadamente 15.000 túbulos em 1 milímetro quadrado de dentina perto da junção cimento-dentina. Devido ao diâmetro e quantidade de túbulos na dentina, os microrganismos são capazes de penetrar, multiplicar-se e

invadir numerosos túbulos expostos (Kettering & Torabinejad, 2000). Entretanto, parece haver uma variação regional na extensão da dentina invadida. O terço cervical é invadido mais extensamente que o terço médio e este, mais que o apical (Love, 2002). Qualquer método utilizado para desinfecção do canal radicular deve ser capaz de acessar e eliminar o máximo de microrganismos possível de todas as partes do sistema endodôntico (Coldero *et al.*, 2002).

Embora ainda pouco exploradas, diversos trabalhos demonstram diferenças estruturais entre a dentina radicular e a coronária, o que pode influenciar a difusão de microrganismos e substâncias neste tecido.

Diferente do que ocorre na região coronária, a trajetória dos túbulos dentinários no maciço radicular é mais retilínea, uma vez que a área superficial ocupada pelo odontoblasto na sua posição inicial de formação não difere da posição final (Ten Cate, 1994).

Os túbulos dentinários percorrem toda a extensão da dentina e ocupam de 20 a 30% do volume total. Apresentam uma conformação cônica, com diâmetro maior próximo a polpa (2,5 μm), diminuindo à medida que se aproxima das regiões amelo-dentinária ou cemento-dentinária (em média 0,9 μm) (Garberoglio & Brannström, 1976).

Na junção dentino-pulpar a concentração de túbulos dentinários é de aproximadamente 45000 unidades/ mm^2 , correspondendo a 22% da área superficial total. No entanto, à medida que se aproxima da periferia, a sua concentração se reduz a 15000 unidades/ mm^2 , ocupando uma área de 1% do total (Lopes & Siqueira Jr, 1999). O número médio de túbulos dentinários por unidade de área em dentina radicular é de 44.243 túbulos/ mm^2 na região cervical, 42.360 túbulos/ mm^2 no terço médio e 8.190 túbulos/ mm^2 na região apical (Carrigan *et al.*, 1984).

O tecido dentinário não é estático. Carrigan *et al.* (1984) ao estudar a concentração de túbulos dentinários em dentes de indivíduos de diferentes faixas

etárias, concluíram que houve uma redução no número de túbulos dentinários por unidade de área à medida que aumentava a idade e se aproximava da área apical. Mjör & Nordahl (1996) demonstraram que há uma rede de canalículos na matriz intertubular estabelecendo conexões entre os túbulos dentinários, sendo encontrados em maior quantidade na dentina radicular, principalmente nas áreas onde a densidade de túbulos dentinários é menor. Esse sistema complexo de interconexões pode afetar diretamente a permeabilidade tecidual, que está relacionada à sensibilidade dentinária, progressão das lesões de cárie e difusão de substâncias bacterianas tóxicas.

Nakabayashi & Pashley (1998) relacionam permeabilidade à facilidade em que uma substância tem em se difundir através de uma barreira, ou seja, um substrato. Segundo estes autores, a permeabilidade dentinária pode ser tanto intra-tubular quanto inter-tubular.

Seltzer (1988) descreve que a dentina produzida pelos odontoblastos na região apical é amorfa e irregular, não seguindo os padrões verificados na dentina dos terços radiculares cervical e médio. Essas características reduziram sua permeabilidade, dificultando o acesso de microrganismos ou outros irritantes ao interior dos túbulos dentinários.

Nagaoka *et al.* (1995) relataram que os túbulos dentinários associados a uma polpa vital dificultam a entrada bacteriana, retardando essa invasão. Outros fatores que influenciam essa progressão são: presença de prolongamento odontoblástico, fluido dentinário e fibras colágenas. No entanto, nos dentes que apresentam polpa necrótica, a invasão dos túbulos dentinários é facilitada. O mesmo acontece para os dentes tratados endodonticamente.

Da mesma forma, Puapichardumrong *et al.* (2005) demonstraram que a presença de componentes pulpares retardou a difusão de substâncias químicas em discos de dentina. Esses autores acreditam que o prolongamento odontoblástico, ao ocupar um espaço considerável da luz do túbulo dentinário,

torna-se uma barreira física importante e capaz de dificultar a invasão bacteriana em dentes com polpa vital.

A permeabilidade da dentina é determinada principalmente pela anatomia dos túbulos dentinários (densidade, diâmetro e profundidade dos túbulos) e pelas características da substância a se difundir (tamanho da molécula e carga) (Pashley, 1990). A difusão de íons com carga negativa como a hidroxila pode ser barrada pela capacidade tampão, pela adsorção e pela carga da dentina. A capacidade tampão da dentina ocorre quando doadores de prótons da camada hidratada da hidroxiapatita, tais como H_2PO_4^- , H_2CO_3 e HCO_3^- , fornecem prótons adicionais com o objetivo de manter o pH da dentina inalterado (Jenkins, 1978).

2.2.2 Forame Apical

O forame apical é a principal e a rota mais perfeita de comunicação entre a polpa e o periodonto. Bactérias e seus subprodutos inflamatórios podem sair através do forame apical para causar alguma patologia periapical. O ápice é também um portal de entrada de subprodutos inflamatórios de bolsas periodontais profundas para a polpa. Inflamação pulpar ou necrose se estendem para os tecidos periapicais causando uma resposta inflamatória local acompanhada de reabsorção óssea e radicular. A terapia endodôntica tem o propósito de eliminar os fatores etiológicos intra-radiculares o que levaria a cura dos tecidos periapicais (Rotstein & Simon, 2004)

Langeland *et al.* 1969, encontraram que a polpa sucumbe somente quando a lesão periodontal envolve o forame apical e de qualquer maneira, se o atingir, apenas pequenas mudanças ocorrem na polpa.

2.2.3 Canais Laterais e Acessórios

Kirkham (1975) investigou a localização e a frequência de canais acessórios em 100 dentes extraídos por motivos periodontais. A injeção de um material radiopaco no interior das câmaras pulpares e dos canais radiculares com subsequente tomada radiográfica. Foram encontrados canais laterais em 23% dos dentes examinados. Destes, apenas 2% localizavam-se na área correspondente à bolsa periodontal.

De Deus (1992) observou, através da técnica de diafanização, em uma análise de 1140 dentes humanos adultos extraídos, que 27,4% dos dentes apresentaram canais laterais, secundários e acessórios, sendo localizados em sua grande maioria (17%) na área apical. Na região de bi e trifurcação dos molares e pré-molares estudados, 2,3% apresentavam-se com canais laterais que emanavam do canal principal. O autor ainda cita como comunicações diretas entre a cavidade pulpar e o ligamento periodontal as ramificações da cavidade pulpar (forame apical, foraminas, deltas apicais e os canais acessório, secundário, lateral e cavo inter-radicular), os túbulos dentinários em situações especiais e, eventualmente, as reabsorções de origem endodôntica, as perfurações dos canais radiculares, as fraturas radiculares totais ou parciais e os defeitos anatômicos (fissuras) das coroas de alguns dentes.

Seltzer *et al.*, em 1967, observaram alterações periodontais inter-radulares em cachorros e macacos após induzir pulpotomias e concluíram que a extensão das lesões inflamatórias pulpares aparentemente ocorre através de canais acessórios ou laterais situados na região de furca.

2.2.4 Sulco Palato-Gengival

É uma anomalia de desenvolvimento encontrada nos incisivos superiores, dos quais os incisivos laterais são mais frequentemente afetados que os centrais. Esse sulco normalmente começa na fossa central, atravessa o cíngulo e se estende apicalmente (Rotstein & Simon, 2004).

2.3 COMUNICAÇÕES NÃO-FISIOLÓGICAS

Perfurações radiculares criam uma comunicação entre o sistema de canais e o ligamento periodontal. Isso pode ocorrer como resultado de uma instrumentação excessiva durante os procedimentos endodônticos, reabsorções externas e/ou internas ou cáries invadindo o assoalho de câmaras pulpares. Quanto mais próxima a perfuração está do sulco gengival ou bolsa periodontal, particularmente no terço cervical da raiz ou região de furca, maior é a probabilidade de um problema periodontal (Meng, 1999).

As fraturas verticais ocorrem ocasionalmente e podem ser vistas radiograficamente como um efeito de halo em volta do dente afetado. O local da fratura proporciona uma porta de entrada para bactérias e suas toxinas, fungos e vírus, além de corpos estranhos, colesterol, corpúsculo de Russel, corpúsculos hialinos de Rushton e cristais de Charcot-Leyden do sistema de canais radiculares para o ligamento periodontal que o circunda (Rotstein & Simon, 2004, Meng, 1999).

2.4 PATOGÊNESE

2.4.1 Doença pulpar e o Periodonto

A maior parte das doenças que atingem polpa e os tecidos perirradiculares são relacionadas tanto diretamente como indiretamente a microrganismos. As bactérias podem seguir vários caminhos para invadir e infectar a polpa. Além dos caminhos apresentados acima, a anacorese pode contribuir para as infecções pulpares e perirradiculares (Baumgartner, 2002). A condição da polpa é um importante fator na suscetibilidade a invasão microbiana. A polpa viva é muito resistente a invasão de microrganismos. A penetração da superfície de uma polpa sadia por bactérias orais é relativamente lenta ou pode ser inteiramente bloqueada. Em contrapartida, uma polpa necrosada é rapidamente invadida e colonizada (Rotstein & Simon 2004).

Aproximadamente 500 espécies bacterianas são reconhecidas como microbiota oral normal, somente um pequeno grupo é comumente isolado de cavidades pulpares de dentes infectados. Há um predomínio estritamente de microrganismos anaeróbicos (mais de 90%), com alguns anaeróbios facultativos e raramente aeróbicos. Isto sugere um processo seletivo favorecendo o crescimento de anaeróbios. A proporção relativa de bactérias anaeróbias para facultativas e aeróbias aumenta com o tempo, assim como a quantidade total de microrganismos (Baumgartner, 2002, Baumgartner & Hutter, 2001). De acordo com os mais recentes trabalhos, presume-se que 700 espécies bacterianas habitam a cavidade oral e mais de metade não pode ser cultivada (Socransky & Haffajee, 2005, Sakamoto *et al.*, 2005). Combinações específicas entre bactérias são encontradas nos canais radiculares e podem contribuir para mudanças ecológicas da microbiota por diferentes mecanismos de interação (Peters *et al.*, 2002).

A polpa dental é um órgão vascular, um tecido conjuntivo frouxo, especializado, de origem mesodérmica, contendo estruturas adaptadas às suas funções específicas e com um metabolismo muito intenso, em cuja intimidade ocorrem inúmeras reações biológicas. É constituída por elementos: (1) celulares: células mesenquimais indiferenciadas, odontoblastos, fibroblastos e células de defesa; (2) extracelulares: fibras e substância fundamental; (3) elementos de suporte: suprimento sanguíneo (capilares, arteríolas e vênulas) e linfáticos; e (4) nervos: feixes de nervos mielínicos e não-mielínicos (De Deus, 1992).

As principais alterações patológicas que acometem a polpa e os tecidos periradiculares são de natureza inflamatória. A inflamação é a principal resposta dos referidos tecidos a uma gama variada de estímulos que causam injúria tecidual. A agressão à polpa pode ser de origem biológica (cáries, bactérias e seus produtos tóxicos), física (térmica ou mecânica, como procedimentos restauradores, traumas), ou química (Simring & Goldberg, 1964; Belk & Gutmann, 1990; Lopes & Siqueira Jr, 1999).

Quando a polpa se torna necrosada, há uma resposta inflamatória direta do ligamento periodontal na região do forame apical e/ou canais acessórios pelo egresso de bactérias e seus produtos para os tecidos periradiculares. A ocorrência de uma lesão no periápice (Lopes & Siqueira Jr, 1999), seguindo as áreas de menor resistência tecidual, pode originar canais de drenagem via periodonto, estabelecendo uma interação patológica (Toledo & Rosetti, 2005). Isso está relacionado às respostas inflamatória e imunológica do hospedeiro com o intuito de conter o avanço da infecção endodôntica (Lopes & Siqueira Jr, 1999).

É um fato bem conhecido que a doença pulpar pode levar à destruição do aparato periodontal através do forame apical e canais laterais e acessórios (Solomon *et al.*, 1995; Walton & Torabinejad, 1997; Toledo & Rosetti, 2005). A saída de agentes irritantes de polpas necrosadas através, principalmente, do forame apical para dentro dos tecidos periradiculares inicia e perpetua uma

resposta inflamatória cujas conseqüências incluem destruição do ligamento periodontal e reabsorção do osso, do cemento e até mesmo da dentina (Walton & Torabinejad, 1997).

Em 1967, Seltzer *et al.*, estudaram a possibilidade do desenvolvimento de lesões periodontais inter-radiculares resultantes da indução de lesões pulpares inflamatórias por exposição pulpar mecânica em dentes permanentes de animais experimentais. Notaram uma alta incidência de canais laterais comunicando o assoalho da câmara pulpar e o ligamento periodontal em dentes posteriores de macacos e cachorros, acreditando haver paralelo entre o desenvolvimento das lesões periodontais da região de furca nestes animais e a formação de tais lesões em humanos. Alterações nos tecidos inter-radiculares foram detectadas em 21 dos 100 dentes examinados. Após 30 a 90 dias, o reparo das lesões inflamatórias do ligamento periodontal havia ocorrido; embora, em cinco deles, a inflamação crônica periodontal tenha persistido com reabsorção contínua da crista óssea. Os autores concluíram que lesões periodontais inter-radiculares podem ser iniciadas e perpetuadas por polpas inflamadas ou necróticas, através de canais acessórios ou laterais situados na região da furca de pré-molares e molares de cachorros e macacos.

Qualquer porção do periodonto pode ser afetada como resultado do envolvimento pulpar. Bender & Seltzer (1972) encontraram tecido de granulação emanando do tecido inflamado de canais laterais e foraminas acessórias, como uma extensão da inflamação pulpar crônica. A pronta difusão de restos pulpares severamente inflamados ou mesmo necróticos para o ligamento periodontal foi encontrada, onde os canais laterais e acessórios são encontrados em maior número. Especialmente em molares, numerosos canais laterais, acessórios e foraminas acessórias foram encontrados entre as raízes, nas regiões de bifurcação e trifurcação (Seltzer *et al.*, 1963; Bender & Seltzer, 1972).

A saída de agentes irritantes de polpas comprometidas patologicamente para o interior dos tecidos periradiculares (De Deus, 1992; Walton & Torabinejad, 1997) resulta em graus variados de alterações no periodonto. A natureza e a extensão da lesão inflamatória depende de vários fatores, como a virulência dos agentes irritantes no sistema do canal radicular, defesa do hospedeiro e duração da doença (Walton & Torabinejad, 1997)

É importante perceber que, do ponto de vista diagnóstico, enquanto a polpa mantiver suas funções vitais, mesmo que inflamada ou cicatrizada, é improvável que ela produza irritantes capazes de causarem problemas no periodonto. Já processos inflamatórios no periodonto, associados às polpas necróticas, têm uma clara etiologia infecciosa, podendo desenvolver-se em qualquer local onde exista comunicação direta com a câmara pulpar (Lindhe *et al.*, 1999).

Walton & Torabinejad (1997) incluem também, além da doença pulpar, procedimentos endodônticos como possíveis causas de alterações patológicas no periodonto. Alterações iatrogênicas podem resultar em uma lesão que se assemelha à lesão periodontal. Uma reação inflamatória aguda pode se desenvolver no periodonto com reabsorção do cimento e do osso alveolar após pulpectomia. Além disso, o esvaziamento e instrumentação do sistema de canais radiculares podem empurrar resíduos para o interior do ligamento periodontal, o que poderá induzir dor e reação inflamatória periapical, assim como o extravasamento de limas, ou materiais obturadores para o periodonto (Walton & Torabinejad, 1997; Fachin *et al.*, 2001). Acidentes de procedimento como perfuração do assoalho da câmara pulpar, ou perfurações radiculares também lesam o periodonto, sendo as perfurações, em especial, progressivamente destrutivas, resultando, com frequência, em defeitos periodontais. Da mesma forma, a fratura radicular vertical durante a colocação de um núcleo intra-radicular, frequentemente produz defeitos de sondagem que simulam doença periodontal (Walton & Torabinejad, 1997). Ainda, se os procedimentos de desinfecção

endodôntica forem deficientes, observa-se retardo ou prejuízo no reparo de um periodonto inflamado (Fachin *et al.*, 2001).

Em um estudo retrospectivo clínico comparando a cura periodontal clínica em dentes periodontalmente envolvidos com e sem patologia pulpar, Ehnevid *et al.* (1993) concluíram que uma infecção do canal radicular evidente como uma radiolucência periapical, se deixada sem tratamento, em uma perspectiva de longo prazo poderá retardar ou prejudicar a cura periodontal após a terapia periodontal. Embora a diferença média extrapolada (0,5 a 1mm) na redução da profundidade de sondagem entre dentes com e sem patologia periapical em um período de observação estendido possa parecer insignificante do ponto de vista clínico, a carga adicional de uma destruição periapical para a cura periodontal deve obter atenção apropriada para o plano de tratamento individual.

Jansson *et al.* (1993) realizaram um estudo no qual foi comparada a profundidade de sondagem periodontal em dentes com e sem patologia endodôntica periapical, e foi possível verificar que a patologia periapical é relacionada com o aumento da profundidade de sondagem na ausência de destruição óssea vertical. Da mesma forma, Ehnevid *et al.* (1993) demonstraram que dentes envolvidos periodontalmente tinham bolsas mais profundas quando eram acompanhados de infecção endodôntica. A infecção do canal radicular provoca reações inflamatórias no periodonto e causa também crescimento epitelial dentro dos tecidos conjuntivos comprometidos. Os autores concluíram então, que a infecção endodôntica sem tratamento por um longo período de tempo, pode resultar em um retardo da cicatrização periodontal, mesmo que o tratamento periodontal já tenha sido instituído. Por isso o tratamento deve ser bem coordenado, incluindo as terapias endodôntica e periodontal.

Em 1983, Sanders *et al.* relataram que após o uso de enxerto de osso liofilizado, 65% dos dentes que não tinham tratamento endodôntico mostraram regeneração óssea completa ou maior do que 50% dos defeitos ósseos

periodontais. Enquanto apenas 33% dos dentes que tinham tratamento endodôntico antes do procedimento de cirurgia periodontal obtiveram regeneração óssea completa ou maior do que 50%. Os autores sugerem que ao menos parte do pequeno sucesso pode ter sido devido à dificuldade em diagnosticar patologia endodôntica contínua, pois admitem que, em ao menos um caso, um canal pobremente obturado foi encontrado; suspeitando que certo número de obturações endodônticas não estivesse adequado.

Em 1979, Nyman & Lindhe, avaliaram um grupo de pacientes que haviam perdido 50% ou mais do suporte ósseo periodontal. Após tratamento periodontal e restaurador protético, foram acompanhados por um período de 5 a 8 anos. Ao se comparar as medidas da altura do osso alveolar interproximal referente aos dentes pilares das próteses, que tinham canais tratados, com os dentes pilares vitais, eles observaram que a altura óssea foi mantida igualmente bem ao redor dos dentes pilares com canal tratado, assim como ao redor dos dentes vitais.

A doença pulpar poderá causar sérios danos ao periodonto circundante (Bender & Seltzer, 1972; Solomon *et al.*, 1995; Walton & Torabinejad, 1997; Toledo & Rosetti, 2005), pela difusão de seus restos pulpares severamente inflamados ou necróticos (Bender & Seltzer, 1972) através, principalmente, do forame apical, para dentro dos tecidos periradiculares (Walton & Torabinejad, 1997), gerando destruição periodontal.

2.4.2 Doença Periodontal e a Polpa

Doenças periodontais são causadas por microrganismos que colonizam a superfície do dente no limite ou abaixo da margem gengival. As bactérias podem se ligar ao dente, nas células epiteliais do periodonto e na bolsa periodontal, a tecidos conjuntivos e a outras bactérias que estão nestes tecidos. Complexos

microbianos que colonizam a área subgengival, como biofilme, podem promover uma variedade de interrelações com o hospedeiro, indo desde prevenir até causar doença. A doença periodontal é dependente da ocorrência de um número de fatores simultâneos para a iniciação e progressão tais como virulência dos patógenos periodontais, ambiente local e suscetibilidade do hospedeiro. É sabido que aproximadamente 15 genes pertencentes ao hospedeiro estão envolvidos na doença periodontal em humanos (Kinane & Hart, 2003).

Não há uma única causa para infecções periodontais e nenhum tratamento sozinho pode controlar a doença.

Foi mostrado que a placa subgengival contém aproximadamente 350 espécies bacterianas cultiváveis sendo que por volta de 100 delas podem ser encontradas em amostras de um único indivíduo (Consensus report, 1996).

Estudos diferentes que utilizam critérios tais como associação entre patógenos e doenças, eliminação de espécies e remissão paralela da doença, resposta do hospedeiro, fatores de virulência, modelos animais, checkerboard DNA-DNA hybridisation e PCR, fizeram possível associar diferentes bactérias com diferentes doenças periodontais. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* (*T forsythia*), *P intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Peptostreptococcus micros* (*P micra*), espécies de *Eubacterium* são os mais conhecidos patógenos periodontais. Análises da placa subgengival demonstraram que certas espécies frequentemente ao encontradas em complexos (Socransky & Haffajee, 2003). Os complexos vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*) e laranja (*P intermedia*, *P nigrescens*, *P micra*, *F nucleatum vicentii*, *F nucleatum nucleatum*, *F nucleatum polymorphum*, *F periodonticum*) são os que aparecem com maior frequência na placa subgengival enquanto o verde (*E corrodens*, *C gingivalis*, *C sputigena*, *C ochracea*, *C concisus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) e o roxo (*V parvula*, *A odontolyticus*) são mais comuns na placa supragengival (Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000).

A literatura a respeito da influência da doença periodontal sobre o tecido pulpar ainda é controversa, embora a transmissão de doença da polpa para os tecidos periodontais seja possível e bem comprovada (Bergenholtz & Lindhe, 1978; Czarnecki & Schilder, 1979; Harrington, 1979; Simon, 1982; Kipioti *et al.*, 1984; Torabinejad & Kiger, 1985; Belk & Gutmann, 1990; Zubery & Kozlovsky, 1993; Chen *et al.*, 1997; Walton & Torabinejad, 1997; Harrington *et al.*, 2002; Aqrabawi & Jarbawi, 2004; Carrote, 2004; Toledo & Rosetti, 2005).

Fachin *et al.* (2001) ressalta que diferenças na concentração e na potência dos agentes irritantes dentro do canal radicular necrótico comparadas com aquelas do periodonto podem explicar porque a gravidade das reações inflamatórias difere em cada tecido. Na doença periodontal, a resposta às bactérias é imunológica ou inflamatória e o periodonto é substituído por tecido granulomatoso com células de defesa. Já, na necrose pulpar, a polpa não é acessível às defesas do hospedeiro e contém agentes irritantes muito potentes que causam alterações patológicas no periodonto. Assim, observa-se muito mais facilmente patologias pulpares afetando o periodonto do que o contrário.

Em um estudo, Seltzer *et al.* (1963) examinaram histologicamente 85 dentes com evidência de doença periodontal (bolsas profundas, reabsorção óssea inter-radicular, reabsorção radicular lateral e mobilidade), dos quais 53 apresentavam lesões cariosas, restaurações ou ambos, e os 32 dentes restantes eram livres de cavidades ou de sinais de interferência operatória prévia (hígidos). Os autores, em correlação com o diagnóstico histológico, encontraram como efeitos das lesões periodontais na polpa: atrofia, inflamação e reabsorção. Polpas atróficas foram encontradas em 23 dentes (27%), incluindo calcificações distróficas quase obliterando a porção coronária da polpa, e a formação de dentina reparadora, que é altamente irregular, estreitando excessivamente os canais radiculares. Destes, 12 dentes estavam entre o grupo de dentes hígidos, apresentando variados graus de atrofia. Lesões inflamatórias foram descobertas em 42 dentes com envolvimento periodontal (49%) e necrose pulpar em 15 (18%),

sendo que destes, apenas 3 dentes são pertencentes ao grupo de dentes hígidos. Essas observações parecem indicar, segundo o autor, que as lesões periodontais produzem um efeito degenerativo na polpa dental dos dentes envolvidos. Dentes com a combinação dos irritantes pulpar e periodontal têm uma maior incidência de reação inflamatória ou necrose (79%) do que os dentes com apenas lesão periodontal ou apenas cáries ou restaurações (61%).

Bender & Seltzer (1972) também relatam que dentes com doença periodontal somada a cáries, restaurações ou ambos mostram menor predisposição a ter polpas intactas, sem inflamação. Os autores afirmam ainda que os dentes com doença periodontal produzem uma alta incidência de degeneração e inflamação da polpa. A doença periodontal produz lesão inflamatória tanto na polpa apical quanto na polpa radicular, sendo esta última geralmente vista em associação com canal lateral que se comunica com a lesão periodontal. Os autores defendem que uma pulpíte secundária causada por uma lesão periodontal pode existir. Em sua revisão histológica de 178 dentes, para determinar os efeitos da doença periodontal sobre a polpa, o grupo constituído de 57 dentes com doença periodontal e sem cáries ou restaurações, apresentou 21% de polpas intactas e sem inflamação. Em apenas 10% dos dentes ocorreu necrose pulpar; e 32% mostraram polpas atróficas. Os autores observaram abundante calcificação distrófica, muitas vezes obliterando a porção coronária da polpa, tecido fibroso, e também canais radiculares eram excessivamente estreitados pela deposição de grandes quantidades de dentina reparadora (altamente irregular) nas paredes dentinárias. Em alguns casos o canal principal parecia, radiograficamente, estar completamente calcificado, embora calcificação completa nunca tenha sido observada histologicamente.

Kipioti *et al.* (1984) examinaram a microbiota bacteriana de canais radiculares e de bolsas periodontais de dentes com doença periodontal avançada, para comparar a microbiota cultivável predominante nos canais, com aquela encontrada nas bolsas periodontais associadas. Os dentes estudados tinham

profundidade de bolsa de, no mínimo, 7mm em dois sítios do dente, coroas clínicas intactas e sem cárie detectável clínica ou radiograficamente, ausência de lesão periapical, e indicação clínica para exodontia, do ponto de vista periodontal. Nenhum dos pacientes havia sido tratado com antibióticos pelos últimos três meses. Nesse estudo foi possível detectar apenas os estágios finais do processo (necrose). Um número limitado destes dentes (36,2%) continha polpas necróticas. Portanto, é possível que as bolsas profundas encontradas em periodontites crônicas possam levar à infecção pulpar e possivelmente à necrose, mas este nem sempre foi o caso. Em 10 de 16 casos nenhuma bactéria foi encontrada e as polpas apresentavam vitalidade. Este estudo demonstrou que os microrganismos presentes nos canais radiculares de dentes livres de cáries com periodontite avançada, geralmente assemelham-se àqueles encontrados nas bolsas periodontais associadas. As espécies de bactérias encontradas em um local eram similares àquelas vistas no outro, sugerindo que a bolsa periodontal poderia ser a fonte para estas infecções não-cariosas dos canais radiculares. Os autores concluíram, então, que a microbiota da bolsa periodontal deve invadir a polpa e levar à patologia pulpar.

Contrariamente, Chacker (1974) acredita que à medida que a periodontite progride e a crista óssea é perdida, as áreas de cemento que permanecem cobertas por tecido inflamatório não servem como pontos de entrada para microrganismos ou agentes tóxicos para o tecido pulpar. Mesmo nos vasos sanguíneos de um canal lateral que passam pela área, a inflamação no tecido periodontal não pode logicamente levar à inflamação na polpa do dente em questão, uma vez que o processo inflamatório é levado pela circulação venosa, e as veias saem da polpa. Ao invés disso, o autor propõe duas rotas pelas quais os agentes nocivos poderiam ter acesso à polpa: canais laterais expostos, ou túbulos dentinários expostos por instrumentação, dano microbiano direto ao cemento, ou por cemento doente poderiam servir como um caminho de entrada, um acesso direto dos microrganismos e seus produtos tóxicos para a polpa. Da mesma

forma, De Deus (1992), afirma que quando um grande número de canalículos dentinários é exposto à doença periodontal, há possibilidade de que a polpa seja afetada, dependendo do estímulo e da resposta pulpar.

Em um estudo com 60 dentes unirradiculares, sendo 30 portadores de periodontite do adulto (PA), e os outros 30 portadores de periodontite de início precoce (PIP), todos vitais e hígidos, apresentando destruição de todo o osso de suporte até o ápice radicular, Aguiar (1999) demonstrou que dentes vitais, isentos de cárie, abrasão, atrição, erosão, restaurações e/ou tratamento periodontal prévio, quando da presença de PA ou PIP, apresentam diversas patologias pulpares. Observaram histologicamente as seguintes alterações: atrofia pulpar, dentina reparadora, fibrose, calcificação distrófica e infiltrado inflamatório crônico.

Segundo Seltzer *et al.* (1963), o efeito da lesão periodontal na polpa advém da interferência no suprimento nutricional das células pulpares induzindo a alterações atróficas e outras degenerações do tecido pulpar, tais como: redução do número e tamanho das células, maior deposição de colágeno, fibroses, calcificações distróficas, formação de dentina reparativa, inflamações e reabsorções. Os mesmos autores, em concordância com Bender & Seltzer (1972), verificaram reabsorções da superfície radicular subjacentes a tecido de granulação cobrindo as raízes; e quando as lesões periodontais eram profundas, reabsorções eram também encontradas dentro e junto aos canais laterais e foramina apical, inclusive células inflamatórias detectadas nos tecidos pulpares apicais.

Por outro lado, Czarnecki & Schilder (1979) examinaram histologicamente 46 dentes humanos com variados graus de envolvimento periodontal, mas sem história de tratamento, e no grupo com maior severidade da doença periodontal, constituído por 34 dentes, foi constatada necrose pulpar em apenas 6 dentes, estando os outros 28 com polpas normais, sendo que todos os casos de necrose ou de inflamação pulpar foram encontrados em dentes com cáries, grandes restaurações ou ambos. Todos os dentes com a coroa clínica

intacta tinham polpas dentro dos limites de normalidade, independentemente do grau de envolvimento periodontal. Os autores concluíram que as alterações pulpares estavam correlacionadas com cáries profundas ou restaurações coronárias extensas, de forma independente da presença, ausência ou severidade da doença periodontal; e não encontraram correlação entre a severidade da doença periodontal e a presença ou ausência de patologia pulpar.

Bergenholtz & Lindhe, em 1978, induziram inflamação e destruição periodontal em macacos. O acúmulo de placa subsequente após cinco a sete meses causou perda dos tecidos de suporte em 30% a 40% das raízes. Um grupo não recebeu nenhum outro tratamento; o outro foi submetido a raspagem e alisamento radicular, e após isso, foi permitido que placa se acumulasse nas raízes recém-raspadas. A análise histológica destes 92 dentes com periodontite induzida, em comparação com dentes de periodonto normal, revelou alterações patológicas da polpa em 57% dos dentes. Formação de dentina secundária e/ou infiltrado de células inflamatórias foram observados em áreas localizadas da polpa, subjacentes a superfície radicular exposta à destruição do tecido periodontal. Estas alterações teciduais da polpa foram de natureza leve, e apenas um dente apresentou sinais de necrose pulpar. Concluíram então, que a destruição periodontal e acúmulo de placa bacteriana na dentina radicular exposta não causam severa alteração na polpa das raízes envolvidas. Sugerem também que a presença de uma camada de cemento intacta parece ser importante na proteção da polpa em relação aos elementos opressores produzidos pelas lesões periodontais (Bergenholtz & Lindhe, 1978). Além disso, outra possível razão para a ausência de reações pulpares adicionais à formação de placa na dentina, seria o fato de os túbulos dentinários da camada externa da dentina serem mais largamente espaçados, e terem seu diâmetro mais estreito na periferia do que na superfície (Bergenholtz & Lindhe, 1978; Chen *et al.*, 1997).

Borba *et al.*, 2002, avaliaram a sensibilidade pulpar em 111 dentes com bolsas periodontais com profundidade maior ou igual a 6 mm, onde 79,3% das

bolsas periodontais tinham profundidade média entre 6 a 8mm e 20,7% profundidade média entre 9 e 12mm. Verificaram que, em ambas as situações, a resposta a sensibilidade pulpar, independente do teste aplicado, foi maior para o grau 2 (65,9%) que seria um grau leve a moderado de percepção de dor ligeira que cessa em 1 a 2 segundos depois da remoção do estímulo. Enquanto nos dentes controle, sem bolsas periodontais, 100% apresentaram sensibilidade pulpar também no mesmo grau 2. Os autores comprovaram também a superioridade do teste ao frio em relação ao teste térmico ao calor. Ao investigar se o tipo de dente com bolsa periodontal poderia influenciar nas respostas dos testes da condição pulpar, verificou-se no teste térmico ao frio, que em todos os tipos de dentes (incisivos, caninos, pré-molares e molares) o grau 2, sintomatologia pulpar positiva, foi o que apresentou percentuais mais elevados (71,2%), enquanto para o grau 1 (ausência de sintomatologia), houve um aumento destes percentuais nos dentes molares (32,4%), e grau 3 (sintomatologia de pulpite reversível), para o grupo de dentes incisivos (36,1%). Ao comparar com o grupo controle (vizinhos ou contralaterais, sem bolsas periodontais) em todos os tipos de dentes, 100% obteve-se resposta no grau 2. Constatou-se que a maioria dos dentes experimentais (79,3%) apresentaram profundidade de bolsa variando entre 6 e 8mm, sendo que 67,6% das mesmas apresentaram resposta no grau 2, enquanto as bolsas com profundidade média variando entre 10 a 12mm (12,6%), a resposta pulpar ao teste térmico ao calor foi maior para o grau 1 (54,1%). Independente da profundidade e dos testes aplicados, verificou-se que a maioria dos dentes com bolsas periodontais responderam com sintomatologia pulpar positiva (grau 2).

Ao examinar clínica e histologicamente 25 dentes de um paciente com variados graus de perda óssea resultante de doença periodontal, Torabinejad & Kiger (1985) concluíram não haver nenhuma correlação entre a severidade da doença periodontal e alterações morfológicas no tecido pulpar.

Mazur & Massler, em 1964, estudando a influência da doença periodontal na polpa dental, também não encontraram correlação entre o envolvimento periodontal do dente e suas alterações pulpares; concluindo que o estado da polpa pode ser completamente independente do tipo e extensão da doença periodontal, e que a polpa não reflete necessariamente a severidade da doença periodontal.

Em 12 casos de ressecção radicular vital e cirurgia periodontal em molares maxilares com envolvimento periodontal severo, não foram encontradas células inflamatórias, ou encontrou-se muito pouco infiltrado celular inflamatório no tecido pulpar das raízes ressecadas estudadas. Apesar do fato de estas raízes estarem total ou quase totalmente envolvidas por doença periodontal. Calcificação distrófica e nódulos pulpares, entretanto, eram proeminentes (Haskell *et al.*, 1980).

Ross & Thompson, em 1978, avaliaram o progresso de pacientes com molares maxilares com envolvimento de furca por um período de 5 a 24 anos. Dos 387 dentes estudados, 79% tinham 50% ou menos de suporte ósseo ao redor da raiz, antes do tratamento periodontal. Apenas 4% (14 de 380 dentes vitais) necessitaram de tratamento dos canais radiculares após a terapia periodontal, e é da opinião do autor que em todos estes casos, a necessidade de tratamento endodôntico resultou de cáries ou degeneração pulpar sob restaurações.

Em uma análise retrospectiva, de 4 a 13 anos, para determinar a freqüência e o acometimento das complicações endodônticas em 52 pacientes tratados para doença periodontal avançada, Bergenholtz & Nyman (1984), compararam dentes que foram usados como pilares de próteses fixas e dentes não pilares. Observaram que 3% dos dentes não usados como pilares (14 de 417 dentes) necessitaram do tratamento endodôntico durante o período de preservação. Necrose pulpar se desenvolveu com uma freqüência significativamente maior em dentes pilares do que nos outros (15% vs. 3%). O

autor cita como razões, a progressão da doença periodontal até envolver o ápice radicular, cáries, fraturas coronárias e razões desconhecidas.

Harrington *et al.* (2002) destacam que a polpa tem um sofisticado sistema vascular para um tecido relativamente primitivo. Vastas redes de leitos capilares têm demonstrado sofisticados sistemas de controle, incluindo esfíncteres pré-capilares e comunicações arteriovenosas; além de um sistema linfático ativo. Como a eficiência do sistema vascular de um tecido é a chave para sua adequada função, estas observações fisiológicas sugerem que a polpa dental tem mecanismos que provêem uma significativa capacidade de sobrevivência, mesmo na presença de um problema periodontal inter-relacionado.

A resposta pulpar frente à doença periodontal parece ser mais reparadora (envolvendo rápida deposição de dentina) do que inflamatória (Chen *et al.*, 1997; Fachin *et al.*, 2001). Afirmação que sugere a ocorrência com maior frequência de alterações leves da polpa dental como atrofias ou calcificações, em detrimento de alterações mais severas onde ocorra, em última análise, o comprometimento da vitalidade pulpar. Corroborando com as afirmações de Harrington *et al.*, em 2002, quando enfatiza que a polpa tem um sofisticado sistema de defesa, tornando-a capaz de sobreviver a diversos insultos.

2.5 CLASSIFICAÇÕES DAS LESÕES ENDO-PERIODONTAIS

As lesões endo-perio são difíceis de classificar, pois faltam manifestações características de lesões estritamente endodônticas, ou estritamente periodontais além de dificuldade de conseguir o histórico do dente (Haueisen & Heidemann, 2002).

A primeira classificação das lesões endo-perio baseada na etiologia, diagnóstico e prognóstico do dente envolvido foi proposto por Simon *et al.*, 1972.

Segue algumas classificações:

A- A classificação de Simon *et al.* (1972), delinea cinco tipos de lesões inter-relacionadas:

1) Lesões Endodônticas primárias: clinicamente são lesões que podem drenar pela área do sulco gengival, com ou sem edema ou tumefação da gengiva inserida vestibular, dando uma impressão clínica inicial de serem de origem periodontal. Dor, geralmente, não está presente. Na realidade são tratos fistulosos resultantes da lesão pulpar. Radiograficamente, diferentes níveis de perda óssea podem ser aparentes, dependendo do caminho da fístula. É imperativo que um cone de guta-percha seja introduzido no trato fistuloso e radiografado para determinar a origem da lesão, embora, se não houver resposta aos testes de vitalidade, é evidente que uma polpa necrótica é a causa. Além disso mínima quantidade de placa e cálculo deve ser encontrada. São na verdade fístulas de origem endodôntica, e a cura resultará do tratamento endodôntico apenas.

2) Lesões Endodônticas primárias com envolvimento periodontal secundário: decorrido um período de tempo, se a lesão endodôntica primária permanecer sem tratamento, pode, então, se tornar secundariamente envolvida pelo colapso periodontal. A formação de placa na margem gengival poderá resultar em periodontite. Este dente agora requer terapia endodôntica e terapia periodontal, sendo que o prognóstico dependerá da terapia periodontal (supondo tratamento endodôntico adequado).

3) Lesões Periodontais primárias: causadas especificamente pela doença periodontal. A sondagem geralmente revela cálculo na superfície radicular, e a polpa responde com vitalidade aos testes endodônticos.

4) Lesões Periodontais primárias com envolvimento Endodôntico secundário: conforme a doença periodontal progride em direção ao ápice radicular, os canais laterais e acessórios podem ser expostos ao meio oral,

levando a polpa à necrose. Além disso, a necrose pulpar pode resultar de procedimentos periodontais quando o suprimento sanguíneo de canais acessórios ou do ápice é rompido. É radiograficamente indistinguível das lesões endodônticas primárias com envolvimento periodontal secundário. Necessita das terapias endodôntica e periodontal, sendo que também terá seu prognóstico dependendo da terapia periodontal.

5) Lesões Endo-Pério Combinadas Verdadeiras: são aquelas onde existe lesão periapical induzida endodônticamente em um dente que também está com envolvimento periodontal (Simon *et al.*, 1972). São a ocorrência e progressão simultânea das patologias endodôntica e periodontal (Simon *et al.*, 1972; Christie & Holthuis, 1990). Uma fratura radicular que tenha penetrado na polpa resultando em necrose, também pode ser classificada como uma lesão endo-pério verdadeira.

B- Classificação de Walton & Torabinejad, em 1997, se baseia nos vários tipos de defeitos periodontais norteados em resultados de procedimentos diagnósticos clínicos. Estas alterações periodontais podem ser classificadas em três tipos:

1) Origem endodôntica: estão associadas com dentes com polpas necrosadas. A sondagem mostra sulcos normais ao redor do dente, exceto uma área com sondagem profunda (fístula) se estendendo até o ápice radicular ou canal lateral. Pode ou não haver sintomatologia ou desconforto. Apenas o tratamento endodôntico é necessário, e nenhuma curetagem periodontal deve ser feita até que se avalie os resultados do tratamento dos canais radiculares.

2) Origem periodontal: ao exame clínico, estas lesões são geralmente generalizadas, dificilmente circunscritas a um único dente. São primariamente um resultado da formação de placa ou de cálculo. Os dentes respondem aos testes de vitalidade pulpar. À sondagem periodontal, os defeitos são amplos e em forma de “V” (Walton & Torabinejad, 1997; Harrington, 1979). Pode ou não haver

sintomatologia. O exame radiográfico mostra perda óssea vertical e horizontal generalizada, e pode ou não haver sintomas significativos. Apenas o tratamento periodontal é necessário, a menos que os dentes estejam sem vitalidade, ou que sejam necessários procedimentos como amputação radicular, ou hemisseção do dente, por exemplo.

3) Origem endodôntica-periodontal (lesões associadas verdadeiras): são duas lesões concomitantes, uma lesão periapical independente derivada de uma polpa necrosada, e outra lesão periodontal independente que progrediu em direção a lesão periapical. Esses dentes não respondem aos testes de vitalidade pulpar. Ao exame radiográfico, alguma perda óssea na crista e uma lesão periapical são evidentes. O exame periodontal e sondagem mostram placa, cálculo, periodontite, e uma bolsa periodontal ampla e cônica. O tratamento consiste tanto de terapia endodôntica como periodontal.

C- A nomenclatura proposta, em 1999, por Niklaus Lang, Huan Xin Meng, W.A. Soskolne, Michael Newman, Gary Greenstein, M. John Novak, David Cochran, Howard Tenenbaum, Esmonde Corbet para periodontite associada a lesões endodônticas simplifica a classificação desta doença em Lesão endodôntica-periodontal combinada embasado na idéia de que independentemente da origem da doença o tratamento deve ser o mesmo, ou seja endodôntico e periodontal.

Uma lesão endo-pério verdadeira, de acordo com Harrington (1979), compreende três critérios: a polpa deve estar sem vitalidade; deve haver destruição periodontal que se origine no sulco gengival; e deve estar presente uma bolsa periodontal que se estenda até os níveis de um canal lateral ou do forame apical. Além disso, não será esperado que a resolução da lesão progrida, a menos que ambos os tratamentos endodôntico e periodontal sejam realizados simultaneamente.

O teste de vitalidade e a sondagem periodontal são críticos para o diagnóstico acurado. Os autores acreditam que o contorno de um defeito no aparato de suporte pode ser identificado por sondagem cuidadosa na periferia do dente, e que é importante para determinação do tratamento apropriado (Harrington, 1979; Harrington *et al.*, 2002). Por exemplo, é fácil identificar um trato fistuloso através do espaço do ligamento periodontal de uma lesão periapical ou lateral. Através de cuidadosa sondagem, uma falha na integridade do sulco marginal de aproximadamente 1mm de largura é encontrada e estará associada a um dente com polpa necrótica ou um dente que teve seus canais tratados, em uma alta percentagem das vezes. Nesses casos, se trata apenas de uma fístula drenando, associada com uma lesão periapical ou lateral, e não é diferente de uma fístula drenando na mucosa alveolar ou na gengiva; simplesmente está no sulco gengival, e é um problema estritamente endodôntico. Nenhum tratamento periodontal é necessário, sendo até mesmo contra-indicado (Walton & Torabinejad, 1997; Harrington *et al.*, 2002). Isto é o que ocorre na maioria das vezes, é a regra geral, porém, este mesmo tipo de trato fistuloso pode estar associado a um dente vital, o que seria uma exceção, mas que pode ocorrer em algumas situações clínicas destacadas por Harrington *et al.* (2002), como a presença de pérolas de esmalte, fenda de desenvolvimento na superfície dental, raízes fusionadas de dentes posteriores, fraturas coronárias incompletas, fraturas corono-radiculares, fraturas radiculares verticais, dente adjacente despulpado, ou dente adjacente com doença periodontal avançada. Estas situações excepcionais também podem estar associadas com um dente despulpado, o que aumentaria a complexidade de identificação da causa correta, e o tratamento apropriado.

O verdadeiro envolvimento endo-pério (lesão associada verdadeira) é de baixa prevalência e raríssimo (De Deus, 1992; Walton & Torabinejad, 1997), e caracteriza-se clinicamente pela presença de bolsa periodontal e alteração pulpar irreversível concomitante. Os seguintes critérios são considerados para definir a verdadeira lesão endopério: (1) o dente envolvido deve estar despulpado, portador

de alteração irreversível da polpa dental; (2) deve existir destruição do aparelho periodontal de inserção a partir do sulco gengival, atingindo até mesmo a região do ápice radicular; (3) ambos os tratamentos endodôntico e periodontal são necessários para a sua resolução (De Deus, 1992).

É de suma importância no diagnóstico das lesões combinadas, estabelecer se a lesão inicial é de origem endodôntica ou periodontal (Stallard, 1972; Fachin *et al.*, 2001; Anand & Nandakumar, 2005). É necessário obter informações sobre duração, intensidade e frequência da dor, pois, em geral, a doença periodontal é um processo crônico e generalizado com pouca ou nenhuma dor, enquanto que as lesões pulpares e periapicais são localizadas e mais associadas à dor aguda. A análise radiográfica também é um valioso instrumento no diagnóstico diferencial, pois as lesões periodontais geralmente apresentam perda óssea angular estendendo-se da região cervical ao ápice radicular, enquanto que as lesões periapicais comprometem a região apical, ocasionalmente avançando cervicalmente. A sondagem periodontal pode mostrar que defeitos originários de uma lesão periodontal são geralmente amplos e não se estendem até o ápice radicular, enquanto que os de origem endodôntica em geral são estreitos e se estendem até o forame ou até as aberturas dos canais laterais. Porém as duas lesões podem se imitar reciprocamente. A palpação e percussão são testes diagnósticos com pouco ou nenhum valor, pois ambas as lesões causam inflamação no ligamento periodontal (Fachin *et al.*, 2001).

A diferenciação entre lesões de origem endodôntica e lesões periodontais depende amplamente da determinação da vitalidade pulpar, de examinar a localização, extensão e profundidades de sondagem das bolsas periodontais. Se a polpa reage normalmente, mas uma bolsa periodontal pode ser localizada, então se deve suspeitar dos tecidos periodontais como a origem tanto do processo crônico quanto do agudo de inflamação. Por outro lado, quando o conteúdo do sistema de canais radiculares, ou mesmo uma porção de um sistema multirradicular se encontra sem vitalidade, o processo inflamatório que passa

através de um canal lateral ou do forame apical vai causar uma lesão de origem endodôntica. E quando esses dois processos se apresentam ao mesmo tempo, a doença é classificada como uma lesão endo-péριο verdadeira (Christie & Holthuis, 1990).

Em alguns casos, a análise microbiológica pode fornecer informações úteis para o diagnóstico e para o tratamento. Diferentes tipos de análises microbiológicas estão disponíveis para a utilização. Normalmente, os testes são utilizados em casos de pacientes que não respondem favoravelmente a terapia convencional ou para monitorar pacientes em terapia de manutenção (Calin, 2005).

A informação gerada pelas análises microbiológicas da placa coletada de pacientes é altamente dependente da técnica de coletar as amostras. Usualmente, as amostras dos canais radiculares são coletadas utilizando cones de papel absorventes estéreis ou limas enquanto as amostras de placa subgengival podem ser coletas utilizando curetas ou cones de papel absorventes estéreis. As informações obtidas através dos dois métodos diferem entre si (Socransky *et al.*, 1998, Socransky & Haffajee, 2002, Hartroth *et al.*, 1999).

Uma variedade de testes de análise microbiológica foi desenvolvida. Inclui: microscopia, cultura, análises enzimáticas, análises imunológicas, sondas de ácidos nucléicos e PCR. Identificação microscópica utiliza campo escuro, claro, contraste de fase e microscopia eletrônica de varredura para o estudo das amostras microbiológicas. Tais técnicas visuais utilizadas coradas de Gram ou naturais podem determinar as relativas proporções dos microrganismos visíveis mas não possibilita a identificação de espécies individuais. Portanto, seu principal uso é observar mudanças na aparência da microbiota (Loomer, 2004, Molven *et al.*, 1991).

O método de cultura microbiológica é considerado o “gold standard” perante outros métodos de identificação (Dahlen, 2002, Loesche *et al.*, 1992).

Muitos patógenos endodônticos e periodontais podem ser identificados pelo uso de meios seletivos e não -seletivos, frequentemente, em combinação com testes bioquímicos. Entretanto, estes métodos também têm limitações significativas como, por exemplo, inabilidade em detectar baixos níveis (quantidade) de microrganismos, alto custo, trabalho intensivo, muito tempo investido antes da obtenção dos resultados e dificuldade de crescimento de algumas espécies bacterianas. Além do mais, métodos moleculares apresentaram aproximadamente 200 filotipos orais que não podem ser cultivados (Sakamoto *et al.*.,2005).

As sondas de ácidos nucléicos (DNA e RNA) consistem em seqüências de ácidos nucléicos rotulados com marcadores radioativos ou enzimáticos que se unem a seqüências de ácidos nucléicos complementares aos microrganismos correspondentes.

O “PCR” (Polimerase Chain Reaction) é uma técnica molecular de alta replicação de DNA. Permite a síntese de um vasto número de cópias para uma quantidade pequena de DNA. Na detecção de patógenos orais, o PCR é um método estabelecido (Riggio *et al.*, 1996, Ashimoto *et al.*, 1996, Conrads *et al.*, 1999, Trans & Rudney, 1996, 1999). Ele também permite a detecção de múltiplas amostras (Griffen *et al.*, 1999, Leys *et al.*, 1994, 1999).

O PCR em tempo real é uma boa alternativa ao PCR convencional para o estudo microbiológico devido a sua baixa variabilidade inter e intra experimento e melhorada sensibilidade quando comparada a cultura microbiana ou a um PCR convencional ou ao nested PCR (Boutaga *et al.*, 2003, Lau *et al.*, 2004). Ele foi descrito como sendo ao menos tão sensível quanto o Southern blot que ainda é considerado o “gold standard” dos ensaios de hibridização baseados em sonda (Capone *et al.*, 2000)

A análise quantitativa do PCR em tempo real é uma importante ferramenta para a concentração de ácidos nucléicos. O acúmulo do produto é monitorado durante o processo de PCR em tempo real pela técnica de fluorescência. Esta técnica combina alta sensibilidade com uma alta taxa dinâmica para a quantificação sem requerer uma análise pós PCR.

A inter-relação diagnóstica entre a endodontia e a periodontia é de fundamental importância. Ao se identificar a origem de uma lesão periodontal, endodôntica ou combinada, a terapêutica deverá ser aplicada de acordo com sua etiologia, propiciando desta forma, uma melhor reparação dos tecidos comprometidos (Lindhe *et al.*, 1999; Borba *et al.*, 2002).

Jansson *et al.* (1993), e Ehnevid *et al.* (1993) concluíram que a infecção endodôntica, sem tratamento por um longo período de tempo, pode resultar em um retardo da cicatrização periodontal, mesmo que o tratamento periodontal já tenha sido instituído. Por isso, o tratamento deve ser bem coordenado, incluindo as terapias endodôntica e periodontal.

Essencialmente, ambas as doenças endodôntica e periodontal existem, com diferentes fatores etiológicos e sem evidência de qual das duas influenciou a outra. Atualmente, ambos os processos de doença devem ser tratados de maneira concomitante, com o prognóstico dependente da remoção dos fatores etiológicos individuais e prevenção de quaisquer fatores adicionais que possam causar impacto no respectivo processo de doença (Belk & Gutmann, 1990).

A maioria dos autores concorda que ambas as formas de tratamento (endodôntico e periodontal), de maneira integrada, são essenciais para o sucesso do tratamento das lesões endo-periodontais combinadas (Seltzer *et al.*, 1963; Belk & Gutmann, 1990; Ehnevid, 1993; Almeida *et al.*, 1999; Anand & Nandakumar, 2005), e também a única forma de manter com saúde os dentes envolvidos. O tratamento combinado melhora a capacidade regenerativa dos tecidos envolvidos, eliminando de maneira mais eficaz os microrganismos e possibilitando um prognóstico mais favorável (Almeida *et al.*, 1999).

Nas lesões combinadas, a seqüência clássica sugerida seria a realização do tratamento endodôntico, tratamento básico periodontal, seguido de um período de observação, através do qual a extensão da cura da área do periodonto possa ser determinada, para finalmente efetuar o tratamento

periodontal definitivo. Essa seqüência visa inicialmente uma melhora das condições periodontais e uma orientação para as medidas de higienização dos dentes para o posterior tratamento periodontal (Lindhe *et al.*, 1999; Toledo & Rosetti, 2005).

Toledo & Rosetti, em 2005, sugerem uma seqüência para o tratamento dos envoltimentos periodontais/endodônticos “verdadeiros”, considerando os fatores primários do seu aparecimento. A seqüência seria: neutralização do conteúdo tóxico/necrótico do canal radicular; raspagem supra-gengival, selamento provisório do canal radicular, raspagem sub-gengival, complementação do tratamento periodontal, tratamento endodôntico definitivo.

No caso da lesão primariamente periodontal, alteração seria feita na ordem dos dois primeiros itens, iniciando-se pela raspagem supra-gengival. Já no caso das lesões combinadas, os autores incluem um dispositivo de liberação química local após o selamento provisório do canal radicular.

Há um consenso de que o tratamento endodôntico deve ser realizado primeiro (Heithersay, 1975; Solomon *et al.*, 1995; Paul & Hutter, 1997; Lindhe *et al.*, 1999; Toledo & Rosetti, 2005), com a finalidade de eliminar todas as bactérias e antígenos do sistema de canais radiculares infectado (Heithersay, 1975). Sem o contínuo estímulo irritante de uma polpa necrótica vindo do forame apical, deltas apicais, canais laterais, e canais na furca, a lesão permanece primariamente como um problema de controle periodontal (Blomlöf *et al.*, 1988).

A lesão endodôntica deve ser tratada com um preparo biomecânico que vise a remoção e neutralização progressiva, no sentido coroa/ápice do conteúdo séptico e tóxico do sistema de canais radiculares (Leonardo & Leal, 1998). O selamento temporário do canal com uma pasta à base de hidróxido de cálcio (Heithersay, 1975; Solomon *et al.*, 1995; Toledo & Rosetti, 2005) seria um complemento da desinfecção do sistema de canais radiculares, modificando o meio e tornando-o impróprio ao desenvolvimento bacteriano, enquanto permite

uma avaliação do tratamento instituído, até que ocorra a reparação periodontal desejada (Toledo & Rosetti, 2005).

Estudos têm mostrado que os medicamentos podem influenciar a cicatrização marginal e o reparo, e que os canais devem ser selados com uma combinação de gutta-percha inerte e cimento antes que o cimento seja removido (Blomlöf *et al.*, 1988). O uso intracanal de hidróxido de cálcio tem sido defendido como um medicamento por inúmeras razões e seu uso pode ser indicado na doença pulpo-periodontal (Heithersay, 1975; Solomon *et al.*, 1995), pois sua ação inibe a contaminação periodontal dos canais instrumentados via canais de comunicação patentes (Solomon *et al.*, 1995). O hidróxido de cálcio tem tido um papel importantíssimo na terapia endodôntica por mais de 70 anos, tendo seu uso extremamente difundido no tratamento endodôntico. O grupo hidroxila é considerado o componente mais importante do hidróxido de cálcio, pois promove a alcalinização do meio, o que encoraja o reparo e a calcificação ativa. O pH alcalino não apenas neutraliza o ácido láctico dos osteoclastos, prevenindo dessa maneira a dissolução dos componentes minerais da dentina, como também pode ativar a fosfatase alcalina, que tem papel importante na formação de tecido duro (Carrote, 2004). Na reabsorção externa, a camada de cimento é perdida em uma porção da superfície radicular, o que permite uma comunicação através dos túbulos dentinários entre o canal radicular e os tecidos periodontais. Foi provado que o coeficiente de dissociação do hidróxido de cálcio permite uma liberação lenta e controlada de ambos os íons cálcio e hidroxila, que podem se difundir através dos túbulos dentinários. Tronstad *et al.* (1981), demonstraram que dentes com necrose pulpar não tratados endodonticamente, tinham um pH de 6.0 a 7.4 na dentina pulpar e ligamento periodontal, ao passo que, após a colocação de hidróxido de cálcio intracanal, o dente mostrava um pH na dentina periférica de 7.4 a 9.6. Os autores sugerem que o hidróxido de cálcio pode ter outras ações, como por exemplo, interromper a reabsorção radicular inflamatória e estimular a cura.

Lindhe *et al.* (1999) sugerem que a substituição de um dente com envolvimento de furca por um implante osseointegrado deve ser considerada com extrema cautela, e apenas se o implante for melhorar o prognóstico do plano de tratamento como um todo.

Como uma alternativa para o tratamento dos casos de envolvimento mais severo, para prevenir maior destruição periodontal nos dentes multirradiculares, pode ser necessário remover alguma raiz; Como esse tratamento irá envolver tratamento endodôntico e cirurgia periodontal, o operador deve considerar alguns fatores antes da ressecção radicular, como: (1) o dente deve ser um membro funcional da dentição; (2) deve ser possível prover o tratamento endodôntico com bom prognóstico; (3) as raízes devem estar separadas por certa quantidade de osso inter-radicular para que a remoção de uma raiz não danifique as raízes remanescentes; (4) deve haver estrutura dental remanescente suficiente para permitir que o dente seja restaurado, e assegurar a correta higienização pelo paciente; (5) o paciente deve ser um candidato adequado para o procedimento cirúrgico, e ser capaz de manter um alto padrão de higiene na área selecionada (Carrote, 2004). Um dente que requer ressecção radicular irá necessitar de tratamento do canal radicular. A cirurgia deve ser planejada cuidadosamente, particularmente com respeito à seqüência do tratamento. Idealmente, segundo Carrote (2004), o dente deve ter seu canal obturado antes da cirurgia, exceto pela raiz a ser removida. Esta deve ter a polpa extirpada e seus 3mm coronários alargados e restaurados com material permanente, para evitar que isto tenha que ser feito durante a cirurgia devido às dificuldades de acesso e contaminação com sangramento.

Lesões endo-perio combinadas são situações que podem potencialmente ser tratadas com regeneração tecidual guiada (RTG) em combinação com cirurgia endodôntica. Britain *et al.*, em 2005, investigaram a aplicação da RTG usando enxerto ósseo e/ou membrana, comparado com debridamento com retalho aberto apenas, para o tratamento de lesões endo-pério

crônicas induzidas. Todos os dentes foram tratados com cirurgia endodôntica incluindo apicectomia, retroinstrumentação e obturação retrógrada com agregado trióxido mineral (MTA). Os autores concluíram que uma melhora significativa nos parâmetros clínicos pode ser esperada quando as técnicas de RTG são usadas no tratamento de lesões endo-pério crônicas. Um dado histológico interessante encontrado mostra que o acréscimo de enxerto ósseo antes da colocação da membrana não trouxe benefício adicional quando comparado com o uso da membrana apenas. Porém, o uso da membrana reabsorvível pode resultar em uma maior formação de tecido conjuntivo e de osso radicular do que o debridamento com retalho aberto apenas.

Do mesmo modo, em 2002, White Jr. & Bryant concluíram que uma abordagem combinada utilizando MTA, osso liofilizado e sulfato de cálcio para uma lesão óssea associada, parece ser uma modalidade viável no tratamento de lesões crônicas endodônticas e periodontais combinadas.

Uma vez que o sistema de canais radiculares pode ser considerado um espaço fechado, o prognóstico para lesões endodônticas primárias é bom. Lesões periodontais são abertas ao meio oral e devem ser manejadas depois de completado o tratamento endodôntico, em lesões combinadas. Quanto mais crônica ou duradoura uma lesão endo-pério combinada, mais pobre será o prognóstico. Dentes com lesões combinadas que são o resultado de uma raiz fraturada ou por variações anatômicas, tem um prognóstico desfavorável (Christie & Holthuis, 1990).

Geralmente, com terapia endodôntica adequada, a cicatrização do componente endodôntico vai ocorrer e o prognóstico dependerá da eficácia da terapia periodontal (Walton & Torabinejad, 1997; Anand & Nandakumar, 2005). Uma vez que isto tenha sido atingido, pode melhorar significativamente a vida e função dos dentes que haviam perdido a saúde tanto pulpar quanto do aparato periodontal (Anand & Nandakumar, 2005).

O prognóstico é influenciado por vários fatores como a longevidade dos tratamentos restauradores complementares, a determinação da causa primária da lesão, a quantidade de destruição tecidual antes do início do tratamento, a seqüência e a qualidade do tratamento desenvolvido, a capacidade de reparação do paciente, bem como a cooperação do mesmo e seu controle de placa bacteriana (Toledo & Rosetti, 2005). De uma forma geral, o prognóstico será melhor se a origem da lesão for exclusivamente endodôntica do que se for exclusivamente periodontal, e já as lesões combinadas, independente da origem, têm um prognóstico pior. Assim, os principais fatores determinantes do resultado do tratamento seriam, sobre tudo, o prognóstico periodontal e a efetividade dos procedimentos de controle de placa dos pacientes.

O mais importante é ter sempre em mente que a melhor terapia é aquela em que a única meta é o melhor para o paciente (Almeida *et al.*, 1999), de forma mais eficaz, com atuação imediata, buscando sempre o conforto e o bem estar e, visando constantemente a saúde geral do paciente.

O assunto da migração bacteriana entre o canal radicular e o periodonto ainda hoje está sob discussão e há pouca informação a respeito da microbiologia das lesões endo-perio combinadas (Zehnder *et al.*, 2002, Harrington *et al.*, 2002). Entretanto, as similaridades entre a microbiota endodôntica e periodontal podem sugerir que uma infecção cruzada entre o canal radicular e a bolsa periodontal pode ocorrer (Zehnder *et al.*, 2002). A existência simultânea de problema pulpar e doença periodontal inflamatória pode complicar o diagnóstico e o tratamento planejado para o dente em questão e clinicamente tratar certos casos pode ser um desafio.

Zehnder *et al.* (2002) concluíram que há necessidade por novas informações nesta área.

Os microrganismos estão em todos os lugares, mas o ambiente os seleciona. Na cavidade bucal existem aproximadamente 10^{10} bactérias consistindo de mais de 700 diferentes espécies de microrganismos (Mims *et al.*,

1995), os quais buscam por um nicho e nutrição. Uma das funções primárias do esmalte dentário é excluir esses microrganismos do complexo dentina-polpa. Em condições normais, as camadas de esmalte e cemento estão intactas, a polpa e o canal radicular protegidos da invasão. Entretanto, a perda destas estruturas por cáries, trincas ou trauma abrem um caminho para penetração das bactérias através dos túbulos dentinários. Todas as bactérias na cavidade bucal têm a oportunidade de invadir do espaço do canal radicular. Entretanto, apenas um grupo restrito de espécies tem sido identificado em canais radiculares infectados (Kantz & Henry, 1974; Wittgow & Sabiston, 1975; Sundqvist, 1994). As interações entre fatores microbiológicos e disponibilidade de nutrientes são os principais elementos que definem a composição da microbiota bucal (Sundqvist & Figdor, 2003).

Na fase inicial de uma infecção no canal radicular, o número de espécies microbianas normalmente é pequeno. Se a via de invasão for por meio de cárie, as bactérias da lesão cariogênica são as primeiras a invadirem a polpa. Nos casos onde não há comunicação aparente com a cavidade oral, as bactérias penetram através dos túbulos dentinários, como pode ocorrer nos casos de trauma sem exposição pulpar (Sundqvist, 1976). O número de espécies em canais radiculares infectados pode variar de 1 a mais de 12, e o número de células bacterianas pode variar de $< 10^2$ a $>10^8$ por canal radicular (Sundqvist & Figdor, 2003).

2.6 MICROBIOTA ENDODÔNTICA E PERIODONTAL

As doenças da cavidade oral, predominantemente cárie e doença periodontal, desenvolvem-se em lugares onde um biofilme já está estabelecido. Estas doenças ocorrem devido a mudança nas condições ambientais, o tipo e as combinações microbianas presentes no momento. Assim, mudanças na superfície dental, com o aumento do número de microrganismos acidogênicos, resultam na desmineralização, provocando cáries. Um aumento no número de bactérias

proteolíticas no sulco gengival resultam no desenvolvimento da doença periodontal (Marsh, 2003). A infecção dos canais radiculares é única na cavidade oral, visto que ela se estabelece em um ambiente previamente livre de microrganismos (Sundqvist & Figdor, 2003).

2.6.1 MICROBIOTA DA PERIODONTITE

O entendimento das doenças periodontais ocorreu no momento em que a microbiologia clínica foi empregada como uma ferramenta para o diagnóstico e planejamento do tratamento (Winkelhoff & Winkel, 2005).

As doenças periodontais são infecções multifatoriais onde estão envolvidos vários complexos bacterianos que interagem com as células do hospedeiro causando uma ampla liberação de mediadores inflamatórios que podem acarretar a destruição das estruturas periodontais. As características da progressão das alterações microbianas do estado de saúde para doença periodontal são vastas e complexas (Holt & Ebersole, 2005).

Socransky e Haffajee (1998) agruparam a microbiota das doenças periodontais em grupos ou complexos que representam as associações bacterianas na placa sub-gengival. O primeiro complexo, ou complexo vermelho, é formado por *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. O segundo complexo, ou complexo laranja, compreende *Fusobacterium nucleatum* spp., *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros* (*P micra*). Dentre as espécies associadas a esse complexo, encontram-se *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Streptococcus constellatus* e *Campylobacter gracilis*. As bactérias *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus intermedius* formam o terceiro complexo, de cor amarela. O quarto complexo ou complexo verde, é constituído por três espécies de *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*

serotipo a. O quinto complexo, ou complexo roxo, é formado por *Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*. *A. actinomycetemcomitans* serotipo b, *Selenomonas noxia* e *Actinomyces naeslundii* são espécies relacionadas com os demais complexos.

O complexo vermelho está presente em etapas mais tardias da formação do biofilme, representando uma comunidade clímax. As bactérias pertencentes a esse grupo são freqüentemente isoladas em casos onde há grandes profundidades de bolsa e sangramento à sondagem (Holt & Ebersole, 2005).

Winkelhoff & Winkel (2005) estabelecem três fases principais no tratamento periodontal: diagnóstico, controle da infecção e restauração do periodonto. A abordagem para controle da infecção emprega medidas com o objetivo de reduzir a carga microbiana total através de instrução de higiene oral, raspagem e alisamento radicular, extrações e cirurgias.

Slots *et al.* (1986) avaliaram a presença de *A. actinomycetemcomitans*, "*B. gingivalis*" e "*B. intermedius*" em sítios que apresentavam doença periodontal. Nas lesões em progressão, a percentagem de ocorrência de *A. a.*, *B. gingivalis* e *B. intermedius* foi elevada. No entanto, nos sítios onde a doença periodontal estava estabilizada, menores incidências foram observadas. Dessa forma, constatou-se que esses patógenos estavam diretamente associados com doença periodontal ativa e profundidade de sondagem.

Chaves *et al.* (2000) demonstraram que lesões periodontais que apresentavam *P. gingivalis* em 1, 3 e 6 meses após o tratamento inicial demonstraram perda adicional de tecido ósseo, enquanto que nos casos onde este patógeno estava ausente após o tratamento houve tendência a recuperação de estrutura óssea. A ausência de *P. gingivalis* no início do tratamento sugere que o sítio não apresentará perda óssea após a terapia periodontal.

Jaramillo *et al.* (2005) ao avaliarem a microbiota de abscessos periodontais relatam que *Fusobacterium* spp, *P. intermedia/nigrescens* e *P. gingivalis* foram freqüentemente isolados, demonstrando similaridade de composição com a microbiota de lesões periodontais crônicas e agressivas.

A periodontite é uma doença que afeta os tecidos de suporte dos dentes, sendo caracterizada por perda de inserção periodontal, incluindo o osso alveolar. A etiologia da doença é multifatorial, sendo que a biofilme microbiano desempenha uma função essencial na etiopatogênese das infecções periodontais (Lamont & Jenkinson, 1998). Dentre as inúmeras espécies bacterianas isoladas do biofilme associado a periodontite, as espécies constituintes do grupo de bastonetes Gram-negativos anaeróbios produtores de pigmento negro mostram-se fortemente relacionadas com infecções periodontais destrutivas (Socransky & Haffajee, 1992). Com o aperfeiçoamento das técnicas de cultivo permitindo o isolamento de microrganismos anaeróbios e com a introdução de técnicas de biologia molecular, surgiram inúmeras pesquisas interessadas na relação da presença de pigmentados negros com quadros de doença periodontal destrutiva.

Como estudos epidemiológicos feitos em vários países em desenvolvimento demonstraram que a porcentagem dos adultos atingida por doença periodontal destrutiva é a mesma vista em adultos de países industrializados, apesar da pior higiene bucal, McNabb *et al.*, em 1992, procuraram estudar a distribuição de patógenos em um grupo de imigrantes de dez países subdesenvolvidos, na Suíça, constituído por trinta homens entre 35 e 44 anos de idade, utilizando métodos de cultivo bacteriano. De acordo com o aumento da profundidade de sondagem, a maior freqüência de detecção foi de *P intermedia*, variando de 90,4% a 100%, seguida da espécie *P melaninogenica* com freqüência entre 42,9% e 33,3% e ainda a *P gingivalis* foi detectada em sítios com evidente destruição periodontal (66,7%), mas também sítios com mínima doença periodontal e sem recessão gengival mostraram freqüência de detecção relativamente alta (34,1%).

Dahlén *et al.*, em 1992, avaliaram a ocorrência de patógenos periodontais em 31 indivíduos quenianos com e sem doença periodontal, com idades variando de 19 a 35 anos. As amostras foram obtidas do sulco gengival e bolsa periodontal e analisadas por cultura para diversos patógenos, entre eles *P gingivalis*, *B intermedius* e grupo de *B melaninogenicus*, os quais foram detectados, respectivamente, em 79%, 86% e 14% dos sítios testes (perda de inserção \geq 5mm; bolsa \geq 4mm) e, em 36%, 86% e 21% dos sítios controles (perda de inserção de 2mm e bolsa de 3mm) nos indivíduos com periodontite, enquanto no grupo sadio a detecção positiva dessas espécies foi de 18%, 47% e 0%, respectivamente. Portanto, espécies de pigmentados negros foram mais freqüentemente detectadas no grupo com periodontite comparados ao grupo sem doença, mas a *P gingivalis* foi o único microrganismo que indicou diferença entre sítios com perda periodontal e sadios, assim como, entre indivíduos. Os autores chamam a atenção para o inadequado padrão de higiene bucal apresentado pela população estudada, favorecendo o estabelecimento de periodontopatógenos mesmo em sítios com bolsas periodontais rasas.

Usando a técnica do Slot Immunoblot (SIB), Rubira, em 1994, analisou amostras de placa subgengival de 10 indivíduos com periodonto saudável, entre 18 e 36 anos de idade, e de 27 portadores de periodontite quanto à presença de dez bactérias, entre as quais, periodontopatógenos. No grupo sadio a prevalência de indivíduos com pelo menos um sítio positivo a um periodontopatógeno variou de 50 a 100%. A porcentagem de sítios positivos foi de 45% para *P intermedia/nigrescens* e 40% para a *P gingivalis*. As diferenças entre o grupo sadio e o com periodontite ocorreram por conta das médias dos escores de detecção, que foram, respectivamente $1,5 \pm 0,6$ e $2,6 \pm 0,4$, para *P gingivalis* e $1,6 \pm 0,5$ e $2,5 \pm 0,4$, para *P intermedia/nigrescens*. A incidência relativa de *P intermedia* e *P nigrescens*, bem como de outros bacteroides formadores de colônias negras em sítios ativos, inativos e saudáveis de indivíduos com periodontite e em sítios subgengivais de indivíduos com periodonto sadio foi analisada por Teanpaisan; Douglas & Walsh (1995), em 58 indivíduos (46 com

periodontite e 12 com periodonto sadio). Um total de 138 sítios (48,2%) apresentou pigmentados negros, dos quais 64% eram sítios ativos, 35,7%, inativos e 38,5% sítios sadios de indivíduos com periodontite e 50% eram sítios do grupo sadio. A *P. gingivalis* foi isolada mais freqüentemente de sítios ativos (11%), mas também ocorreu em sítios sadios (5%) no grupo com periodontite. No entanto, não foi detectada em indivíduos com periodonto normal. As incidências de *P. intermedia* e *P. nigrescens* nos sítios ativos, inativos e sadios dos pacientes foram respectivamente de 15,5% e 37,7%; 0% e 18,6% e, 20,5% e 11,5% e no total de sítios dos indivíduos com periodonto sadio, 18,3% e 31,6%. Segundo os autores, essas espécies, diferentemente da *P. gingivalis* parecem ser comensais comuns, mas podem agir como patógenos oportunistas.

A prevalência de diversos patógenos periodontais, entre eles *P. gingivalis* e *P. intermedia*, foi determinada em amostras subgingivais de 50 indivíduos com periodontite avançada (17 a 75 anos) e 50 adultos (21 a 36 anos) e 50 crianças com gengivite (2 a 11 anos) por Ashimoto *et al.*, em 1996, usando como método de detecção a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) baseada no RNAr 16S. A prevalência em indivíduos com periodontite e em adultos e crianças com gengivite, respectivamente, foi de 70%, 10% e 14% para *P. gingivalis*, 58%, 12% e 18% para *P. intermedia*. A porcentagem de sítios colonizados por esses patógenos foi de 22% ou menos em adultos e crianças com gengivite, sugerindo que estes microrganismos não são componentes importantes da microbiota subgingival de pacientes sem periodontite. O método de detecção por PCR foi mais sensível que a cultura e exibiu menor reatividade cruzada que a sonda de DNA.

A incidência de bacteróides produtores de pigmento negro, especialmente *P. intermedia* e *P. nigrescens*, foi objeto de estudo de Maeda *et al.*, em 1998. Um total de 60 indivíduos foi incluído na pesquisa, sendo dividido em dois grupos: um formado por 45 indivíduos com periodonto saudável ($\pm 21,1$ anos) e outro, constituído por 15 pacientes com periodontite ($\pm 51,3$ anos). Os bacteróides negros foram isolados em 71,1% dos indivíduos saudáveis e nos

pacientes com periodontite foram detectados em 47,1% (16/34) dos sítios saudáveis e 87,8% (36/41) dos sítios ativos. A *P gingivalis* foi isolada apenas em sítios ativos do grupo com periodontite, enquanto a *P intermedia* foi predominante em sítios ativos e saudáveis (37,7% e 41,7%, respectivamente) deste grupo, e encontrada em 16,8% dos indivíduos sem doença. A *P nigrescens* foi predominante em indivíduos com periodonto saudável (70,5%) e detectada em 19,6% e 21,1% respectivamente dos sítios saudáveis e sítios ativos dos pacientes. As espécies *P melaninogenica*, *P loeschii* e *P denticola* revelaram, respectivamente, a prevalência de 2,3%, 1,7% e 1,7%, em sítios ativos e 3,3%, 5,9% e 9,8%, em sítios saudáveis e, ainda, 1,7%, 0% e 8,1% no grupo sem doença.

O padrão de distribuição de *P gingivalis* e *P intermedia/nigrescens* após terapia periodontal (raspagem e alisamento radicular e retalho modificado de Widman) foi demonstrado por Mombelli *et al.* (2000), em 17 pacientes com periodontite, que tiveram amostras de placa subgingival colhidas de todos os dentes. As duas espécies de microrganismos apresentaram diferentes padrões de persistência. A *P gingivalis* foi detectada em 59% dos indivíduos, mas em baixa proporção nos sítios (5,4%). A *P intermedia/nigrescens* mostrou forte relação em sítios com sangramento, não sendo detectada em um único indivíduo, com 40,6% dos sítios positivos para essa espécie. Os autores concluíram que se após o tratamento mecânico padrão, um grande número de sítios continuar a sangrar, pode-se esperar número elevado de sítios positivos para *P intermedia/nigrescens* e se muitas bolsas profundas persistirem, um maior número de sítios *P gingivalis* positivos.

Utilizando técnicas de cultivo microbiano, van Winkelhoff *et al.*, em 2002, investigaram a presença de patógenos periodontais suspeitos em 116 pacientes com destruição periodontal (\pm 42,4 anos) e em 94 indivíduos sem doença (\pm 40,4 anos). A prevalência de indivíduos para a presença de *P gingivalis* e *P intermedia* foi, respectivamente, 59,5% e 10,6% no grupo sem doença e, 87,9% e 69,1% no grupo com doença periodontal. Segundo os autores, os resultados demonstraram que periodontopatógenos como *P gingivalis*, *B forsythus* (*T forsythia*),

Actinobacillus actinomycetemcomitans (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), *P intermedia*, *F nucleatum* e *P micros* (*Parvimonas micra*) são fortes marcadores de doença periodontal destrutiva.

Socransky, Smith & Haffajee, em 2003, investigaram os perfis microbiológicos relacionados com periodontite refratária, por meio da técnica de hibridização checkerboard DNA-DNA. A análise microbiológica revelou quatro diferentes perfis: perfil I - caracterizado por altas proporções de espécies bacterianas do complexo amarelo e verde, perfil II - constituído por pequeno número e alta proporção de espécies do complexo laranja e lilás, perfil III - demonstrou elevado número de A.a. e espécies do complexo lilás e por último, o perfil IV com alta proporção de espécies do complexo vermelho e laranja. Os autores enfatizam a presença do complexo laranja e vermelho em casos de periodontite refratária, nos quais as espécies *P intermedia*, *P nigrescens* e *P gingivalis* estão incluídas e mostram-se fortemente relacionadas com parâmetros clínicos periodontais, como perda de inserção e sangramento gengival à sondagem.

Souto & Colombo (2007) avaliaram a presença de *Enterococcus faecalis* no biofilme subgengival e na saliva de pacientes com doença periodontal (n=169) e de indivíduos saudáveis (n=56) através de PCR. Dos resultados obtidos, *E. faecalis* esteve presente em 34.6% das amostras coletadas de biofilme subgengival e em 35.1% na saliva. *E faecalis* foi detectado em maior número em pacientes com doença periodontal (biofilme subgengival: 47.8% e da saliva em 40.5%) quando comparado aos pacientes saudáveis (Biofilme subgengival: 17.1% e da saliva em 14.6%). Os resultados demonstraram que *E faecalis* foi frequentemente detectado na microbiota bucal de pacientes com doença periodontal sugerindo que a infecção periodontal pode favorecer a colonização da espécie.

2.6.2 MICROBIOTA DA DOENÇA PULPAR

A maioria dos casos de necrose pulpar é decorrente da invasão bacteriana (via lesão de cárie) e produção de toxinas. Estes microrganismos e seus subprodutos chegam à luz do canal, penetram nos túbulos dentinários e propagam-se por todo o sistema de canais radiculares, incluindo ramificações, istmos e deltas apicais, alcançando a região periapical e causando as periodontites apicais (Nair, 1987; Baumgartner & Falkler, 1991; Sjögren *et al.*, 1991).

Em 1894, Miller sugeriu a correlação direta entre a ocorrência de patologias pulpares e a presença de bactérias. Salientou ainda a importância desses conhecimentos na compreensão e tratamento das patologias dos tecidos periapicais.

Brown Jr. e Rudolph, em 1957, avaliaram a microbiota de 70 canais radiculares de dentes que não apresentavam exposição pulpar, cáries profundas, defeitos anatômicos, restaurações extensas, doença periodontal ou história de trauma. Foram realizadas culturas em aerobiose e anaerobiose em meios: ágar sangue, ágar chocolate, ágar PPLO, agar Sabouraud, ágar fusiforme e caldo tioglicolato. A suspensão bacteriana remanescente foi avaliada por microscopia de contraste/fase e em campo escuro. Pela observação direta foi possível a detecção de microrganismos em 90% dos casos, predominantemente espiroquetas. Por meio da técnica de cultura foi possível identificar: 51,3% de anaeróbios facultativos, 23,9% de anaeróbios obrigatórios e 23,9% de aeróbios nos canais radiculares infectados.

Já em 1967, Melville e Birch estudaram a microbiota dos canais radiculares e do tecido periapical de dentes sem vitalidade pulpar. Foram realizadas colheitas do interior dos canais radiculares e do tecido periapical de 104 incisivos, sendo 27 já tratados endodonticamente e com indicação de cirurgia parendodôntica. A colheita foi realizada por meio de uma técnica asséptica, em

que o dente foi desinfectado com pedra pomes antes da colocação do lençol de borracha, e após a colocação, o lençol e o dente isolado foram desinfectados com tintura de iodo (25%), durante três minutos. O canal foi acessado com instrumentos esterilizados e a microbiota do canal foi colhida com pontas de papel esterilizadas. Foram realizadas apicectomias apenas de dentes anteriores e para obtenção da amostra bacteriológica da área periapical, dois esfregaços foram colhidos da superfície da mucosa do campo operatório. A maioria das bactérias isoladas dos canais foram estreptococos e com menor frequência estafilococos. Os autores concluíram que para um estudo microbiológico da região periapical, seria essencial tanto cultura aeróbia quanto anaeróbia e que, mesmo em presença de bactérias no canal radicular, a região periapical pode permanecer esterilizada. No entanto, geralmente a microbiota periapical é idêntica à microbiota presente no interior do canal radicular.

Sundqvist (1976), em um estudo clássico, avaliou 32 dentes unirradiculados sem vitalidade pulpar e câmaras pulpares não expostas, de 27 pacientes. Os dentes não apresentavam lesão de cárie, restaurações ou alterações anatômicas, e a perda da vitalidade pulpar era decorrente de trauma. Foram isoladas bactérias de 18 dos 19 dentes que apresentavam lesão periapical visível radiograficamente. Destes, a maior parte continha mais de uma espécie bacteriana. Em alguns dentes, puderam ser isoladas até oito cepas e no total foram isoladas 88. Os resultados mostraram o papel fundamental dos microrganismos na etiologia e desenvolvimento das lesões periapicais. Apenas cinco das 88 cepas encontradas cresceram em ambiente aeróbio, o que comprovou a eficácia dos meios de transporte e cultivo utilizados neste estudo. Foram isolados *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Campylobacter*.

Sundqvist e Reuterving (1980) isolaram pela primeira vez *Actinomyces israeli* a partir de amostras de lesões periapicais, por meio de uma nova técnica microbiológica. Antes deste estudo, a espécie só havia sido isolada do interior de canais radiculares. Neste estudo, o dente selecionado foi tratado, removendo-se o

material restaurador em condições assépticas e deixando curativo de demora, e os espécimes foram colhidos quatro dias após. As amostras foram colocadas em meio tioglicolato, adicionado a ágar. Um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio foi então colocado no canal. O dente foi acompanhado em intervalos de seis meses, e em cada ocasião, uma amostra do canal radicular foi colhida. A destruição periapical aumentou em tamanho durante o tratamento e optou-se por uma cirurgia periapical. Após a apicectomia, o canal foi obturado com guta-percha e selado com amálgama. Os autores diagnosticaram a infecção por *A israelii* previamente ao tratamento cirúrgico, em um caso onde o tratamento endodôntico convencional não apresentou sucesso.

Byström e Sundqvist (1981) avaliaram a presença bacteriana em 15 dentes unirradiculados portadores de polpas necróticas e lesões periapicais, durante todos os tratamentos endodônticos. Foi observada a eficácia da instrumentação manual utilizando como solução irrigadora apenas o soro fisiológico. Após a realização do preparo biomecânico, 47% da amostra ainda apresentava crescimento bacteriano. Microrganismos anaeróbios estritos representavam 88% dos microrganismos detectados no interior dos canais radiculares, e as espécies mais comumente isoladas foram *Peptostreptococcus micro* (*Parvimonas micra*), *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella oralis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium alactolyticum* e *Prevotella intermedia*.

Möller *et al.* (1981), após exposição ao ambiente bucal do tecido pulpar de dentes de macacos, realizaram o selamento coronário e examinaram esses dentes após seis meses. Amostras microbiológicas foram colhidas do canal radicular dos dentes de macacos em períodos de 7, 90 e 180 dias. O exame microscópico de todas as amostras foi realizado por microscopia a fresco (contraste/fase) e por coloração de Gram. Todas as polpas expostas se tornaram infectadas com microrganismos como *Streptococcus* alfa-hemolíticos, *Enterococcus*, coliformes e anaeróbios como os bacteróides, eubactéria,

propionibactéria e *Peptostreptococcus*. 90% dos dentes desenvolveram lesões periapicais visíveis radiograficamente.

Haapasalo e Orstavik (1983) realizaram exame bacteriológico em dois casos de infecções periapicais persistentes. Os dois casos não haviam respondido ao tratamento endodôntico convencional associado à administração sistêmica de penicilina e eritromicina. O cultivo das amostras foi realizado imediatamente após a colheita do material do interior dos canais radiculares. No primeiro caso, foi isolado *Enterobacter cloace*, e no segundo *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus spp.* Não foram detectados anaeróbios obrigatórios. O tratamento endodôntico obteve sucesso após a administração de medicamentos baseados na susceptibilidade antibiótica dos microrganismos isolados.

Ando e Hoshino (1990) estudaram a presença e os tipos de bactérias invasoras de camadas profundas de dentina (0.5 – 2.0 mm) da parede de canais radiculares infectados de dentes humanos recém-extraídos. Amostras foram colhidas em oito dentes com destruição de parte da coroa por cárie. Após a exodontia de cada dente, o ápice radicular e a cavidade coronária foram selados e os dentes foram colocados sob uma mistura de gás nitrogênio e gás carbônico na concentração de 5%. Os dentes foram desinfetados com iodo e transferidos para uma caixa em ambiente de anaerobiose contendo 80% de nitrogênio, 10% de hidrogênio e 10% de gás carbônico. Na caixa, as amostras da dentina do canal radicular foram colhidas e pesadas. A seguir, as amostras foram colocadas em placas contendo ágar e meio BHI, e incubadas em anaerobiose. Foram encontradas bactérias anaeróbias obrigatórias em 80% da amostra, em maior quantidade os gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*. Nas camadas mais profundas de dentina não foram detectadas cepas de bacilos anaeróbios Gram-negativos.

Nair *et al.* (1987) analisaram com microscopia de luz e eletrônica, nove lesões periapicais assintomáticas, removidas como blocos de biópsias durante o tratamento cirúrgico dos dentes afetados. Seis, das nove biópsias revelaram a presença de microrganismos na região apical do canal radicular. Quatro

continham uma ou mais espécies de bactérias e duas apresentavam leveduras. Dos três casos onde nenhum microrganismo pôde ser observado, um apresentou características histopatológicas de um granuloma de células gigantes. Estes achados sugerem que na maior parte dos dentes humanos tratados endodonticamente com lesões periapicais resistentes à terapia não-cirúrgica, os

Hashioka *et al.* (1992) avaliaram a relação entre os sintomas clínicos e a presença de bactérias anaeróbias em canais radiculares infectados. Foram avaliados microbiologicamente 28 dentes de 25 pacientes com periodontite apical. Os resultados demonstraram a presença freqüente de *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Porphyromonas* e *Bacteroides* nos casos com dor espontânea e à percussão; *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* e *Bacteroides* nos casos com dor à percussão, odor, exsudato e aumento de volume. *P. gingivalis* e *P. endodontalis* foram freqüentemente encontrados nos casos com dor à percussão, odor e presença de exsudato, indicando uma correlação positiva entre *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Porphyromonas* e *Bacteroides* isolados de canais radiculares infectados e dor à percussão, assim como entre *Porphyromonas* e *Bacteroides* e a presença de odor no interior dos canais radiculares.

Sundqvist (1992) investigou a existência de relações comensais ou antagonistas entre microrganismos nos canais radiculares de dentes com necrose pulpar e periodontite apical. Foram colhidas amostras de 65 canais radiculares de dentes de humanos e estas analisadas microbiologicamente. As espécies mais freqüentemente encontradas foram *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros* (*Parvimonas micra*), *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium alactolyticum*, *Eubacterium lentum* e *Wolinella recta*. Os resultados reafirmaram o conceito de que há um ambiente especial e seletivo dentro do canal, criado, em parte, pelos relacionamentos de cooperação e de antagonismo entre as bactérias ali presentes.

Gomes *et al.* (1995) estudaram a associação de bactérias específicas com alguns sinais endodônticos e sintomas clínicos. Para isso, foi feito o exame

microbiológico de 30 canais radiculares de pacientes que buscavam tratamento endodôntico; destes 14 relacionados com sintomatologia dolorosa, 20 com sensibilidade à percussão, 23 com presença de exsudato, 7 relacionados à edema, 5 com exsudato purulento e 4 com fístula. No total 57 espécies bacterianas diferentes foram encontradas nos canais radiculares. A correlação entre o aspecto clínico e o microbiológico foi observada particularmente com relação à sintomatologia dolorosa, onde os microrganismos anaeróbios foram isolados em 93% dos canais. Nos casos que não estavam relacionados com dor, a presença de microrganismos anaeróbios foi de apenas 53%. Os autores afirmaram que existe uma associação significativa entre dor e a presença de *Prevotella* e *Peptostreptococcus* sp. nos canais radiculares.

Gomes *et al.* (1996 a) procuraram avaliar se uma determinada combinação de bactérias específicas está associada com sinais e sintomas endodônticos. Foi realizado o estudo microbiológico de 70 canais radiculares, onde o material colhido com pontas de papel absorventes foi inoculado em quatro diferentes meios sólidos. O mesmo cone de papel também foi utilizado para inocular um meio semi-líquido, não seletivo para anaeróbios. Foram identificadas 65 espécies bacterianas diferentes, sendo que os microrganismos anaeróbios obrigatórios totalizaram 64% das espécies isoladas. Os anaeróbios foram isolados de 70,3% dos casos onde havia dor, confirmando a associação dos anaeróbios com a sintomatologia dolorosa.

Também em 1996 (b), Gomes *et al.* estudaram as variações na susceptibilidade de componentes da microbiota endodôntica aos procedimentos biomecânicos. Amostras microbiológicas foram colhidas de 42 canais radiculares, sendo que foram divididos em 2 grupos: grupo 1 que apresentava dentes sem tratamento endodôntico anterior e grupo 2 que já havia sido submetido a tratamento endodôntico prévio. Amostras colhidas antes e após a instrumentação e os achados bacterianos foram comparados. Houve uma significativa diminuição entre a primeira e a segunda colheita em relação a anaeróbios e a espécies Gram-positivas, especialmente *Peptostreptococcus* spp. Ainda assim, os autores

concluíram que certas espécies são mais resistentes a procedimentos biomecânicos que outras.

Gonçalves e Mouton (1999) avaliaram a prevalência de *Bacteroides forsythus* (*T forsythia*) em canais radiculares com polpas necróticas e presença de lesão periapical visível radiograficamente. Foram examinados 11 canais radiculares por meio de quatro técnicas, entre elas o PCR e o slot-blot, ambos baseados na biologia molecular. Através do método de PCR evidenciou a espécie em um maior número de canais, 6/11. Pela técnica de slotblot, 3/11; 5/11 pelo ELISA e 4/11 pela imunofluorescência.

Gonçalves *et al.* (1999) colheram amostras de canais radiculares infectados e de biofilme bacteriano subgingival de 10 pacientes sem lesões de cáries ou restaurações profundas. As amostras foram submetidas à cultura em anaerobiose para detecção de anaeróbios pigmentados de negro. A técnica PCR com *primer* arbitrário foi realizada para examinar a diversidade genética dos microrganismos isolados. De acordo com os resultados observados pelos autores, os tecidos periodontais e os canais radiculares podem ser colonizados pelos mesmos tipos clonais de anaeróbios pigmentados de negro.

Siqueira *et al.* (2000) examinaram o conteúdo de 28 canais radiculares utilizando 42 sondas de DNA e *Checkerboard* DNA-DNA *Hybridization*. Para confirmar a presença de DNA bacteriano nas amostras, foi realizado um teste PCR com *primers* comuns a maioria das espécies bacterianas. Ao teste *Checkerboard* DNA-DNA *Hybridization*, 22 das 42 sondas utilizadas foram reativas com pelo menos uma das amostras. O número de espécies bacterianas em cada amostra foi em média 4,7 espécies, variando de 1 a 17. Das 28 amostras, 17 foram positivas para pelo menos uma das sondas de DNA. As espécies prevalentes foram *Bacteroides forsythus* (*T forsythia*), *Haemophilus aphrophilus*, *Corynebacterium matruchoti*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. Os métodos baseados na biologia molecular podem fornecer conhecimento adicional a respeito da microbiota endodôntica uma vez que permitem a detecção

de bactérias que não são facilmente identificadas pelas técnicas convencionais de cultura.

Sunde *et al.* (2002) realizaram um estudo a fim de identificar as bactérias presentes em lesões periapicais de dentes que não apresentavam sintomatologia dolorosa. Foram selecionados para a amostra 34 dentes com canais radiculares endodonticamente tratados, portadores de lesões periapicais. A amostra foi dividida em dois grupos, de acordo com a incisão utilizada para exposição da lesão periapical: incisão marginal ou submarginal. As lesões foram removidas com o auxílio de curetas esterilizadas, e levadas a um recipiente contendo meio de transporte (PRAS). Foi realizada a técnica de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, utilizando 40 sondas de DNA completo. Nos casos onde foi realizada incisão marginal, o número de espécies bacterianas evidenciadas foi maior, sugerindo que nestes casos, bactérias que colonizam primariamente os tecidos periodontais, podem de forma iatrogênica, alcançar os tecidos periapicais subjacentes.

Jung *et al.* (2000) procuraram identificar espécies de espiroquetas originárias de infecções endodônticas e determinar sua associação com *Bacteroides forsythus* (*T forsythia*) e *Porphyromonas gingivalis* em dentes portadores de lesão periapical visível radiograficamente. Para isso, foram colhidas amostras do conteúdo dos canais radiculares de 79 dentes, e realizada análise por PCR com a amplificação do gene 16 rRNA. Foi realizada também hibridação *dot-blot* com 8 sondas de oligonucleotídeos espécie-específicas. Como espécie mais freqüente foi detectada *P gingivalis* seguida de *Treponema maltophilum*, *Bacteroides forsythus* (*T forsythia*) e *Treponema socranskii*. Foram observadas associações entre *T maltophilum*, *B forsythus* e *P gingivalis*.

Siqueira e Lopes (2001) examinaram a presença de bactérias na superfície radicular apical de dentes não tratados endodonticamente associados a lesões periapicais crônicas. Foram extraídos 27 dentes de humanos com extensas lesões de cárie e lesões periapicais de variados tamanhos. Após fixação, as lesões foram removidas e os cinco mm finais da porção apical de cada raiz foram

seccionados. A presença de bactérias na superfície radicular foi examinada utilizando um microscópio eletrônico de varredura. Células bacterianas foram observadas próximas ao forame apical, mas restritas ao canal radicular. Bactérias na superfície extra-radicular foram observadas em um dente dos 27 estudados (4% dos casos).

Rôças *et al.* (2001) procuraram determinar a existência de associação entre os microrganismos *Bacteroides forsythus* (*T forsythia*), *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, conhecidos patógenos periodontais. Por meio da biologia molecular foram estudados 50 canais radiculares de dentes sem vitalidade pulpar e com lesão periapical. O DNA das amostras foi extraído e examinado por PCR. Em 33 casos foi encontrado pelo menos um dos microrganismos estudados. *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Bacteroides forsythus* foram detectados em 44%, 30% e 20% dos casos respectivamente. Os três microrganismos foram identificados em conjunto em 4 casos.

Peters *et al.* (2002) avaliaram as bactérias encontradas em infecções endodônticas de dentes portadores de lesões periapicais crônicas sem sintomatologia ou sinais clínicos. Amostras do conteúdo de 58 canais radiculares foram cultivadas em anaerobiose, e os microrganismos contados e classificados. Todas as amostras apresentaram crescimento bacteriano. Microrganismos anaeróbios obrigatórios representaram 87% de toda a amostra. A espécie bacteriana mais prevalente foi *Prevotella intermedia*, presente em 33% dos canais radiculares analisados, *Peptostreptococcus micros* (*Parvimonas micra*), em 29% dos canais, e *Actinomyces odontolyticus*, em 19%. De acordo com os resultados observados, os autores concluíram que os patógenos responsáveis por patologias endodônticas não infectam os canais radiculares de forma randômica, mas são encontrados em combinações específicas.

Jacinto *et al.* (2003) estudaram a correlação entre a composição da microbiota de canais radiculares infectados de dentes com periodontite apical com a presença de sinais e sintomas clínicos. Testaram, ainda, a susceptibilidade a

antibióticos de cinco bactérias anaeróbias mais comumente encontradas em canais radiculares de dentes sintomáticos. Amostras bacterianas foram colhidas de 48 canais radiculares, 29 sintomáticos e 19 assintomáticos. Os dentes sintomáticos apresentaram um maior número de anaeróbios obrigatórios nos canais radiculares e um maior número de espécies bacterianas. Mais de 70% das bactérias isoladas foram anaeróbios obrigatórios. Relações foram estabelecidas entre alguns microrganismos específicos (anaeróbios Gram-negativos) e a presença de dor espontânea e de dor à percussão e à palpação. A maioria das espécies bacterianas anaeróbias testadas foi susceptível a todos os antibióticos estudados, sendo que a espécie que se apresentou menos susceptível foi *Prevotella intermedia/nigrescens* contra a Penicilina G.

Buscando identificar os microrganismos associados a canais radiculares com abscessos periapicais, Sousa *et al.* (2003) colheram amostras de 30 canais radiculares, utilizando pontas de papel absorvente esterilizadas. Do total de 117 tipos diferentes de bactérias encontradas, 75 eram anaeróbios obrigatórios. Os anaeróbios obrigatórios mais frequentemente isolados foram: *Peptostreptococcus micros* (*Parvimonas micra*), *P prevotti* (*Anaerococcus prevotii*) e *F necrophorum*. Bactérias facultativas como *Gemella morbillorum* e *Streptococcus mitis* foram também encontradas, porém, em menor quantidade. Concluíram que bactérias anaeróbias Gram-positivas predominam na microbiota mista de canais radiculares com abscesso periapical.

A prevalência de *Treponema socranskii* em infecções endodônticas foi estudada por Siqueira Jr. e Rôças (2003) por meio do *nested PCR*. As amostras foram colhidas de 60 canais radiculares com necrose pulpar e diferentes patologias periapicais. O DNA extraído das amostras foi inicialmente amplificado por meio de iniciadores universais 16S rDNA. Uma segunda amplificação, desta vez com os produtos do PCR, foi realizada para detectar um fragmento específico do *T socranskii* 16S rDNA. *T socranskii* foi detectado em 11 dos 28 casos assintomáticos (39,3%), 5 dos 12 canais radiculares associados com periodontite apical aguda (41,7%), e 5 dos 20 casos diagnosticados como abscesso periapical

agudo (25%). Não foi possível observar relação entre a presença de *T socranskii* e a ocorrência de sintomatologia. Em geral, este microrganismo foi detectado em 21 das 60 amostras (35%).

Rôças *et al.*(2004) estudaram a associação da espécie *Enterococcus faecalis* com diferentes formas de doenças periapicais. Esta espécie é ocasionalmente isolada de casos de infecção endodôntica primária, mas é freqüentemente encontrada em falhas de tratamento endodôntico. As amostras foram colhidas de canais radiculares não tratados endodonticamente, associados com lesões periapicais crônicas assintomáticas, pericementite apical aguda ou abscesso periapical agudo; e de canais radiculares já tratados endodonticamente, associados a lesões periapicais crônicas assintomáticas. Foi extraído o DNA das amostras, e para identificação da espécie *E faecalis*, foi utilizada a técnica de *Nested PCR*. Foi possível a detecção de *E faecalis* em 7 dos 21 canais radiculares associados com lesões assintomáticas, em 1 dos 10 canais radiculares associados com pericementite apical aguda, e em 1 dos 19 casos de abscesso periapical agudo. A análise estatística demonstrou que a espécie *E faecalis* está significativamente mais associada com casos assintomáticos do que com as infecções com características agudas. *E faecalis* foi detectada em 20 dos 30 casos de infecção persistente pós-tratamento endodôntico. Quando comparadas as freqüências desta espécie nos casos de infecção persistente e nos casos de infecção endodôntica primária, a análise estatística demonstrou uma forte associação do *E faecalis* com as infecções persistentes.

Foschi *et al.* (2005) avaliaram pelo método de cultura e métodos moleculares a presença de *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* (*T forsythia*) e *Treponema denticola* em canais radiculares infectados. Foram utilizados 62 dentes de 54 pacientes, 70% com infecções endodônticas primárias. *T denticola* e *E faecalis* foram detectados em 24% dos casos, *P gingivalis* em 13%, *P intermedia* em 8%, *T forsythensis* em 7%. Os autores sugerem que essas espécies possuem um papel importante nas patologias endodônticas.

Vianna *et al.* (2005) avaliaram a microbiota dos canais radiculares de 20 dentes com necrose pulpar utilizando o método de cultura e o método molecular: microarray (DNA chip). Os microrganismos mais freqüentemente encontrados por DNA chip foram: *Micromonas micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Veillonella parvula*, *Eubacterium nodatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces odontolyticus* e *Streptococcus constellatus*. *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* não puderam ser encontradas pelo método da cultura de microrganismos. Os autores concluíram que o DNA chip pode complementar os métodos de cultura para identificação da microbiota dos canais radiculares.

Gomes *et al.* (2005) avaliaram pelo método da cultura e PCR a presença de *P gingivalis*, *P endodontalis*, *P intermedia* e *P nigrescens* em dentes com lesões periapicais. Amostras de 100 canais radiculares (50 com infecções primárias e 50 com secundárias). *P gingivalis* foi raramente isolado por cultura (1%), entretanto, freqüentemente encontrado por PCR (38%). *P endodontalis* não foi isolado por cultura, mas por PCR foi encontrado em 25% das amostras. *P gingivalis*, *P endodontalis*, *P intermedia* e *P nigrescens* foram os mais freqüentemente identificados em casos de infecções primárias do que secundárias. Entretanto a freqüência de microrganismos produtores de pigmento negro foi elevada utilizando ambos os métodos.

Em 2006, Jacinto *et al.* estudaram a prevalência de *Porphyromonas gingivalis* em canais radiculares de dentes com abscesso periapical e avaliaram a susceptibilidade dessa espécie a alguns antibióticos prescritos freqüentemente. Amostras foram obtidas de 70 canais radiculares de dentes com abscesso. A obtenção das amostras bem como os procedimentos laboratoriais foram realizados por métodos de cultura microbiológica apropriados para espécies anaeróbias. Os antibióticos testados foram: amoxicilina, amoxicilina associada ao clavulonato, azitromicina, benzilpenicilina, cefaclor, clindamicina, eritromicina, metronidazol e tetraciclina. Um total de 352 tipos de microrganismos foi

encontrado, pertencente a 69 espécies diferentes. Oitenta e três por cento dos microrganismos eram anaeróbios obrigatórios e 47,5% das bactérias isoladas eram Gram-negativas. *Porphyromonas gingivalis* foi encontrado em 20 canais radiculares e mais freqüentemente em casos sintomáticos. Todos dessa espécie, *P.gingivalis*, foram sensíveis a: amoxicilina, amoxicilina associada ao clavulonato, benzilpenicilina, cefaclor, clindamicina, metronidazol e tetraciclina. Um tipo foi resistente a eritromicina e oito foram resistentes a azitromicina. Os autores concluíram que o patógeno *Porphyromonas gingivalis* é isolado com freqüência de canais radiculares de dentes com abscessos periapicais. Amoxicilina, assim como amoxicilina associada ao ácido clavulânico e benzilpenicilina foram efetivas contra *P.gingivalis*.

Seol *et al.* (2006) propuseram detectar a presença de *Porphyromonas endodontalis*, *P.gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *P.nigrescens* e *P.tanneriae* em amostras clínicas utilizando o método de reações em cadeia da polimerase (PCR). Dois diferentes protocolos de PCR foram utilizados (um para as duas espécies de *Porphyromonas* e outro para as três espécies de *Prevotella*). Os resultados foram comparados àqueles obtidos pelos métodos tradicionais de cultura microbiológica. Amostras microbianas foram colhidas assepticamente de 40 canais radiculares infectados de pacientes com abscesso. Condições de anaerobiose foram obtidas para a técnica de cultura utilizando um kit "Rapid ID 32". O método de PCR foi processado por meio do DNA extraído de cada amostra. Pelo menos uma das cinco espécies de bactérias pigmentadas de negro foram encontradas em 65% (26 de 40) das amostras utilizando PCR, e em 15% (6 de 40) utilizando o tradicional método de cultura. O PCR foi mais rápido, sensível, específico e efetivo em detectar bactérias pigmentadas de negro do que os procedimentos convencionais de cultura.

Em 2008, Jacinto *et al.*, avaliaram a freqüência, interações microbianas e suscetibilidade antimicrobiana de *F.nucleatum* e *F.necrophorum* encontrados em infecções primárias de canais radiculares através do método de cultura microbiológica. Das 110 amostras, encontraram *F.nucleatum* em 38 canais e

estavam associados a *P gingivalis*, *Prevotella* spp. e *Eubacterium* spp. . *F necrophorum* foi encontrado em 20 dos 110 canais analisados e estava associado ao *A. prevotii*. Concluíram também que tanto o *F nucleatum* quanto o *F necrophorum* encontrados foram sensíveis a Amoxicilina.

Gomes *et al.* (2008) investigaram a presença de *Gemella morbillorum* em infecções endodônticas primárias (50 casos) e persistentes (50 casos) através de dois métodos de identificação: cultura e nested PCR. Encontraram a espécie em 38% dos canais com infecção primária e em 8% com infecção secundária através da técnica de cultura. Por PCR encontraram *Gemella morbillorum* em 82% dos casos de infecção primária e em 72% dos casos de infecção secundária.

2.6.3 MICROBIOTA DAS LESÕES ENDO-PERIODONTAIS

Kipioti *et al* (1984) estudando a microbiota periodontal e endodôntica de 6 dentes necrosados, com coroas intactas, sem lesões periapicais e com bolsas periodontais profundas, demonstraram que a microbiota de canais radiculares era similar àquela encontrada na adjacência das bolsas periodontais. Os organismos mais frequentemente isolados em ambos os locais foram *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus* spp, *Capnocytophaga* spp, *Actinomyces* spp e *Streptococcus* spp. Os autores enfatizaram que a bolsa periodontal era a possível fonte de infecção dos canais radiculares.

Kurihara *et al.* (1995) estudaram a microbiota dos canais radiculares de dentes necrosados e sem cárie aparente e de bolsas periodontais de 5 pacientes. Os autores encontraram mais microrganismos nas bolsas periodontais que nos canais radiculares, sendo que a microbiota das bolsas periodontais consistia principalmente por bacilos e cocos. Espiroquetas foram encontradas apenas nas bolsas periodontais. As espécies bacterianas mais encontradas nos canais radiculares foram *Peptostreptococcus* e *Streptococcus* (cocos Gram-positivos) e

Actinomyces e *Rothia* (bacilos Gram-positivos). As bactérias mais encontradas nas bolsas periodontais foram bastonetes anaeróbios facultativos e obrigatórios (Gram-negativos e positivos), *Campylobacter* spp, *Fusobacterium* spp, *Peptostreptococcus productus* e *Peptostreptococcus* spp, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans* e spp.

Rupf *et al.* (2000) estudaram os perfis dos patógenos periodontais nas doenças pulpar e periodontal associadas e encontraram perfis comparáveis exceto no grupo da periodontite progressiva do adulto.

De acordo com Dahlén (2002), não houve ainda uma caracterização específica da microbiota da lesão endo-periodontal. As bactérias associadas a ela são similares às encontradas nas lesões endodônticas e periodontais isoladas. O autor sugere que o padrão bacteriano possivelmente seja único, uma vez que há similaridade na microbiota das lesões endodônticas e periodontais.

2.7 REDUÇÃO BACTERIANA DO PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO E APÓS O USO DE MEDICAÇÕES INTRACANAIS

2.7.1 *In vitro*

Siqueira *et al.* (1999) avaliaram *in vitro* a redução da população microbiana de canais radiculares antes e após o preparo mecânico. Os canais foram infectados com *Enterococcus faecalis* e instrumentados manualmente com limas Nitiflex, GT e Profile 0,06 (série 29, rotatória). A irrigação foi realizada com solução salina. Os autores verificaram que todas as técnicas foram capazes de reduzir mais de 90% o número de microrganismos do interior dos canais radiculares.

Dametto (2005) teve como proposta avaliar e comparar *in vitro* a atividade antibacteriana da clorexidina gel 2% frente a *Enterococcus faecalis* em relação a outros irrigantes (clorexidina líquida 2% e hipoclorito de sódio 5,25%).

Para tal avaliação, raízes de pré-molares inferiores humanos foram preparadas por instrumentação seriada, autoclavadas e contaminadas por um período de 7 dias com monoculturas de *Enterococcus faecalis*. Em seguida os dentes foram divididos em 5 grupos e submetidos ao preparo químico-mecânico com variação apenas da substância química auxiliar. Para se avaliar o potencial antimicrobiano das substâncias químicas auxiliares, foram realizadas 3 coletas bacteriológicas denominadas: pré-tratamento (coleta antes do preparo químico-mecânico); pós-tratamento (imediatamente após o preparo químico-mecânico) e final (7 dias após o preparo químico-mecânico). Uma vez obtidas as coletas, estas foram cultivadas a fim de se determinar a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), sendo então os resultados analisados estatisticamente. O gluconato de clorexidina 2,0% tanto na forma gel quanto líquida promoveram uma redução significativa nas coletas imediata e 7 dias após. Já o hipoclorito de sódio 5,25% apenas reduziu UFC na coleta imediatamente após o PQM, constatando crescimento bacteriano na coleta final. Conclui-se que, dentre os meios químicos auxiliares testados como irrigante endodôntico, o gluconato de clorexidina 2%, gel e líquida, foram mais efetivos que o NaOCl 5,25% sobre o *E faecalis*.

Siqueira *et al.* (2002) avaliaram *in vitro* a redução microbiana nos canais radiculares instrumentados pela técnica manual com limas de níquel titânio irrigadas com NaOCl 2,5% seguido de ácido cítrico (G1), limas rotatórias alternadas irrigadas com NaOCl 2,5% e clorexidina líquida 2% (G2) e limas rotatórias GT irrigadas com NaOCl 2,5%. As amostras foram coletadas antes e após a instrumentação e as unidades formadoras de colônia (UFC/mL) contadas. Todas as técnicas utilizadas promoveram redução microbiana similar nos canais radiculares. Os autores concluíram que é importante utilizar uma solução irrigadora com potencial antimicrobiano durante o preparo químico-mecânico independentemente da técnica empregada.

Berber (2005) avaliou *in vitro* o uso de substâncias químicas auxiliares do preparo mecânico (clorexidina; CLX) gel e líquida 2%, hipoclorito de sódio (NaOCl) 5,25%, 2,5% e 0,5% e soro fisiológico e técnicas de instrumentação

Híbrida; Cérvico-Apical (FOP-UNICAMP); instrumentação rotatória com HERO 642 na redução de *Enterococcus faecalis* no canal radicular e nos túbulos dentinários. Foram utilizadas 270 raízes de pré-molares inferiores contaminadas com *Enterococcus faecalis*, divididas em 18 grupos nos quais as técnicas de instrumentação foram testadas variando o uso das substâncias químicas auxiliares. Amostras bacteriológicas do canal radicular foram coletadas antes e imediatamente após o preparo químico-mecânico, as UFC/mL contadas. Além disso, amostras de dentina foram removidas dos terços apical, médio e cervical. Na luz do canal radicular, todas as substâncias, inclusive o soro fisiológico quando associados à instrumentação mecânica, promoveram uma redução de quase 100% nas coletas microbiológicas imediatamente após o preparo químico-mecânico. Nas coletas resultantes das raspas de dentina, em todos os terços, técnicas e profundidades o NaOCl 5,25% e a CLX gel 2% obtiveram os melhores resultados na redução bacteriana dos túbulos dentinários seguidos do NaOCl 2,5%, CLX líquida 2% e NaOCl 0,5%. Concluiu-se que, o NaOCl 5,25% a CLX gel 2% com as técnicas Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP e HERO, foram mais efetivos na eliminação do *E.faecalis* dos túbulos dentinários e do canal radicular.

2.8.2. *In vivo*

O efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio a 0,5%, como solução irrigadora de canais radiculares, foi avaliado por Byström & Sundqvist (1983). O preparo biomecânico foi realizado em 30 dentes unirradiculares, apresentando coroa intacta, necrose pulpar e lesão periapical. Todas as amostras bacteriológicas iniciais colhidas dos canais radiculares evidenciaram crescimento bacteriano, sendo isoladas 169 espécies bacterianas, com 80% de incidência de anaeróbios. Na maioria das culturas houve mais de uma espécie por amostra, em média de 4 espécies por canal radicular, sendo *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* e *Bacteroides* os gêneros mais freqüentemente isolados. Foi

realizado um total de 4 preparos biomecânicos, com intervalos de 2 a 4 dias, obtendo-se a cada sessão uma coleta bacteriológica. Após o tempo pré-estabelecido, foram feitos testes bacteriológicos dos canais. Os resultados evidenciaram culturas negativas em 12 dos 15 espécimes tratados com hipoclorito de sódio a 0,5% e 8 dos 15 tratados com soro fisiológico. Os resultados sugerem melhor efetividade da solução de hipoclorito de sódio a 0,5% como irrigante de canais em comparação ao soro fisiológico.

Byström & Sundqvist, em 1987, avaliaram *in vivo* a ação antibacteriana após a realização do preparo biomecânico em 31 dentes unirradiculares, portadores de necrose pulpar intacta e lesão periapical visível radiograficamente. O sistema de instrumentação ultra-sônico foi empregado com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% como solução irrigadora. Culturas bacteriológicas, em anaerobiose, foram realizadas decorridos sete dias da primeira e segunda sessões, apresentando 29% e 22,5% de culturas bacteriológicas positivas, respectivamente.

Gomes *et al.* (1996 b) avaliaram as variações na susceptibilidade da microbiota endodôntica aos procedimentos biomecânicos. Quarenta e dois canais radiculares foram investigados, amostras foram coletadas antes e após a instrumentação e os microrganismos comparados. Em 15 casos de infecções primárias não foram observadas mudanças na microbiota. Entretanto, nos 27 casos de infecções secundárias houve uma redução no número de *Peptostreptococcus*. Quando os 42 casos foram avaliados conjuntamente houve um declínio no número de anaeróbios, espécies Gram-positivas, especialmente *Peptostreptococcus* após o procedimento biomecânico. Os autores concluíram que algumas espécies foram mais resistentes ao preparo biomecânico.

Leonardo *et al.* (1999) avaliaram *in vivo* a atividade antimicrobiana da solução de clorexidina 2%. Foram utilizados 22 dentes (incisivos e molares) de 12 pacientes. As amostras foram coletadas antes e após 48 horas da instrumentação, nesses período os canais permaneceram vazios, isto é sem medicamento intracanal. Os resultados mostraram que houve uma redução de 100% de *S.*

mutans e em geral houve uma redução de 77,78% para microrganismos anaeróbios. Os autores concluíram que a clorexidina previne *in vivo* o crescimento microbiano devido aos seus efeitos residuais até 48 horas após sua utilização.

Peters *et al.* (2002) avaliaram os efeitos da instrumentação, irrigação com hipoclorito de sódio 2,0% e medicação intracanal de dentes com polpas infectadas e com lesões periapicais. Foram coletadas amostras de 43 dentes antes (S1), após o tratamento durante a primeira visita de atendimento (S2), antes (S3) e após tratamento (S4) na segunda visita de atendimento. Na primeira visita os dentes foram instrumentados e divididos em dois grupos, em um grupo os dentes foram obturados (metade dos dentes avaliados) e outro grupo os canais preenchidos com hidróxido de cálcio ou salina. Após 4 semanas os dentes que continham medicação foram acessados novamente e coletados (S3, S4). O número de UFC das amostras diminuíram significativamente no final da primeira sessão de $1,0 \times 10^6$ para $1,0 \times 10^3$, mas houve um aumento no número de UFC para as coletas S3 e S4. Não houve diferenças de UFC entre S2 e S4 (após instrumentação). As espécies mais freqüentemente isoladas foram *P. intermedia*, *Capnocytophaga* spp., *Actinomyces odontolyticus*, *Propionibacterium acnes* e *Propionibacterium micros*. Os autores concluíram que o número de microrganismos aumentou no período entre visitas, apesar do uso hidróxido de cálcio como medicação intracanal por 4 semanas.

Ferrari *et al.* (2005) avaliaram o efeito dos procedimentos endodônticos em enterococos, bactérias entéricas e fungos em infecções endodônticas primárias. Vinte e cinco dentes unirradiculares com necrose pulpar, câmara pulpar intacta e lesões periapicais foram utilizadas neste estudo. As amostras foram coletadas antes e após a instrumentação. Os resultados mostraram que foram isolados microrganismos em 92% amostras iniciais, destes 22% eram enterococos, enterobactérias ou fungos. Após 7 dias sem a colocação de medicamentos intracanaís, 100% dos canais continham microrganismos, 52% apresentavam uma das três espécies pesquisadas. Entretanto após o emprego de

7 dias de medicamento intracanal (paramonoclorofenol, rinosoro com polietilenoglicol); as enterobactérias e fungos não foram encontradas, entretanto *E. faecalis* foi encontrado. Os autores concluíram que os enterococos, enterobactérias e fungos estão presentes em infecções endodônticas primárias. Enterococos, particularmente *E. faecalis* e *E. faecium* mostraram-se resistentes à remoção por meio do preparo químico-mecânico e da medicação intracanal.

Vianna *et al.* (2006) avaliaram *in vivo* a redução microbiana após o preparo químico-mecânico em canais radiculares de dentes humanos com polpas necrosadas e lesões periapicais. Foram selecionados 32 dentes unirradiculares, os quais foram instrumentados com auxílio da clorexidina gel (2%) ou NaOCl (2,5%). A redução microbiana foi avaliada pelo método da reação de polimerase em cadeia em tempo real (Real-time PCR) utilizando dois diferentes experimentos (SYBRGreen e Taq Man) e a título de comparação a redução microbiana também foi avaliada pelo método tradicional de cultura. Os resultados mostraram que tanto o grupo da clorexidina como o do hipoclorito de sódio foram capazes de reduzir substancialmente a quantidade de microrganismos no interior dos canais radiculares acima de 96%. Entretanto, pelo método da cultura pôde-se verificar que o grupo instrumentado com NaOCl apresentou maior número canais livres de microrganismos (75% dos casos), enquanto que o grupo da clorexidina 50% ainda apresentaram positivos para cultura. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio apresentou maior capacidade de eliminar microrganismos presentes nos canais radiculares de dentes com infecções primárias.

Martinho & Gomes (2008) quantificaram as endotoxinas pelo ensaio Limulus amoebocyte lysate e as bactérias cultiváveis pelo método de cultura em dentes com infecções endodônticas primárias antes e após o preparo químico-mecânico utilizando hipoclorito de sódio a 2,5%. Detectaram a presença de endotoxinas e microrganismos em todos os 24 casos iniciais com a concentração média de endotoxinas de 139 unidades/mL e $2,64 \times 10^5$ UFC/mL. Altos índices de LPS foram encontrados nos casos com sintomatologia dolorosa. Após a

instrumentação, houve diminuição de 59,99% da quantidade de endotoxinas encontradas e 99,78% dos microrganismos.

2.8 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS AUXILIARES AO PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO

A ação mecânica dos instrumentos endodônticos é incapaz de promover completa desinfecção de algumas áreas devido às complexidades anatômicas dos canais (Byström *et al.*, 1985). Para tanto, é importante ressaltar a necessidade da utilização de substâncias químicas auxiliares com o intuito de promover uma significativa redução dos depósitos bacterianos nos canais radiculares, uma vez que, auxiliarão na lubrificação do canal radicular durante a ação de corte dos instrumentos, na remoção de *smear layer*, na desinfecção, dissolução do exsudato, dissolução do tecido pulpar necrosado e pré-dentina (Spangberg, 1982; Byström & Sundqvist, 1983). Algumas substâncias químicas têm sido utilizadas com estes objetivos. Dentre elas o hipoclorito de sódio (NaOCl), clorexidina, EDTA e ácido cítrico se destacam.

A partir da introdução do hipoclorito de sódio (NaOCl) como solução irrigadora em Endodontia (Walker, 1936), esta substância química vem sendo amplamente utilizada. Sua ação antimicrobiana (Gomes *et al.*, 2001, Ferraz *et al.*, 2001, Vianna *et al.*, 2004) e dissolução tecidual (Beltz *et al.*, 2003, Naenni *et al.*, 2004) têm sido demonstradas em vários estudos. O NaOCl é conhecido por sua atividade antimicrobiana frente aos microrganismos encontrados no interior do sistema de canais radiculares (Byström & Sundqvist, 1983; Foley *et al.*, 1983; Hauman & Love, 2003; Berber *et al.*, 2006). A ação antimicrobiana da solução de hipoclorito de sódio ocorre devido ao seu equilíbrio dinâmico, demonstrado na seguinte reação química: $\text{NaOCl} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{NaOH} + \text{HOCl} \leftrightarrow \text{Na}^+ + \text{OH}^- + \text{H}^+ + \text{OCl}^-$

O NaOCl (hipoclorito de sódio, sal) reage com molécula de água (H₂O) formando NaOH (hidróxido de sódio, base forte) e HOCl (ácido hipocloroso, ácido

fraco). O hidróxido de sódio atua como solvente orgânico e de gordura, formando sabão (reação de saponificação). O ácido hipocloroso possui efeito antimicrobiano por liberar cloro nascente, que se liga ao grupamento NH₂ dos aminoácidos, formando as cloraminas, interferindo no metabolismo celular. Além disso, inibe a função enzimática bacteriana por oxidação irreversível dos grupos SH (sulfidril) de enzimas bacterianas essenciais (Vianna, 2002). Entretanto, a toxicidade do NaOCl é diretamente proporcional à concentração (Becking, 1991; Hülsmann & Hahn, 2000; Tanomaru Filho *et al.*, 2002). A literatura relata casos de injeções acidentais deste irrigante nos tecidos periapicais (Becking, 1991; Kaufman & Keila, 1989), causando várias complicações aos tecidos. Tais acidentes são de relevância clínica por poderem gerar dor severa, rápido desenvolvimento de edema, hematoma, necrose e abscessos. Gernhardt *et al.* (2004) demonstraram por intermédio de um caso clínico os efeitos lesivos aos tecidos moles proporcionados pela irrigação endodôntica com NaOCl e sugerem precauções na sua utilização.

A clorexidina tem sido recomendada como uma substância irrigadora alternativa ao NaOCl devido a sua biocompatibilidade (Jeansonne & White, 1994). Seu uso tem sido proposto na forma de sal digluconato, líquido ou gel, em diferentes concentrações tanto como agente irrigante dos canais radiculares (Delany *et al.*, 1982; Greenstein *et al.*, 1986; Fardal & Turnbull, 1986; Jeansonne & White, 1994; Ferraz, 1999; Leonardo *et al.*, 1999, Vianna *et al.*, 2004) quanto como medicação intracanal (Delany *et al.*, 1982; Heling *et al.*, 1992 b; Siqueira & Uzeda, 1997; Vianna, 2002; Gomes *et al.*, 2006).

A clorexidina possui: a) ação antimicrobiana imediata; b) um amplo espectro antibacteriano sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, anaeróbias, facultativas e aeróbias, leveduras e fungos (Hennessey, 1973; Greenstein, *et al.*, 1986; Fardal & Turnbull, 1986, Vianna *et al.*, 2004; Dametto *et al.*, 2005), especialmente *Candida albicans* (Waltimo *et al.*, 1999); c) relativa ausência de toxicidade (Greenstein *et al.*, 1986); d) capacidade de adsorção pela

dentina e lenta liberação da substância ativa, o que prolonga sua atividade antimicrobiana residual (Heling *et al.*, 1992; Jeansonne & White, 1994; White *et al.*, 1997).

A clorexidina é uma base anti-séptica forte e é mais estável na forma de sal (gluconato, acetato ou hidrocloreto). Para uso oral é preparada na forma de digluconato em diferentes concentrações, por possuir alta solubilidade em água e, quando em pH fisiológico, dissociar-se e interagir com a hidroxiapatita, película adquirida, glicoproteínas salivares, superfície de mucosas e às paredes celulares das bactérias (Greenstein, *et al.*, 1986; Fardal & Turnbull, 1986). Hennessey (1973) relata que a interação da clorexidina com as células bacterianas ocorre devido a: a) aderência à parede celular; b) alteração da permeabilidade da membrana celular; c) precipitação e coagulação do conteúdo citoplasmático.

Esta ação ocorre devido à aderência das moléculas catiônicas de clorexidina às paredes celulares dos microrganismos, que são carregadas negativamente, alterando a permeabilidade da membrana celular, o que resulta na perda dos componentes intracelulares e no desequilíbrio osmótico da célula. Em baixa concentração a clorexidina promove a saída das substâncias de baixo peso molecular, como o potássio e o fósforo, exercendo assim o efeito bacteriostático. Em alta concentração promove o efeito bactericida, pela precipitação ou coagulação do conteúdo citoplasmático, resultando na morte celular (Fardal & Turnbull, 1986). O efeito bacteriostático da clorexidina é considerado o mais importante porque a ligação da molécula de clorexidina é liberada lentamente em baixas quantidades (Fardal & Turnbull, 1986).

Diversos estudos têm demonstrado que a clorexidina inibe o crescimento de bactérias encontradas nas infecções endodônticas (Cervone *et al.*, 1990; Siqueira & Uzeda, 1997; Ferraz, 1999, Vianna *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2006), possui ação antimicrobiana residual, resultante de sua lenta liberação, 48 a 72 horas (White *et al.*, 1997; Leonardo *et al.*, 1999) ou até 7 dias (Dametto *et al.*, 2005) após a instrumentação do canal radicular. Além da ação residual possui

relativa ausência de citotoxicidade (Jeansonne & White, 1994).

Duas formulações têm sido propostas para o uso da clorexidina, a líquida e a gel. Alguns estudos mostram que a atividade antimicrobiana da clorexidina líquida é igual ou superior a gel quando o contato direto é utilizado como metodologia (Ferraz *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2004). Em contrapartida, a clorexidina gel facilita a instrumentação, lubrificando a luz do canal radicular, o que diminui o atrito entre parede e instrumento podendo reduzir, assim, a ocorrência de fraturas de instrumentos no interior do sistema de canais radiculares (Berber, 2005). Além de que, ao facilitar a instrumentação, a clorexidina gel termina por melhorar a capacidade dos instrumentos em eliminar tecidos orgânicos, o que compensa sua incapacidade de dissolvê-lo (Vivacqua-Gomes *et al.*, 2001). Outra vantagem da clorexidina gel sobre a líquida seria a diminuição da formação de *smear layer* (Ferraz *et al.*, 2001), o que não acontece com a líquida.

2.9 MEDICAÇÃO INTRACANAL

Os objetivos do emprego de medicações intracanaís são: promover a eliminação de bactérias que sobreviveram ao preparo químico-mecânico, atuar como barreira físico-química contra a infecção ou reinfecção por microrganismos da saliva, reduzir a inflamação perirradicular, solubilizar a matéria orgânica, neutralizar produtos tóxicos, controlar a exsudação persistente, controlar reabsorção inflamatória externa e estimular a reparação por tecido mineralizado (Leonardo, 2004).

O uso das medicações intracanaís tem se tornado cada vez mais limitado (De Deus, 1992), uma vez que a redução bacteriana é atingida em níveis satisfatórios após a conclusão de um preparo químico-mecânico com instrumentação e irrigação cuidadosas (Walton & Torabinejad, 1989).

Embora as medicações intracanaís não possam substituir o preparo químico-mecânico, seu emprego como coadjuvante em situações específicas é indicado (Siqueira Jr, 2004).

Duas abordagens podem ser consideradas quando se discute a utilização de medicações intracanal. A primeira seria que as bactérias remanescentes ao preparo químico-mecânico poderiam ser eliminadas e seus produtos tóxicos neutralizados com o emprego de tais substâncias. A segunda abordagem visa impedir a influência das bactérias remanescentes na perpetuação das lesões periapicais através do seu enclausuramento no interior do tecido dentinário através de uma obturação adequada do sistema de canais radiculares, imediatamente após o preparo do canal radicular. Assim, a realização de tratamento endodôntico em uma sessão ou em múltiplas sessões deve ser considerada como parte de uma abordagem integral, determinada pelas peculiaridades de cada caso. (Vivacqua-Gomes *et al.*, 2005)

Em estudo prospectivo, Peters & Wessellink (2001) avaliaram os índices de cicatrização de lesões periapicais em dentes com culturas microbianas negativas e positivas no momento da obturação quando o tratamento foi concluído em única sessão ou se empregou medicação intracanal de hidróxido de cálcio por 4 semanas. Decorridos quatro anos e meio após o término do tratamento, os autores observaram que nos casos de dentes tratados em sessão única, 81% apresentava regressão total da lesão enquanto que 19% demonstraram redução no tamanho da lesão. Quando o curativo de hidróxido de cálcio foi empregado, 71% dos casos apresentavam sem sinais radiográficos de alteração periapical, 23% apresentaram diminuição no tamanho da lesão enquanto que 1 caso apresentou insucesso. Não houve diferença significativa nos padrões de reparo quando os testes microbianos demonstraram cultura positiva no momento da obturação. Assim, os autores demonstraram que a presença de cultura positiva imediatamente antes da obturação, em tratamentos realizados em sessão única ou múltipla com o emprego de medicação intracanal, não influenciou no reparo de lesões periapicais.

2.9.1 Hidróxido de Cálcio

Dentre os vários empregos, merecem destaque àqueles relacionados à Endodontia: capeamento pulpar direto e indireto, pulpotomia, medicação intracanal, prevenção de reabsorções radiculares, reparo de perfurações iatrogênicas e tratamento de fraturas radiculares horizontais.

O hidróxido de cálcio é uma base forte, com pH 12,6, pouco solúvel em água e obtida a partir da calcinação do carbonato de cálcio, até sua transformação em óxido de cal. Com a hidratação do óxido de cálcio chega-se ao hidróxido de cálcio (Estrela *et al.*, 2005)

Foreman e Barnes, em 1990, relacionaram as diversas propriedades do hidróxido de cálcio tais como: capacidade de iniciação e indução de mineralização, indução da formação de dentina, destruição de bactérias, dissolução de material necrótico.

O hidróxido de cálcio deve ser associado a uma outra substância que permita a sua veiculação para o interior do sistema de canais radiculares. Essas substâncias são conhecidas como veículos e devem permitir a dissociação iônica do hidróxido de cálcio em íons cálcio e hidroxila, uma vez que suas propriedades são dependentes dessa ionização.

Os veículos podem ser classificados de acordo com suas características físico-químicas em veículos hidrossolúveis ou oleosos. Do ponto de vista da atividade antimicrobiana, podemos classificar os veículos como inertes ou biologicamente ativos. Os veículos inertes são biocompatíveis, mas não influenciam as propriedades antimicrobianas do hidróxido de cálcio. Dentre eles, destacam-se o soro fisiológico, a glicerina, o propilenoglicol e soluções anestésicas. A clorexidina, o PMCC e o tricresolformalina funcionam como veículos biologicamente ativos pois conferem às pastas de hidróxido de cálcio propriedades adicionais. (Lopes & Siqueira Jr, 2004)

Estrela & Pesce (1996), analisando quimicamente a liberação de íons hidroxila do hidróxido de cálcio, verificaram que quando se coloca hidróxido de

cálcio no canal radicular, 45,89% e 54,11% se dissociam respectivamente em íons hidroxila e íons cálcio.

O mecanismo de ação do hidróxido de cálcio ainda não está totalmente esclarecido. Segundo Estrela (2002) as propriedades do hidróxido de cálcio derivam da sua dissociação iônica em íons cálcio e íons hidroxila, sendo que, a ação destes íons sobre os tecidos e as bactérias, explicam as propriedades biológicas e antimicrobianas desta substância.

Para Lopes & Siqueira (2004) a ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio se dá por meio da perda da integridade da membrana citoplasmática bacteriana, por inativação enzimática e por dano ao DNA. A variação do pH influencia o crescimento bacteriano, uma vez que exerce ação sobre a atividade enzimática. Da mesma forma, pode afetar o metabolismo celular, alterando o crescimento e a proliferação celular (Estrela, 2002).

Estrela *et al.* (1994) demonstraram que há uma inativação enzimática bacteriana irreversível em condições extremas de pH, em longos períodos de tempo. No entanto, quando o valor de pH retornar aos níveis ideais para a ação enzimática, a sua atividade volta ao normal.

Durante a evolução da infecção endodôntica podem ocorrer inter-relações entre as espécies microbianas que são provavelmente baseadas em relações nutricionais e conseqüente estabelecimento de um ambiente favorável à colonização bacteriana (Gomes *et al.*, 1996 a, b). Outro mecanismo que explicaria a ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio seria a sua capacidade em absorver dióxido de carbono nos canais radiculares (Kontakiotis *et al.*, 1995). Dessa forma, espécies CO₂-dependentes terão seu crescimento inibido.

Safavi & Nichols (1993) avaliaram *in vitro* o efeito do hidróxido de cálcio sobre o LPS bacteriano através da quantificação de íons hidroxila livres de ácidos graxos após a exposição à medicação. A liberação de íons hidroxila está relacionada à alteração na conformação do ácido graxo, componente característico do LPS bacteriano, o que sugere a perda da toxicidade desse elemento. Após o tratamento com hidróxido de cálcio e análise em cromatografia

de gás, elevados níveis de íons hidroxila foram constatados, demonstrando a sua alta capacidade de inativação do LPS. Dessa forma, pode-se concluir que o hidróxido de cálcio tem a capacidade de alterar as propriedades biológicas do LPS bacteriano.

Para que o hidróxido de cálcio seja eficaz contra bactérias localizadas no interior dos túbulos dentinários, os íons hidroxila devem se difundir pela dentina em uma concentração iônica suficiente para exercer ação antimicrobiana. A permeabilidade dentinária e a sua capacidade tampão podem afetar a difusibilidade dos íons no maciço radicular (Nerwich *et al.*, 1993, Nakabayashi & Pashley, 1998). A maioria das espécies bacterianas que coloniza os canais radiculares consegue manter sua viabilidade até pH 9. No entanto o *Enterococcus faecalis* pode sobreviver em níveis de pH superiores através do desenvolvimento de mecanismos adaptativos em seu metabolismo (Evans *et al.*, 2002).

A tensão superficial de uma substância pode influenciar a sua capacidade de difusão. Estrela *et al.* (2002) demonstraram que a tensão superficial de pastas a base de hidróxido de cálcio foi alterada de acordo com o veículo empregado. Menores valores foram obtidos quando o hidróxido de cálcio foi empregado com PMCC, ao passo que altos valores foram obtidos com o emprego de água destilada e digluconato de clorexidina 2%.

Nerwich *et al.* (1993) estudando as alterações no pH na dentina radicular decorrentes da aplicação de hidróxido de cálcio, observaram que a substância requer de 1 a 7 dias para alcançar a dentina radicular externa. O pH da superfície dentinária que não recebeu nenhum tratamento variou entre 7,6 e 8,3 no período de experimento. O pH da dentina cervical externa começou a alterar após 3 a 7 dias, estabilizando-se em pH 9,0 após duas semanas e atingindo nível máximo de 9,3. No terço apical, a superfície radicular externa teve seu pH alterado para 9,0 após duas semanas, no entanto as alterações iniciaram-se após 24 horas.

Solak & Öztan, em 2003, avaliaram *in vitro* as alterações de pH de pastas de hidróxido de cálcio quando anestésicos locais foram empregados como

veículos, em períodos de tempo de 3 minutos a 7 dias após o preparo dos medicamentos. Os veículos testados foram: solução salina, Citanest com Octapressin 3% e Ultracaína. Os resultados desse estudo mostraram que para os quatro veículos aquosos as variações de pH ocorreram entre os valores de 11,0 e 12,0 sugerindo que os anestésicos locais podem ser uma alternativa no preparo de pastas de hidróxido de cálcio.

Estrela *et al.* (1999) avaliaram a influência de diferentes veículos na ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio frente a culturas puras e mistas de microrganismos. Os veículos empregados foram: solução salina, paramonoclorofenol canforado, solução de clorexidina a 1%, lauril sulfato de sódio e Otosporin[®]. Foi verificada ação antimicrobiana após 48 horas em culturas puras de *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans* e sobre a cultura mista independente da substância empregada como veículos.

Haapasalo *et al.* (2000) avaliaram o efeito tampão promovido pelo contato da dentina em pó com substâncias químicas comumente empregadas na terapia endodôntica e a alteração das propriedades antimicrobianas desses medicamentos. O hidróxido de cálcio teve sua ação antimicrobiana frente ao *Enterococcus faecalis* anulada quando misturado com pó de dentina, o que demonstrou o efeito neutralizador promovido pela capacidade tampão da dentina.

Pacios *et al.* (2003) constataram que as alterações de pH que ocorrem na dentina radicular decorrentes do emprego de pastas de hidróxido de cálcio não foram capazes de modificar a estrutura química da dentina em períodos inferiores a 35 dias. Todos os veículos empregados foram capazes de manter a alcalinidade da dentina, necessária para que ocorra ação antimicrobiana de forma a não determinar que um veículo específico seja preferível em relação a um outro.

2.9.2 Clorexidina como Medicação Intra-canal

A clorexidina foi desenvolvida na década de 40, como resultado de uma pesquisa para a obtenção de um agente antiviral, no entanto observou-se um notável efeito antibacteriano. Caracterizada como uma base forte, comumente é preparada na forma de um sal de digluconato o que lhe confere uma maior estabilidade e hidrossolubilidade. A clorexidina é empregada em várias áreas da Odontologia, tais como Cariologia, Periodontia e Prótese (Fardal & Turnbull, 1983).

Segundo Hennessey, em 1973, a sua ação é resultante da adsorção da clorexidina na parede celular dos microrganismos. Em baixas concentrações, substâncias de baixo peso molecular tais como potássio e fósforo difundem-se para o meio externo, exercendo um efeito bacteriostático. O efeito bactericida da clorexidina é observado quando empregada em altas concentrações e resulta da coagulação do citoplasma bacteriano.

Basrani *et al.* (2002) demonstraram *in vitro* que a clorexidina gel 2% quando empregado como medicação intracanal por um período de sete dias apresentou ação antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* presente em dentina bovina infectada.

Ballal *et al.* (2007) verificaram, através do método de halo de inibição, a ação antimicrobiana da clorexidina gel 2%, pasta de hidróxido de cálcio e associação de ambos contra *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. Concluíram que a clorexidina gel 2% pode ser uma medicação intracanal mais eficiente que a pasta de hidróxido de cálcio e a associação de ambos contra *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*.

2.9.3 Associação do hidróxido de cálcio e clorexidina

Gomes *et al.* (2003 a) avaliaram a efetividade do gel de digluconato de clorexidina 2% na forma de gel e hidróxido de cálcio como medicação intra-canal em diferentes períodos de tempo (1, 2, 7, 15 e 30 dias). Para o estudo, foram empregadas raízes de dentes bovinos previamente infectadas com *Enterococcus faecalis*. As medicações testadas foram clorexidina gel 2%; hidróxido de cálcio + polietileno glicol 400; e clorexidina gel 2% + hidróxido de cálcio. Observou-se que a clorexidina gel 2% inibiu o crescimento bacteriano proveniente das amostras de dentina infectada em todos os períodos de tempo. A associação de hidróxido de cálcio e polietilenoglicol 400 foi ineficiente na eliminação bacteriana em todos os períodos de teste. Observou-se ausência de contaminação da dentina nos períodos de 1 e 2 dias nas amostras onde a associação de clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio foi empregada. Nos períodos subseqüentes de 7 e 15 dias houve um decréscimo da atividade antimicrobiana e em 30 dias, todas as amostras desse grupo apresentaram-se contaminadas. Dessa forma, concluiu-se que a clorexidina 2% na forma de gel tem uma ampla ação antimicrobiana frente ao *Enterococcus faecalis*, no entanto, quando associado ao hidróxido de cálcio, tem sua ação reduzida se empregado por longos períodos de tempo.

Evans *et al.* (2003) avaliaram o efeito antimicrobiano da associação de clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio quando comparado ao efeito da associação entre hidróxido de cálcio e água destilada em discos de dentina bovina previamente contaminada com *Enterococcus faecalis*. Após permanecerem 7 dias no interior do canal radicular, nenhum dos medicamentos associados foi capaz de eliminar completamente as bactérias do interior dos túbulos dentinários. No entanto, os resultados demonstraram que a associação entre clorexidina 2% na forma de gel e hidróxido de cálcio foi mais efetiva na eliminação das bactérias.

Basrani *et al.* (2004) avaliaram algumas propriedades das medicações intracanaís que poderiam afetar a liberação de hidróxido de cálcio e clorexidina quando associados. As medicações testadas foram clorexidina 0,2% e 2%,

hidróxido de cálcio associado à água na proporção de 40g/100mL, e associação de hidróxido de cálcio e clorexidina 0,2%. O pH inicial para as associações de hidróxido de cálcio à clorexidina ou à água foi igual à 12,4 e não se alterou nas primeiras 24 horas. Dessa forma, a clorexidina não alterou o pH do hidróxido de cálcio, mantendo assim a ação antimicrobiana associada à liberação de íons hidroxila. O ângulo de contato do hidróxido de cálcio associado à clorexidina foi inferior àquele observado quando o hidróxido de cálcio foi associado à água, aumentando a capacidade de molhamento da medicação, o que pode explicar o acréscimo na atividade antimicrobiana da primeira associação.

Gomes *et al.* (2006) investigaram a atividade antimicrobiana da associação do hidróxido de cálcio e a clorexidina gel 2% quando comparados com o hidróxido de cálcio + água destilada e com a clorexidina gel 2% utilizada sozinha através de dois métodos: difusão em ágar e contato direto. Concluíram que, a associação do hidróxido de cálcio com a clorexidina favoreceu a ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio do que a associação com água destilada.

Gomes *et al.*(2008) avaliaram *in vitro* a ação antimicrobiana de medicações intracanaís (clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio + soro fisiológico, hidróxido de cálcio + clorexidina gel 2%, óxido de zinco + clorexidina gel 2%+ hidróxido de cálcio) na superfície externa de dentes na presença ou ausência de cimento. Com os resultados, puderam concluir que, os canais preenchidos com clorexidina gel 2% obtiveram a melhor ação antimicrobiana, seguida por clorexidina gel 2% + hidróxido de cálcio, óxido de zinco + clorexidina gel 2%+ hidróxido de cálcio e por último hidróxido de cálcio + soro fisiológico.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

1. Identificar a microbiota dos canais radiculares e bolsas periodontais de dentes com polpas necrosadas, lesões periapicais, sangramento gengival e bolsas periodontais pelos métodos de cultura microbiológica e PCR.
2. Verificar a capacidade do preparo químico-mecânico do uso de medicação intracanal por 7 (clorexidina gel 2%) e 14 dias (hidróxido de cálcio e associação entre hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2%) em reduzir a contagem de unidades formadoras de colônias no canal radicular e na bolsa periodontal associada.
3. Investigar possíveis associações entre as espécies bacterianas detectadas e entre microrganismos e sinais e sintomas clínicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. SELEÇÃO DA AMOSTRA

Compareceram à Faculdade de Odontologia de Piracicaba no período de 2 anos, 1123 pacientes com doença periodontal avançada. Destes pacientes, 816 dentes com bolsas periodontais profundas foram avaliados. Apenas 40 dentes foram selecionados. Os critérios de inclusão foram:

- Dentes indicados para a realização de tratamento endodôntico devido à necrose pulpar, lesão periapical, sangramento gengival e bolsa periodontal associada com profundidade de sondagem maior ou igual a 6 mm em mais de uma face.
- Pacientes que não fizeram uso de antibióticos sistêmicos e/ou locais nos últimos 3 meses.
- Pacientes que não foram submetidos a nenhum tratamento periodontal no último ano.

Dentes abertos, com cárie comunicante à câmara pulpar, com trincas, calcificados, com reabsorção externa foram descartados deste estudo. Pacientes portadores de doenças sistêmicas como por exemplo, diabetes melitus e AIDS também não participaram deste trabalho.

Na figura 1 , alguns casos iniciais utilizados foram exemplificados.

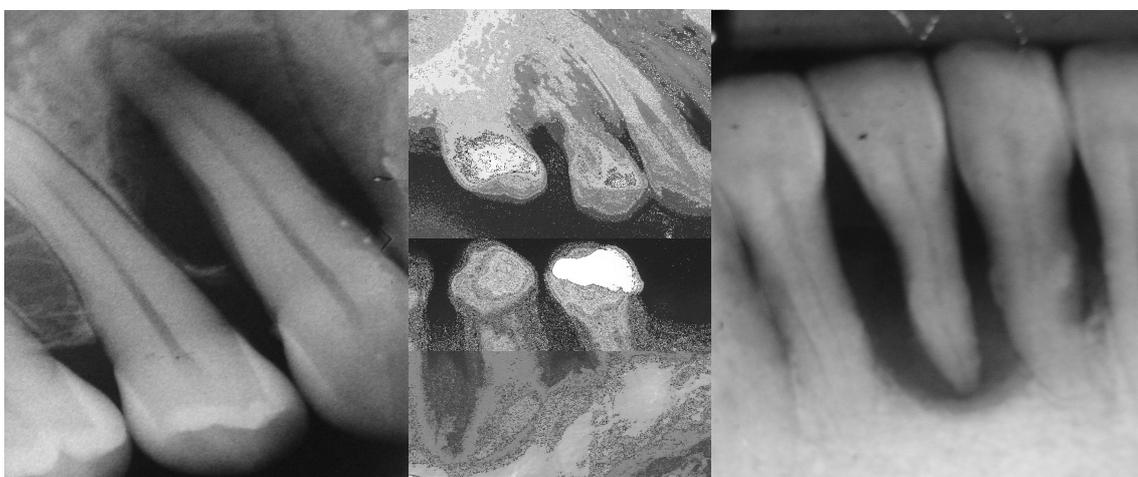


Figura 1- Radiografias de alguns casos iniciais utilizados neste experimento.

4.1.2. Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), da Universidade Estadual de Campinas, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (protocolo nº 034/ 2005 – ANEXO I). Os pacientes assinaram um termo de consentimento elaborado conforme as normas deste mesmo comitê (ANEXO II).

4.2. ASPECTOS CLÍNICOS, RADIOGRÁFICOS E ANÁLISE POR CULTURA MICROBIOLÓGICA

Para cada paciente foram anotadas todos os dados e características clínicas relativas ao dente investigado de acordo com a ficha clínica presente no Apêndice I.

4.2.1. Procedimentos Clínicos e Coleta das Amostras

Inicialmente os pacientes foram submetidos à anestesia, e então a primeira coleta microbiológica foi realizada.

4.2.1.1. Procedimentos Clínicos e Coleta Microbiológica da bolsa periodontal (P1) - *Primeira sessão de atendimento*

Alguns princípios foram observados na coleta das amostras: utilização de técnicas assépticas, promoção de um fácil acesso para a coleta das amostras como remoção de cálculo supragengival e evitar a contaminação química do periodonto.

Isolamento relativo com o auxílio de roletes de algodão foi utilizado com o intuito de se evitar a contaminação por saliva.

A placa supragengival foi removida esfregando-se uma gaze esterilizada umedecida em soro fisiológico na coroa do dente, em todas as faces. Um jato de ar foi aplicado a fim de manter a superfície dental completamente seca.

A coleta da amostra periodontal foi realizada na bolsa de maior profundidade com 3 pontas de papel absorventes calibre FM Dentsply (Petrópolis, Rio de Janeiro) ,uma de cada vez, introduzidas até o fundo da bolsa por 1 minuto. A figura 2-A ilustra este procedimento.

Em seguida, as amostras foram transferidas imediatamente para tubos tipo *ependorf* previamente esterilizados, contendo 1,0 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III - Viability Medium Göteberg Agar (Dahlén *et al.*, 1993) e transportado em jarros a vácuo para o laboratório de Microbiologia da disciplina de Endodontia da FOP-UNICAMP.

Após a primeira coleta dos microrganismos da bolsa periodontal, o próximo passo realizado foi a primeira coleta dos microrganismos do canal radicular.

4.2.1.2. Procedimentos Clínicos e Coleta Microbiológica do canal radicular (E1) – *Primeira sessão de atendimento*

Ao coletar amostras microbiológicas dos canais radiculares os seguintes princípios foram observados: técnicas assépticas durante toda a coleta, remoção dos contaminantes coronários, isolamento absoluto, desinfecção do campo operatório, acesso fácil ao instrumento de amostra, evitar contaminação química do espaço pulpar.

Inicialmente, o dente envolvido recebeu um polimento coronário com pedra pomes e foi isolado com lençol de borracha. A seguir, um vedamento da interface coroa/lençol foi feito utilizando cianoacrilato (Super Bonder, Loctite, SP) para evitar uma possível infiltração com saliva. Prosseguiu-se, então, com a primeira desinfecção do conjunto arco-lençol-grampo-dente usando *swabs* estéreis umedecidos, primeiramente, em H₂O₂ a 30%(v/v) e depois em NaOCl

2,5% por 30 segundos cada, sendo subseqüentemente neutralizados com solução estéril de tiosulfato de sódio a 5 % (Möller 1981). Após a abertura coronária, o campo operatório e a câmara pulpar foram novamente submetidos a esses procedimentos. Nos casos de dentes multirradiculares, foi coletada amostra de um único canal radicular associado à bolsa periodontal de maior profundidade, de maneira a confinar o exame microbiológico em um único ambiente ecológico.

Três cones de papel absorvente estéreis calibre FM Dentsply (Petrópolis, Rio de Janeiro) padronizados com diâmetro da ponta correspondente a uma lima K número 20 foram introduzidos, um de cada vez, no comprimento total do canal (determinado pela radiografia pré-operatória) permanecendo nesta posição por 1 minuto. Este procedimento está ilustrado na figura 2- B e C. Em casos onde o canal estava seco, este foi umedecido com soro fisiológico estéril para assegurar uma amostra viável.

Em seguida, as amostras microbiológicas foram depositadas em tubos tipo eppendorf previamente esterilizados, contendo 1,0 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III - Viability Medium Göteberg Agar (Dahlén *et al.*, 1993) e transportados em jarros a vácuo para o laboratório de microbiologia da disciplina de Endodontia da FOP-UNICAMP.

Há uma grande incidência de canais atrésicos em dentes com comprometimento periodontal, prejudicando a coleta microbiológica através de cones de papel absorvente. Nestes casos, a primeira coleta foi feita com a utilização de limas de pequeno diâmetro inseridas até o comprimento total do dente. Os cabos foram cortados e as limas depositadas em tubos tipo eppendorf contendo VMGA III. Todas as demais amostras foram feitas com a utilização de cones de papel absorvente.

Todas as amostras (periodontais ou dos canais radiculares) foram coletadas sob fluxo contínuo de nitrogênio.

As ilustrações desses procedimentos estão representadas na figura 2.

4.2.2. Inoculação, incubação e isolamento bacteriano.

Ao chegar ao laboratório, no interior da cabine de fluxo laminar, os frascos foram agitados mecanicamente por 1 minuto para facilitar a dispersão dos microrganismos. A seguir foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) utilizando *Fastidious Anaerobe Broth* (FAB-LabM, Bury, UK) como mostra a figura 2 -D,E e F.

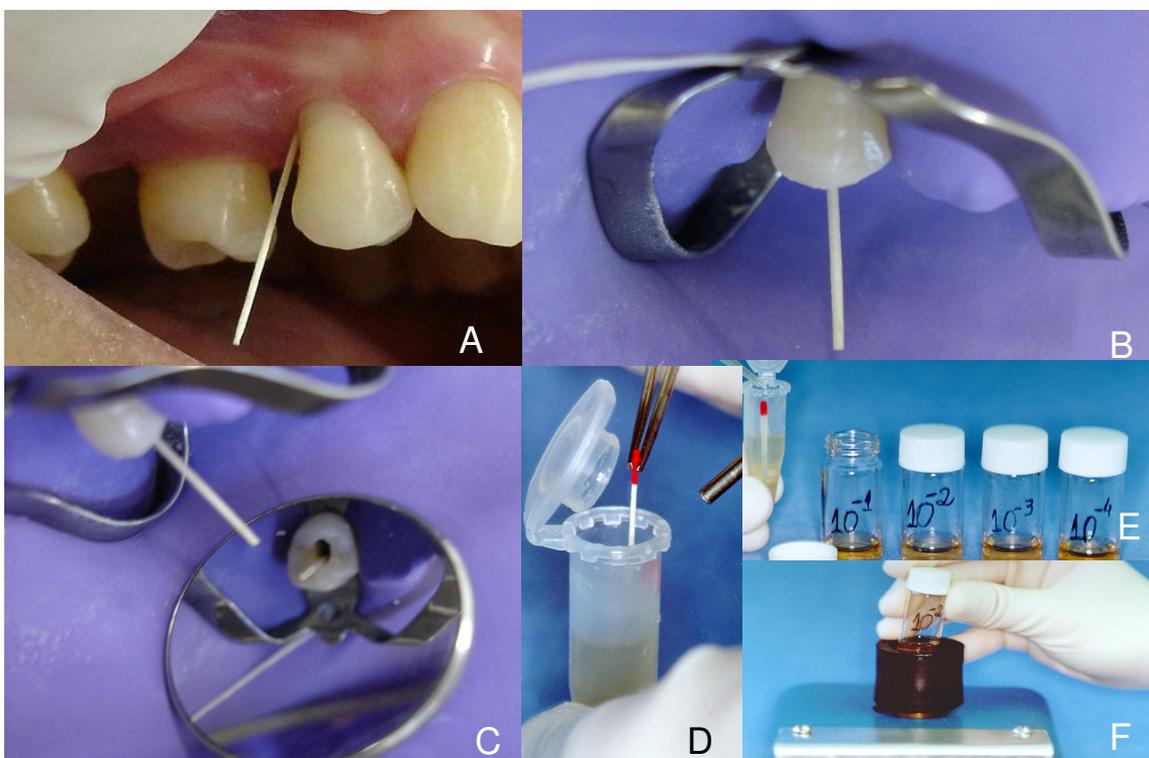


Figura 2 - Procedimentos de coleta microbiológica e processamento inicial das amostras. A- Coleta inicial da bolsa periodontal de maior profundidade; B e C-Coleta inicial do canal radicular; D-Colocação do cone de papel contaminado no meio de transporte VMGA III; E e F- Diluição.

Cinqüenta μL da amostra “mãe” (sem diluição) e 50 μL de cada diluição foram inoculados em placas pré-reduzidas contendo:

- *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA-LabM, Bury, UK), acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado suplementados por hemina (5 mg/L), e vitamina K1 (1 mg/L). Essas placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 10% de H_2 , 10% de CO_2 , 80% de N_2 até 14 dias, para permitir a detecção de microrganismos anaeróbios estritos.
- *Brain Heart Infusion* (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK) ágar sangue e incubados aerobicamente a 37°C por 48 horas para permitir o crescimento de microrganismos aeróbios e/ou facultativos.

Cinqüenta μL da amostra “mãe” (sem diluição) também foram inoculados em outras placas pré-reduzidas contendo meios seletivos:

- *Ágar Dextrose “Sabouraud”* (Oxoid, Basingstoke, UK) acrescido de cloranfenicol (500 mg/L), 37°C por 2 dias em aerobiose, para permitir o crescimento de fungos e leveduras.
- M - *Enterococcus Agar* (Difco, Sparks, USA) 37°C por 2 dias em estufa de CO_2 como meio seletivo de enterococos.
- Placas de ágar contendo soro de cavalo +TSBV (soja-tripticaseína, bacitracina e vancomicina), em cabine de anaerobiose e estufa de CO_2 a 37°C, por 2, 7, 14 dias para selecionar *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

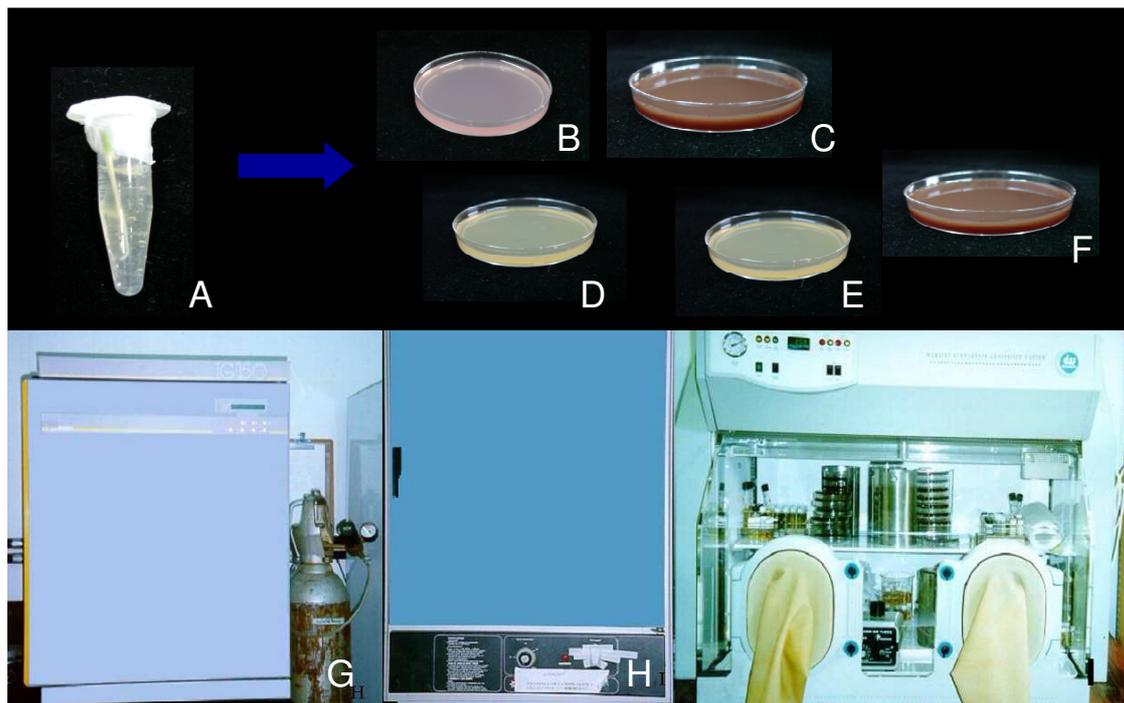


Figura 3. Processamento das amostras pelo método de cultura, plaqueamento em meios de cultura seletivos e requerimentos gasosos. A-Tubo contendo VMGA III e cone de papel contaminado; B-M-Enterococcus; C-FAA; D-TSBV; E-Agar Sabouraud; F-BHI agar ; G-Estufa de CO₂; H- Estufa de O₂; I- Cabine de anaerobiose.

Após a incubação, cada placa foi examinada em lupa estereoscópica em aumento de 3 vezes, as unidades formadoras de colônias contadas (UFC/mL) e os diferentes tipos de colônias foram subcultivados em placas de FAA + 5% sangue de carneiro desfibrinado recém-preparados e pré-reduzidos (para obter culturas puras das espécies). As colônias foram selecionadas para a sua identificação inicial através das suas características macroscópicas no ágar, o que é facilitado pela adição de sangue. O reconhecimento morfológico das colônias foi feito pelo: tamanho, cor, forma, elevação, borda, superfície, textura, consistência, opacidade, efeito no ágar e efeito no sangue (nenhum, hemólise parcial, completa). As colônias puras foram inicialmente identificadas pela coloração de Gram, requerimentos gasosos, e teste de catalase. A especificação foi, então, obtida através de testes bioquímicos padronizados, apropriados para identificação. A figura 4 ilustra esses procedimentos.

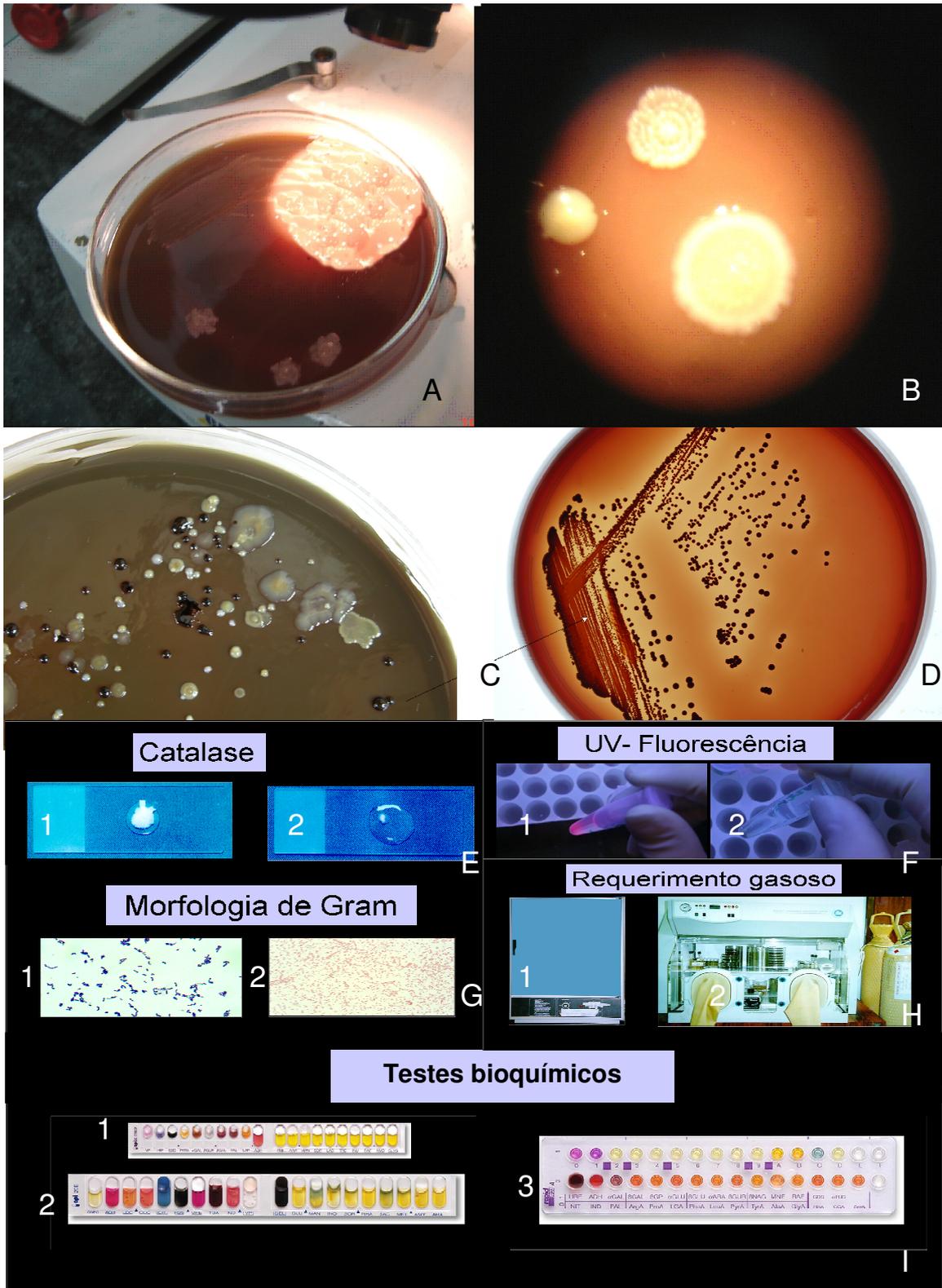


Figura 4 - Isolamento e identificação microbiana. A- Placa mãe na lupa, B- Colônias bacterianas a serem isoladas e plaqueadas, C- Placa resultante de uma diluição com uma colônia a ser isolada, D-Placa contendo bactéria pigmentada de negro isolada, E-1 Teste de catalase positivo, E-2 teste de catalase negativo, F-1 Teste de fluorescência positivo, F-2 Teste de fluorescência negativo, G-1 Gram positivo, G-2 Gram negativo, H-1 Estufa de O₂ , H-2 Câmara de anaerobiose, I- 1Teste bioquímico Api 20 Strep, I-2 Teste bioquímico Api 20E , I-3 Teste bioquímico ID32A.

Para determinação dos requerimentos gasosos cada colônia obtida anaerobicamente foi inoculada em duas placas de FAA + 5% acrescida de sangue de carneiro desfibrinado. Uma placa foi incubada por 2 dias aerobicamente e a outra pelo mesmo período de tempo anaerobicamente. Estas placas foram comparadas para determinar se os isolados eram anaeróbios facultativos ou obrigatórios. As espécies que cresceram somente em anaerobiose, foram incubadas em estufa de CO₂ e se nenhum crescimento foi constatado, estas foram consideradas anaeróbias estritas. A morfologia bacteriana foi confirmada após cada incubação pela coloração de Gram.

4.2.3. Especificação microbiana

Os seguintes testes bioquímicos padronizados foram utilizados para especificação dos microrganismos isolados:

- Rapid ID 32 A (BioMérieux AS, Marcy-L'Etoile, França) para os bastonetes e cocos Gram-negativos e Gram-positivos, anaeróbios obrigatórios.
- Rapid ID NH System (Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, GA, USA) para *Eikenella*, *Haemophilus*, *Neisseria* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
- Rapid ID 32 Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) para os estreptococos (cocos Gram-positivos, catalase negativa)
- API Staph (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) para os estafilococos e micrococos (cocos Gram-positivos, catalase positiva)
- API 20 C aux (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) para espécies de *Candida*

Todos os tubos de eppendorf contendo VMGAIII e os cones de papel absorvente, imediatamente após a retirada das alíquotas para diluição, foram estocados em freezer – 70 °C para futuras análises (PCR).

4.2.4. Preparo dos canais radiculares, coletas microbiológicas (E2 e P2) e colocação de medicação intracanal – *Primeira sessão de atendimento*

Uma vez realizada as coletas iniciais (P1 e E1), as câmaras pulpare foram descontaminadas com clorexidina gel a 2% (Endogel, Itapetininga, SP). O preparo da entrada dos canais foi complementado com a realização de desgastes compensatórios, utilizando a broca diamantada # 3082 e as brocas de Largo #2 e #3. A seguir, utilizando-se limas tipo K # 10 a 2,0 mm do comprimento aparente do dente (CAD), a patência do canal foi verificada.

O preparo dos 2/3 iniciais do canal radicular foi feito com o rotatório de Níquel-Titânio Hero (Micromega, Besançon, França) 0.6, ponta 20. No mesmo comprimento, o próximo passo foi a inserção das brocas de Gates-Glidden #5, #4, #3, #2 em direção “crown-down”. A odontometria foi feita com o auxílio de um localizador apical (Novapex, Forum Technologies, Rishon le-Zion, Israel) e lima manual tipo K #10, #15 ou #20 (aquela que se ajustar ao diâmetro do canal). A confecção de um ombro foi feita com instrumentação 3 limas de diâmetros crescentes da lima da odontometria 1mm aquém do forame apical. Em seguida, o recuo em escalonamento “step-back” foi realizado com 3 limas de diâmetro acima da lima utilizada na confecção do ombro.

Durante o preparo químico-mecânico (PQM), os canais foram inundados com clorexidina gel 2% a cada início do uso de lima e irrigados com soro fisiológico após cada utilização de lima. Após a instrumentação, os canais foram irrigados com 4,0 mL de solução de *tween* 80 + lecitina de soja, para neutralizar a ação da substância química-auxiliar (Siqueira *et al.*, 1998). Uma nova irrigação com 4,0 mL de solução fisiológica foi feita. Então, 1,0 mL de EDTA foi inserido no interior do canal radicular por 3 minutos sob agitação com lima tipo K#15. A irrigação final foi realizada com 3,0 mL de solução fisiológica estéril.

Após o PQM, nova amostra bacteriana do canal radicular foi coletada (E2). Removeu-se todo o isolamento absoluto e da mesma maneira que P1, a

amostra 2 da bolsa periodontal foi coletada (P2). Os mesmos procedimentos de coleta, contagem de colônias, isolamento e identificação foram realizados.

Após as coletas E2 e P2, os 40 pacientes foram divididos, aleatoriamente (por sorteio) previamente ao início do estudo, em 4 grupos de 10 dentes de acordo com a medicação utilizada e os seguintes procedimentos foram tomados:

- Grupo 1 [SF] (n= 5 por 7 dias e n=5 por 14 dias): os canais deste grupo foram secos com cones de papel, preenchidos com soro fisiológico estéril e a seguir foi colocada uma bolinha de algodão previamente esterilizada na embocadura do canal radicular e em seqüência, uma camada de aproximadamente 2 mm de Cavit, aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos, adesivo Single Bond 3M (3M Dental Products, St Paul, USA) e aproximadamente 3 mm de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St Paul, USA).

Os casos clínicos selecionados para esse grupo no período de 7 dias foram: 15,17,28,29,40 e no período de 14 dias foram: 18,21,30,31,39.

- Grupo 2 [CL] (n= 10 por 7 dias): os canais deste grupo foram secos com cones de papel, preenchidos com clorexidina gel 2 % e a seguir foi colocada uma bolinha de algodão previamente esterilizada na embocadura do canal radicular, e em seqüência uma camada de aproximadamente 2 mm de Cavit, aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos, adesivo Single Bond 3M (3M Dental Products, St Paul, USA) e aproximadamente 3 mm de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St Paul, USA).

Os casos clínicos selecionados para esse grupo no período de 7 dias foram: 3,6,7,14,11,19,25,26,34,35.

- Grupo 3 [HC+CL] (n=10 por 14 dias): os canais deste grupo foram secos com cones de papel, preenchidos com hidróxido de cálcio + clorexidina gel 2 % (1:1) e a seguir foi colocada uma bolinha de algodão previamente esterilizada na embocadura do canal radicular, e em seqüência uma camada de

aproximadamente 2 mm de Cavit, aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos, adesivo Single Bond 3M (3M Dental Products, St Paul, USA) e aproximadamente 3 mm de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St Paul, USA).

Os casos clínicos selecionados para esse grupo no período de 14 dias foram: 1,2,4,11,22,23,24,32,33,38.

- Grupo 4 [HC+S] (n=10 por 14 dias): os canais deste grupo foram secos com cones de papel, preenchidos com hidróxido de cálcio + solução fisiológica estéril (9:1) e a seguir foi colocada uma bolinha de algodão previamente esterilizada na embocadura do canal radicular, e em seqüência uma camada de aproximadamente 2 mm de Cavit, aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos, adesivo Single Bond 3M (3M Dental Products, St Paul, USA) e 3 mm de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St Paul, USA).

Os casos clínicos selecionados para esse grupo no período de 14 dias foram: 5,8,9,10,12,13,16,27,36,37.

A diferença na quantidade de tempo deixada para cada grupo deve-se ao fato de que a clorexidina gel não permanece no interior dos canais radiculares por um período maior que uma semana.

Os casos foram sorteados de acordo com cada grupo previamente ao início de todo o trabalho.

Foram realizadas radiografias periapicais imediatamente após a colocação das medicações intracanaís contendo hidróxido de cálcio. Elas mostraram que os canais que continham hidróxido de cálcio estavam bem preenchidos. A clorexidina não apresenta radiopacidade, por isso não foi possível verificar seu preenchimento por radiografia periapical.

4.2.5 Coletas microbiológicas após o uso das medicações intracanais (E3 e P3)

Transcorrendo o período de 7 ou 14 dias, dependendo da medicação utilizada, os pacientes foram novamente atendidos. As características clínicas foram avaliadas novamente e anotadas na ficha clínica.

Seguindo os princípios das primeiras coletas (P1 e P2), a amostra microbiológica da bolsa periodontal foi coletada (P3).

Após a coleta periodontal prosseguiu-se com a endodôntica e os seguintes princípios foram observados novamente: técnicas assépticas durante toda a coleta, remoção dos contaminantes coronários, isolamento absoluto, desinfecção do campo operatório, acesso fácil ao instrumento de amostra, evitar contaminação química do espaço pulpar.

Os canais, então, foram irrigados com 10mL de solução fisiológica com o intuito de remover a medicação intracanal e abrir espaço para a nova coleta (E3). Assim, 3 cones de papel foram colocados um de cada vez no interior do canal radicular, pelo tempo de 1 minuto, e depositados em tubos tipo “eppendorf” contendo VMGAIII.

Ambas as amostras (P3 e E3) foram processadas da mesma maneira descrita anteriormente e os microrganismos foram isolados, identificados, as unidades formadoras de colônias contadas e as amostras contendo os cones de papel e o meio de transporte VMGAIII estocados no freezer -70°C para análise posterior por PCR.

A seguir, os canais foram reinstrumentados e se estavam secos e propícios para a obturação, foram obturados utilizando-se a técnica do cone modelado apical. Os dentes foram, então, restaurados. Estes pacientes foram encaminhados à clínica desta faculdade para tratamento periodontal adequado.

4.3. ANÁLISE POR PCR

O PCR (Técnica da reação em cadeia da Polimerase) foi utilizado para a análise da presença de *Treponema denticola*, *Treponema socranskii*, *Gemella morbillorum*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella tanneriae*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Filifactor alocis*, *Parvimonas micra* nas coletas dos canais radiculares e bolsas periodontais nas mesmas etapas de tratamento que a análise microbiológica clássica através de métodos bioquímicos de identificação.

4.3.1 Extração do DNA bacteriano

A extração de DNA foi realizada com o QIA amp DNA kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante (APÊNDICE IV).

4.3.2 Reação de PCR

A reação de PCR foi processada na quantidade de 25 µL de uma mistura de reagentes (Master Mix) contendo as quantidades especificadas no quadro 1 para 1,5 µL do DNA da amostra.

Reagentes	Quantidade (µL)
Tampão (10 x Reaction <i>buffer</i> Invitrogen [®] - Life Technology do Brasil)	2,5 µL
<i>DNTPs</i> (Invitrogen [®] - Life Technology do Brasil):	0,5 µL
<i>MgCl</i> ₂ (Invitrogen [®] - Life Technology do Brasil)	1,25 µL
<i>H</i> ₂ <i>O MiliQ</i>	17,625 µL
<i>Primer Forward</i> 100µM (Invitrogen [®] - Life Technology do Brasil)	0,75 µL
<i>Primer Reverse</i> 100µM (Invitrogen [®] - Life Technology do Brasil)	0,75 µL
<i>Taq Platinum</i> (Invitrogen [®] - Life Technology do Brasil)	0,125 µL

Quadro 1 - Proporções dos reagentes no Master Mix

A Taq DNA Polimerase escolhida foi a Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen[®] - Life Technology do Brasil) que não se degrada com o aumento gradativo da temperatura, podendo ser acrescentada diretamente na mistura (Mix) da reação evitando a necessidade de *hot start*.

A determinação da temperatura de anelamento ideal foi feita através de reações de PCR contendo primers espécie-específicos (Quadro 2) realizadas em um aparelho termociclador convencional e submetidas a vários gradientes de temperatura (MJ96G, Biocycler, termocicladores, Curitiba, SC, Brasil) utilizando amostras ATCCs correspondentes e baseadas na literatura de suporte.

Espécies Região	Primers: Seqüência de nucleotídeos Referências Comprimento do Amplicon	Reação <small>(ciclos padronizados no laboratório de Microbiologia Endodôntica da FOP-UNICAMP)</small>
<i>A actinomycetemcomitans</i> 16 S	5' AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC 3' 5' ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT 3' Ashimoto <i>et al.</i> , 1996 593 bp	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação inicial: 95°C por 2 min • 36 ciclos de: <i>Desnaturação:</i> 94°C por 30s <i>Anelamento:</i> 50°C por 1min <i>Extensão:</i> 72°C por 2min • Elongamento: 72°C por 10 min
<i>F alocis</i> 16 S	5' CGT GGG TAA TCT GCC TTT GTC 3' 5' CCT TGG TGG GCT TTT ATC TCA 3' Siqueira & Rôças, 1997 594 bp	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação inicial: 95°C por 2 min • 36 ciclos de: <i>Desnaturação:</i> 94°C por 30s <i>Anelamento:</i> 60°C por 1min <i>Extensão:</i> 72°C por 2min • Elongamento: 72°C por 10 min
<i>F nucleatum</i> 16 S	5' ATT GTG GCT AAA AAT TAT AGT T 3' 5' ACC CTC ACT TTG AGG ATT ATA G 3' Ávila-Campos <i>et al.</i> , 1999 1000 bp	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação inicial: 95°C por 2 min • 36 ciclos de: <i>Desnaturação:</i> 94°C por 30s <i>Anelamento:</i> 55°C por 1min <i>Extensão:</i> 72°C por 2min • Elongamento: 72°C por 10 min
<i>G morbillorum</i> 16 S	5' AGA GAC GGT ACC TAA CCA GAA 3' 5' TAT GAG GTT GGC TGA CTC TCG 3' "Primer" desenhado pela autora a partir do seqüenciamento genético L14327 do Gen bank 781 bp	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação inicial: 95°C por 2 min • ciclos de: <i>Desnaturação:</i> 94°C por 30s <i>Anelamento:</i> 52°C por 1min <i>Extensão:</i> 72°C por 2min • Elongamento: 72°C por 10 min

Quadro 2 - Dados sobre as reações e "primers" espécie - específicos utilizados para cada microrganismo investigado.

Espécies Região	Primers: Sequência de nucleotídeos Referências Comprimento do Amplicon	Reação
<i>P. micra</i> 16 S	5'AGA GTT TGA ATC CTG GCT CAG 3' 5'ATA TCA TGC GAT TCT GTG GTC TC 3' Conrads G <i>et al.</i> , 1997 207 bp	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação inicial: 95°C por 2 min • 36 ciclos de: <i>Desnaturação:</i> 94°C por 30s <i>Anelamento:</i> 60°C por 1min <i>Extensão:</i> 72°C por 2min • Elongamento: 72°C por 10 min
<i>P. endodontalis</i> 16 S	5' GCT GCA GCT CAA CTG TAG TC 3' 5' CCG CTT CAT GTC ACC ATG TC 3' Siqueira <i>et al.</i> , 2001 672 bp	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação inicial: 95°C por 2 min • 36 ciclos de: <i>Desnaturação:</i> 94°C por 30s <i>Anelamento:</i> 58°C por 1min <i>Extensão:</i> 72°C por 2min • Elongamento: 72°C por 10 min
<i>P. gingivalis</i> 16 S	5' CAA TAC TCG TAT GCC CGT TAT TC 3' Conrads <i>et al.</i> , 1996 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' Edwards <i>et al.</i> , 1989 478 bp	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação inicial: 95°C por 2 min • 36 ciclos de: <i>Desnaturação:</i> 94°C por 30s <i>Anelamento:</i> 58°C por 1min <i>Extensão:</i> 72°C por 2min • Elongamento: 72°C por 10 min
<i>P. intermedia</i> 16 S	5' TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG 3' 5' TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T 3' Slots <i>et al.</i> , 1995 575 bp	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação inicial: 95°C por 2 min • 36 ciclos de: <i>Desnaturação:</i> 94°C por 30s <i>Anelamento:</i> 58°C por 1min <i>Extensão:</i> 72°C por 2min • Elongamento: 72°C por 10 min

Quadro 2 - Dados sobre as reações e "primers" espécie - específicos utilizados para cada microrganismo investigado (continuação).

Espécies Região	Primers: Sequência de nucleotídeos Referências Comprimento do Amplicon	Reação
<i>P nigrescens</i> 16 S	5' ATG AAA CAA AGG TTT TCC GGT AAG 3' 5' CCC ACG TCT CTG TGG GCT GCG A 3' Bogen & Slots, 1999 804 bp	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação inicial: 95°C por 2 min • 36 ciclos de: <i>Desnaturação</i> 94°C por 30s <i>Anelamento:</i> 58°C por 1min <i>Extensão:</i> 72°C por 2min • Elongamento: 72°C por 10 min
<i>P tannerae</i> 16 S	5' CTT AGC TTG CTA AGT ATG CCG 3' 5' CAG CTG ACT TAT ACT CCC G 3' Xia <i>et al.</i> , 2000 550 bp	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação inicial: 95°C por 2 min • 36 ciclos de: <i>Desnaturação</i> 94°C por 30s <i>Anelamento:</i> 55°C por 1min <i>Extensão:</i> 72°C por 2min • Elongamento: 72°C por 10 min
<i>T forsythia</i> 16 S	5'-TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT-3' Slots <i>et al.</i> , 1995 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' Edwards <i>et al.</i> , 1989 641 bp	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação inicial: 95°C por 2 min • 36 ciclos de: <i>Desnaturação:</i>94°C por 30s <i>Anelamento:</i> 56°C por 1min <i>Extensão:</i> 72°C por 2min • Elongamento: 72°C por 10 min
<i>T denticola</i> 16 S	5'TAA TAC CGT ATG TGC TCA TTT ACA T 3' 5'TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA 3' Ashimoto <i>et al.</i> , 1996 316 bp	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação inicial: 95°C por 2 min • 36 ciclos de: <i>Desnaturação</i> 94°C por 30s <i>Anelamento:</i> 58°C por 1min <i>Extensão:</i> 72°C por 2min • Elongamento: 72°C por 10 min

Quadro 2 - Dados sobre as reações e "primers" espécie - específicos utilizados para cada microrganismo investigado (continuação).

Espécies Região	Primers: Seqüência de nucleotídeos Referências Comprimento do Amplicon	Reação
<i>Treponema socranskii</i> 16 S	5' GAT CAC TGT ATA CGG AAG GTA GAC A 3' 5' TAC ACT TAT TCC TCG GAC AG 3' Siqueira <i>et al.</i> , 2003 288 bp	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação inicial: 95°C por 2 min • 36 ciclos de: <i>Desnaturação:</i> 94°C por 30s <i>Anelamento:</i> 56°C por 1min <i>Extensão:</i> 72°C por 2min • Elongamento: 72°C por 10 min

Quadro 2 - Dados sobre as reações e "primers" espécie - específicos utilizados para cada microrganismo investigado (continuação).

Além das amostras, foram utilizados como controles positivos o DNA genômico purificado dos microrganismos investigados e como controle negativo água Mili Q esterilizada.

4.3.3 Eletroforese

As amostras após a reação de PCR (produtos da amplificação), foram conservadas a 4 °C ou analisadas imediatamente por eletroforese. Utilizou-se gel de agarose a 1% (Invitrogen® - Life Technology do Brasil) em tampão de Tris-borato EDTA (pH 8,0) e corado com brometo de etídio (5ug/mL-Invitrogen® - Life Technology do Brasil).

Foi incluído em cada gel, um padrão de peso molecular de 100 bp (DNA ladder, Invitrogen® - Life Technology do Brasil). Após o término de cada corrida (60 volts por 1 hora), as bandas foram observadas com auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta. A documentação fotográfica dos géis foi obtida com o sistema Image Master-VDS (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) e a

captura das imagens foram realizadas pelo programa LISCAP Image Capture software. As imagens ilustrativas podem ser conferidas na figura 5.



Figura 5- Processamento das amostras pelo método de PCR. A-Estação de trabalho para reações de PCR; B-Termociclador; C-Gel de agarose na cuba; D-Sistema de eletroforese; E-Sistema de imagens para leitura dos géis; F- Imagem dos géis após a corrente para análise.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a obtenção dos dados, estes foram analisados utilizando o programa SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Cultura microbiológica

1. Diferenças na prevalência das diferentes espécies dentro das coletas e a presença de sinais e sintomas (na coleta 1 da bolsa e do canal), foram comparadas por meio do teste de Cochran para dados nominais. Para testar a hipótese nula de relação entre as espécies foi utilizado o teste de Fischer ($p < 0,05$). Nos casos em que essa hipótese foi descartada, ou seja, quando houve diferenças entre as espécies ($p < 0,05$), o teste de Odds ratio foi realizado. Associações positivas foram aquelas em que Odds ratio foi maior que 2 e para associações negativas aquelas em que os valores de Odds ratio foram menores que 0,5.

2. Para avaliar as diferenças entre os medicamentos intracanalais foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Foram utilizados os valores obtidos da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

PCR

1. Para avaliar as diferenças entre a frequência de aparecimento dos diferentes microrganismos testados nas diferentes fases do tratamento utilizou-se o teste de Mc Nemar ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Compareceram à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 1123 pacientes com doença periodontal avançada. Destes pacientes, 816 dentes com bolsas periodontais profundas foram avaliados. Apenas 40 dentes foram selecionados.

Foram examinados 38 pacientes que apresentavam 40 dentes com necrose pulpar, lesão periapical, sangramento gengival e bolsas periodontais maiores que 6 mm (média 7mm) com idades variando entre 30 e 72 anos, sendo que 19 deles pertenciam ao gênero masculino e 21 deles ao gênero feminino.

Os elementos dentais avaliados pertenciam ao grupo dos incisivos (5/40), caninos (8/40), pré-molares (7/40) e molares (20/40). Clinicamente, 19/40 apresentaram-se com restaurações, 2/40 estavam com coroas, 3/40 apresentaram cárie, 16/40 eram hígidos.

Todos os 40 dentes avaliados apresentavam-se com mobilidade dental. As respostas aos testes de percussão vertical e palpação periapical demonstraram-se positivas em 65% e 47,5% dos casos, respectivamente. Apenas 3/40 apresentavam-se com dor espontânea e 2/40 com tumefação inflamatória intraoral que drenavam pela bolsa periodontal associada.

No período estudado, as bolsas periodontais mantiveram suas características clínicas iniciais. Outra característica clinica notada é que em todos os 13 casos de fístula, a origem era endodôntica e não periodontal. Este fato foi confirmado com o mapeamento da fístula utilizando cone de guta-percha no seu interior e radiografia periapical.

Alguns dos pacientes apresentaram sensibilidade pós-operatória entre as sessões de atendimento (6/40) que foram controladas com o uso de analgésicos. Destes pacientes, 2 pertenciam ao grupo sem medicação

intracanal, 2 ao grupo da clorexidina gel 2% + hidróxido de cálcio, 1 ao grupo da clorexidina gel 2 % e 1 ao grupo do soro fisiológico + hidróxido de cálcio.

5.2 MÉTODO CLÁSSICO DE CULTURA

Todos os 40 dentes incluídos apresentaram bactérias cultiváveis, as quais pertenciam a diferentes espécies e diferentes gêneros.

Tabela 1- Frequência de aparecimento de anaeróbios estritos, facultativos, gram-positivos e gram –negativos pelo método de cultura microbiológica.

	E1 (inicial)	P1 (inicial)
Número total de casos	40 (100%)	40 (100%)
Número total de microrganismos	224 (100%)	259(100%)
Número de Gram-positivos	128 (57,14%)	141 (54,44%)
Número de Gram-negativos	96 (42,85%)	118 (45,55%)
Número de facultativos	113 (50,44%)	127 (49%)
Número de anaeróbios	111(49,55%)	132 (50,96%)

5.2.1. *Microrganismos presentes nos canais radiculares e bolsas periodontais infectados antes da instrumentação (microbiota primária)*

5.2.1.1 Canais radiculares – Frequência

As espécies bacterianas mais frequentemente encontradas nos casos avaliados de canais radiculares infectados de dentes com comprometimento periodontal foram: *Prevotella intermedia/nigrescens/tanneriae* e *Fusobacterium nucleatum* (ambos em 45%), *Gemella morbillorum* (40%), *Parvimonas micra* e *Streptococcus oralis* (ambos com 32,5%) de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2- Frequência de espécies bacterianas presentes em **40 canais radiculares** deste estudo por cultura microbiológica na coleta inicial.

Espécies	N° de canais	Frequência de Aparecimento
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	18	45,00%
<i>Prevotella intermedia/nigrescens/tanneriae</i>	18	45,00%
<i>Gemella morbillorum</i>	16	40,00%
<i>Parvimonas micra</i>	13	32,50%
<i>Streptococcus oralis</i>	13	32,50%
<i>Anaerococcus prevotii</i>	9	22,50%
<i>Neisseria spp</i>	9	22,50%
<i>Actinomyces meyeri</i>	7	17,50%
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	7	17,50%
<i>Enterococcus faecalis</i>	7	17,50%
<i>Gemella haemolysans</i>	7	17,50%
<i>Prevotella oralis</i>	7	17,50%
<i>Actinomyces viscosus</i>	5	12,50%
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	5	12,50%
<i>Eggerthella lenta</i>	5	12,50%
<i>Prevotella loesheii</i>	5	12,50%
<i>Streptococcus constellatus</i>	5	12,50%
<i>Streptococcus mitis 1</i>	5	12,50%
<i>Clostridium subterminale</i>	4	10,00%

Tabela 2- Frequência de espécies bacterianas presentes em **40 canais radiculares** deste estudo por cultura microbiológica na coleta inicial (continuação).

Espécies	N° de canais	Frequência de Aparecimento
<i>Eubacterium limosum</i>	4	10,00%
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	4	10,00%
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	4	10,00%
<i>Haemophilus</i> spp	4	10,00%
<i>Neisseria cinerea</i>	4	10,00%
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	4	10,00%
<i>Propionibacterium acnes</i>	4	10,00%
<i>Streptococcus acidominus</i>	4	10,00%
<i>Streptococcus salivarius</i>	4	10,00%
<i>Veillonella</i> spp	4	10,00%
<i>Weeksela</i> spp	4	10,00%
<i>Actinomyces israelii</i>	2	5,00%
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	2	5,00%
<i>Bifidobacterium</i> spp	2	5,00%
<i>Capnocytophaga</i> spp	2	5,00%
<i>Clostridium bifermentans</i>	2	5,00%
<i>Clostridium perfringens</i>	2	5,00%
<i>Clostridium</i> spp	2	5,00%
<i>Leuconostoc</i> spp	2	5,00%

Tabela 2- Frequência de espécies bacterianas presentes em **40 canais radiculares** deste estudo por cultura microbiológica na coleta inicial (continuação).

Espécies	N° de canais	Frequência de Aparecimento
<i>Micrococcus</i> spp	2	5,00%
<i>Micrococcus varians/roseus</i>	2	5,00%
<i>Prevotella buccae</i>	2	5,00%
<i>Streptococcus sanguis</i>	2	5,00%

5.2.1.2 Bolsas periodontais - Frequência

Os microrganismos mais frequentemente encontrados nas bolsas periodontais dos dentes avaliados foram: *Porphyromonas gingivalis* e *Gemella morbillorum* isolados em 50% dos casos, *Prevotella intermedia/nigrescens/tanneriae* e *Gemella haemolysans* em 45%, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces meyeri* e *Streptococcus constellatus* em 40% das bolsas periodontais avaliadas conforme a Tabela 3.

Tabela 3 -Frequência de espécies bacterianas presentes em **40 bolsas periodontais** deste estudo por cultura microbiológica na coleta inicial.

Espécies	N° de bolsas	Frequência de Aparecimento
<i>Gemella morbillorum</i>	20	50,00%
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	20	50,00%
<i>Gemella haemolysans</i>	18	45,00%
<i>Prevotella intermedia/nigrescens/tanneriae</i>	18	45,00%
<i>Actinomyces meyeri</i>	16	40,00%
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	16	40,00%
<i>Streptococcus constellatus</i>	16	40,00%
<i>Anaerococcus prevotii</i>	15	37,50%
<i>Parvimonas micra</i>	15	37,50%
<i>Neisseria spp</i>	13	32,50%
<i>Haemophilus spp</i>	9	22,50%
<i>Actinomyces naeslundii</i>	7	17,50%
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	7	17,50%
<i>Clostridium spp</i>	5	12,50%
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	5	12,50%
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	5	12,50%
<i>Prevotella melaninogenica</i>	5	12,50%
<i>Prevotella oralis</i>	5	12,50%
<i>Propionibacterium acnes</i>	5	12,50%

Tabela 3 -Frequência de espécies bacterianas presentes em **40 bolsas periodontais** deste estudo por cultura microbiológica na coleta inicial (continuação).

Espécies	N° de bolsas	Frequência de Aparecimento
<i>Actinomyces israelii</i>	4	10,00%
<i>Aerococcus viridans</i>	4	10,00%
<i>Bifidobacterium</i> spp	4	10,00%
<i>Candida albicans</i>	4	10,00%
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	4	10,00%
<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	4	10,00%
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	4	10,00%
<i>Prevotella loesheii</i>	4	10,00%
<i>Propionibacterium propionicum</i>	4	10,00%
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	2	5,00%
<i>Capnocytophaga</i> spp	2	5,00%
<i>Clostridium bifermentans</i>	2	5,00%
<i>Clostridium botulinum 2</i>	2	5,00%
<i>Clostridium difficile</i>	2	5,00%
<i>Clostridium glicolicum</i>	2	5,00%
<i>Clostridium subterminale</i>	2	5,00%
<i>Eggerthella lenta</i>	2	5,00%
<i>Eubacterium limosum</i>	2	5,00%
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	2	5,00%

Tabela 3 -Frequência de espécies bacterianas presentes em **40 bolsas periodontais** deste estudo por cultura microbiológica na coleta inicial (continuação).

Espécies	N° de bolsas	Frequência de Aparecimento
<i>Prevotella buccae</i>	2	5,00%
<i>Prevotella denticola</i>	2	5,00%
<i>Staphylococcus cohnii</i>	2	5,00%
<i>Streptococcus acidominus</i>	2	5,00%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	5,00%
<i>Streptococcus intermedius</i>	2	5,00%
<i>Streptococcus mitis 1</i>	2	5,00%
<i>Streptococcus salivarius</i>	2	5,00%

5.2.1.3 Canais radiculares e bolsas periodontais conjuntamente

Os microrganismos mais frequentemente isolados em ambos os locais do mesmo dente (bolsa periodontal e canal radicular) foram: *Prevotella intermedia /nigrescens/tanneriae* (32,5%) e *Fusobacterium nucleatum* (27,5%) de acordo com a tabela 4.

Tabela 4 - Frequência de espécies bacterianas encontradas concomitantemente nas **40 bolsas peridontais e canais radiculares** deste estudo por cultura microbiológica nas coletas iniciais.

Espécies	B P	C R	Ambos	Frequência de Aparecimento em Ambos
<i>P intermedia/nigrescens/tannerae</i>	18	18	13	32,50%
<i>F nucleatum</i>	16	18	11	27,50%
<i>Neisseria spp</i>	13	9	7	17,50%
<i>P micra</i>	15	13	5	12,50%
<i>Anaerococcus prevotii</i>	15	9	4	10,00%
<i>Gemella morbillorum</i>	20	16	4	10,00%
<i>Actinomyces meyeri</i>	16	7	2	5,00%
<i>Streptococcus constellatus</i>	16	5	2	5,00%
<i>A actinomycetemcomitans</i>	2	7	0	0,00%
<i>Actinomyces israelii</i>	4	2	0	0,00%
<i>Actinomyces naeslundii</i>	7	0	0	0,00%
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	7	2	0	0,00%
<i>Actinomyces viscosus</i>	0	5	0	0,00%
<i>Aerococcus viridans</i>	4	0	0	0,00%
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	0	5	0	0,00%
<i>Bifidobacterium spp</i>	4	2	0	0,00%
<i>Candida albicans</i>	4	0	0	0,00%
<i>Capnocytophaga spp.</i>	2	2	0	0,00%
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	4	0	0	0,00%
<i>Clostridium bifermentans</i>	2	2	0	0,00%
<i>Clostridium botulinum 2</i>	2	0	0	0,00%
<i>Clostridium difficile</i>	2	0	0	0,00%
<i>Clostridium glicolicum</i>	2	0	0	0,00%
<i>Clostridium perfringens</i>	0	2	0	0,00%
<i>Clostridium spp</i>	5	2	0	0,00%
<i>Clostridium subterminale</i>	2	4	0	0,00%

Tabela 4 - Frequência de espécies bacterianas encontradas concomitantemente nas **40 bolsas peridontais e canais radiculares** deste estudo por cultura microbiológica nas coletas iniciais (continuação).

Espécies	B P	C R	Ambos	Frequência de Aparecimento em Ambos
<i>Eggerthella lenta</i>	2	5	0	0,00%
<i>E faecalis</i>	0	7	0	0,00%
<i>Eubacterium limosum</i>	2	4	0	0,00%
<i>Gemella haemolysans</i>	18	7	0	0,00%
<i>H parainfluenzae</i>	0	4	0	0,00%
<i>H aphrophilus</i>	5	4	0	0,00%
<i>Haemophilus spp</i>	9	4	0	0,00%
<i>L lactis cremoris</i>	4	0	0	0,00%
<i>Leuconostoc spp</i>	0	2	0	0,00%
<i>M varians/roseus</i>	0	2	0	0,00%
<i>Micrococcus spp</i>	0	2	0	0,00%
<i>Neisseria cinerea</i>	0	4	0	0,00%
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	4	0	0	0,00%
<i>P anaerobius</i>	2	0	0	0,00%
<i>P asaccharolyticus</i>	0	4	0	0,00%
<i>P endodontalis</i>	5	0	0	0,00%
<i>P gingivalis</i>	20	0	0	0,00%
<i>P propionicum</i>	4	0	0	0,00%
<i>Prevotella buccae</i>	2	2	0	0,00%
<i>Prevotella denticola</i>	2	0	0	0,00%
<i>Prevotella loesheii</i>	4	5	0	0,00%
<i>Prevotella melaninogenica</i>	5	0	0	0,00%
<i>Prevotella oralis</i>	5	7	0	0,00%
<i>Propionibacterium acnes</i>	5	4	0	0,00%
<i>Staphylococcus cohnii</i>	2	0	0	0,00%

Tabela 4 - Frequência de espécies bacterianas encontradas concomitantemente nas **40 bolsas peridontais e canais radiculares** deste estudo por cultura microbiológica nas coletas iniciais (continuação).

Espécies	B P	C R	Ambos	Frequência de Aparecimento em Ambos
<i>Streptococcus acidominus</i>	2	4	0	0,00%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	0	0	0,00%
<i>Streptococcus intermedius</i>	2	0	0	0,00%
<i>Streptococcus mitis 1</i>	2	5	0	0,00%
<i>Streptococcus oralis</i>	0	13	0	0,00%
<i>Streptococcus salivarius</i>	2	4	0	0,00%
<i>Streptococcus sanguis</i>	0	2	0	0,00%
<i>Veillonella spp</i>	0	4	0	0,00%
<i>Weeksela spp</i>	0	4	0	0,00%

5.2.2. *Microbiota presente nos canais radiculares e bolsas periodontais imediatamente após o preparo químico-mecânico dos canais radiculares*

5.2.2.1 Canais radiculares-Frequência

Dos casos avaliados, poucas espécies microbiológicas foram encontradas imediatamente após o preparo químico-mecânico. Segue a frequência na Tabela 5.

Tabela 5 - Freqüência de espécies bacterianas presentes em **40 canais radiculares** deste estudo por cultura microbiológica imediatamente após o preparo químico-mecânico.

Espécies	Nºde canais	Freqüência de Aparecimento
<i>Micrococcus varians/roseus</i>	2	5,00%
<i>Gemella haemolysans</i>	2	5,00%
<i>P intermedia/nigrescens/tannerae</i>	2	5,00%
<i>Propionibacterium propionicum</i>	2	5,00%
<i>Streptococcus salivarius</i>	2	5,00%

5.2.2.2. Bolsas periodontais-Freqüência

Os microrganismos mais frequentemente encontrados em bolsas periodontais imediatamente após o preparo químico-mecânico do canal radicular foram: *Parvimonas micra* (62,5%), *Fusobacterium nucleatum* (50%), seguida pela *Prevotella intermedia/nigrescens/ tannerae* (32,5%) e *Actinomyces meyeri* (27,5%). Todos os microrganismos encontrados e suas respectivas freqüências estão dispostos na tabela 6.

Tabela 6 - Freqüência de espécies bacterianas presentes em **40 bolsas periodontais** deste estudo por cultura microbiológica imediatamente após o preparo químico-mecânico.

Espécies	N° de bolsas	Frequência de Aparecimento
<i>Parvimonas micra</i>	25	62,50%
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	20	50,00%
<i>P intermedia/nigrescens/tanneriae</i>	13	32,50%
<i>Actinomyces meyeri</i>	11	27,50%
<i>Anaerococcus prevotii</i>	9	22,50%
<i>Gemella haemolysans</i>	9	22,50%
<i>Gemella morbillorum</i>	9	22,50%
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	9	22,50%
<i>Streptococcus constellatus</i>	9	22,50%
<i>Clostridium</i> spp	7	17,50%
<i>Streptococcus mitis 1</i>	7	17,50%
<i>Actinomyces israelii</i>	5	12,50%
<i>A actinomycetemcomitans</i>	5	12,50%
<i>Bifidobacterium</i> spp	5	12,50%
<i>Streptococcus oralis</i>	5	12,50%
<i>Haemophilus influenzae</i>	5	12,50%
<i>Actinomyces naeslundii</i>	4	10,00%
<i>Neisseria</i> spp	4	10,00%
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	4	10,00%

Tabela 6 - Freqüência de espécies bacterianas presentes em **40 bolsas periodontais** deste estudo por cultura microbiológica imediatamente após o preparo químico-mecânico (continuação).

Espécies	N° de bolsas	Frequência de Aparecimento
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	4	10,00%
<i>Prevotella oralis</i>	4	10,00%
<i>Actinomyces viscosus</i>	2	5,00%
<i>Aerococcus viridans</i>	2	5,00%
<i>Capnocytophaga spp</i>	2	5,00%
<i>Clostridium difficile</i>	2	5,00%
<i>Clostridium septicum</i>	2	5,00%
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	2	5,00%
<i>Fusobacterium varium</i>	2	5,00%
<i>Haemophilus spp</i>	2	5,00%
<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	2	5,00%
<i>Peptostreptococcus assacharolyticus</i>	2	5,00%
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	2	5,00%
<i>Prevotella buccae</i>	2	5,00%
<i>Prevotella loesheii</i>	2	5,00%
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2	5,00%
<i>Staphylococcus cohnii</i>	2	5,00%
<i>Streptococcus intermedius</i>	2	5,00%

5.2.2.3 Bolsas periodontais e canais radiculares conjuntamente

Nenhum microrganismo esteve presente concomitantemente na bolsa periodontal e no canal radicular logo após a instrumentação endodôntica.

5.2.3. *Microbiota presente nos canais radiculares e bolsas periodontais logo após remoção da medicação intracanal*

Diferentemente das outras coletas, os 10 casos do grupo controle, ou seja, aqueles que o soro fisiológico foi deixado no interior dos canais radiculares nos períodos de 7 e 14 dias não foram contabilizados.

5.2.3.1. Canais radiculares-Freqüência

Os microrganismos mais frequentemente encontrados após o uso de uma medicação intracanal foram: *Actinomyces naeslundii* (36,66%) e *Propionibacterium propionicum* (36,66%) de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7 - Frequência das espécies bacterianas presentes em **30 canais radiculares** por cultura microbiológica logo após remoção da medicação intracanal.

Espécies	N° de canais	Frequência de Aparecimento
<i>Actinomyces naeslundii</i>	11	36,66%
<i>Propionibacterium propionicum</i>	11	36,66%
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	5	16,66%
<i>Eggerthella lenta</i>	5	16,66%
<i>Haemophilus influenzae</i>	4	13,33%
<i>Actinomyces meyeri</i>	2	6,66%
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	2	6,66%
<i>Candida albicans</i>	2	6,66%
<i>Capnocytophaga spp</i>	2	6,66%
<i>Clostridium</i>	2	6,66%
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	6,66%
<i>Gemella morbillorum</i>	2	6,66%
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	2	6,66%
<i>Propionibacterium acnes</i>	2	6,66%
<i>Streptococcus mitis</i>	2	6,66%
<i>Streptococcus oralis</i>	2	6,66%
<i>Veillonella spp</i>	2	6,66%

5.2.3.2. Bolsas Periodontais-Freqüência

O microrganismo mais frequentemente encontrado nas bolsas periodontais avaliadas logo após a remoção da medicação intracanal foi o *Fusobacterium nucleatum* em 73,33% dos casos. A *Gemella morbillorum* foi isolada em 66,66% dos casos, enquanto a *Prevotella intermedia/nigrescens/tanneriae* em 50% e o *Actinomyces meyeri* em 43,33% conforme a Tabela 8.

Tabela 8 - Freqüência das espécies bacterianas presentes em **30 bolsas periodontais** logo após remoção da medicação intracanal.

Espécies	N° de bolsas	Freqüência de Aparecimento
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	22	73,33%
<i>Gemella morbillorum</i>	20	66,66%
<i>P intermedia/nigrescens/tanneriae</i>	15	50,00%
<i>Actinomyces meyeri</i>	13	43,33%
<i>Neisseria spp</i>	11	36,66%
<i>Anaerococcus prevotii</i>	9	30,00%
<i>Gemella haemolysans</i>	9	30,00%
<i>Parvimonas micra</i>	9	30,00%
<i>Prevotella oralis</i>	9	30,00%
<i>Clostridium spp</i>	7	23,33%
<i>Propionibacterium propionicum</i>	7	23,33%
<i>Actinomyces naeslundii</i>	5	16,66%
<i>Capnocytophaga spp</i>	4	13,33%
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	4	13,33%
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	4	13,33%
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	4	13,33%

Tabela 8 - Frequência das espécies bacterianas presentes em **30 bolsas periodontais** por cultura microbiológica logo após remoção da medicação intracanal (continuação).

Espécies	N° de bolsas	Frequência de Aparecimento
<i>Streptococcus constellatus</i>	4	13,33%
<i>Actinomyces israelii</i>	2	6,66%
<i>Actinomyces viscosus</i>	2	6,66%
<i>Aerococcus viridans</i>	2	6,66%
<i>Bifidobacterium spp</i>	2	6,66%
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	6,66%
<i>Eubacterium avium</i>	2	6,66%
<i>Haemophilus influenzae</i>	2	6,66%
<i>Prevotella bivia</i>	2	6,66%
<i>Prevotella buccae</i>	2	6,66%
<i>Prevotella denticola</i>	2	6,66%
<i>Prevotella loesheii</i>	2	6,66%
<i>Veillonella spp</i>	2	6,66%

5.2.3.3 Bolsas periodontais e canais radiculares conjuntamente

Nenhum microrganismo esteve presente concomitantemente na bolsa periodontal e no canal radicular logo após a remoção de medicação intracanal.

5.2.4 Variação do número de microrganismos após intervenções

A mediana do número de espécies bacterianas encontrada na infecção primária dos canais radiculares avaliados foi 6 espécies, enquanto nas bolsas periodontais correspondentes foi 7. Após o preparo químico-mecânico a mediana do número de espécies bacterianas reduziu para zero no canal radicular e cinco na bolsa periodontal. Após o uso das medicações, de uma maneira geral, no canal radicular (o grupo controle não participa desta contagem) a mediana foi de apenas 1 espécie encontrada e na bolsa periodontal 3 conforme os dados descritos na tabela 9.

Tabela 9 - Média e Mediana do número de espécies bacterianas em cada intervenção

	E1	E2	E3	P1	P2	P3
Mediana	6	0	1	7	5	3
Média	5,775	0,25	1,47	6,97	4,87	4,7

E1= coleta de canal inicial (imediatamente após abertura coronária) / **E2**= coleta de canal logo após a instrumentação / **E3**= coleta de canal 7 ou 14 dias após a instrumentação (canal preenchido com medicação). O grupo controle não está presente.

P1=coleta da bolsa periodontal antes das instrumentações do canal radicular e da bolsa periodontal / **P2**= coleta da bolsa periodontal logo após a instrumentação / **P3**=coleta da bolsa periodontal 7 ou 14 dias após a instrumentação (canal preenchido com medicação). O grupo controle não está presente.

A tabela 10 mostra que ao utilizar a clorexidina gel 2% por 7 dias nos canais radiculares avaliados a mediana do número de espécies no canal radicular foi 0, ao passo que na bolsa periodontal foi 7. Quando se utilizou a clorexidina gel 2% ou o soro fisiológico associada ao hidróxido de cálcio como medicações intracanaís, a mediana foi 1 no canal radicular e o número de espécies das bolsas radiculares destes dois grupos se manteve em 7 .

Em ambos os grupos controles, nos quais apenas o soro fisiológico permaneceu no interior dos canais radiculares por 7 e 14 dias o número de espécies encontradas foi 3 nos canais radiculares e 6 nas bolsas periodontais.

Tabela 10 - Mediana do número de espécies bacterianas encontradas nos canais radiculares e bolsas periodontais logo após remoção de cada medicação intracanal.

	N° de casos	Mediana do N° de espécies (CR)	Mediana do N° de espécies (BP)
CL 2%	10	0	7
CL 2%+HC	10	1	7
S + HC	10	1	7
S (7 dias)	5	3	6
S (14 dias)	5	3	6

CL = Clorexidina gel 2% / HC= Hidróxido de cálcio / S= Soro fisiológico/ CR=canal radicular/ BP=bolsa periodontal.

5.2.5 Variação de Unidades formadoras de colônias após cada intervenção

5.2.5.1 No canal radicular

Quanto a contagem das unidades formadoras de colônias, após o preparo químico- mecânico a mediana de UFC/mL nos canais radiculares foi 0. Este resultado se manteve após o uso de clorexidina gel 2% por 7 dias como medicação intracanal. Com a utilização da clorexidina gel associada ao hidróxido

de cálcio por 14 dias a mediana também foi 0 UFC/mL. Em contrapartida, a mediana foi 20 UFC/mL quando a medicação utilizada foi soro fisiológico com hidróxido de cálcio. Nos grupos controles (preparo químico-mecânico utilizando clorexidina gel 2% e soro fisiológico por 7 ou 14 dias como “medicação intracanal”), a mediana do n° de microrganismos encontrados foi 0 UFC/mL logo após a instrumentação e $2,3 \times 10^3$ UFC/mL após o período do uso do soro fisiológico como medicação intracanal. Estes dados estão na tabela 11.

5.2.5.2 Na bolsa periodontal

Antes e após a utilização de quaisquer das três medicações intracanaís, a contagem das unidades formadoras de colônia por mL se manteve estável conforme a tabela 12.

Tabela 11 - Mediana e Média do número de microrganismos (UFC/mL) encontrados nos canais radiculares antes e após intervenções.

	CL 2%			CL 2%+HC			S + HC			S		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
Mediana	1,4 x 10 ⁴ a	0 b	0 b	2,5 x 10 ² a	0,4 x 10 ² b	0 b	5 x 10 ⁴ a	0 b	0,2 x 10 ² b	6x10 ⁷ a	0 b	2,3x10 ³ c
Média	4,2 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁴	2,3 x 10 ⁵	7,22 x 10 ⁶	5,6 x 10 ⁵	1,6 x 10 ²	1,7 x 10 ⁶	44	42	6x10 ⁷	0	3,7x10 ⁶

Tabela 12 - Mediana e Média do número de microrganismos (UFC/mL) encontrados nas bolsas periodontais antes e após intervenções.

	CL 2%			CL2%+ HC			S + HC			S		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
Mediana	1,8 x 10 ⁸ a	2,6 x 10 ⁷ a	6,5 x 10 ⁷ a	3,6 x 10 ⁷ a	2,5 x 10 ⁵ a	1,5 x 10 ⁷ a	0,35 x 10 ⁷ a	2,35 x 10 ⁶ a	2,3 x 10 ⁷ a	6,7x10 ⁹ a	3,8x10 ⁸ b	6,0x10 ⁹ ab
Média	3,8 x 10 ⁸	2,1 x 10 ⁸	1,8 x 10 ⁸	7,5 x 10 ⁷	2,5 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁷	2,01 x 10 ⁷	3,6 x 10 ⁶	9,7 x 10 ⁸	6,7x10 ⁹	3,2x10 ⁹	6,0x10 ⁹

A estatística de ambas as tabelas foi feita linearmente comparando os momentos 1, 2 e 3 em cada coluna de medicação. **P1**=coleta da bolsa periodontal antes das instrumentações do canal radicular e da bolsa periodontal / **P2**= coleta da bolsa periodontal logo após a instrumentação / **P3**=coleta da bolsa periodontal 7 ou 14 dias após a instrumentação (canal preenchido com medicação), p<0.05. **E1**= coleta de canal após abertura coronária / **E2**= coleta de canal logo após a instrumentação / **E3**= coleta de canal 7 ou 14 dias após a instrumentação (canal preenchido com medicação), **CL** = Clorexidina gel 2% / **HC**= Hidróxido de cálcio / **S**= Soro fisiológico/ p<0,05

6.2.6 Associações entre os microrganismos

6.2.6.1 No canal radicular

Algumas associações positivas e negativas aconteceram no interior dos canais radiculares nas várias etapas do tratamento endodôntico conforme a tabela 13.

Tabela 13 - Associações positivas e negativas entre os microrganismos no interior dos canais radiculares

Microrganismos	Valor de p	Odds ratio	95% intervalo de confiança
Coleta Inicial canal (E1)			
Associação Positiva			
<i>Aa e E faecalis</i>	0,01	51,0	2,46-1057
<i>Aa e Neisseria spp</i>	0,024	24,0	1,61-356,63
<i>A. viscosus e B ureolyticus</i>	0,013	3,0	0,60-14,86
<i>A. viscosus e P loesheii</i>	0,013	3,0	0,60-14,86
<i>A. viscosus e P oralis</i>	0,026	2,0	0,75-5,32
<i>B ureolyticus e P loesheii</i>	0,038	36,0	1,56-826,11
<i>Cl subterminale e Eggerthella lenta</i>	0,013	3,0	0,60-14,86
<i>Cl subterminale e E faecalis</i>	0,026	2,0	0,75-5,32
<i>Eggerthella lenta e Neisseria spp</i>	0,006	2,5	0,85-7,31
<i>E faecalis e Neisseria spp</i>	0,024	24,0	1,61-356,63
<i>Haemophilus spp e E limosum</i>	0,026	2,0	0,75-5,32
<i>F nucleatum e Pintermedia/nigrescens</i>	0,015	12,0	1,581-91,08
<i>H parainfluenzae e Strep constellatus</i>	0,013	3,0	0,60-14,86
<i>Neisseria spp e Strep oralis</i>	0,001	3,5	1,08-11,29
<i>P micra e Strep oralis</i>	0,038	0,533	0,332-0,856

Tabela 13 - Associações positivas e negativas entre os microrganismos no interior dos canais radiculares

Microrganismos	Valor de p	Odds ratio	95% intervalo de confiança
• Associação negativa			
<i>Aa e Cl subterminale</i>	0,026	0,100	0,027-0,372
<i>Aa e Neisseria cinerea</i>	0,026	0,100	0,027-0,372

<i>A meyeri</i> e <i>H aphrophylus</i>	0,013	0,05	0,007-0,338
<i>Eggerthella lenta</i> e <i>Neisseria cinerea</i>	0,013	0,05	0,007-0,338
<i>E faecalis</i> e <i>Neisseria cinerea</i>	0,026	0,100	0,027-0,372
<i>F nucleatum</i> e <i>Gemella haemolysans</i>	0,029	0,333	0,173-0,641
<i>Haemophilus</i> spp e <i>Strep salivarius</i>	0,026	0,100	0,027-0,372
<i>P intermedia/nigrescens/tanneriae</i> e <i>P oralis</i>	0,045	0,389	0,218-0,694
<i>P micra</i> e <i>Strep constellatus</i>	0,023	0,211	0,088-0,503
Coleta após instrumentação (E2)			
Não houve associações			
Coleta após medicação (E3)			
• Associação negativa			
<i>A meyeri</i> e <i>A viscosus</i>	0,026	0,100	0,027-0,372

5.2.6.2 Na bolsa periodontal

Algumas associações positivas e negativas aconteceram na bolsa periodontal nas várias etapas do tratamento endodôntico conforme a tabela 14.

Tabela 14 - Associações positivas e negativas entre os microrganismos no interior das bolsas periodontais.

Microrganismos	Valor de p	Odds ratio	95% intervalo de confiança
Coleta Inicial Perio (P1)			
• Associação Positiva			
<i>A meyeri</i> e <i>Neisseria</i> spp	0,038	0,533	0,322-0,856
<i>C. albicans</i> e <i>Haemophilus</i> spp	0,013	3,000	0,606-14,864
<i>C. albicans</i> e <i>L. cremoris</i>	0,013	3,000	0,606-14,864
<i>Cl acetobutilicum</i> e <i>P loesheii</i>	0,013	3,000	0,606-14,864
<i>Haemophilus</i> spp e <i>L. cremoris</i>	0,038	36,00	1,569-826,11
<i>A prevotii</i> e <i>P gingivalis</i>	0,032	10,00	1,26-79,33
• Associação negativa			
<i>A naeslundii</i> e <i>Bifidobacterium</i> spp	0,026	0,100	0,027-0,372
<i>A odontolyticus</i> e <i>P propionicum</i>	0,026	0,100	0,027-0,372
<i>Clostridium</i> spp e <i>P propionicum</i>	0,013	0,050	0,007-0,338
<i>Gemella haemolysans</i> e <i>P prevotii</i>	0,010	0,400	0,215-0,743
<i>Haemophilus</i> spp e <i>O. antropi</i>	0,013	0,050	0,007-0,338
<i>L cremoris</i> e <i>Ochrobactrum antropi</i>	0,013	0,050	0,007-0,338
Coleta após instrumentação Perio (P2)			
• Associação Positiva			
<i>Haemophilus</i> spp e <i>Strep oralis</i>	0,001	4,00	0,203-78,791
• Associação Negativa			
<i>Aa</i> e <i>A naeslundii</i>	0,013	0,050	0,007-0,338

Tabela 14 - Associações positivas e negativas entre os microrganismos no interior das bolsas periodontais (continuação).

Microrganismos	Valor de p	Odds ratio	95% intervalo de confiança
Coleta após instrumentação Perio (P3)			
• Associação Positiva			
<i>B ureolyticus</i> e <i>P oralis</i>	0,006	2,5	0,855-7,314
<i>G haemolysans</i> e <i>P propionicum</i>	0,024	24,000	1,61-356,63
• Associação negativa			
<i>A meyeri</i> e <i>S constellatus</i>	0,043	0,150	0,053-0,426
<i>A odontolyticus</i> e <i>G morbillorum</i>	0,032	0,083	0,008-0,895
<i>F nucleatum</i> e <i>P propionicum</i>	0,045	0,389	0,218-0,694

5.2.6.3 Associações entre sinais e sintomas e a presença de certos microrganismos na bolsa periodontal e no canal radicular

Tabela 15 - Associações positivas e negativas entre os microrganismos e sinais e sintomas.

Microrganismos	Valor de p	Odds ratio	95% intervalo de confiança
Coleta Inicial Canal (E1)			
• Associação Positiva			
○ Assintomáticos			
<i>F nucleatum</i>	0,017	11,66	1,52-89,121
<i>P intermedia/nigrescens/tanneriae</i>	0,040	7,875	1,105-56,123
○ Sensibilidade entre sessões			
<i>Haemophilus spp</i>	0,046	15,00	1,136-198,039

Tabela 15 - Associações positivas e negativas entre os microrganismos e sinais e sintomas (continuação).

Microrganismos	Valor de p	Odds ratio	95% intervalo de confiança
----------------	------------	------------	----------------------------

• Associação Negativa			
○ Assintomáticos			
<i>A prevotii</i>	0,049	0,471	0,284-0,779
○ Sensibilidade entre sessões			
<i>F nucleatum</i>	0,046	0,143	0,022-0,937
<i>A prevotii</i>	0,030	0,412	0,233-0,727
○ Percussão			
<i>F nucleatum</i>	0,046	0,143	0,022-0,937
<i>A prevotii</i>	0,030	0,412	0,233-0,727
○ Dor espontânea			
<i>Neisseria cinerea</i>	0,026	0,100	0,027-0,372
<i>S mitis</i>	0,026	0,100	0,027-0,372
○ Dentes hígidos			
<i>Gemella morbillorum</i>	0,020	0,500	0,296-0,844
○ Dentes restaurados			
<i>Gemella morbillorum</i>	0,009	0,429	0,234-0,785
Coleta Inicial Bolsa (P1)			
• Associação Positiva			
○ Assintomáticos			
<i>F nucleatum</i>	0,00	96,00	5,21-1766,83
○ Supuração			
<i>A prevotii</i>	0,032	10,00	1,26-79,339
<i>P micra</i>	0,032	10,00	1,26-79,339
<i>Strep constellatus</i>	0,008	18,00	2,012-161,044
○ Supuração 2 faces			
<i>P loesheii</i>	0,038	36,00	1,56-826,118
Tabela 15 - Associações positivas e negativas entre os microrganismos e sinais e sintomas (continuação).			
Microrganismos	Valor de p	Odds ratio	95% intervalo de confiança
Coleta Inicial Bolsa (P1)			
• Associação Negativa			

○ Sensibilidade entre sessões			
<i>F nucleatum</i>	0,001	0,023	0,002-0,296
○ Percussão			
<i>F nucleatum</i>	0,001	0,023	0,002-0,296
○ Supuração 1 face			
<i>Candida albicans</i>	0,026	0,100	0,027-0,372
<i>Ochrobactrum antropi</i>	0,026	0,100	0,027-0,372
○ Supuração 2 faces			
<i>Aa</i>	0,013	0,05	0,007-0,338

5.3 PCR

5.3.1 Canal Radicular

Os microrganismos mais frequentemente encontrados nos canais radiculares na primeira coleta (antes do preparo químico-mecânico) foram: *P micra* (67,5%) e *T socranskii* (67,5%) enquanto que imediatamente após o preparo químico-mecânico *P micra* (57,5%) e *P gingivalis* (47,5%) foram as mais prevalentes de acordo com a tabela 16.

Tabela 16 - Porcentagem de aparecimento de determinados microrganismos no canal radicular após cada intervenção.

	E 1	E 2	E 3	E CL	E CL+HC	E S+HC	E VAZIO 7	E VAZIO 14
<i>A actinomycetemcomitans</i>	0,00%	0,00%	6,66%	0,00%	20,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>F alocis</i>	32,50%	20,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>F nucleatum</i>	5,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>G morbillorum</i>	0,00%	0,00%	6,66%	0,00%	20,00%	0,00%	0,00%	0,00%

	32,50							
<i>P endodontalis</i>	%	20,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	37,50			30,00				
<i>P gingivalis</i>	%	47,50%	40,00%	%	60,00%	30,00%	0,00%	60,00%
<i>P intermedia</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	67,50			70,00			100,00	
<i>P micra</i>	%	57,50%	86,66%	%	80,00%	70,00%	%	100,00%
	10,00							
<i>P nigrescens</i>	%	5,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>P tanneriae</i>	5,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	57,50			20,00				
<i>T denticola</i>	%	22,50%	23,33%	%	20,00%	30,00%	0,00%	40,00%
	32,50							
<i>T forsythia</i>	%	5,00%	13,33%	0,00%	40,00%	0,00%	40,00%	40,00%
	67,50			20,00				
<i>T socranskii</i>	%	27,50%	20,00%	%	40,00%	0,00%	0,00%	40,00%

E1= coleta de canal após abertura coronária / **E2**= coleta de canal logo após a instrumentação / **E3**= coleta de canal 7 ou 14 dias após a instrumentação (canal preenchido com medicação) / **E CL**= Após medicação com clorexidina gel 2 % por 7 dias / **E CL + HC** =Após medicação com clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio por 14 dias/ **E S + HC**= Após medicação de soro fisiológico e hidróxido de cálcio por 14 dias/ **E VAZIO 7**= Após 7 dias sem medicação intracanal/ **E VAZIO 14**= Após 14 dias sem medicação intracanal

Houve diferenças estatisticamente significantes com relação ao aparecimento dos microrganismos analisados por PCR nos 3 momentos de coleta (antes e imediatamente após o preparo químico –mecânico do canal radicular e depois do uso de medicações intracanaís) do canal radicular quando *Porphyromonas endodontalis*, *Treponema denticola* e *Treponema socranskii* foram analisados conforme a tabela 17.

Tabela 17 - Número absoluto de aparecimento dos microrganismos pré-determinados no canal radicular antes e após o preparo químico-mecânico e depois do uso das medicações intracanaís.

	E 1	E 2	E 3
<i>A actinomycetemcomitans</i>	00 a	00 a	02 a
<i>F alocis</i>	17 a	14 a	04 a
<i>F nucleatum</i>	02 a	00 a	00 a
<i>G morbillorum</i>	00 a	00 a	02 a
<i>P endodontalis</i>	13 a	08 ab	00 b
<i>P gingivalis</i>	15 a	19 a	12 a
<i>P intermedia</i>	00 a	00 a	00 a
<i>P micra</i>	27 a	21 a	26 a
<i>P nigrescens</i>	04 a	02 a	00 a
<i>P tanneriae</i>	02 a	00 a	00 a
<i>T denticola</i>	23 a	10 b	07 b
<i>T forsythia</i>	13 a	02 a	04 a
<i>T socranskii</i>	27a	11b	06 b

A estatística foi realizada apenas linearmente. **E1**= coleta de canal após abertura coronária / **E2**= coleta de canal logo após a instrumentação / **E3**= coleta de canal 7 ou 14 dias após a instrumentação (canal preenchido com medicação). $p < 0.05$

6.3.2 Bolsa Periodontal

Os microrganismos mais frequentemente encontrados na bolsa periodontal pelo método de PCR na primeira coleta foram: *P micra* (80%) e *T socranskii* (80%). Imediatamente após o preparo químico-mecânico, o *P micra* (95%) e o *T socranskii* (72,5%) continuam entre os mais encontrados além de *T denticola* (80%) conforme os dados da tabela 18.

Tabela 18 - Porcentagem de aparecimento de determinados microrganismos após cada intervenção na bolsa periodontal

	P 1	P 2	P3	P CL	P CL+HC	P S+HC	P VAZIO 7	P VAZIO 14
<i>A actinomycetemcomitans</i>	20,00 %	20,00%	13,33%	20,00 %	0,00%	20,00%	0,00%	0,00%
<i>F alocis</i>	47,50 %	37,50%	33,33%	30,00 %	60,00%	70,00%	0,00%	0,00%
<i>F nucleatum</i>	32,50 %	15,00%	40,00%	30,00 %	40,00%	30,00%	0,00%	0,00%
<i>G morbillorum</i>	10,00 %	10,00%	6,00%	0,00%	20,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>P endodontalis</i>	47,50 %	27,50%	56,60%	30,00 %	100,00 %	40,00%	0,00%	0,00%
<i>P gingivalis</i>	62,50 %	57,50%	60,00%	30,00 %	80,00%	70,00%	100,00 %	0,00%
<i>P intermedia</i>	25,00 %	10,00%	16,60%	0,00%	20,00%	30,00%	40,00%	0,00%
<i>P micra</i>	80,00 %	95,00%	83,33%	80,00 %	60,00%	100,00 %	100,00 %	100,00%
<i>P nigrescens</i>	20,00 %	5,00%	10,00%	0,00%	20,00%	10,00%	40,00%	0,00%
<i>P tanneriae</i>	5,00% 75,00	0,00%	6,00%	0,00%	20,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>T denticola</i>	75,00 %	80,00%	36,55%	30,00 %	40,00%	40,00%	100,00 %	40,00%
<i>T forsythia</i>	52,50 %	57,50%	33,33%	20,00 %	20,00%	60,00%	100,00 %	100,00%
<i>T socranskii</i>	80,00 %	72,50%	73,33%	50,00 %	100,00 %	70,00%	100,00 %	40,00%

P1= coleta da bolsa periodontal após abertura coronária / **P2**= coleta da bolsa periodontal logo após a instrumentação / **P3**= coleta da bolsa periodontal 7 ou 14 dias após a instrumentação (canal preenchido com medicação) / **P CL**= coleta da bolsa periodontal após medicação com clorexidina gel 2 % por 7 dias / **P CL + HC** =Após medicação com clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio por 14 dias/ **P SF + HC**= Após medicação de soro fisiológico e hidróxido de cálcio por 14 dias/ **P VAZIO 7**= Coleta da bolsa periodontal após 7 dias sem medicação intracanal/ **E VAZIO 14**= Coleta da bolsa periodontal após 14 dias sem medicação intracanal

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o aparecimento dos microrganismos analisados por PCR nos 3 momentos de coleta (antes e imediatamente após o preparo químico –mecânico do canal radicular e depois do uso de medicações intracanaís) da bolsa periodontal na maior parte dos casos. Apenas *T forsythia* e *T denticola* obtiveram diferenças estatisticamente significantes entre P2 e P3 conforme a tabela 19.

Tabela 19 - Número absoluto de aparecimento dos microrganismos na bolsa periodontal antes e após o preparo químico-mecânico e depois do uso das medicações intracanaís por PCR.

	P 1	P 2	P 3
<i>A actinomycetemcomitans</i>	08 a	08 a	04 a
<i>F alocis</i>	17 a	17 a	10 a
<i>F nucleatum</i>	14 a	06 a	12 a
<i>G morbillorum</i>	02 a	02 a	02 a
<i>P endodontalis</i>	19 a	11 a	17 a
<i>P gingivalis</i>	25 a	23 a	18 a
<i>P intermedia</i>	08 a	04 a	04 a
<i>P micra</i>	36 a	40 a	25 a
<i>P nigrescens</i>	08 a	02 a	03 a
<i>P tanneriae</i>	02 a	00 a	02 a
<i>T denticola</i>	30 a	32 a	11 b
<i>T forsythia</i>	21 a	23 a	10 b
<i>T socranskii</i>	32 a	29 a	22 a

A estatística foi realizada apenas linearmente. **P1**= coleta da bolsa periodontal após abertura coronária / **P2**= coleta da bolsa periodontal logo após a instrumentação / **P3**= coleta da bolsa periodontal 7 ou 14 dias após a instrumentação (canal preenchido com medicação). p<0.05

6.3.3. Em ambos os locais

Quando se comparou a freqüência de aparecimento de microrganismos no mesmo período de coleta, mas em locais diferentes (canal radicular e bolsa periodontal), as diferenças estatísticas foram notadas nos microrganismos: *P*

micra, *T denticola* e *T forsythia* na segunda coleta (imediatamente após o preparo químico-mecânico) e nos microrganismos: *F nucleatum* e *P endodontalis* na terceira coleta (após o uso de medicações intracanaís). Não houve diferenças estatisticamente significantes nas coletas iniciais.

Os microrganismos mais frequentemente isolados em ambos os locais do mesmo dente (bolsa periodontal e canal radicular) nas primeiras coletas foram: *P micra* (67,5%), *T socranskii* (52,5%), *T denticola* (37,5%), *F alocis* (32,5%) de acordo com a tabela 20.

Tabela 20- Aparecimento de microrganismos no canal radicular e na bolsa periodontal e em ambos os locais no mesmo caso por PCR nas primeiras coletas .

Microrganismos	P 1 BP	E1 CR	Ambos	Frequência de Aparecimento em Ambos
<i>P micra</i>	36 a	27 a	27	67,50%
<i>T socranskii</i>	32 a	27 a	21	52,50%
<i>T denticola</i>	30 a	23 a	15	37,50%
<i>F alocis</i>	17 a	17 a	13	32,50%
<i>P endodontalis</i>	19 a	13 a	10	25,00%
<i>P gingivalis</i>	25 a	15 a	10	25,00%
<i>T forsythia</i>	21 a	13 a	6	15,00%
<i>P nigrescens</i>	8 a	4 a	2	5,00%
<i>A actinomycetemcomitans</i>	8 a	0 a	0	0,00%
<i>F nucleatum</i>	14 a	2 a	0	0,00%
<i>G morbillorum</i>	2 a	0 a	0	0,00%
<i>P intermedia</i>	8 a	0 a	0	0,00%
<i>P tanneriae</i>	2 a	2 a	0	0,00%

A estatística foi executada apenas entre as colunas BP e CR linearmente. **P1**= coleta da bolsa periodontal após abertura coronária / **P2**= coleta da bolsa periodontal logo após a instrumentação / **P3**= coleta da bolsa periodontal 7 ou 14 dias após a instrumentação (canal preenchido com medicação). **E1**= coleta de canal após abertura coronária / **E2**= coleta de canal logo após a instrumentação / **E3**= coleta de canal 7 ou 14 dias após a instrumentação (canal preenchido com medicação). p<0.05

Os microrganismos mais frequentemente isolados em ambos os locais do mesmo dente (bolsa periodontal e canal radicular) na segunda coleta foram: *P micra* (52,5%), *P gingivalis* (42,5%), *T socranskii* e *F alocis* (27,5%) de acordo com a tabela 21.

Tabela 21- Aparecimento de microrganismos no canal radicular e na bolsa periodontal e em ambos os locais no mesmo caso por PCR na segunda coleta.

Microrganismos	P 2 BP	E2 CR	Ambos	Frequência de Aparecimento em Ambos
<i>P micra</i>	40 a	21 b	21	52,50%
<i>P gingivalis</i>	23 a	19 a	17	42,50%
<i>T socranskii</i>	29 a	11 a	11	27,50%
<i>F alocis</i>	17 a	14 a	11	27,50%
<i>T denticola</i>	32 a	10 b	8	20,00%
<i>P endodontalis</i>	11 a	8 a	0	0,00%
<i>T forsythia</i>	23 a	2 b	0	0,00%
<i>P nigrescens</i>	2 a	2 a	0	0,00%
<i>A actinomycetemcomitans</i>	8 a	0 a	0	0,00%
<i>F nucleatum</i>	6 a	0 a	0	0,00%
<i>G morbillorum</i>	2 a	0 a	0	0,00%
<i>P intermedia</i>	4 a	0 a	0	0,00%
<i>P tanneriae</i>	0 a	0 a	0	0,00%

A estatística foi executada apenas entre as colunas BP e CR linearmente. **P1**= coleta da bolsa periodontal após abertura coronária / **P2**= coleta da bolsa periodontal logo após a instrumentação / **P3**= coleta da bolsa periodontal 7 ou 14 dias após a instrumentação (canal preenchido com medicação). **E1**= coleta de canal após abertura coronária / **E2**= coleta de canal logo após a instrumentação / **E3**= coleta de canal 7 ou 14 dias após a instrumentação (canal preenchido com medicação). p<0.05

Os microrganismos mais frequentemente isolados em ambos os locais do mesmo dente (bolsa periodontal e canal radicular) na terceira coleta foram: *P micra* (53,33%), *P gingivalis* (23,33%), *T socranskii* e *T denticola* (10,00%) de acordo com a tabela 22.

Tabela 22- Aparecimento de microrganismos no canal radicular e na bolsa periodontal e em ambos os locais no mesmo caso por PCR na terceira coleta.

Microrganismos	P 3 BP	E 3 CR	Ambos	Frequência de Aparecimento em Ambos
<i>P micra</i>	21 a	19 a	16	53,33%
<i>P gingivalis</i>	16 a	10 a	7	23,33%
<i>T socranskii</i>	19 a	4 a	3	10,00%
<i>T denticola</i>	10 a	6 a	3	10,00%
<i>F alocis</i>	7 a	3 a	1	3,33%
<i>P endodontalis</i>	14 a	0 b	0	0,00%
<i>T forsythia</i>	7 a	3 a	0	0,00%
<i>P nigrescens</i>	3 a	0 a	0	0,00%
<i>A actinomycetemcomitans</i>	3 a	1 a	0	0,00%
<i>F nucleatum</i>	9 a	0 b	0	0,00%
<i>G morbillorum</i>	1 a	1 a	0	0,00%
<i>P intermedia</i>	4 a	0 a	0	0,00%
<i>P tanneriae</i>	3 a	0 a	0	0,00%

A estatística foi executada apenas entre as colunas BP e CR linearmente. **P1**= coleta da bolsa periodontal após abertura coronária / **P2**= coleta da bolsa periodontal logo após a instrumentação / **P3**= coleta da bolsa periodontal 7 ou 14 dias após a instrumentação (canal preenchido com medicação). **E1**= coleta de canal após abertura coronária / **E2**= coleta de canal logo após a instrumentação / **E3**= coleta de canal 7 ou 14 dias após a instrumentação (canal preenchido com medicação). p<0.05

6 DISCUSSÃO

A escassa literatura sobre o tema “endo-pério” e também os desafios em se tratar casos clínicos com perda óssea avançada foram fatores motivadores para o desenvolvimento deste estudo. O trabalho procurou investigar a ocorrência de alguns dos principais patógenos em lesões endo-perio por dois métodos de identificação: cultura microbiológica e PCR tradicional.

É sabido que a grande parte dos patógenos periodontais também são patógenos endodônticos embora haja poucos estudos relacionando-os a casos que envolvam ambas as doenças em um único dente, ou seja, dentes com lesão endo-periodontal.

6.1 *Características clínicas das lesões endo-perio*

No período estudado, as bolsas periodontais mantiveram suas características clínicas iniciais (Tabela 1 – Apêndice II). Fato este devido ao curto período de avaliação e ausência de raspagem e alisamento radicular. Normalmente, as avaliações periodontais se dão em períodos de 45 dias, 3 meses, 6 meses, 1 ano (Machion, 2005, Martins, 2005) e não em apenas 7, 14 dias. Não foi feita esta avaliação longitudinal porque o intuito do trabalho foi avaliar as alterações microbiológicas apenas no período de uso da medicação intracanal, ou seja, avaliar o efeito do tratamento endodôntico no período mais frequentemente utilizado clinicamente.

Ao passo que o efeito deletério da doença pulpar no periodonto é bem documentado e esclarecido (Simon *et al.*, 1972, Sinai & Soltanoff, 1973, Seltzer *et al.*, 1963), o caminho contrário ainda é controverso. Esse fato foi também percebido no decorrer do presente estudo. A fase mais difícil foi encontrar os casos clínicos que se enquadrassem no perfil desejado. Foram avaliados 1123 pacientes com doença periodontal avançada e 816 dentes com bolsas periodontais profundas. Apenas 40 dentes apresentavam as características

clínicas necessárias para este trabalho. Muitas vezes, o dente em questão apresentava bolsas profundas que iam até o ápice, grande mobilidade, supuração, casos estes já com indicação de extração, mas ainda assim, permaneciam com certa sensibilidade pulpar. Além disso, os casos selecionados e diagnosticados como dentes com lesão endo – pério apresentavam-se, na sua grande maioria, com restaurações de médias a profundas e/ou com histórico de tratamento periodontal.

Alguns autores encontraram uma forte correlação entre a doença periodontal e mudanças inflamatórias e degenerativas da polpa (Seltzer *et al.*,1963, Stallard, 1972, Rubach, 1965), outros, não verificaram tais correlações (Czarnecki & Schilder ,1979, Mazzur & Massler ,1964).

Langeland *et al.* (1974) concluíram que a polpa sucumbe somente quando a lesão periodontal atinge o forame apical; e caso o forame não seja alcançado pela doença, apenas pequenas mudanças e/ou danos ocorrem na polpa. Soma-se a isto o fato de a polpa ter um sofisticado sistema vascular, com sistemas de controle aprimorados como esfíncteres pré-capilares, e um sistema linfático ativo, o que demonstra a eficácia de seu sistema vascular, que é a chave para sua adequada função. Tudo isto comprova que a polpa tem mecanismos que promovem uma significativa capacidade de sobrevivência (Harrington *et al.*, 2002). Entretanto, é necessário lembrar que os efeitos de uma vida toda de cáries, procedimentos restauradores, operatórios, doença periodontal e tratamentos são cumulativos. A polpa pode começar a perder algumas de suas capacidades de recuperação com cada estímulo deletério adicional. Doença periodontal, portanto, pode contribuir para a inflamação pulpar mesmo quando o forame apical não está envolvido. De qualquer maneira, esses efeitos são menos dramáticos que os efeitos comumente vistos das lesões de origem endodôntica no periodonto (Solomon *et al.*,1995).

Não foi possível, neste estudo, caracterizar os casos dentro de classificações clássicas como, por exemplo, a de Simon *et al.* (1972) devido à carência de história dental e a dificuldade de encontrar o número de casos

suficientes que se encaixasse em cada grupo. Calin, em 2005, também obteve tal dificuldade e classificou como endo-pério, as lesões endodônticas e periodontais concomitantes no mesmo dente independentemente da origem assim como em nosso estudo.

6.2 *Microbiologia das lesões endo-periodontais*

O número de espécies bacterianas encontradas na bolsa periodontal foi maior do que o encontrado nos canais radiculares envolvidos. Enquanto na bolsa periodontal a média foi de 5,6 espécies na coleta inicial (E1), no canal radicular foi de 6,47 espécies na mesma coleta (P1). Estes resultados estão de acordo com Kipioti *et al.* (1984), Kerekes *et al.* (1990) e Kurihara *et al.* (1995). Após a instrumentação endodôntica e o uso das medicações intracanaís houve redução desse número, principalmente, no canal radicular.

Foram encontrados resultados proporcionais entre microrganismos anaeróbios facultativos e estritos tanto na bolsa periodontal como no canal radicular no período e nos casos analisados. Este resultado difere da literatura que encontra grande prevalência de microrganismos anaeróbios estritos no canal (Vianna *et al.*, 2006, Gomes *et al.*, 1996, Jacinto *et al.*, 2003) e na bolsa periodontal (Uematsu & Hoshino, 1992, Van Winkelhoff *et al.*, 2002). O uso dos meios de cultura seletivos como M-Enterococcus, Agar Sabouraud, TSBV podem ter interferido nos resultados já que propiciam o crescimento de microrganismos facultativos, aeróbios e microaerófilos.

No presente trabalho houve uma predominância de microrganismos Gram-positivos (57,14% no canal radicular (E1) e 54,44% na bolsa periodontal (P1)). No canal radicular, este resultado está de acordo com Peters *et al.* (2002) e Vianna *et al.* (2006) que encontraram microrganismos Gram-positivos em 56% dos casos e Martinho & Gomes, em 2008, que encontraram 59,3%. Entretanto, outros estudos como de Jacinto *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 1994 verificaram a

predominância de Gram-negativos em infecções endodônticas primárias sintomáticas ou assintomáticas.

Os bacilos Gram-positivos constituem um importante segmento da microbiota remanescente, mantendo-se presente mesmo depois da obturação dos canais radiculares (Molander *et al.*, 1998). Na etapa após a remoção da medicação (E3) pelo método de cultura, notou-se a presença elevada de bacilos Gram-positivos. Os gêneros mais freqüentemente isolados foram *Actinomyces* sp. e *Propionibacterium* sp.

Os mecanismos pelos quais os microrganismos Gram-positivos se mantêm viáveis nos canais radiculares após os procedimentos endodônticos são determinados por interações entre espécies (Dahlen & Möller, 1992). Por isso, deve haver um particular interesse em explorar os mecanismos pelos quais essas espécies ingressam e permanecem no interior dos canais radiculares após o tratamento endodôntico e sua implicância nas lesões periapicais. As espécies *Actinomyces meyeri*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* e *Propionibacterium propionicum* parecem possuir habilidades de se estabelecerem e sobreviverem em tecidos periapicais, ou seja, fora dos canais radiculares (Happonen, 1986; Sjogren *et al.*, 1988; Clarridge & Zhang, 2002). *Actinomyces* sp. são considerados colonizadores primários da cavidade bucal e são cruciais no desenvolvimento da placa bacteriana (Yeung, 1999), além disso, têm se mostrado envolvidos nas infecções endodônticas persistentes (Kalfas *et al.*, 2001). A sobrevivência em ambientes desprovidos de nutrientes pode ser devido à presença de enzimas extracelulares, por exemplo, aquelas envolvidas no metabolismo de uréia e sucrose (Yeung, 1999). A espécie *Propionibacterium propionicum*, antigamente chamada de *Arachnia propionica*, também é um habitante normal da cavidade bucal e tem sido isolado em mono infecções ou infecções mistas, sua patogenicidade ainda não é totalmente esclarecida (Sjogren *et al.*, 1988).

No presente estudo esses microrganismos foram isolados com uma freqüência relativamente alta nas coletas após o uso de medicamentos intracanaís

(*Actinomyces naslundii* e *Propionibacterium propionicum* 27,5% em E3) por 7 ou 14 dias, o que evidencia a dificuldade em se combater infecções na presença de microrganismos como estes, tanto por meio do preparo químico-mecânico como pelo uso de medicamentos intracanáis.

Na bolsa periodontal, o resultado é conflitante já que a maior parte dos estudos (Kipioti *et al.*, 1984, Kobayashi *et al.*, 1990, Kurihara *et al.*, 1995) verifica a predominância de Gram-negativos em dentes com envolvimento endodôntico e doença periodontal. Entretanto, deve-se levar em consideração que são trabalhos mais antigos, utilizando técnicas de identificações menos precisas além de avaliarem um número reduzido de casos. Daniluk *et al.* (2006) verificaram uma maior presença de microrganismos gram-positivos em bolsas periodontais.

Há simples verdades que parecem ser óbvias até mesmo para observadores casuais da microbiota periodontal nos últimos 100 anos. Primeiramente, que a microbiota periodontal é complexa em termos de sua composição e que a microbiota difere em composição de local para local no mesmo sujeito e de sujeito para sujeito. A questão começa, então, como quais são os fatores que governam a composição da microbiota subgingival? Possíveis fatores que podem impactar na natureza da colonização das espécies tais como adesão, coagregação, viabilidade de nutrientes e interações antagonistas e sinérgicas têm sido estudados *in vitro* por muitos anos. Entretanto, a validade ou ausência dela, dos mecanismos postulados de aquisição, desenvolvimento e regulação do complexo ecossistema microbiano têm se tornado difíceis de confirmar ou refutar *in vivo*.

Além disso, o acesso *in vivo* de relações ecológicas entre espécies bacterianas e seu habitat não-bacteriano é difícil de reproduzir devido às técnicas laboratoriais necessárias para acessar a ampla gama de espécies bacterianas em um grande número de amostras clínicas microbiológicas tomadas de locais distintos (Haffajee & Socransky, 2006).

Diferenças existem entre as microbiotas endodôntica e subgengival principalmente devido à forte presença da defesa do organismo hospedeiro, da presença de saliva na bolsa periodontal, higienização do paciente, etc. Fatores externos locais que acabam por interferir e determinar a microbiota da bolsa periodontal e que, dificilmente, chegam a sequer modificar a interação microbiana do interior dos canais radiculares. Haffajee & Socransky, em 2006, afirmam que mais importante do que identificar os microrganismos presentes em bolsas periodontais seria quantificá-los e verificar o inter-relacionamento entre eles. Para tanto, a técnica de cultura nos permite tais interpretações.

6.2.1 Cultura *versus* PCR

O método de cultura microbiológica apresenta apenas o crescimento de microrganismos que se encontram em grande quantidade no meio estudado, tornando-se útil na avaliação de situações onde envolvam pré e pós tratamento. Este método de cultivo é ainda considerado referência, em comparação a outras técnicas utilizadas para determinação da presença e viabilidade de microrganismos. Na microbiologia moderna, até o presente momento, não existe um único método que seja capaz de isolar todos os microrganismos presentes no sistema de canais radiculares e bolsas periodontais.

Dentre as vantagens deste método pode-se citar a possibilidade de quantificar as espécies isoladas, pois nenhuma outra é capaz de detectar o amplo espectro microbiano encontrado na microbiota subgengival e no canal radicular; a possibilidade de se obter cepas em cultura pura para realização de pesquisas posteriores como a genotipagem, estudos sobre fatores de virulência e, ainda; é o único meio para obtenção do antibiograma. Desta maneira, testes bacteriológicos devem ser usados conjuntamente com testes imunológicos (i.e. ELISA, "slot blot", imunofluorescência indireta), sondas de DNA, reação de polimerase em cadeia (PCR), DNA-chip (Microarrays) para detectar uma maior gama de espécies bacterianas (Gomes et al. , 1995 ;Vianna *et al.*, 2005).

Por outro lado, a técnica da cultura microbiológica consiste de etapas laboratoriais exaustivas e onerosas e também, produz menores valores de detecção quando comparada com métodos de detecção baseada nos princípios da biologia molecular, onde teoricamente números inusitadamente baixos de microrganismos podem ser detectados (Ashimoto *et al.*, 1996).

Os meios de cultura empregados neste estudo não são totalmente apropriados para o crescimento de todos os tipos de microrganismos, mas sim de uma grande maioria. Siqueira & Rôças (2005) relatam que o método de cultura ainda apresenta deficiências, principalmente no que diz respeito à composição dos meios artificiais, a quebra da intercomunicação bacteriana induzida pela separação das espécies e fatores relacionados ao crescimento específico de cada cepa bacteriana. Espécies tais como espiroquetas e micoplasmas não sobrevivem nos meios de cultura utilizados e, de fato, não foram isoladas. Microrganismos difíceis de serem cultivados como *Tannerella forsythia*, *Filifactor alocis*, *Treponema socranskii* não foram identificados pelo método de cultura e a frequência de aparecimento apenas pôde ser verificada pelo método molecular.

Apesar de tudo, não podemos esquecer que, até o momento, a cultura é a única técnica que possibilita a diferenciação entre células viáveis e células mortas, sendo um método extremamente útil, pois casos que não respondem ao tratamento podem se beneficiar de uma investigação microbiológica, onde poderá também ser avaliada a susceptibilidade microbiana aos antibióticos ou agentes quimioterapêuticos como medicações intracanaís e substâncias químicas auxiliares (Gomes, 1995).

Diante destes aspectos, foi também realizada a reação de polimerase em cadeia (PCR) a qual forneceu a identificação de patógenos periodontais, alguns previamente visualizados através da técnica de cultura microbiana, na qual foram usados meios específicos para crescimento de periodontopatógenos. O método PCR é um meio rápido e altamente sensível de identificação para os microrganismos periodontais quando comparados a outras formas de identificação como a cultura e ensaios imunológicos. Entretanto, esta técnica também

apresenta certas limitações como o fato de que para que um microrganismo seja detectado por PCR, é necessário o prévio conhecimento, ao menos parcial, de seu seqüenciamento genético para a sintetização dos “primers” com as características da seqüência de nucleotídeos. O método, portanto, complementa os achados encontrados na análise de cultura deste estudo.

Apesar de utilizarmos, na maioria dos casos, oligonucleotídeos já descritos na literatura, os ciclos de termociclagem e as temperaturas foram totalmente adaptados à estrutura do laboratório de Microbiologia endodôntica da FOP-UNICAMP. Fato este, é devido, principalmente, às poucas informações contidas nos artigos científicos pois pequenas diferenças de temperatura, quantidade de ciclos, proporções e quantidade de reagentes podem interferir nos resultados.

Na diversidade da microbiota da cavidade bucal, *A actinomycetemcomitans*, *P gingivalis*, *T forsythia* e *T denticola* são consideradas verdadeiros patógenos periodontais, os quais estão envolvidos diretamente com o início e a progressão da doença periodontal.

Neste estudo, foi encontrado *P gingivalis* em 62,5% e em 50% das bolsas periodontais avaliadas no estágio inicial (P1) pelos métodos de PCR e cultura microbiológica, respectivamente. *T forsythia* foi encontrado em 52,5% dos casos na primeira coleta periodontal pelo método de PCR e não foi isolado nenhuma vez pelo método de cultura. *A actinomycetemcomitans* foi encontrado em apenas 5 % dos casos de P1 quando identificado pelo método de cultura e em 20% dos casos quando identificado por PCR. Lotufo & Panuti, em 2004, relataram que *P gingivalis* e *T forsythia* estão mais associados à periodontite crônica e *A actinomycetemcomitans* está mais relacionada a indivíduos jovens e a casos de periodontite localizada, mas pode ser encontrada em casos de periodontite crônica. Algumas bactérias subgingivais têm a capacidade de produzir enzimas que degradam o tecido periodontal, por exemplo: a hialuronidase, a colagenase. Outras enzimas e diversas proteases que podem causar danos aos tecidos

periodontais são sintetizadas por periodontopatógenos (Lotufo & Panuti, 2004). Estes microrganismos, com exceção da *Pg*, são de difícil cultivo.

Os testes bioquímicos convencionais não são capazes de diferenciar dentro do gênero *Prevotella*, as espécies *intermedia* e *nigrescens*. Mais recentemente, no trabalho de Xia *et al.* (2000), *Prevotella tannerae* também não pode ser diferenciado destas espécies através de testes bioquímicos. Apenas através das técnicas moleculares seriam diferenciadas. Segundo Bae *et al.*, em 1997, e Baumgartner *et al.*, em 1999, ao aplicarem técnicas moleculares e caracterização de proteínas através de SDS-PAGE, respectivamente, verificaram um predomínio de *P nigrescens* em relação a *P intermedia* em canais radiculares necrosados. Em nosso estudo, por cultura, encontramos uma freqüência alta de *P intermedia/nigrescens/tannerae* tanto no canal radicular (E1: 45%, E2: 5% e E3: 0%) como na bolsa periodontal (P1: 45%, P2: 32,5% e P3: 37,5%) dos dentes envolvidos. Ao passo que, por PCR, no canal radicular não encontramos a presença de *P intermedia* em nenhum dos momentos do tratamento e sim a presença de *P nigrescens* em 10% dos casos em E1, 5% em E2 e 0% em E3 e a presença de *P tannerae* em 5% de E1, e 0% em E2 e E3. Na bolsa periodontal, ainda encontramos uma maior freqüência de *P intermedia* (P1: 25%, P2: 10%, P3: 17,5%) quando comparados ao *P nigrescens* (P1: 20%, P2: 5%, P3: 12,5%) e ao *P tannerae* (P1: 5%, P2: 0%, P3: 6%). Pearce *et al.* (2000) relatam, no entanto, que a presença de *P intermedia* em bolsas periodontais está associada à presença de formas mais severas de doença, quando comparada às formas mais brandas e moderadas associadas à detecção de *P. nigrescens*.

Através do método de PCR, o microrganismo *Parvimonas micra* (antigo: *Peptostreptococcus micros*) foi um dos mais frequentemente encontrados no canal radicular e na bolsa periodontal em todas as etapas do tratamento endodôntico. *Peptostreptococcus* foi descrito pela primeira vez como um gênero bacteriano em 1936, sendo considerado um anaeróbio similar ao estreptococo, pois as células se arranjam em cadeias (Murdoch, 1998). O gênero compreende 16 espécies e fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal, trato genito-urinário de

mulheres e pele. *Parvimonas micra*, coco Gram-positivo, anaeróbio estrito, é considerado o mais predominante entre as espécies deste grupo e já foi isolado em infecções de diferentes lugares do corpo, incluindo abscessos cerebrais, infecções intra-abdominais, abscessos de reto, septicemias, infecções ginecológicas, infecções de ouvido, entre tantas outras. Na cavidade oral, há relatos de *P micra* em parotidites agudas supurativas, osteomielite, doença periodontal, periimplantites, abscessos periodontais, abscessos periradiculares agudos e canais radiculares infectados (Williams *et al.*, 1983, Sundqvist, 1992, Rams *et al.*, 1992, Ashimoto *et al.*, 1996, Gomes *et al.*, 1996).

Rams *et al.* (1992) relataram a sua participação no desenvolvimento de periodontites, sendo dificilmente isolado em placa bacteriana de indivíduos saudáveis. Tanabe *et al.* (2007) demonstraram, *in vitro*, a capacidade de componentes da parede celular de *P micra* em induzir vias de sinalização intracelular em macrófagos, aumentando a produção de citocinas, quimiocinas e MMP-9. Gomes *et al.* (2004) isolaram, por cultura microbiológica, este microrganismo em 35% dos casos de infecções primárias de canais radiculares, e sua presença esteve associada à dor. Martinho & Gomes, em 2008, avaliando casos assintomáticos e Montagner (2008), casos de dor espontânea isolaram também uma grande quantidade de *P micra* no canal radicular na frequência de 63,3% e 53,3%, respectivamente. Siqueira *et al.* (2003) detectou *P micra* em 28% das amostras de canais radiculares através do método molecular 16S r-DNA PCR. Este resultado é similar aos encontrados por cultura microbiológica já que o *P micra* não é um microrganismo difícil de ser cultivado. Embora seja anaeróbio, não é extremamente sensível ao oxigênio (Tally *et al.*, 1975).

Van Dalen *et al.* (1998) demonstraram *in vitro* que a associação entre *P. micra* e diferentes cepas do bacilo gram-negativo *Prevotella intermedia* favoreceu o desenvolvimento de abscessos, tornando-os mais agressivos.

Gemella morbillorum, através do método de cultura microbiológica, foi frequentemente encontrado tanto na bolsa periodontal quanto no canal radicular. Apesar desse resultado, Woo *et al.* (2007), preferem a identificação desta espécie

bacteriana pela técnica de seqüenciamento e não por métodos bioquímicos tradicionais como os utilizados neste trabalho devido às poucas reações contidas nestes testes. Eles constataram que o sistema bioquímico Vitek (GPI) não foi capaz de identificar nenhuma amostra de *Gemella* com sucesso, o sistema API (20 Strep) e o sistema ATB (ID 32 Strep), utilizados também neste estudo, foram capazes de identificar uma de 2 espécies de *Gemella* corretamente. Scola & Raoult (1998) obtiveram resultados semelhantes.

Pelo método de PCR, após sucessivas tentativas frustradas, com o objetivo de se identificar a espécie de *Gemella morbillorum* através de oligonucleotídeos conhecidos da literatura, como por exemplo, os propostos por Gomes *et al.* (2008), optamos por desenhá-lo a partir de um sequenciamento L14327 (Whitney & O'Connor, 1993). Portanto, o “primer” utilizado neste estudo foi totalmente desenvolvido para o uso em nosso laboratório e previamente testado em amostras ATCCs. As principais dificuldades foram: presença de múltiplas bandas ou ausência total de bandas mesmo na presença de amostras ATCCs de *Gemella morbillorum*.

De acordo com Dahlén (2002), não houve ainda uma caracterização específica da microbiota da lesão endo-periodontal. As bactérias associadas a ela são similares às encontradas nas lesões endodônticas e periodontais isoladas. O autor sugere que o padrão bacteriano possivelmente seja único, uma vez que há similaridade na microbiota das lesões endodônticas e periodontais.

6.2.4 Efeito do preparo químico-mecânico e medicações intracanais sobre os microrganismos do canal radicular e bolsa periodontal

O preparo químico-mecânico utilizado neste trabalho teve como substância química auxiliar a clorexidina gel 2% e o agente irrigador o soro fisiológico estéril e como resultado, houve uma grande redução na contagem de UFCs/mL presentes no canal radicular imediatamente após este preparo que

corroboram com estudos de Berber, 2005 (*in vitro*) e Vianna *et al.*, 2006 e 2007 (*in vivo*).

Em alguns casos deste presente estudo, culturas negativas foram encontradas logo após o preparo químico-mecânico. Entretanto, este resultado, ou seja, o não crescimento de microrganismos logo após a instrumentação não significa que o canal radicular esteja completamente livre de microrganismos e sim que possam estar em quantidade insuficiente de serem detectados pela técnica de cultura .

A clorexidina tem sido sugerida como substância química alternativa ao hipoclorito de sódio. A clorexidina é uma bisguanida catiônica que parece agir pela absorção por parte da parede celular do microrganismo resultando na quebra dos componentes intracelulares. Em altas concentrações, a clorexidina é bactericida por causa da precipitação e/ou coagulação de constituintes intracelulares (McDonnell & Russell, 1999). A atividade antimicrobiana ótima é no pH de 5.5 a 7.0.(Russel & Day, 1993).

Em geral, os estudos *in vitro* sugerem que o NaOCl e a clorexidina apresentam atividade antibacteriana similares em concentrações também similares (Delany *et al.*, 1982, Jeansonne & White, 1994). Em adição, a clorexidina é promissora como agente final de irrigação (Zamany *et al.*, 2003, Zehnder, 2006). Em um estudo clínico de Zamany *et al.*, em 2003, mostraram que a solução de clorexidina utilizada como irrigante final diminuiu a microbiota dos canais que foram preparados com NaOCl. Algumas vantagens adicionais são: característica de se reter a dentina (Rosenthal *et al.*, 2004) e sua relativamente baixa citotoxicidade (Filho *et al.*, 2002).

O uso do hidróxido de cálcio como medicação no selamento temporário do canal nos casos de lesões endo-periodontais encontra amplo respaldo na literatura (Heithersay, 1975; Solomon *et al.*, 1995; Toledo & Rosetti, 2005), pois sua ação inibe exatamente essa suposta contaminação periodontal dos canais instrumentados via canais de comunicação patentes (Solomon *et al.*, 1995). Além

disso, foi provada a difusão de seus íons através dos túbulos dentinários quando a camada protetora de cimento estiver perdida (Carrote, 2004 e Gomes *et al.*, 2008) e o hidróxido de cálcio também parece promover certo aumento do pH na dentina periférica (Tronstad *et al.*, 1981). Portanto, para alguns raros casos de doença periodontal agressiva e prognóstico duvidoso, o uso intracanal do hidróxido de cálcio pode ser uma alternativa. Tendo em mente também que a cura da lesão endo-periodontal dependerá mais do prognóstico periodontal do que do endodôntico.

O objetivo do uso de uma medicação intracanal é controlar a infecção no interior dos canais radiculares. Isto é importante porque a cultura negativa antes da obturação do canal está relacionada com o sucesso do tratamento endodôntico (Trope *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 2007). Entretanto, alguns estudos questionam a efetividade do hidróxido de cálcio para a desinfecção do canal radicular e relatam a presença de uma microbiota residual em canais com mais de 1 semana de uso de medicação (Peters & Wesselink, 2002, Waltimo *et al.*, 2005). Em alguns casos, bactérias residuais crescem em número mesmo na presença de hidróxido de cálcio (Peters & Wesselink, 2002, Waltimo *et al.*, 2005).

Resultado semelhante foi notado em nosso estudo já que em alguns dentes foi obtida cultura negativa logo após o preparo químico-mecânico, mas após o uso de medicação intracanal por 14 dias algumas bactérias voltaram a contaminar o canal radicular. Uma possível explicação seria o fato de um baixo número de microrganismos (abaixo dos limites de detecção da técnica de cultura microbiológica) pode persistir nas anastomoses, istmos, túbulos dentinários e após o período de uso da medicação, estas bactérias cresceram em quantidade capaz de serem detectadas.

O tempo necessário para que uma medicação intracanal exerça seu efeito ideal é muito discutido na literatura. Vários períodos de aplicação de medicação intracanal com hidróxido de cálcio têm sido recomendados. Optou-se por um período de 7 a 14 dias pois o objetivo principal foi verificar o efeito antimicrobiano das medicações nos períodos mais utilizados clinicamente. O

endodontista clínico dificilmente utiliza medicações intracanaís por um período muito longo.

Cvek (1973) obteve 90% de culturas negativas após a utilização de medicação intracanal com hidróxido de cálcio por 3 semanas. Bystrom & Sundqvist (1985) obtiveram 100% de culturas negativas após 4 semanas, Reit & Dahlen (1988) 74% após 2 semanas, Sjögren *et al.* (1991) 100% de canais livres de bactérias com o emprego de medicação por uma semana. Ørstavik *et al.* (1991) encontraram 65% das amostras negativas para cultura após 7 dias do emprego de hidróxido de cálcio como medicação intracanal.

Nos resultados de nosso estudo, nem o hidróxido de cálcio, nem a clorexidina ou a associação dos dois medicamentos promoveu a completa desinfecção dos canais radiculares. Esse fato pode ser devido ao emprego de técnicas e meios de culturas diferenciados que podem ter favorecido o cultivo de microrganismos viáveis presentes mesmo em pequenas quantidades. Esperava-se, também, que número de UFC/mL após o uso de medicação intracanal fosse menor ou similar ao obtido após o preparo químico-mecânico, entretanto não foi o que ocorreu na maioria dos casos. Em valores médios, de forma geral para todas as medicações, houve um aumento no número de UFC/mL, o que vem ao encontro de achados de Peters *et al.* (2002) e Vianna (2006), que também encontraram um aumento do número de UFC/mL após o uso por 4 semanas e por 7 dias, respectivamente, de hidróxido de cálcio como medicamento intracanal.

Na bolsa periodontal, aparentemente nenhum efeito antimicrobiano foi notado. Antes e após a utilização de quaisquer das três medicações intracanaís, a contagem das unidades formadoras de colônia se manteve estável. Fato este pode ser explicado, talvez, pela presença de túbulos dentinários diminuídos em razão da doença periodontal e, conseqüentemente, as medicações intracanaís não conseguem se difundir através deles. Sendo assim, a única comunicação existente entre a bolsa periodontal e o canal radicular foi o forame apical. O que no caso não seria suficiente para uma mudança notável na microbiota da bolsa periodontal. Outro fator que pode ter interferido é a não manipulação da bolsa

periodontal, ou seja, nenhum tratamento, como por exemplo, raspagem e alisamento radicular, foi feito na bolsa periodontal associada ao dente avaliado dificultando também a ação das medicações intracanaís nos microrganismos da bolsa periodontal.

Trabalhos como o de Tronstad *et al.* (1981) analisaram a difusão de íons hidroxila do hidróxido de cálcio através dos túbulos dentinários e o possível aumento do pH nos tecidos no período de quatro semanas. O valor do pH na dentina próxima à polpa variou em torno de 12,2; a dentina associada ao canal radicular e em contato com a pasta de hidróxido de cálcio apresentou pH entre 8,0 e 12,2. Na dentina mais periférica os valores de pH variaram entre 7,0 e 10,0 enquanto que nenhuma alteração de pH foi observada no cimento radicular.

Em um estudo *in vitro*, Gomes *et al.* (2008), avaliaram a ação antimicrobiana de medicações intracanaís: Clorexidina gel 2%, Clorexidina gel 2% + hidróxido de cálcio, Clorexidina gel 2%+ hidróxido de cálcio + óxido de zinco e o soro fisiológico estéril + hidróxido de cálcio frente *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Actinomyces viscosus* e *Porphyromonas gingivalis* presentes do lado externo dos dentes avaliados quando na presença ou ausência de cimento. Portanto, as medicações intracanaís para exercerem algum efeito antibacteriano sobre os microrganismos deveriam se difundir através dos túbulos dentinários. Como resultado, obtiveram que a clorexidina gel 2% foi a melhor medicação do experimento em termos de difusão. A partir de trabalhos como este, esperávamos resultados interessantes neste nosso estudo *in vivo*.

Idealmente, uma sessão seria o desejável para um tratamento endodôntico. Nossos resultados mostraram que a clorexidina 2% gel é uma substância química efetiva na desinfecção dos canais radiculares e o uso adicional de qualquer uma das medicações intracanaís utilizadas não melhorou esta desinfecção e também não foram capazes de alterar a microbiota das bolsas periodontais no período estipulado.

De qualquer maneira, futuras investigações devem ser feitas com o intuito comparativo de resultados no uso das medicações utilizadas e também de

outros tipos de medicações intracaneais em períodos de tempos diferentes dos aplicados em nosso estudo.

7 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados microbiológicos, pode-se concluir que:

1. Os canais radiculares e as bolsas periodontais de dentes com comprometimento pulpar e bolsa periodontal apresentaram-se infectados com uma combinação de espécies de microrganismos formada principalmente por bactérias anaeróbias estritas e facultativas, gram-positivas.
2. O preparo químico-mecânico foi o grande responsável pela redução microbiológica do interior dos canais radiculares de dentes com comprometimento endo-periodontal.
3. Correlações estatísticas positivas foram observadas entre a presença de sinais e sintomas de origem endodôntica e periodontal e algumas espécies bacterianas, e também entre as espécies.
4. Quaisquer das medicações intracanáis testadas não foram capazes de alterar ou reduzir a microbiota da bolsa periodontal associada no período de 7 ou 14 dias.
5. Não houve diferenças de eficiência antimicrobiana entre as medicações intracanáis utilizadas tanto no canal radicular como na bolsa periodontal no período estudado.

REFERÊNCIAS¹

1. Aguiar TRS. Estudo histopatológico da polpa de dentes humanos portadores de doença periodontal envolvendo o ápice radicular [tese]. São Paulo: FO/USP; 1999.
2. Almeida MM, Castro ET, Castillo, SAS, Aragonés, LCA. Inter-relação periodontia e cirurgia parodontal na solução de casos com envolvimento de grandes perdas ósseas por lesões endo-periodontais. JBC J Bras Clin Estet Odontol. 1999; 3: 57-61.
3. Anand PS, Nandakumar K. Management of Periodontitis Associated with Endodontically Involved Teeth: A Case Series. J Comtemp Dent Pract. 2005; 6: 118-129.
4. Ando N, Hoshino E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentin. Int Endod J 1990;23:20-7.
5. Aqrabawi J, Jarbawi MM. The healing potential of periodontal-endodontic lesions. Int Dent J. 2004; 54: 166-70.
6. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol 1996;11: 266–73.
7. Avila-Campos MJ, Sacchi, CT, Whitney AM, Steigerwalt AG & Mayer LW - Arbitrarily primed polymerase chain reaction for identification and epidemiologic subtyping of oral isolates of *Fusobacterium nucleatum*. J. Periodont 1999;70: 1202-1208.
8. Ballal V, Kundabala M, Acharya S, Ballal M. Antimicrobial action of calcium hydroxide, chlorhexidine and their combinations on endodontic pathogens. Aust Dent J 2007; 52: 118-21.

¹ De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors-grupo de Vancouver . Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

9. Basrani B, Ghanem A, Tjäderhane L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. *J Endod.* 2004; 30:413-417.
10. Basrani B, Santos JM, Tjäderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, Lawrence HP, Friedman S. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human dentine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94: 240-245.
11. Baumgartner JC, Falkler Jr WA. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod.* 1991; 17: 380-3.
12. Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod.* 1999; 25: 413-5.
13. Baumgartner JC, Hutter JW. Endodontic Microbiology and Treatment of Infections. In: Cohen S, Burns RC, editors. *Pathways of the pulp.* 8th ed: Mosby; 2001. p. 501- 518.
14. Baumgartner JC. Endodontic microbiology. In: Walton RE, Torabinejad M, editors. *Principles and practice of endodontics.* 3rd ed. Philadelphia: Saunders Co.; 2002. p. 282-293.
15. Becking AG. Complications in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71: 192-96.
16. Belay N, Mukhopadhyay B, Conway DM, Galask R, and Daniels L. Methanogenic bacteria in human vaginal samples. *J Clin Microbiol.* 1990; 28:1666–8.
17. Belk CE, Gutmann JL. Perspectives, Controversies and Directives on Pulpal-Periodontal Relationships. *J Can Dent Assoc.* 1990; 56: 1013-1017.
18. Beltz RE, Torabinejad M, Pouresmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and EDTA on bovine pulp and dentin. *J Endod.* 2003; 29:334-7.

19. Benatti BB, Carvalho MD, Gomes BP, de Toledo S, Nociti Júnior FH, Nogueira-Filho Gda R. Importance of differential diagnosis in endodontic-periodontal lesions: case reports. *Gen Dent*. 2003 ;51(3):246-8.
20. Bender IB, Seltzer S. The effect of periodontal disease on the pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1972; 33(3): 458-74.
21. Berber VB, Gomes BPFA, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J*. 2006; 39:10-17.
22. Berber VB. Verificação da redução do *Enterococcus faecalis* no canal radicular e nos túbulos dentinários utilizando diferentes substâncias químicas e técnicas de instrumentação. Piracicaba, 2005. 109 p. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
23. Bergenholtz G, Lindhe J. Effect of experimentally induced marginal periodontitis and periodontal scalling on the dental pulp [abstract]. *J Clin Periodontol*. 1978; 5: 59-73.
24. Blomlöf L, Lindskog S, Hammarstrom L. Influence of pulpal treatments on cell and tissue reactions in the marginal periodontium. *J Periodontol*. 1988; 59: 577-83.
25. Bonesvoll P. Oral pharmacology of chlorhexidine. *J Clin Periodontol*. 1977; 12: 49-65.
26. Borba SMC, Gusmão ES, Santos RL, Travassos RMC, Silveira RCJ. Diagnóstico Clínico da Sensibilidade Pulpar em Dentes com Bolsas Periodontais. *Rev Bras Cienc Saude* 2002; 6: 269-278.
27. Boutaga K, van Winkelhoff A J, Vandenbroucke-Grauls Christina M J. E., M. SPH. Comparison of Real-Time PCR and Culture for Detection of *Porphyromonas gingivalis* in Subgingival Plaque Samples. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4950-4954.

28. Britain SK, von Arx T, Schenk RK, Buser D, Nummikoski P, Cochran DL. The Use of Guided Tissue Regeneration Principles in Endodontic Surgery for Induced Chronic Periodontic-Endodontic Lesions: A Clinical, Radiographic, and Histologic Evaluation. *J Periodontol.* 2005; 76: 450-460.
29. Brown LR Jr, Rudolph CE Jr. Isolation and identification of microorganisms from unexposed canals of pulp-involved teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1957; 10: 1094–1099.
30. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol.* 1985; 1: 170-5.
31. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg.* 1983; 55: 307-12.
32. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand. J. Dent. Res.* 1981; 89: 321-8.
33. Calin AC. A qualitative and quantitative study of five selected periodontal pathogens in combined periodontal-endodontic lesions. 2005. 64p. Dissertação (Master in Philosophy of Dentistry -University of Bergen-Norway).
34. Capone RB, Pai SI, Koch WM, Gillison ML, Danish HN, Westra WH, et al. Detection and Quantitation of Human Papillomavirus (HPV) DNA in the Sera of Patients with HPV-associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2000 2000;6:4171-4175.
35. Carrigan PJ, Morse DR, Furst ML, Sinai I. A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. *J Endod.* 1984; 10: 359-363.
36. Carrote P. Endodontics: Part 9 Calcium hydroxide, root resorption, endo-perio lesions. *British Dental Journal.* 2004; 197: 735-743.

37. Cervone F, Tronstad L & Hammond B. Antimicrobial effect of chlorhexidine in a controlled release delivery system. *Endod Dent Traumatol.* 1990; 1: 33-6.
38. Chacker FM. The endodontic-periodontic continuum. *Dent Clin N Amer.* 1974; 18(2): 383-414.
39. Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *J Clin Period.* 2000; 27: 897-903.
40. Chen S-Y, Wang H-L, Glickman GN. The influence of endodontic treatment upon periodontal wound healing. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 449-56.
41. Chilton NW. Periodontic-endodontic relationships: a synthesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1972;34(2):327-8.
42. Christie WH, Holthuis AF. The Endo-Perio Problem in Dental Practice: Diagnosis and Prognosis. *J Can Dent Assoc.* 1990; 56 (11):1005-11.
43. Clarridge JE, Zhang Q. Genotypic diversity of clinical *Actinomyces* species: phenotype, source, and disease correlation among genospecies. 2002; 40: 3442-8.
44. Coldero LG, McHugh S, MacKenzie D, Saunders WP. Reduction in intracanal bacteria during root canal preparation with and without apical enlargement. *Int Endod J.* 2002; 35:437-46.
45. Conrads G, Flemmig TF, Seyfarth I, Lampert F, Lutticken R. Simultaneous Detection of *Bacteroides forsythus* and *Prevotella intermedia* by 16S rRNA Gene-Directed Multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(5):1621- 1624.
46. Conrads G, Mutters R, Fischer J, Brauner A, Lutticken R, Lampert F. PCR reaction and dot-blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals. *J Periodontol* 1996; 67: 994–1003.

47. Consensus report. Periodontal disease: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol.* 1996;1:926-932.
48. Czarnecki R, Schilder AA. A histological evaluation of the human pulp in teeth with varying degrees of periodontal disease. *J Endod.* 1979; 5:242-53.
49. Dahlén G, Pipattanagovit P, Rosling B, Möller AJ. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol.* 1993;8:375-82.
50. Dahlén G. Microbiology and treatment of dental abscesses and periodontal-endodontic lesions. *Periodontol 2000.* 2002; 28: 206-239.
51. Dahlen G, Möller A.R. Microbiology of endodontic infections. In: *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*, 1st edn. St Louis, Missouri, USA: Mosby-Year Book, pp. 444-75. 1992.
52. Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPF, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99:768-72.
53. De Deus QD. *Endodontia*. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSCI; 1992.
54. Delany GM, Patterson SS, Miller MS, Newton CW. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982; 53: 518-23.
55. Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M, Bottger EC. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 7843–7853.
56. Ehnevid H, Jansson L, Lindskog S, Blomlöf L. Periodontal healing in teeth with periapical lesions. A clinical retrospective study. *J Clin Periodontol.* 1993; 20: 254-8.

57. Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gul K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. J Endod. 2004; 30:84-7.
58. Estrela C, Estrela CRA, Guimarães LF, Silva RS, Pécora JD. Surface tension of calcium hydroxide associated with different substances. J Appl Oral Sci 2005; 13:152-6.
59. Estrela C, Estrela CRA. O hidróxido de cálcio é a única medicação intra-canal para combater a infecção endodôntica? In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN, organizadores. Endodontia & Trauma. 1 ed.; 2002.
60. Estrela C, Pesce HF. Chemical analysis of the formation of calcium hydroxyl ions of calcium hydroxide pastes in the presence of connective tissue of the dog. Part I. Braz Dent J. 1996; 7:41-46.
61. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Fellipe Jr O. Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. Rev Fac Odont Bauru. 1994; 2:29-36.
62. Estrela C, Pimenta F, Ito IY, Bammann L. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. J Endod. 1999; 25: 416-8.
63. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. Int Endod J 2002; 35:221-8.
64. Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul S-U. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. J Endod. 2003; 29: 338-339.
65. Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Möller A JR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. Scand J Dent Res. 1982; 90: 134–144.

66. Fachin EVF, Luisi SB, Borba MG. Relação Pulpo-periodontal: Considerações Histológicas e Clínicas. Rev Fac Odontol Porto Alegre. 2001; 42: 9-15.
67. Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. J Am Dent Assoc. 1986; 112: 863-869.
68. Ferrari PH, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. Int Endod J. 2005; 38: 372-80.
69. Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. J Endod. 2001; 27:452-455.
70. Filho M, Leonardo M, Silva L, Anibal F, Faccioli L. Inflammatory responses to different endodontic irrigating solutions. Int Endod J 2002;35:735–9.
71. Foley DB, Weine FS, Hagen JC, de Obarrio JJ. Effectiveness of selected irrigants in the elimination of *Bacterioides melaninogenicus* from the root canal system: an *in vitro* study. J Endod 1983; 9: 236-41.
72. Foreman PC, Barnes IE. A review of calcium hydroxide. Int Endod J. 1990; 23:283-297.
73. 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; 20: 289-95.
74. Gao ZR. Relationship between the degree of periodontic destruction and the pathologic changes in the dental pulp--clinical and pathologic manifestations in 111 cases. Zhonghua Kou Qiang Ke Za Zhi. 1984;19:196-8. Chinese.
75. Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. Archs oral Biol. 1976; 21: 355-362.

76. Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A, Brandt M. Toxicity concentrated sodium hypochlorite used as endodontic irrigant. *Int Endod J* 2004; 37: 272-80.
77. Gibbons RJ, Engle LP. Vitamin K compounds in bacteria that are obligate anaerobes. *Science* 1964; 146: 1307–9.
78. Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol*. 2005; 20: 211-5.
79. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19:71-6.
80. Gomes BPFA, Sato E, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. *Int Endod J*. 2003; 36: 604-9. (b)
81. Gomes BPFA. Investigação dos microrganismos envolvidos na sintomatologia e no insucesso do tratamento endodôntico. Piracicaba, 2002. Tese (Livre Docência) – Universidade Estadual de Campinas.
82. Gomes BPFA, Carvalho SS, Ferraz CCR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antibacterial activity of chlorhexidine gel and calcium hydroxide separately and combined on infected bovine root dentin . *Int Endod J*. 2003; 36: 267-75. (a)
83. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2001; 34: 424-8.
84. Gomes B.P.F.A., Lilley J.D., Drucker D.B. Variations in the susceptibilities of the root canal microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J*. 1996; 29: 235-41. (b)

85. Gomes BPFA, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CCR, 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.* 2006; 102: 544-50.
86. Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, Souza-Filho FJ. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent.* 2008 Nov 6. [Epub ahead of print]
87. Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, Pinheiro ET, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. *Gemella morbillorum* in primary and secondary/persistent endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105:519-25.
88. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J.* 1994; 27: 291-8.
89. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J.* 1996; 27: 291-8. (a)
90. Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dent.* 1996; 29: 47-55 (c).
91. Gomes BPFA, Rodrigues HH, Tancredo N. The use of a modelling technique to investigate the root canal morphology of mandibular incisors. *Int Endod J.* 1996;29: 29-36 (a).
92. Gomes BPFA, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. *Int Endod J.* 2003; 36: 267-275.
93. Gomes BPFA. Microorganismos: quais são, onde estão e que danos causam? *In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN, organizadores. Endodontia & Trauma.* 1 ed.; 2002.

94. Gonçalves RB, Mouton C. Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in infected root canals. J Endod. 1999;25:336-40.
95. Gonçalves RB, Robitaille M, Mouton C. Identical clonal types of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella nigrescens* recovered from infected root canals and subgingival plaque. Oral Microbiol Immunol. 1999;14:197-200.
96. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. J Periodontol. 1986; 57: 370-7.
97. Griffen AL, Becker MR, Lyons SR, Moeschberger ML, Leys EJ. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and Periodontal Health Status. J Clin Microbiol. 1998; 36: 3239-3242.
98. Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TMT, Ørstavik D, Haapasalo MPP. Inactivation of local root canal medicaments by dentin: an *in vitro* study. Int Endod J. 2000; 33: 126-131.
99. Haffajee AD, Socransky SS. Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. Periodontol 2000. 2006;42:7-12.
100. Happonen RP. Periapical actinomycosis: a follow-up study of 16 surgically treated cases. Endod Dent Traumatol. 1986; 2: 205-9.
101. Harrington GW, Steiner DR, Ammons Jr WF. The periodontal-endodontic controversy. Periodontol 2000. 2002; 30:123-130.
102. Harrington GW. The Perio-Endo Question: Differential Diagnosis. Dent Clin North Am. 1979; 23: 673-90.
103. Hartroth B, Seyfahrt I, Conrads G. Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters. Oral Microbiol Immunol. 1999;14:326- 330.

104. 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;18:558-61.
105. Haskell EW, Stanley H, Goldman S. A New Approach to Vital Root Resection. *J Periodontol.* 1980; 51: 217-224.
106. Haueisen H, Heidemann D. Hemisection for treatment of an Advanced Endodontic-Periodontal lesion: a case report. *Int Endod J.* 2002; 35:557-72.
107. Hauman C.H.J., Love R.M. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J.* 2003; 36; 75-85.
108. Heithersay GS. Calcium Hydroxide in the Treatment of Pulpless Teeth with Associated Pathology. *J Brit Endod Soc.* 1975; 8: 74-93.
109. Heling I, Sommer M, Steinberg D, Friedman M, Sela MN. Microbiological evaluation of the efficacy of chlorhexidine in a sustained-release device for dentine sterilization. *Int Endod J.* 1992; 25: 15-19. (a)
110. Heling I, Steinberg D, Kenig S, Gavrilovich I, Sela MN, Friedman M. Efficacy of a sustained-release device containing chlorhexidine and Ca(OH)₂ in preventing secondary infection of dentinal tubules. *Int Endod J.* 1992; 25: 20-24. (b)
111. Hennessey TS. Some antibacterial properties of chlorhexidine. *J Period Res.* 1973; 8(suppl 12):61-67.
112. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2005; 38:72-122.
113. Hülsmann M., Hahn W. Complications during root canal irrigation: literature review and case reports. *Int Endod J* 2000; 33:186-93.

114. 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; 18:285-92.
115. Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. *Int End J.* 2006; 39:62-70.
116. Jacinto RC, Montagner F, Signoretti FG, Almeida GC, Gomes BP. Frequency, microbial interactions, and antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* isolated from primary endodontic infections. *J Endod.* 2008 ;34:1451-6. Epub 2008 Oct 19.
117. Jansson L, Ehnevid H, Lindskog S, Blomlöf L. Relationship between periapical and periodontal status: A clinical retrospective study. *J Clin Periodontol.* 1993; 20: 117-23.
118. Jaramillo A, Arce RM, Herrera D, Batancourth M, Botero JE, Contreras A. Clinical and microbiological characterization of periodontal abscesses. *J Clin Period.* 2005; 32: 1213-1218.
119. Jeansonne M.J. & White R.R. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod.* 1994; 20: 276-8.
120. Jenkins GN. *The physiology and biochemistry of the mouth.* 4ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1978.
121. Jung IY, Choi BK, Lee SJ, Lee CY, Park DS. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *J Endod.* 2000; 26: 599-604.
122. Kalfas S, Figdor D, Sundqvist G. A new bacterial species associated with failed endodontic treatment: identification and description of *Actinomyces*

- radicidentis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001; 92: 208-14.
123. Kantz WE, Henry CA. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of nonvital teeth in man. Archs Oral Biol 1974; 19: 91–6.
 124. Kaufman AY, Keila S. Hypersensitivity to sodium hypochlorite. J. Endodon.. 1989; 15: 224-226.
 125. Kerekes K, Olsen I. Similarities in the microfloras of root canals and deep periodontal pockets. Endod Dent Traumatol. 1990;6:1-5. Review.
 126. Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polymorphism associated with periodontal disease. Crit Rev Oral Biol Med.2003;14:430-449.
 127. Kipiotti A, Nakou M, Legakis N, Mitsis F. Microbiological findings of infected root canals and adjacent periodontal pockets in teeth with advanced periodontitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1984; 58: 213-20.
 128. Kirkham DB. The location and incidence of accessory pulpal canals in periodontal pockets. J Am Dent Assoc. 1975; 91: 353-356.
 129. Kobayashi T, Hayashi A, Yoshikawa R, Okuda K, Hara K. The microbial flora from root canals and periodontal pockets of non-vital teeth associated with advanced periodontitis. Int Endod J. 1990; 23: 100–6.
 130. Kontakiotis E, Nakou M, Georgopoulou M. In vitro study of indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. Int End J 1995;28:285-95.
 131. Kurihara H, Kobayashi Y, Francisco AI, Isoshima O, Nagai A, Murayama Y. A microbiological and immunological study of endodontic-periodontic lesions. J End. 1995; 21:617-621.
 132. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of Porphyromonas gingivalis. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62:1244-63.

133. Langeland K, Rodrigues H, Dowden W. Periodontal disease, bacteria and pulpal histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Path.* 1974; 37: 257-70.
134. Langeland K, Toben G, Eda S, Langeland LK. The effects of lowered temperatures on dental tissues. *J Conn State Dent Assoc.* 1969;43:12-25.
135. Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martin C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol.* 2004;31:1061-1069.
136. Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LAB, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. *In vivo* antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod.* 1999; 25: 167-71.
137. Leonardo MR, Leal JM. *Endodontia: tratamento de canais radiculares.* São Paulo: Panamericana; 1998.
138. Leonardo MR. Bacteriologic conditions of root canals--in relation to treatment. *Rev Bras Odontol.* 1967;25:489-96. Português.
139. Leys E, Griffen A, Strong S, Fuerst P. Detection and strain identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by nested PCR. *J Clin Microbiol.,* 1994;32:1288-1294.
140. Lindhe J, Karring T, Lang NP, editores. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral.* 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.
141. Loomer PM. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2004;34:49-56.
142. Lopes HP & Siqueira Jr JF. *Endodontia: Biologia e Técnica.* Rio de Janeiro: MEDSI (1999).

143. Lotufo R F M, Pannuti C M. Efeitos diretos dos patógenos bucais nas condições periodontal e sistêmica. *Periodontia Médica: uma abordagem integrada*. São Paulo: Editora Senac São Paulo; 2004. p. 41-58.
144. Love RM. The effect of tissue molecules on bacterial invasion of dentine. *Oral Microbiol Immunol*. 2002; 17: 32–7.
145. Machion L . Avaliação clínica e microbiológica do uso local da Doxíciclina como adjunto à terapia periodontal em pacientes fumantes. Estudo longitudinal de 2 anos. 2005. 87p. Tese (Doutorado em clínica odontológica-Piracicaba)- Universidade Estadual de Campinas.
146. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*. 2003; 149: 279–94.
147. 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;34:268-72. Epub 2008 Jan 31.
148. Martins A G . Avaliação clínica e microbiológica do uso de pontas Sônicas diamantadas na descontaminação radicular (estudo longitudinal). 2005.111p. Tese (Doutorado em clínica odontológica-Piracicaba)- Universidade Estadual de Campinas.
149. Mazur B, Massler M. Influence of periodontal disease on the dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Path*. 1964; 17: 592-603.
150. McNabb H, Mombelli A, Gmür R, Mathey-Dinç S, Lang NP Periodontal pathogens in the shallow pockets of immigrants from developing countries..*Oral Microbiol Immunol*. 1992;7:267-72.
151. Melville TH, Birch RH. Root canal and periapical floras of infected teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1967 ;23:93-8.
152. Meng HX. Periodontic-endodontic lesions. *Ann Periodontol*. 1999;4:84-90. Review.

153. Miller WD. An introduction to the study of the bacteriopathology of the dental pulp. *Dental Cosmos* 1894; 36: 505-28.
154. Mims C, Dimmock N, Nash A, Stephen J. Mims' Pathogenesis of Infectious Disease. New York: Academic Press, 1995.
155. Mjör IA, Nordahl I. The density and branching of dentinal tubules in human teeth. *Archs oral Biol.* 1996; 41: 401-412.
156. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998; 31: 1-7.
157. Möller AJR, Fabricius L, Dahlen G, Öhman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scan J Dent Res.* 1981; 89: 475-84.
158. Molven O, Olsen I, Kerekes K. Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 1991;7:226-229.
159. Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *J Periodontol.* 2000;71:14-21.
160. Murdoch DA. Gram-positive anaerobic cocci. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:81–120.
161. Nagaoka S, Miyasaki FJ, Liu HJ, Iwamoto Y, Kitano M, Kawagoe M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. *J Endod.* 1995; 21: 70-73.
162. Nair R. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J. Endod.* 1987; 1: 29-39.
163. Nakabayashi N, Pashley D. Hybridization of Dental Hard Tissues. Quintessence Publishing:Tokyo; 1998.

164. Nerwich A, Figdor D, Meser HH. pH changes in root dentine over a 4 week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod.* 1993; 19: 302-306.
165. Nyman S, Lindhe J. A Longitudinal Study of Combined Periodontal and Prosthetic Treatment of Patients with Advanced Periodontal Disease. *J Periodontol.* 1979; 50: 163-169.
166. Ørstavik D., Kerekes K., Molven O. Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial infection during treatment of apical periodontitis: a pilot study. *Int Endod J.* 1991; 24: 1-7.
167. Osborn JW, Ten Cate AR. *Histologia dental avançada.* 4. ed. São Paulo: Quintessence, 1988.
168. Pashley DH. Dentin permeability: theory and practice. In: Spangberg LSW. *Experimental Endodontics.* Boca Raton: CRC Press, 1990.
169. Paul BF, Hutter JW. The Endodontic-Periodontal Continuum Revisited: New Insights Into Etiology, Diagnosis and Treatment. *J Am Dent Assoc.* 1997; 128: 1541-8.
170. Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. *Int Endod J.* 2002; 35: 698–702.
171. Petka KP. The sixteen deadly sins: a comprehensive approach to accurate diagnosis. *Dent Today* 2000; 19: 56-8, 60-1.
172. Pilatti GL, Toledo BEC. As comunicações anatômicas entre polpa e periodonto e suas consequências na etiopatogenia das lesões endo-periodontais. *Rev Paul Odontol.* 2000; 22: 38-40.
173. Puapichartdumrong P, Ikeda H, Suda H. Influence of the pulpal components on human dentin permeability *in vitro.* *Int Endod J.* 2005; 38: 152-159.
174. Rams TE, Feik D, Listgarden MA, Slots J. *Peptostreptococcus micros* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7:1–6.

175. Riggio MP, Lennon A, Smith A. Detection of *Peptostreptococcus micros* DNA in clinical samples by PCR. *J Med Microbiol* 2001;50:249–54.
176. Rocas IN, F. SJ, Santos KRN, Coelho AMA. 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;91:468-471.
177. Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98:488 –92.
178. Ross IE, Thompson RH. A long term study of root retention in the treatment of maxillary molars with furcation involvement. *J Periodontol.* 1978; 49: 238-244.
179. Rotstein I, Simon JHS. Diagnosis, prognosis and decision-making in treatment of combined periodontal-endodontic lesions. *Periodontol* 2000 2004;34:165-203.
180. Rubach WC, Mitchell DF. Periodontal disease, accessory canals and pulp pathosis. *J Periodontol.*1965; 36: 34–8.
181. Rupf S, Kannengiesser S, Merte K, Pfister W, Sigusch B, Eschrich K. Comparison of profiles of key periodontal pathogens in the periodontium and endodontium. *Endod Dent Traumatol* 2000: 16: 269–275.
182. Russell AD, Day MJ. Antibacterial activity of chlorhexidine. *J Hosp Infect*1993;25:229 –38.
183. Safavi KE, Nichols FC. Effect of Calcium Hydroxide on Bacterial Lipopolysaccharide. *J Endod* 1993; 19: 76-8.
184. Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. Molecular analysis of oral human microbiota. *J Periodontal Res.* 2005;40:277-85. Review.

185. Sanders JJ, Sepe WW, Bowers GM, Koch RW, Williams JE, Lekas JS *et al.* Clinical Evaluation of Freeze-Dried Bone Allografts in Periodontal Osseous Defects. 3. Composite Freeze-Dried Bone Allografts With and Without Autogenous Bone Grafts. *J Periodontol.* 1983; 54: 1-8.
186. Santiago CN, Fonseca GA. Influência da Doença Periodontal na Polpa Dental. *Rev Bras Odontol.* 1983; 40: 19-9.
187. Seltzer S, Bender IB, Nazimov H, Sinai I. Pulpitis-Induced Inter-radicular Periodontal Changes in Experimental Animals. *J Periodontol.* 1967; 38:124-9.
188. Seltzer S, Bender IB, Ziontz M. Interrelationship of pulp and periodontal disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1963;16:1474-90.
189. Seltzer S, Bender IB, Ziontz M. The interrelationship of pulp and periodontal disease. *Oral Surg.* 1963; 16: 1474-90.
190. Seltzer S. *The dental pulp: biologic considerations in dental procedures.* Philadelphia: JB Lippincott; 1988.
191. Seol JH, Cho BH, Chung CP, Bae KS. Multiplex polymerase chain reaction detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod.* 2006;32:110-4.
192. Shuping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod.* 2000; 26:751-5.
193. Simon JH. Tratamento endo-periodôntico. *In:* Cohen S, Burns RC. *Caminhos da Polpa* 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1982.
194. Simon JHS, Glick DH, Frank AL. The relationship of endodontic-periodontic lesions. *J Periodont.* 1972; 43: 202-8.
195. Simring M, Golderg M. The pulpal pocket approach: retrograde periodontitis. *J Periodontol.* 1964; 35: 22-48.

196. Siqueira JF Jr, Roças IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J Dent.* 2003; 31: 333-39.
197. Siqueira JF Jr, Roças IN. *Treponema socranskii* in primary endodontic infections as detected by nested PCR. *J Endod.* 2003; 29: 244-7.
198. Siqueira JF Jr, Roças IN. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 3314-9.
199. Siqueira JF Jr, Roças IN, Andrade AF, de Uzeda M. *Peptostreptococcus micros* in primary endodontic infections as detected by 16S rDNA-based polymerase chain reaction. *J Endod.* 2003; 29:111-3.
200. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Santos SR, Lima KC, Magalhaes FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod.* 2002; 28:181-4.
201. Siqueira JF Jr, Lopes HP. Bacteria on the apical root surface of untreated teeth with periradicular lesions: a scanning electron microscopy study. *Int Endod J.* 2001; 34: 216-220.
202. Siqueira Jr JF, Lopes H P. Microbiologia endodôntica. In: Siqueira Jr. J. F., Lopes H. P. *Endodontia. Biologia e Técnica.* Rio de Janeiro: Medsi, 1999. 650 p.
203. Siqueira Jr JF, Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod.* 1996; 22: 674-6.
204. Siqueira Jr JF, Lima KC, Magalhaes FA, Lopes HP, de Uzeda M. Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *J Endod.* 1999; 25: 332-5.

205. Siqueira Jr JF, Roças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000; 89: 744-8.
206. Siqueira Jr JF, Rocas IN, Oliveira JC, Santos KR. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod.* 2001; 27:563-6.
207. Siqueira Jr JF, Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J.Endod.* 1997; 3: 167-9.
208. Siren EK, Haapasalo MP, Waltimo TM, Orstavik D. *In vitro* antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. *Eur J Oral Sci.* 2004; 112: 326-31.
209. Sjögren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J.* 1991; 24: 119-25.
210. Sjögren U, Happonen RP, Kahnberg KE, Sundqvist G. Survival of *Arachnia propionica* in periapical tissue. *Int Endod J* 1988; 21: 277-82.
211. Slots J, Bragd L, Wikström M, Dahlén G. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* e *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol.* 1986; 13: 570-577.
212. Socransky S, Macdonald JB, Sawyer S. The cultivation of *Treponema microdentium* as surface colonies. *Arch Oral Biol.* 1959;1:171-2.
213. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25:134-144.
214. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr. RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25:134-144.

215. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 2002; 28:12-55.
216. Socransky SS, Haffajee AD. Microbiology of periodontal disease. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP, editors. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*: Blackwell Munksgaard; 2003. p. 106-149.
217. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000*. 2005;38:135-187.
218. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 1994;17:788-92.
219. Solak H, Öztan MD. The pH changes of four different calcium hydroxide mixtures used for intracanal medication. *J Oral Rehab*. 2003; 30:436-439.
220. Solomon C, Chalfin H, Kellert M, Weseley P. The endodontic-periodontal lesion: a rational approach to treatment. *J Am Dent Assoc*. 1995; 126: 473-479.
221. Sousa EL, Ferraz CC, Gomes BP, Pinheiro ET, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Bacteriological study of root canals associated with periapical abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003; 96: 332-9.
222. Souto R, Colombo AP. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Arch Oral Biol*. 2008;53(2):155-60. Epub 2007 Sep 25.
223. Souza AO, Machado WAS. Inter-relação Entre Doença Periodontal e Comprometimento Endodôntico. *Rev Bras Odontol*. 1995; 52:31-4.
224. Spangberg LSM. Endodontic Medicaments. In: Smith DC & Williams DF, eds. *Biocompatibility of Dental Materials* 1st edn. Boca Raton, USA: CRC Press. 1982; 223-57.

225. Stallard RE. Periodontic-endodontic relationships. *Oral Surg.* 1972; 34: 314-26.
226. Stanley HR, Weaver K. A technique for the preparation of human pulpal tissues. In: Finn SB, editor. *Biology of the Dental Pulp Organ. A Symposium.* Alabama: University of Alabama Press, 1968. Apud.
227. Harrington GW, Steiner DR, Ammons Jr WF. The periodontal-endodontic controversy. *Periodontol 2000.* 2002; 30:123-130.
228. Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod.* 2002; 28:304-310.
229. Sundqvist G, Reuterving CO. Isolation of *Actinomyces israelii* from periapical lesion. *J Endod.* 1980 Jun;6:602-6.
230. Sundqvist G. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps. *Odontological Dissertation n° 7.* University of Umea, Sweden 1976.
231. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod.* 1992; 18: 427–430.
232. Sundqvist G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1994; 78: 522-30.
233. Sundqvist G, Figdor D. Life as endodontopathogen. *Endodontic Topics.* 2003; 6: 3–28.
234. Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J.* 1998; 31: 311-25.
235. Tally FP, Stewart PR, Sutter VL, Rosenblatt JE. Oxygen tolerance of fresh clinical anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 1975;1:161–4.
236. Tanabe S, Bodet C, Grenier D. *Peptostreptococcus micros* cell wall elicits a pro-inflammatory response in human macrophages. *J Endotoxin Res.* 2007;13: 219-26.

237. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LAB, Anibal EF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *Int Endod J.* 2002; 35: 735-9.
238. Teanpaisan R, Douglas CW, Walsh TF. Characterisation of black-pigmented anaerobes isolated from diseased and healthy periodontal sites. *J Periodontal Res.* 1995;30:245-51.
239. Ten Cate AR. Oral histology - development, structure and function. St. Louis: Mosby Year Book, 1994.
240. Toledo BEC, Rosetti EP. Lesões endo-periodontais combinadas. *In: Leonardo MR. Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos.* .ed. São Paulo: Artes Médicas, 2005.
241. Torabinejad M, Kiger RD. A histologic evaluation of dental pulp tissue of a patient with periodontal disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985; 59: 198-200.
242. Tran S, Rudney J. Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol.* 1996 November 1, 1996;34:2674-2678.
243. Tran SD, D. RJ. Improved Multiplex PCR Using Conserved and Species-Specific 16S rRNA Gene Primers for Simultaneous Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forshytus* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3504-3508.
244. Tronstad L, Andreassen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod.* 1981; 7: 17-21.
245. Trope M, Delano EO, Ørstavik D. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis:single vs. multivisit treatment. *J Endod* 1999;25:345–50.

246. Van Dalen PJ, van Deutekom-Mulder EC, de Graaf J, van Steenberg TJM. Pathogenicity of *Peptostreptococcus micros* morphotypes e *Prevotella* species in pure and mixed culture. J Med Microbiol. 1998; 47: 135-40.
247. van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. J Clin Periodontol. 2002;29:1023-8.
248. Vianna M E. Microbiologia e tratamento das infecções endodônticas [Tese]. Piracicaba:UNICAMP-FOP; 2006.
249. Vianna ME. Atividade antimicrobiana de alguns medicamentos utilizados como irrigantes e medicações intracanaís. 2002. 293p. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica [Piracicaba]) - Universidade Estadual de Campinas.
250. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004; 97: 79-84.
251. Vianna ME, Horz H-P, Gomes BPFA, Conrads G. In vitro evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. Int Endod J. 2006; 39: 484-92.
252. Vianna ME, Horz H-P, Gomes BPFA, Conrads G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. Oral Microbiol Immunol. 2005; 20: 253-8.
253. Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004; 97:79-84.

254. 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;39:484-92.
255. Vivacqua-Gomes N, Gurgel-Filho ED, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single- or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth *ex vivo*. *Int Endod J.* 2005; 38:697-704.
256. Walker A. A definitive and dependable therapy for pulpless teeth. *J Am Assoc* 1936; 23: 1418-24.
257. Waltimo TM, Orstavik D, Siren EK, Haapasalo MP. *In vitro* susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J.* 1999; 32: 421-9.
258. Walton RE, Torabinejad M. *Princípios e Prática em Endodontia*. 1. ed. São Paulo: Santos; 1997.
259. Wang CS, Arnold RR, Trope M, Teixeira FB. Clinical Efficiency of 2% Chlorhexidine Gel in Reducing Intracanal Bacteria. *J Endod* 2007; 33: 1283-1289.
260. Wang H-L, Glickman GN. Endodontic and Periodontic Interrelationships. In: Cohen S, Burns RC, editors. *Pathways of the pulp*. Eighth ed: Mosby; 2002. p. 651-664.
261. White Jr C, Bryant N. Combined therapy of Mineral trioxide aggregate and guided tissue regeneration in the treatment of external root resorption and an associated osseous defect. *J Periodontol.* 2002; 73: 1517-1521.
262. White RR, Hays GL & Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod.* 1997; 23: 229-31.

263. Winkelhoff AJ, Winkel EG. Microbiological diagnostics in periodontics: biological significance and clinical validity. *Periodontol 2000*, 2005; 39:40-52.
264. Wittgow WC Jr, Sabiston CB Jr. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. *J Endod.* 1975; 1: 168–71.
265. Xia T, Baumgartner C. Occurrence of *Actinomyces* in infections of endodontic origin. *J Endod.* 2003; 29:549-552.
266. Xia T, Baumgartner JC, David LL. Isolation and identification of *Prevotella tanneræ* from endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2000; 15: 273-5.
267. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000;27:722-732.
268. Yeung MK. Molecular and genetic analyses of *Actinomyces* spp. Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the Am Ass Oral Biol. 1999; 10: 120-38.
269. Zamany A, Safavi K, Spångberg L. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2003;96:578–81.
270. Zambon JJ, Haraszthy VI. The laboratory diagnosis of periodontal infections. *Periodontology 2000*, 1995;69-82.
271. Zavistoski J, Dzink J, Onderdonk A, Bartlett J. Quantitative bacteriology of endodontic infections *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1980;49:171-4.
272. Zehnder M. Endodontic infection caused by localized aggressive periodontitis: A case report and bacteriologic evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92:440-445.
273. Zerella JA, Fouad AF, Spangberg 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;100:756 – 61.

274. Zubery Y, Kozlovsky A. Two Approaches to the Treatment of True
Combined Periodontal-Endodontal Lesions. J Endod. 1993; 19: 414-6.

ANEXOS

ANEXO I - Comitê de ética-certificado

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Ação antimicrobiana in vivo de medicações intracanaís sobre patógenos endo-periodontais encontrados em canais radiculares e bolsas periodontais", protocolo nº 034/2005, dos pesquisadores **BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES** e **VANESSA BELLOCCHIO BERBER**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 01/06/2005.

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "Antimicrobial action of intracanal medication on periodontal-endodontic pathogens found in root canals and periodontal pockets", register number 034/2005, of **BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES** and **VANESSA BELLOCCHIO BERBER**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 01/06/2005.

Cynthia Pereira Machado Tabchoury
Cynthia Pereira Machado Tabchoury

Secretária
CEP/FOP/UNICAMP

Jacks Jorge Júnior
Jacks Jorge Júnior

Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

ANEXO II. Termo de consentimento livre e esclarecimento específico para a pesquisa

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO PARA PESQUISA CLÍNICA

VOLUNTÁRIO: _____

As informações contidas neste prontuário foram fornecidas pela orientadora Prof^ª. Dr^ª. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e/ou pela aluna de doutorado Vanessa Bellocchio Berber, objetivando formar acordo, por escrito, mediante o qual o indivíduo, parte integrante da pesquisa, autoriza sua participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

I. TÍTULO DA PESQUISA

"Ação antimicrobiana in vivo de medicações intracanaís sobre patógenos endo-periodontais encontrados em canais radiculares e bolsas periodontais".

II. PROPOSIÇÃO

1. Investigar a presença de microrganismos em canais radiculares e bolsas periodontais de dentes que apresentam necrose pulpar e bolsas periodontais maiores que 6 mm antes e após o preparo químico-mecânico e durante trocas de medicação intracanal pelo método de cultura microbiológica (testes bioquímicos padronizados).
2. Verificar, através da contagem de unidades formadoras de colônias e identificação microbiológica, a suscetibilidade destes microrganismos ao preparo químico-mecânico e às trocas de medicação por 7 dias e 14 dias além de analisar o efeito antibacteriano das medicações intracanaís testadas em bolsas periodontais .
3. Identificação dos seguintes microrganismos: *Treponema denticola*, *Treponema socranskii*, *Gemella morbillorum*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella tanneriae*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Filifactor alocis*, *Parvimonas micra* através do método de PCR, podendo comparar o método clássico (cultura) ao método molecular (PCR).

III. JUSTIFICATIVA

Estudos sobre medicação intracanal e soluções irrigadoras fazem parte da linha de pesquisa do laboratório de Microbiologia aplicada à Endodontia, da FOP-UNICAMP, desta maneira haverá uma continuidade na linha de pesquisa. A atividade antimicrobiana da clorexidina gel, hidróxido de cálcio e da associação de ambos utilizados como medicação intracanal já foi testada em nosso laboratório por métodos *in vitro* com resultados satisfatórios quanto à ação antibacteriana no interior de túbulos dentinários necessitando, portanto, ser avaliada clinicamente. O trabalho de Mestrado da aluna tratou-se da ação antibacteriana de substâncias químicas auxiliares ao preparo mecânico na luz do canal radicular e em toda a extensão dos túbulos dentinários *in vitro*. Este projeto teve como agência financiadora a FAPESP (02/12464-7).

Este estudo possibilitará testar *in vivo*, o potencial antimicrobiano destas substâncias no interior do canal radicular e através dos túbulos dentinários, em bolsas periodontais, além de identificar patógenos de origem periodontal no interior dos canais radiculares através do método de cultura microbiológica e de PCR.

IV. Grupos e Procedimentos

Amostras das bactérias que habitam as bolsas periodontais e canais radiculares dos pacientes selecionados serão feitas antes e depois da instrumentação dos canais radiculares e

durante as trocas de curativo (7 e 14 dias) com auxílio de cones de papel absorvente o que não afetará em nada a saúde dos mesmos já que é um procedimento corriqueiro no tratamento endodôntico (secagem do canal radicular antes da colocação de medicação no interior dos canais radiculares e obturação se faz da mesma maneira).

Os canais radiculares serão desinfectados seguindo uma técnica de instrumentação adequada e um potente agente antimicrobiano (clorexidina gel 2%).

Os 32 pacientes serão divididos em 4 grupos com diferentes medicações intracanaís:

- Grupo 1: os canais radiculares deste grupo serão secos com cones de papel, e a seguir uma bolinha de algodão previamente esterilizada será colocada na embocadura do canal radicular, uma camada de aproximadamente 2 mm de Cavit, aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos, adesivo Single Bond 3M (3M Dental Products, St Paul, USA) e 3 mm de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St Paul, USA).
- Grupo 2: os canais deste grupo serão secos com cones de papel, preenchidos com clorexidina gel 2 % e a mesma seqüência de restauração do dente utilizada no grupo 1 será seguida nos demais grupos.
- Grupo 3: os canais deste grupo serão secos com cones de papel, preenchidos com hidróxido de cálcio + clorexidina gel 2 % (1:1) .
- Grupo 4: os canais deste grupo serão secos com cones de papel, preenchidos com hidróxido de cálcio + água destilada (9:1).

Os dentes somente serão obturados se apresentarem condições como ausência de dor e exsudato (canais estiverem secos). Se os sintomas persistirem mais trocas de curativo poderão ser feitas.

Após esta etapa, os pacientes serão encaminhados à clínica da FOP-UNICAMP para a finalização de um tratamento periodontal adequado.

Para o tratamento endodôntico, não há método alternativo pois há a necessidade de uma instrumentação dos canais radiculares eficiente auxiliada por uma substância química antimicrobiana de comprovada ação contra os microrganismos encontrados no interior dos canais. Além da utilização de uma medicação intracanal que melhore ainda mais esta desinfecção.

V. DESCONFORTO OU RISCOS ESPERADOS

O processo é indolor mas caso ocorra, esta não será devido à coleta de amostra e sim a persistência da infecção nos canais radiculares e/ ou nos tecidos periapicais. Se a manifestação dolorosa ocorrer fora dos dias marcados para a execução do tratamento, o paciente poderá ser atendido no Plantão de Emergência da FOP-UNICAMP, que funciona normalmente de segunda à sexta-feira, de 8:00 às 12:00 hs e de 13:30 às 17:30 hs e também poderão entrar em contato com os pesquisadores para uma assistência imediata através dos telefones 34125215 (laboratório de Endodontia) ou 96922695 (celular do pesquisador).

O paciente tem toda a liberdade de pedir esclarecimentos sobre a metodologia antes e durante a pesquisa, podendo ou não concordar em participar da mesma. Caso recuse, não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

Apesar dos resultados clínicos e microbiológicos serem divulgados publicamente para fins acadêmicos e científicos, será preservada a privacidade do indivíduo quanto aos dados confidenciais que possam ser envolvidos na pesquisa.

VI. BENEFÍCIOS DO EXPERIMENTO

Os voluntários terão o tratamento endodôntico do dente envolvido executado e serão encaminhados para o tratamento periodontal com todo o cuidado que se deve tomar.

VII. INFORMAÇÕES

O voluntário tem a garantia de que receberá respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa.

Também, os pesquisadores supracitados assumem o compromisso de proporcionar informações atualizadas obtidas durante o estudo, ainda que esta possa afetar a participação do indivíduo no experimento.

Os materiais e, ou dados coletados, ficarão à disposição dos sujeitos de pesquisa, sendo preservada a identidade dos voluntários.

Os pesquisadores assumem a responsabilidade de entregar uma cópia deste documento (TCLE) ao voluntário.

VIII. RETIRADA DO CONSENTIMENTO

O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo e assim do grupo de amostra, este não será penalizado e não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

IX. Previsão de Ressarcimento ou indenização

A pesquisa não acarretará nenhum ônus ao paciente. Se por acaso houver necessidade de deslocamentos ou procedimentos adicionais para coleta de amostra, além das necessárias para o tratamento endodôntico convencional, os gastos com este deslocamento serão ressarcidos. Para quaisquer outros problemas não há previsão de indenização já que não acarreta riscos previsíveis ao paciente.

Caso ocorra falha no tratamento endodôntico que não está relacionada com a pesquisa em si, o paciente deverá entrar em contato com a pesquisadora (34125215 ou 96922695) ou comparecer no plantão de urgência.

X. CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, _____
certifico que tenho lido as informações acima e suficientemente esclarecido(a) de todos os itens pela Prof^a. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e/ou Vanessa Bellocchio Berber, estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, eu autorizo a execução da pesquisa, exposta acima, em mim.

Piracicaba, ____ de _____ de 2005.

Nome: _____

RG: _____

Assinatura:

ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da FOP – UNICAMP, endereçado a Av. Limeira, 901 – Caixa Postal 52, CEP 13414-903, telefone: (019) 34125349, na cidade de Piracicaba/SP, e-mail: cep@fop.unicamp.br, website: www.fop.unicamp.br.

APÊNDICE I

Ficha clínica

DADOS

Paciente: _____
Endereço: _____
Cidade: _____
Data de nascimento: ___/___/___ Idade: _____ Sexo: ___ Fone: _____
Requer cuidados sistêmicos: _____
Dente: _____

EXAME CLÍNICO:

Dente: hígido cariado aberto(s/restauração) restaur. prov. restaur. perman. prótese c/ pino prot. sem pino

Avaliação Periodontal Geral: Saudável Gengivite Periodontite Grau _____

Dor: espontânea provocada prévia ausente

CONDIÇÃO PULPAR:

Testes de Sensibilidade: positivo negativo

Diagnóstico Pulpar: polpa normal pulpite reversível pulpite irreversível necrose
 dente despulpado(1ª fase feita)

CONDIÇÃO PERIAPICAL:

Teste de Percussão: normal sensível dor

Teste de Palpação: normal sensível dor

Mobilidade Dental: presente ausente

Presença de Abscesso: não sim

Aspectos clínicos: edema flutuação fístula difuso localizado

EXAME RADIOGRÁFICO:

Região periapical: normal c/ espessamento apical lesão periapical ___ mm

Diagnóstico Periapical: pericementite abscesso intra-ósseo abscesso subperiósteo
 abscesso submucoso lesão periapical crônica

Outras Razões: protética endo-perio trauma / tempo decorrido: _____

APÊNDICE II

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda.

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3
1	30 anos, feminino, lesão: 6mm, sintomatologia: não, Palpação: não/ Percussão: sensível/ Mobilidade: presente (extrusão e intrusão)/ Bolsa antes: M 10mm, V 10mm, D 10mm, P 10mm/ Bolsa depois: M 10mm, V 10mm, D 10mm, P 10mm/ Dor entre sessões.TPP.SUP 1 F Restauração em amálgama 2 faces	<i>P intermedia, B ureolyticus, S constellatus, P mica, G morbillorum, H parainfluenzae, Micrococcus spp., S salivarius, F nucleatum.</i>			<i>P intermedia, P prevotii, A meyeri, Pacnes, Pmicra, Haemophilus spp., P gingivalis, G haemolysans</i>	<i>F nucleatum, Pprevotii, Clostridium spp, Aa, S constellatus</i>	<i>P loesheii, Pintermedia, B ureolyticus, P micra, A odontolyticus, A meyeri, P oralis, Pendodontalis, S constellatus</i>
2	34 anos, masculino, Tamanho da lesão: 4mm/ sintomatologia: não/ Palpação: não/ Percussão: não/ Mobilidade: presente/ Bolsa antes: M 5mm, V 3mm, D 6mm, P 4mm/ Bolsa depois: M 5mm, V 3mm, D 6mm, P 4mm/SUP 2F	<i>P intermedia, Pmicra, S constellatus, F nucleatum, G morbillorum</i>			<i>P prevotii, A meyeri, Pacnes, Pmicra, F nucleatum</i>	<i>F nucleatum, Pprevotii, Clostridium spp, P intermedia, P gingivalis</i>	<i>P loesheii, Pintermedia, P micra, A odontolyticus, A meyeri</i>

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda (continuação).

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3
3	38 anos, feminino, Tamanho da lesão: 4mm/ Sintomatologia: não/ Palpação: não/ Percussão: não/ Mobilidade: presente/ Bolsa antes: M 8mm, V 5mm, D 5mm, P 8mm Bolsa depois: M 8mm, V 5mm, D 5mm, P 8mm. TPP Restauração em resina	<i>P intermedia, P micra</i>			<i>P intermedia, Pendodontalis, F nucleatum</i>	<i>P intermedia, Pendodontalis, F nucleatum</i>	<i>A odontolyticus, P intermedia</i>
34							
4	46	56 anos, masculino, Tamanho da lesão: 5mm/ Sintomatologia: não/ Palpação: sensível/ Percussão: sensível/ Mobilidade: presente/ Bolsa antes: M 8mm, V6 mm, D 5mm, P 6mm/ Bolsa depois: M 8mm, V6 mm, D 5mm, P 6mm. Restauração em amálgama	<i>P intermedia, P mica, Haemophilus spp, E limosum, G morbillorum, A prevotii</i>	<i>P propionicum</i>	<i>P intermedia, P gingivalis, P acnes, P micra, Clostridium spp, G morbillorum</i>	<i>P intermedia, P asacharolyticus, F nucleatum, Clostridium spp.</i>	<i>A odontolyticus, P intermedia</i>

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda (continuação).

201

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3
5 36	53 anos, feminino, lesão: 7mm/ sintomatologia: não/ Palpação: sensível/ Percussão: sensível/ Mobilidade: presente/ Bolsa antes: M 7mm, V6 mm, D 7mm, P 6mm/ Bolsa depois: M 7mm, V6 mm, D 7mm, P 6mm/ TPP	<i>S acidominimus, A prevotii, P micra, A naeslundii</i>		<i>P propionicum</i>	<i>Poralis, P endodontalis, A meyeri, A naeslundii, Bifidobacterium spp, G haemolysans, G morbillorum</i>	<i>G haemolysans, P intermedia, A israelii, Poralis, S constellatus</i>	<i>G haemolysans, P intermedia, A israelii, Poralis, S constellatus</i>
6 36	36 anos, masculino, lesão: 5mm/ Sintomatologia: não/ Palpação: sensível/ Percussão: sensível/ Mobilidade: presente/ Bolsa antes: M 7mm, V6 mm, D 7mm, P 6mm Bolsa depois: M 7mm, V6 mm, D 7mm, P 6mm Cárie	<i>A prevotii, S acidominimus</i>		<i>P propionicum, A prevotii</i>	<i>P endodontalis, A naeslundii, Bifidobacterium spp, G haemolysans, G morbillorum, Poralis, A meyeri,</i>	<i>P intermedia, A israelii, G haemolysans Poralis, S constellatus,</i>	<i>Pintermedia</i>

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda (continuação).

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3
7 33	31 anos, masculino, Lesão: 4mm/ Sintomatologia: sim/ palpação: sensível/ Percussão: sensível/ Mobilidade: presente/ Bolsa antes: M 10mm, V 9mm, D 3mm, P 3mm/ Bolsa depois: M 10mm, V 9mm, D 3mm, P 3mm/ Dor entre sessões	<i>P micra</i>	<i>Micrococcu s varians/ros eus</i>		<i>Cl subterminale, A naeslundii, P buccae, A meyeri, A odontolyticus, Haemophilus spp., G morbillorum, P melaninogenica, S constellatus</i>	<i>Fvarium, Pbuccae, P micra, P melaninogenica, S constellatus</i>	<i>Pbuccae, G morbillorum</i>
8 14	63 anos, masculino, Lesão: 6mm/ sintomatologia: não/ Palpação: não/ Percussão: não/ Mobilidade: presente/ Bolsa antes: M 3mm, V 4mm, D 6mm, P 6mm/ Bolsa depois: M 3mm, V 4mm, D 6mm, P 6mm /Fístula/ Dor entre sessões Restauração em amálgama	<i>Weeksella virosa, Neisseria spp, F nucleatum, A meyerii, S oralis, S sanguis, P intermedia</i>			<i>Staphylococcus cohnii, Aerococcus viridans, Pintermedia, Neisseria spp, Haemophilus spp., G morbillorum</i>	<i>Aerococcus viridans, Neisseria spp, Haemophilus pp., Staphylococcus s cohnii, Pintermedia, G morbillorum</i>	<i>Neisseria, Clostridium spp, Eubacterium avium, A prevotii, A naslundii, G morbillorum, G haemolysans, Haemophilus spp, P intermedia</i>

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda (continuação).

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3
9	47 anos, feminino, Lesão: 8mm/ Sintomatologia: sim (espontânea)/ Palpação: sensível/ Percussão: muito sensível/ Mobilidade: presente (extrusão e intrusão)/ Bolsa antes: M 6mm, V 6mm, D 6mm, P 6mm/ Bolsa depois: M 6mm, V 6mm, D 6mm, P 6mm/ Abscesso. Tumefação inflamatória intra oral. Restauração em resina	<i>Pmicra, P assacharolyticus, Fnucleatum, G haemolysans, A prevotii, Smitis, P intermedia</i>	<i>P intermedia, G haemolysans</i>	<i>P acnes, A odontolyticus, G morbillorum</i>	<i>Cl difficile, Poralis, P intermedia, Aa, P micra, Haemophilus spp., P loesheii, G morbillorum, Pmelaninogenica, S intermedius, S acidominus</i>	<i>Fnucleatum, A prevotii, Clostridium spp, G morbillorum, S constellatus</i>	<i>Prevotella bivia, A viscosus, Prevotella denticola, A prevotii, A odontolyticus, G morbillorum, E faecalis</i>
10	67 anos, feminino, Lesão: 3mm/ Sintomatologia: não/ Palpação: sensível/ Percussão: sensível/ Mobilidade: presente/Bolsa antes: M 4mm, V 7mm, D 10mm, P 3mm/ Bolsa depois: M 4mm, V 7mm, D 10mm, P 3mm Restauração em resina 1 face	<i>Clostridium spp., Haemophilus spp., P acnes, Eubacterium limosum</i>			<i>Clostridium botulinum 2, Peptostreptococcus anaerobius, A naeslundii, Streptococcus mitis 1, Capnocytophaga spp., Haemophilus spp., S constellatus, G haemolysans</i>	<i>A israelii, Streptococcus mitis 1, Capnocytophaga spp., Cl difficile, G morbillorum, G haemolysans</i>	<i>A israelii, Neisseria spp, H aphrophilus/paraphrophilus, Hinfluenzae, G morbillorum, G haemolysans, Fnucleatum, A meyeri, P propionicum, Veillonella spp, Pacnes, A prevoti</i>

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda (continuação).

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3
11	55 anos, masculino, lesão: 4mm/ sintomatologia: provocada/ Palpação: sensível/ Percussão: sensível/ Mobilidade: presente/ Bolsa antes: M 3mm, V 3mm, D 6mm, P 6mm/ Bolsa depois: M 3mm, V 3mm, D 6mm, P 6mm Cárie	<i>Aa, H aphrophilus, P loesheii, F nucleatum, Leuconostoc spp., S salivarius, P intermedia, G morbillorum, Bifidobacterium spp, P asaccharolyticus, A meyeri, P buccae</i>	<i>P propionicum, S salivarius</i>	<i>G morbillorum, H influenzae, A meyeri, A viscosus, S salivarius, Veillonella spp</i>	<i>P intermedia, A meyeri, A odontolyticus, S constellatus, P melaninogenica, P loesheii, Cl acetobutylicum</i>	<i>F nucleatum, S intermedius, Aa, A naeslundii, A meyeri, Cl tyrobutyricum</i>	<i>A meyeri, S constellatus, P intermedia, Clostridium spp, G morbillorum, Bifidobacterium adolescencis 1, Aerococcus viridans 2</i>
12	16	59 anos, masculino, lesão: 4mm/ Sintomatologia: sim/ Palpação: dor/ Percussão: dor/ Mobilidade: presente/ Abscesso periodontal-palatina/ Bolsa antes: M 3mm, V 4mm, D 10mm, P 10mm/ Bolsa depois: M 3mm, V 4mm, D 10mm, P 10mm Restauração em amálgama	<i>A meyeri, Haphrophilus, Weeksela, P oralis, Veillonella spp., S constellatus, H parainfluenzae, G morbillorum, A prevotii, P micra, A odontolyticus, Capnocytophaga spp</i>	<i>Soralis, P propionicum, Smitis 1</i>	<i>P intermedia, A meyeri, A prevotii, S constellatus, P gingivalis, P denticola, Cl acetobutylicum, Cl glicolicum, Eubacterium limosum, P loesheii, S agalactiae</i>	<i>P anaerobius, Lactococcus lactis cremoris, Aa, A naeslundii, A viscosus, P micra, Bifidobacterium spp, G morbillorum, H aphrophilus</i>	<i>G morbillorum, Capnocytophaga spp, F nucleatum</i>

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda (continuação).

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3
13	61 anos, feminino, lesão: 3mm/ Sintomatologia: não/ Palpação: não/ Percussão: dor/ Mobilidade: presente/ Bolsa antes: M 8mm, V 4mm, D 8mm, P 8mm/ Bolsa depois: M 8mm, V 4mm, D 8mm, P 8mm	<i>A meyeri, G morbillorum, A viscosus, P oralis, Veillonella spp., A prevotii</i>			<i>H aphrophilus, S salivarius, A prevotii, Neisseria spp, P gingivalis</i>	<i>P anaerobius, P micra, G haemolysans</i>	<i>G morbillorum, Capnocytophaga spp, F nucleatum</i>
14	72 anos, masculino, lesão: 3mm/ Sintomatologia: não/ Palpação: sensível/ Percussão: dor/ Mobilidade: presente/ Restauração: presente (coroa)/ Bolsa antes: M 3mm, V 4mm, D 12mm, P 12mm/ Bolsa depois: M 3mm, V 4mm, D 12mm, P 12mm	<i>E faecalis</i>		<i>S mitis, G morbillorum, E faecalis</i>	<i>G haemolysans, G morbillorum, Aa, Neisseria spp, F nucleatum, A israelii, P micra, S constellatus, Cl bifermentans</i>	<i>Pintermedia, P micra, G haemolysans, Neisseria spp, Cl septicum, F nucleatum, A meyeri, S mitis 1.</i>	<i>G morbillorum, A naeslundii, F nucleatum, G haemolysans, A meyeri, P intermedia, P micra</i>

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda (continuação).

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3
15	58 anos, masculino, lesão: 2mm/ Sintomatologia: sim. Dor espontânea/ Palpação: sensível/ Percussão: sensível/ Mobilidade: presente/ Restauração: presente (amálgama)/ Bolsa antes: M 7mm, V 7mm, D 7mm, P 7mm/ Bolsa depois: M 7mm, V 7mm, D 7mm, P 7mm/	<i>E faecalis</i> , <i>Eggerthella lenta</i> , <i>Aa</i> , <i>G morbillorum</i> , <i>S oralis</i> , <i>Neisseria spp</i> , <i>S mitis</i>		<i>Cl difficile</i> , <i>Capnocytophaga spp</i> , <i>H parainfluenzae</i> .	<i>G haemolysans</i> , <i>Neisseria spp</i>	<i>H aphrophilus</i> , <i>S oralis</i>	<i>G morbillorum</i> , <i>Neisseria spp</i>
26		<i>1</i> , <i>N cinerea</i> , <i>Cl subterminalis</i>					
16	70 anos, feminino, lesão: 4mm/ Sintomatologia: não./ Palpação: insensível/ Percussão: sensível/ Mobilidade: presente/ Restauração: ausente/ Bolsa antes: M 10mm, V 7mm, D 10mm, P 10mm/ Bolsa depois: M 10mm, V 7mm, D 10mm, P 10mm	<i>E faecalis</i> , <i>F nucleatum</i> , <i>Aa</i> , <i>G haemolysans</i> , <i>S oralis</i> , <i>Neisseria spp</i> , <i>P intermedia</i>		<i>A naeslundii</i> , <i>A meyeri</i> , <i>G morbillorum</i>	<i>A israelii</i> , <i>Neisseria spp</i> , <i>G morbillorum</i> , <i>S constellatus</i> , <i>P gingivalis</i> , <i>P micra</i> , <i>A prevotii</i> , <i>F nucleatum</i>	<i>H aphrophilus</i> , <i>S oralis</i> , <i>P micra</i> , <i>A prevotii</i> , <i>F nucleatum</i>	<i>A naeslundii</i> , <i>P propionicum</i> , <i>F nucleatum</i>

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda (continuação).

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3
17	55 anos, feminino, lesão: 3mm/ Sintomatologia: não./ Palpação: insensível/ Percussão: insensível/ Mobilidade: presente/ Restauração: ausente/ Fístula: Bolsa antes: M 10mm, V 7mm, D 7mm, P 9mm/ Bolsa depois: M 10mm, V 7mm, D 7mm, P 9mm/ Restauração em resina	<i>F nucleatum, P intermedia, G haemolysans, S oralis</i>		<i>G morbillorum, A meyeri, P propionicum</i>	<i>H aphrophilus, Ochrobactrum anthropi, G morbillorum, S constellatus, P gingivalis, P micra, A prevotii, F nucleatum, C albicans, Latococcus lactis cremoris ssp</i>	<i>H influenzae, A meyeri, P micra, A prevotii, F nucleatum</i>	<i>A meyeri, P propionicum, F nucleatum, A odontolyticus, G haemolysans, P micra.</i>
18	48 anos, feminino, lesão: 5mm/ Sintomatologia: não./ Palpação: insensível/ Percussão: insensível/ Mobilidade: presente/ Restauração: ausente/ Bolsa antes: M 10mm, V 7mm, D 7mm, P 9mm/ Bolsa depois: M 10mm, V 7mm, D 7mm, P 9mm	<i>F nucleatum, P intermedia, G haemolysans, S oralis</i>		<i>Eggertella lenta, G morbillorum, P propionicum</i>	<i>G morbillorum, S constellatus, P gingivalis, P micra, A prevotii, F nucleatum, C albicans, Latococcus lactis cremoris ssp, H aphrophilus, Ochrobactrum anthropi</i>	<i>P micra, A prevotii, H influenzae, A meyeri, F nucleatum</i>	<i>A odontolyticus, G haemolysans, P micra, A meyeri, P propionicum, F nucleatum</i>

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda (continuação).

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3
19	40 anos, masculino, lesão: 4mm/ Sintomatologia: não/ Palpação: insensível/ Percussão: sensível/ Mobilidade: presente/ Restauração: presente (amálgama)/ Bolsa antes: M 7mm, V 7mm, D 7mm, P 7mm/ Bolsa depois: M 7mm, V 7mm, D 7mm, P 7mm/	<i>Cl perfringes</i> , <i>Eggerthella lenta</i> , <i>Neisseria spp</i> , <i>G morbillorum</i> , <i>S oralis</i> , <i>P intermedia</i> , <i>P acnes</i>			<i>G haemolysans</i> , <i>Neisseria spp</i> , <i>G morbillorum</i> , <i>F nucleatum</i> , <i>P micra</i>	<i>H aphrophilus</i> , <i>S oralis</i> , <i>G morbillorum</i> , <i>F nucleatum</i> , <i>P micra</i>	<i>F nucleatum</i> , <i>Neisseria spp</i> , <i>P oralis</i>
20	38 anos, feminino, lesão: 2mm/ Sintomatologia: não/ Palpação: insensível/ Percussão: insensível/ Mobilidade: presente/ Restauração: presente (amálgama) Bolsa antes: M 3mm, V 3mm, D 6mm, P 6mm/ Bolsa depois: M 3mm, V 3mm, D 6mm, P 6mm	<i>P loesheii</i> , <i>B ureolyticus</i> , <i>P oralis</i> , <i>A viscosus</i> , <i>F nucleatum</i>		<i>A a</i> , <i>S mitis</i>	<i>G haemolysans</i> , <i>Aerococcus viridans</i> , <i>A odontolyticus</i> , <i>Eggerthella lenta</i> , <i>P propionicum</i> , <i>Clostridium spp.</i> , <i>F nucleatum</i> , <i>P intermedia</i> , <i>P gingivalis</i>	<i>A meyeri</i> , <i>S mitis</i> 1, <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>P micra</i> , <i>H parainfluenzae</i>	<i>F nucleatum</i> , <i>G morbillorum</i> , <i>P oralis</i> , <i>H aphrophylu</i> , <i>Clostridium spp</i> , <i>B ureolyticus</i>

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda (continuação).

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3
21	52 anos, feminino, lesão: 2mm/ Sintomatologia: sim. Dor espontânea/ Palpação: sensível/ Percussão: sensível/ Mobilidade: presente/ 26 Restauração: presente (amálgama)/ Bolsa antes: M 7mm, V 7mm, D 7mm, P 7mm/ Bolsa depois: M 7mm, V 7mm, D 7mm, P 7mm/	<i>E faecalis</i> , <i>Eggerthella lenta</i> , <i>Aa</i> , <i>G morbillorum</i> , <i>S oralis</i> , <i>Neisseria spp</i> , <i>S mitis 1</i> , <i>N cinerea</i> , <i>Cl subterminale</i>		<i>C albicans</i> , <i>Capnocytophaga spp.</i>	<i>G haemolysans</i> , <i>Neisseria spp</i>	<i>H aphrophilus</i> , <i>S oralis</i>	<i>F nucleatum</i> , <i>Neisseria spp</i> , <i>P oralis</i>
22	45 anos, feminino, lesão: 4mm/ Sintomatologia: não/ Palpação: insensível/ Percussão: insensível/ Mobilidade: presente/ 41 Restauração: ausente/ Bolsa antes: M 6mm, V 6mm, D 6mm, P 6mm/ Bolsa depois: M 6mm, V 6mm, D 6mm, P 6mm	<i>P loesheii</i> , <i>B ureolyticus</i> , <i>P oralis</i> , <i>A viscosus</i> , <i>F nucleatum</i>			<i>G haemolysans</i> , <i>A odontolyticus</i> , <i>P propionicum</i> , <i>Clostridium spp.</i> , <i>F nucleatum</i> , <i>P intermedia</i> , <i>P gingivalis</i>	<i>A meyeri</i> , <i>S mitis 1</i> , <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>F nucleatum</i> , <i>P gingivalis</i>	<i>F nucleatum</i> , <i>G morbillorum</i> , <i>P oralis</i> , <i>Clostridium spp.</i> , <i>B ureolyticus</i> , <i>P intermedia</i>

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda (continuação).

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3
23 37	33 anos, feminino, lesão: 6mm, sintomatologia: não, Palpação: não/ Percussão: sensível/ Mobilidade: presente (extrusão e intrusão)/ Bolsa antes: M 10mm, V 10mm, D 10mm, P 10mm/ Bolsa depois: M 10mm, V 10mm, D 10mm, P 10mm/ Dor entre sessões. restauração resina 1 face	<i>Micrococcus spp., S salivarius, F nucleatum, P intermedia, B ureolyticus, S constellatus, P mica, G morbillorum, H parainfluenzae</i>			<i>P prevotii, A meyeri, Pacnes, P intermedia, P micra, Haemophilus spp., P gingivalis, G haemolysans</i>	<i>Aa, S constellatus, F nucleatum, Pprevotii, Clostridium spp</i>	<i>P loesheii, Pintermedia, B ureolyticus, P micra, A odontolyticus, A meyeri, P oralis, Pendodontalis, S constellatus</i>
24 43	31 anos, masculino, Tamanho da lesão: 4mm/ sintomatologia: não/ Palpação: não/ Percussão: não/ Mobilidade: presente/ Bolsa antes: M 5mm, V 3mm, D 6mm, P 4mm/ Bolsa depois: M 5mm, V 3mm, D 6mm, P 4mm/	<i>Pmicra, S constellatus, F nucleatum, P intermedia, G morbillorum</i>			<i>A meyeri P prevotii, Pacnes, Pmicra, F nucleatum</i>	<i>Clostridium spp, P intermedia, F nucleatum, P prevotii, P gingivalis</i>	<i>P micra, A odontolyticus, P loesheii, Pintermedia, A meyeri</i>

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda (continuação).

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3	
25	38 anos, feminino, Tamanho da lesão: 4mm/ Sintomatologia: não/ Palpação: não/ Percussão: não/	<i>P intermedia, P mica</i>			<i>Pintermedia, Pendodontalis, F nucleatum</i>	<i>P intermedia, Pendodontalis, F nucleatum</i>	<i>A odontolyticus, P intermedia</i>	
44	Mobilidade: presente/ Bolsa antes: M 8mm, V 5mm, D 5mm, P 8mm Bolsa depois: M 8mm, V 5mm, D 5mm, P 8mm.							
26	56 anos, masculino, Tamanho da lesão: 5mm/ Sintomatologia: não/ Palpação: sensível/ Percussão: sensível/ Mobilidade: presente/ Bolsa antes: M 8mm, V6 mm, D 5mm, P 6mm/ Bolsa depois: M 8mm, V6 mm, D 5mm, P 6mm. Restauração em resina	<i>P intermedia, P mica, Haemophilus spp, E limosum, G morbillorum, A prevotii</i>			<i>P propionicum</i>	<i>P intermedia, P gingivalis, P acnes, P mica, Clostridium spp, G morbillorum</i>	<i>Pintermedia, P asacharolyticus, Fnucleatum, Clostridium spp.</i>	<i>A odontolyticus, P intermedia</i>

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda (continuação).

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3
27 46	59 anos, feminino, da lesão: 7mm/ sintomatologia: não/ Palpação: sensível/ Percussão: sensível/ Mobilidade: presente/ Bolsa antes: M 7mm, V6 mm, D 7mm, P 6mm/ Bolsa depois: M 7mm, V6 mm, D 7mm, P 6mm	<i>S acidominimus, A prevotii</i>		<i>P propionicum, G morbilorum</i>	<i>Poralis, P endodontalis, A meyeri, A naeslundii, Bifidobacterium spp, G haemolysans, G morbillorum</i>	<i>G haemolysans, P intermedia, A israelii, Poralis, S constellatus</i>	<i>P intermedia, G morbilorum, A israelii</i>
28 37	36 anos, masculino Tamanho da lesão: 7mm/ Sintomatologia: não/ Palpação: sensível Percussão: sensível Mobilidade: presente/ Bolsa antes: M 7mm, V6 mm, D 7mm, P 6mm Bolsa depois: M 7mm, V6 mm, D 7mm, P 6mm Restauração em resina	<i>A prevotii, S acidominimus</i>		<i>P propionicum</i>	<i>P endodontalis, A naeslundii, Bifidobacterium spp, G haemolysans, G morbilorum, Poralis, A meyeri,</i>	<i>P intermedia, A israelii, G haemolysans Poralis, S constellatus,</i>	

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda (continuação).

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3
29 43	30 anos, masculino, Lesão: 4mm/ Sintomatologia: sim/ palpação: sensível/ Percussão: sensível/ Mobilidade: presente/ Bolsa antes: M 10mm, V 9mm, D 3mm, P 3mm/ Bolsa depois: M 10mm, V 9mm, D 3mm, P 3mm/ Dor entre sessões Restauração em resina	<i>P micra</i>	<i>Micrococcus varians/roseu s</i>	<i>Microco ccus varians/ roseus</i>	<i>Cl subterminale, A naeslundii, P buccae, A meyeri, A odontolyticus, Haemophilus spp., G morbillozum, P melaninogenica, S constellatus</i>	<i>Fvarium, Pbuccae, P micra, P melaninogenica, S constellatus</i>	<i>Pbuccae, G morbillozum</i>
30 15	61 anos, masculino, Lesão: 6mm/ sintomatologia: não/ Palpação: não/ Percussão: não/ Mobilidade: presente/ Bolsa antes: M 3mm, V 4mm, D 6mm, P 6mm/ Bolsa depois: M 3mm, V 4mm, D 6mm, P 6mm / Dor entre sessões	<i>Weeksella virosa, Neisseria spp, F nucleatum, A meyer, S oralis, S sanguis, P intermedia</i>			<i>Staphylococcus cohnii, Aerococcus viridans, P intermedia, Neisseria spp, Haemophilus spp., G morbillozum</i>	<i>Aerococcus viridans, Neisseria spp, Haemophilus pp., Staphylococ cus cohnii, Pintermedia, G morbillozum</i>	<i>Neisseria, Clostridium spp, Eubacterium avium, A prevotii, A naslundii, G morbillozum, G haemolysans, Haemophilus spp, P intermedia</i>

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda (continuação).

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3
31	47 anos, feminino, Lesão: 8mm/ Sintomatologia: sim (espontânea)/ Palpação: sensível/ Percussão: muito sensível/ Mobilidade: presente (extrusão e intrusão)/ Bolsa antes: M 6mm, V 6mm, D 6mm, P 6mm/ Bolsa depois: M 6mm, V 6mm, D 6mm, P 6mm/ Abscesso. Tumefação inflamatória intra oral. Restauração em resina	<i>P micra, P assacharolyticus, F nucleatum, G haemolysans, A prevotii, Smitis, P intermedia</i>	<i>G haemolysans, P intermedia</i>	<i>P acnes, A odontolyticus, G morbillorum</i>	<i>Cl difficile, Poralis, P intermedia, Aa, P micra, Haemophilus spp., P loesheii, G morbillorum, Pmelaninogenica, S intermedius, S acidominus</i>	<i>F nucleatum, G morbillorum, S constellatus, A prevotii, Clostridium spp,</i>	<i>Prevotella bivia, A viscosus, Prevotella denticola, A prevotii, A odontolyticus, G morbillorum, E faecalis</i>
32	24	67 anos, feminino, Lesão: 3mm/ Sintomatologia: não/ Palpação: sensível/ Percussão: sensível/ Mobilidade: presente/Bolsa antes: M 4mm, V 7mm, D 10mm, P 3mm/ Bolsa depois: M 4mm, V 7mm, D 10mm, P 3mm	<i>Haemophilus spp., P acnes, Clostridium spp., Eubacterium limosum</i>		<i>P anaerobius, Cl botulinum 2, A naeslundii, S mitis 1, Capnocytophaga spp., Haemophilus spp., S constellatus, G haemolysans</i>	<i>A israelii, Streptococcus mitis 1, Capnocytophaga spp., Cl difficile, G morbillorum, G haemolysans</i>	<i>H aphrophilus/paraphrophilus, A israelii, Neisseria spp, Influenzae, G morbillorum, G haemolysans, F nucleatum, A meyeri, P propionicum, Veillonella spp, Pacnes, A prevoti.</i>

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda (continuação).

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3
33 16	45 anos, masculino, lesão: 4mm/ sintomatologia: provocada/ Palpação: sensível/ Percussão: sensível/ Mobilidade: presente/ Fístula/ Bolsa antes: M 3mm, V 3mm, D 6mm, P 6mm/ Bolsa depois: M 3mm, V 3mm, D 6mm, P 6mm Cárie	<i>Aa, H aphrophilus, P loesheii, F nucleatum, Leuconostoc spp., S salivarius, P intermedia, G morbillorum, Bifidobacterium spp, P asaccharolyticus, A meyeri, P buccae</i>	<i>S salivarius, P propionicum</i>	<i>G morbillorum, H influenzae, A meyeri, A viscosus, S salivarius, Veillonella spp</i>	<i>S constellatus, P melaninogenica, P loesheii, P intermedia, A meyeri, A odontolyticus,, Cl acetobutylicum</i>	<i>Aa, A naeslundii, A meyeri, F nucleatum, S intermedius, Cl tyrobutyricum</i>	<i>Clostridium spp, G morbillorum, A meyeri, S constellatus, P intermedia, Bifidobacterium adolescencis 1, Aerococcus viridans 2</i>

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda (continuação).

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3
34 26	57 anos, masculino, lesão: 4mm/ Sintomatologia: sim/ Palpação: dor Percussão: dor/ Mobilidade: presente/ Abscesso periodontal-palatina/ Bolsa antes: M 3mm, V 4mm, D 10mm, P 10mm/ Bolsa depois: M 3mm, V 4mm, D 10mm, P 10mm Restauração em amálgama	<i>A meyeri</i> , <i>Haphrophilus</i> , <i>Weeksela</i> , <i>P oralis</i> , <i>Veillonella spp.</i> , <i>S constellatus</i> , <i>H parainfluenzae</i> , <i>G morbillorum</i> , <i>A prevotii</i> , <i>P micra</i> , <i>A odontolyticus</i> , <i>Capnocytophaga spp</i>		<i>Smitis 1</i> , <i>S oralis</i> , <i>P propionicum</i>	<i>P intermedia</i> , <i>A meyeri</i> , <i>A prevotii</i> , <i>S constellatus</i> , <i>P gingivalis</i> , <i>Pdenticola</i> , <i>Cl acetobutylicum</i> , <i>Cl glicolicum</i> , <i>Eubacterium limosum</i> , <i>P loesheii</i> , <i>S agalactiae</i>	<i>P anaerobius</i> , <i>Lactococcus lactis cremoris</i> , <i>Aa</i> , <i>A naeslundii</i> , <i>A viscosus</i> , <i>P micra</i> , <i>Bifidobacterium spp</i> , <i>G morbillorum</i> , <i>H aphrophilus</i>	<i>G morbillorum</i> , <i>Capnocytophaga spp</i> , <i>F nucleatum</i>

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda (continuação).

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3
35	63 anos, feminino, lesão: 3mm/ Sintomatologia: não/ Palpação: não/ Percussão: dor/ Mobilidade: presente/ Bolsa antes: M 8mm, V 4mm, D 8mm, P 8mm/ Bolsa depois: M 8mm, V 4mm, D 8mm, P 8mm	<i>A meyeri, G morbillorum, A viscosus, P oralis, Veillonella spp., A prevotii</i>			<i>Neisseria spp, H aphrophilus, S salivarius, A prevotii, P gingivalis</i>	<i>P micra, P anaerobius, G haemolysans</i>	<i>F nucleatum, G morbillorum, Capnocytophaga spp</i>
22							
36	72 anos, masculino, lesão: 3mm/ Sintomatologia: não/ Palpação: sensível/ Percussão: dor/ Mobilidade: presente/ Restauração: presente (coroa)/ Bolsa antes: M 3mm, V 4mm, D 12mm, P 12mm/ Bolsa depois: M 3mm, V 4mm, D 12mm, P 12mm	<i>E faecalis, G morbillorum</i>	<i>E faecalis</i>	<i>E faecalis, S mitis, G morbillorum,</i>	<i>G haemolysans, G morbillorum, Aa, Neisseria spp, F nucleatum, A israelii, P micra, S constellatus, Cl bifermentans</i>	<i>Pintermedia, P micra, G haemolysans, Neisseria spp, Cl septicum, F nucleatum, A meyeri, S mitis 1.</i>	<i>G morbillorum, A naeslundii, F nucleatum, G haemolysans, A meyeri, P intermedia, P micra</i>

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda (continuação).

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3
37	51 anos, masculino, lesão: 2mm/ Sintomatologia: sim. Dor espontânea/ Palpação: sensível/ Percussão: sensível/ Mobilidade: presente/ Restauração: presente (amálgama)/ Fístula/ Bolsa antes: M 7mm, V 7mm, D 7mm, P 7mm/ Bolsa depois: M 7mm, V 7mm, D 7mm, P 7mm/	<i>Eggerthella lenta</i> , <i>Aa</i> , <i>G morbillorum</i> , <i>E faecalis</i> , <i>S oralis</i> , <i>Neisseria spp</i> , <i>S mitis</i>	<i>Eggerthella lenta</i>	<i>Capnocytophaga spp</i> , <i>Cl difficile</i> , <i>H parainfluenzae</i>	<i>G haemolysans</i> , <i>Neisseria spp</i>	<i>S oralis</i> , <i>H aphrophilus</i>	<i>G morbillorum</i> , <i>Neisseria spp</i>
26	28 anos, feminino, lesão: 4mm/ Sintomatologia: não./ Palpação: insensível/ Percussão: sensível/ Mobilidade: presente/ Restauração: ausente/ Bolsa antes: M 10mm, V 7mm, D 10mm, P 10mm/ Bolsa depois: M 10mm, V 7mm, D 10mm, P 10mm	<i>E faecalis</i> , <i>F nucleatum</i> , <i>Aa</i> , <i>G haemolysans</i> , <i>S oralis</i> , <i>Neisseria spp</i> , <i>P intermedia</i>		<i>A naeslundii</i> , <i>A meyeri</i> , <i>G morbillorum</i>	<i>A israelii</i> , <i>Neisseria spp</i> , <i>G morbillorum</i> , <i>S constellatus</i> , <i>P gingivalis</i> , <i>P micra</i> , <i>A prevotii</i> , <i>F nucleatum</i>	<i>H aphrophilus</i> , <i>S oralis</i> , <i>P micra</i> , <i>A prevotii</i> , <i>F nucleatum</i>	<i>A naeslundii</i> , <i>P propionicum</i> , <i>F nucleatum</i>
38	12						

Tabela 1. Dados clínicos e microbiológicos dos canais radiculares de 40 pacientes com dentes indicados para tratamento endodôntico e bolsa periodontal profunda (continuação).

Dente	Características Clínicas	E1	E2	E3	P1	P2	P3
39	50 anos, feminino, lesão: 3mm/ Sintomatologia: não./ Palpação: insensível/ Percussão: insensível/ Mobilidade: presente/	<i>G haemolysans</i> , <i>S oralis</i> , <i>F nucleatum</i> , <i>P intermedia</i> ,		<i>G morbillorum</i> , <i>A meyeri</i> , <i>P propionicum</i>	<i>H aphrophilus</i> , <i>Ochrobactrum anthropi</i> , <i>G morbillorum</i> , <i>S constellatus</i> , <i>P gingivalis</i> , <i>P micra</i> , <i>A prevotii</i> , <i>F nucleatum</i> , <i>C albicans</i> , <i>Latococcus lactis cremoris ssp</i>	<i>H influenzae</i> , <i>A meyeri</i> , <i>P micra</i> , <i>A prevotii</i> , <i>F nucleatum</i>	<i>A meyeri</i> , <i>P propionicum</i> , <i>F nucleatum</i> , <i>A odontolyticus</i> , <i>G haemolysans</i> , <i>P micra</i> .
43	Restauração: ausente/ Fístula/ Bolsa antes: M 10mm, V 7mm, D 7mm, P 9mm/ Bolsa depois: M 10mm, V 7mm, D 7mm, P 9mm/						
40	38 anos, feminino, lesão: 3mm/ Sintomatologia: não/ Palpação: não/ Percussão: não/ Mobilidade: presente/ Restauração: ausente/ Bolsa antes: M 10mm, V 7mm, D 7mm, P 9mm/ Bolsa depois: M 10mm, V 7mm, D 7mm, P 9mm	<i>F nucleatum</i> , <i>P intermedia</i> , <i>G haemolysans</i> , <i>S oralis</i>		<i>Eggertella lenta</i> , <i>G morbillorum</i> , <i>P propionicum</i>	<i>G morbillorum</i> , <i>S constellatus</i> , <i>P gingivalis</i> , <i>P micra</i> , <i>A prevotii</i> , <i>F nucleatum</i> , <i>C albicans</i> , <i>Latococcus lactis cremoris ssp</i> , <i>H aphrophilus</i> , <i>Ochrobactrum anthropi</i>	<i>P micra</i> , <i>A prevotii</i> , <i>H influenzae</i> , <i>A meyeri</i> , <i>F nucleatum</i>	<i>A odontolyticus</i> , <i>G haemolysans</i> , <i>P micra</i> , <i>A meyeri</i> , <i>P propionicum</i> , <i>F nucleatum</i>

APÊNDICE III

MEIO DE TRANSPORTE

VMGA III (Viability Medium Göteborg Agar)

1. Descrição

O meio de transporte VMGAIII (Viability Medium Göteborg Agar) foi descrito inicialmente por Moller (1966) e por Dahlén et al. (1993) e é preparado para suportar a sobrevivência de organismos anaeróbios estritos e aeróbios sem ocorrer crescimento. É aplicado para amostras pequenas, como as coletadas por pontas de papel absorvente. Se armazenado em recipiente bem fechado e sem contato com oxigênio, pode ser guardado por longo tempo. Deve ser protegido da luz. O indicador de oxi-redução é o azul de metileno e sua função é consumir o oxigênio, mantendo o meio reduzido. A solução protetora é a peptona 0,1% e a gelatina 5%. Sua consistência é semi-sólida em temperatura ambiente e semi-fluido acima de 30°C.

2. Preparo do meio

2.1. Componentes necessários

- a) Acetato de fenilmercúrio;
- b) Glicerofosfato de sódio;
- c) CaCl anidro ou CaCl₂.6H₂O
- d) KCl
- e) MgSO₄.7H₂O
- f) NaOH
- g) Agar bacteriológico
- h) Gelatina (DIFCO, Detroit, EUA)
- i) Triptose (DIFCO, Detroit, EUA)
- j) Thiotona e Peptona (BBL, Cockeyville, EUA)
- k) L-cisteína-dihidroclorito (Sigma, St. Louis, EUA)
- l) Ácido tioglicólico (Sigma, St. Louis, EUA)

Autoclavar previamente:

- a) Frascos de Eppendorf ou vidros pequenos com 3 bolinhas de vidro (Glass beads). A quantidade de Eppendorfs é de acordo com o volume que será preparado do meio. Neste caso, se for preparar 250 mL de VMGA III, autoclavar cerca de 130 frascos.
- b) Proveta de 50mL
- c) 2 frascos vazios de 500mL
- d) 2 frascos vazios de 1000mL
- e) 4 funis
- f) 4 tubos de ensaio
- g) 4 espátulas
- h) 1 frasco de Becker pequeno
- i) 2 provetas de 200mL
- j) 30 pedaços de papel alumínio
- k) 1 vidro de 500mL

2.2. Preparo dos volumes líquidos

Para os volumes de VMGA III, autoclavar os respectivos volumes de **água bidestilada**.

	500 mL	250 mL	125 mL
1 frasco	275 mL	137,5 mL	68,75 mL
1 frasco	150 mL*	75 mL*	37,5 mL*
1 frasco	600 mL	300 mL	150 mL
1 frasco	5 mL	2,5 mL	1,25 mL

*Colocar um peixinho para ajudar a dissolver a gelatina

Para os volumes de VMGA III, autoclavar os respectivos volumes de **solução salina**.

	500 mL	250 mL	125 mL
1 frasco	50 mL	25 mL	12,5 mL

2.3. Solução de Sais de Estoque IV

Verificar se tem a **solução de sais de estoque IV** (Cor azul) e autoclavar, caso não tenha, autoclavar:

1 frasco	60 mL de água bidestilada (1)
1 frasco	40 mL de água bidestilada (2)
1 frasco	60 mL de água bidestilada (3)
1 frasco	40 L de água bidestilada (4)

Verificar se tem a **solução de NaOH e KOH (8M)**, caso não tenha, preparar. Volume final de 200 mL. Modo de preparo: Pesar 64g de NaOH e 89,76g de KOH. Dissolver em 140 mL de água bidestilada. Depois de dissolvido, acrescentar água bidestilada q.s.p 200 mL. Autoclavar por 20 minutos.

No dia anterior, preparar as soluções:

a) SOLUÇÃO 1 – Água bidestilada estéril 60mL + Acetato de fenilmercúrio 0,1g (não pesar com espátula de metal). Dissolver em banho-maria e deixar overnight a 56°C.

b) SOLUÇÃO 2 – Água bidestilada estéril 40mL + Glicerofosfato de sódio 20g. Dissolver aquecendo levemente na manta e deixar overnight.

No dia do preparo do VMGA III, para preparar a solução azul:

c) SOLUÇÃO 3 – Água bidestilada estéril 60mL + CaCl anidro 0,24g ou CaCl₂.6H₂O 0,32g + KCl 0,84g + MgSO₄.7H₂O 0,2g.

Misturar bem as SOLUÇÕES 1, 2 e 3 e resfriar em uma proveta graduada.

Adicionar 40mL de água bidestilada já estéril para completar 200 mL. Ao final, adicionar 0,006g de azul de metileno e acondicionar na geladeira.

2.4. Mistura das soluções e preparo do VMGA III

a) Solução A:

SOLUÇÃO A	1000 mL	250 mL	125 mL
Água bidestilada	550 mL	137,5 mL	68,75 mL
Triptose	0,5 g	0,125 g	0,0625 g
Thitona e Peptona	0,5 g	0,125 g	0,0625 g

O frasco com água bidestilada deve estar estéril no dia anterior. Dissolver com agitação e aquecimento na manta ou no microondas por 10 segundos.

b) Solução B:

SOLUÇÃO B	1000 mL	250 mL	125 mL
Água Bidestilada	300 mL	75 mL	37,5 mL
Gelatina	50 g	12,5 g	6,25 g

A água bidestilada deve estar pré-aquecida. O frasco com água destilada e o peixinho já devem estar estéreis no dia anterior. Aquecer no microondas por 10 segundos + 10 segundos + 10 segundos (total de 30 segundos), observando atentamente se derrete a gelatina. Deixar em banho-maria caso não derreta tudo.

Essa solução não pode mais ser autoclavada.

c) Solução C:

SOLUÇÃO C	1000 mL	250 mL	125 mL
Água bidestilada	50 mL	12,5 mL	6,25 mL
Agar	2 g	0,5 g	0,25 g

Autoclavar a 121 °C por 20 minutos, manter em banho-maria.

d) Solução D:

SOLUÇÃO D	1000 mL	250 mL	125 mL
Água bidestilada	10 mL	2,5 mL	1,25 mL
L-cisteína	0,05 g	0,125 g	0,0625 g

Autoclavar a 121 °C por 20 minutos, manter em banho-maria.

e) Solução E:

SOLUÇÃO E	1000 mL	250 mL	125 mL
Solução salina	100 mL	25 mL	12,5 mL
Ácido Tioglicólico	0,5 mL	0,125 mL	0,0625 mL

A solução salina deve estar estéril no dia anterior. O ácido tioglicólico encontra-se no freezer, e deve ser manipulado com muito cuidado, empregando luvas e máscara.

Misturar as **SOLUÇÕES A + B + C** em frasco de 500 mL na manta. Resfriar a 45-50°C. Adicionar 25mL da solução de sais de estoque azul IV. Adicionar a solução de ácido tioglicólico (**SOLUÇÃO E**). Ferver a solução por 5 minutos até que a cor azul desapareça (fica amarelo). Resfriar em água morna sob fluxo de N₂. Levar para a câmara de anaerobiose. Adicionar a solução de cisteína (**SOLUÇÃO D**).

Ajustar o pH 7,2 a 7,4 com a solução de NaOH + KOH, adicionando de 10 em 10 microlitros. Adicionar aos poucos, pois não tem volta. A solução de NaOH + KOH vai diminuir o pH.

Colocar 1 mL da solução em cada eppendorf e deixar levemente aberto na cabine de anaerobiose. Passar parafilme para evitar qualquer tipo de contato com oxigênio e contaminação. Proteger da luz com papel alumínio.

MEIOS DE CULTURA

1. Fastidious Anaerobe Agar (FAA) – LAB M, Bury, UK.

1.1 Descrição

Meio capaz de favorecer o crescimento dos anaeróbios isolados clinicamente. As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação de crescimento. Amido e bicarbonato atuam como agentes detoxificantes, enquanto a hemina favorece a produção de pigmento nos “*Bacteroides*” produtores de pigmento negro.

Agentes específicos de estimulação de crescimento:

- a) Cisteína – para *Fusobacterium* spp, *Propionibacterium acnes*, e *Bacteroides fragilis*;
- b) Arginina – para *Eubacterium* spp.; pirofosfato solúvel para *Porphyromonas asaccharolytica*.
- c) Piruvato – contribui para a neutralização do peróxido de hidrogênio e pode ser também utilizado pela *Veillonella* spp. como fonte de energia.
- d) Vitamina K e succinato de sódio fornecem fatores essenciais de crescimento para alguns anaeróbios, como também 0,1% de glicose. O nível baixo de glicose impede a produção de níveis elevados de ácidos e alcoóis que podem inibir o crescimento bacteriano.

O pH médio do meio de cultura é 7,4 ±0,2.

1.2. Preparo

Adicionar 23,0 g do pó em 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min. e depois agitada. É esterilizada em autoclave 121 °C por 15 min e resfriada a 47 °C. Então adicionar assepticamente 5% de sangue desfibrinado de carneiro, misturar bem e distribuir nas Placas de Petri.

1.3. Armazenagem do meio preparado

O meio preparado deve ser armazenado em placas de Petri por até 7 dias, em temperatura média de 4 °C, fora do alcance da luz.

1.4. Incubação

- a) Temperatura: 37°C;
- b) Condições Gasosas: anaerobiose (80% H₂, 10% N₂, 10% CO₂);
- c) Período de tempo: 48 horas e 7 dias.

1.5. Fórmula

Componentes	Concentração (g/L)
Mistura de peptonas	23,0
Cloreto de sódio	5,0
Amido solúvel	1,0
Ágar nº 2	12,0
Glicose	0,4
Piruvato de sódio	1,0
L-cisteína monoidratada	1,0
Hemina	0,5
Vitamina K	0,001
L-arginina	1,0
Pirofosfato solúvel	0,25
Succinato de sódio	0,5

1.6. Enriquecimento do Meio

1.6.1 Solução Vitamina K1 (1 mg/mL) - Sigma-Aldrich, USA.

Pesar 0,1g de Vitamina K1 e adicionar a um tubo contendo 100mL de etanol absoluto. Armazenar o vidro em refrigerador, devidamente vedado e protegido da luz. Adicionar 1µL da solução a cada mL de meio produzido.

1.6.2 Solução de Hemina (5 mg/mL) - Sigma-Aldrich, USA.

Dissolver 0,5g de Hemina em 10 mL de Hidróxido de sódio 1N. Completar com água destilada até atingir 100 mL. Autoclavar a 121°C por 15 min. Para usar como suplemento, adicionar 1µL da solução a cada mL de meio produzido.

2. Fastidious Anaerobe Broth (FAB) – LAB M (Bury, UK)

2.1. Descrição

Meio de cultura líquido capaz de favorecer o crescimento de bactérias anaeróbias e facultativas. As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação de crescimento. Vitamina K, hemina e L-cisteína são também fatores de crescimento para alguns anaeróbios. L-cisteína e tioglicolato de sódio reduzem o potencial de óxido redução do meio e o agar inibe a absorção do oxigênio.

O pH do meio é $7,4 \pm 0,2$.

2.2. Preparo

Dispensar 14,85g do pó em 500 mL de água deionizada. A mistura é dispensada em tubos que são deixados semi-abertos durante a esterilização, que é feita em autoclave a 121 °C por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a esterilização.

2.3. Armazenagem

Armazenar em tubos com tampas, por até 3 meses, a 15-20 °C, fora do alcance da luz.

2.4. Incubação

Incubar a 37 °C por 24-72 horas, mantendo os tubos bem fechados.

2.5. Fórmula

Componentes	Concentração (g/L)
Mistura de peptonas	15
Cloreto de sódio	2,5
Extrato de levedura	1,0
Ágar nº 1	0,75
L-cisteína	0,5
Hemina	0,005
Vitamina K	0,005
Resazurina	0,001
Bicarbonato de sódio	0,4

3. Brain Heart Infusion Ágar (BHI) – LAB M (Bury, UK)

3.1 Descrição

Este meio foi desenvolvido inicialmente para o isolamento de patógenos orais. Com a adição de 5% de sangue desfibrinado, este meio permite o crescimento da maioria dos microrganismos fastidiosos. O fosfato tamponado ajuda neutralizar os ácidos produzidos pela utilização da glicose, mantendo a viabilidade dos microrganismos. Este meio não é recomendado para a determinação das reações hemolíticas porque contém glicose em sua composição.

O pH do meio é $7,4 \pm 0,2$.

3.2 Preparo

Adicionar 24,5 g do pó em 500 ml de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min. e depois agitada. É esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min e resfriada a 47°C antes de distribuir sobre as placas. Caso deseje, adicionar asepticamente 5% de sangue desfibrinado de carneiro, misturar bem e distribuir nas placas de Petri.

3.3. Armazenagem

Armazenar as placas por período de até 7 dias em temperatura de 4°C, preferencialmente no escuro.

3.4 Incubação

Tempo e temperatura são determinados para cada microrganismo.

3.5 Fórmula

Componentes	Concentração (g/L)
Infusão de sólidos de cérebro e coração	17,5
Proteose peptona	10
Glicose	2
Cloreto de sódio	5
Fosfato di-sódico	2,5
Agar número 2	12

4. Brain Heart Infusion Broth (BHI) – LAB M (Bury, UK)

4.1. Descrição

Meio de infusão isotônico rico em triptose (uma mistura de carne e peptonas do leite) promovendo uma ampla gama de substratos. Uma concentração baixa de glicose é utilizada para estimular o crescimento precoce. É ligeiramente tamponado para impedir a morte rápida de algumas espécies devido à produção de ácido.

O pH do meio é $7,4 \pm 0,2$.

4.2. Preparo

Dispensar 18,5 g do pó em 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ficar em repouso por 10 minutos, sendo a seguir dissolvida sob aquecimento brando, antes de ser dispensada em tubos que são deixados semi-abertos durante a esterilização. A esterilização é feita em autoclave a 121 °C por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a esterilização.

4.3. Armazenagem

Armazenar em tubos com tampas, até 3 meses a 15-20 °C protegidos da luz.

4.4. Incubação

Incubar aerobicamente a 37 °C por até 15 dias.

4.5. Fórmula

Componentes	Concentração (g/L)
Infusão de sólidos de cérebro de boi	12,5
Infusão de sólidos de coração	5,0
Proteose peptona	10,0
Glicose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato di-sódico	2,5

5. Brucella Medium Base (OXOID, Hampshire-UK)

5.1 Descrição

As peptonas são incorporadas para máxima estimulação do crescimento microbiano. A glicose fornece fatores essenciais de crescimento para alguns anaeróbios. O nível baixo de glicose impede a produção de níveis elevados de ácidos e de alcoóis que poderiam inibir o crescimento microbiano. O agar inibe a absorção do oxigênio e corrente de propagação.

O pH médio do meio é de $7,5 \pm 0,2$.

5.2. Preparo

Misturar 22,5g do pó a 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 minutos e depois agitada. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos e resfriada a 47°C . Adicionar assepticamente 5% de sangue desfibrinado de carneiro, 500 μL de Hemina e menadiona preparados previamente. Homogeneizar e distribuir em placas de Petri estéreis.

5.3 Armazenagem

Armazenar em placas de Petri por até 7 dias, em temperatura média de 4°C , fora do alcance da luz.

5.4. Incubação

Incubar a 37°C anaerobicamente em atmosfera de 80% H_2 , 10% N_2 , 10% CO_2 , por períodos entre 48 horas e 7 dias.

5.6 Fórmula

Componentes	Concentração (g/L)
Peptona	10,0
Extrato de carne	5,0
Glicose	10,0
Cloreto de sódio	5,0
Agar	15,0

6. Agar Mitis Salivarius (Difco, Becton & Dickison, MD, Estados Unidos)

6.1 Descrição

Meio de cultura empregado para o isolamento de Streptococcus mitis, S. salivarius, e Enterococcus.

6.2. Preparo

Misturar 90g do pó a 1000 mL de água deionizada. Dissolver o pó sob agitação e ferver por 1 minuto. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos e resfriada a 47°C.

6.3. Armazenagem

Armazenar em placas de Petri por até 7 dias, em temperatura média de 4°C, fora do alcance da luz.

6.4. Incubação

Incubar a 37°C aerobicamente por períodos entre 48 horas e 7 dias.

6.5. Fórmula

Componentes	Concentração (g/L)
Digerido pancreático de caseína	6,0
Peptona de proteosa número 3	5,0
Dextrose	1,0
Sacarose	50,0
Fosfato dipotássico	4,0
Azul tripano	0,075g
Violeta cristal	0,0008
Agar	15g

7. Agar MacConkey (Difco, Becton & Dickison, MD, Estados Unidos)

7.1 Descrição

Meio de cultura para isolamento e diferenciação de organismos entéricos.

7.2. Preparo

Misturar 50g do pó a 1000 mL de água deionizada. Dissolver o pó sob agitação e ferver por 1 minuto. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos e resfriada a 47°C.

7.3 Armazenagem

Armazenar em placas de Petri por até 7 dias, em temperatura média de 4°C, fora do alcance da luz.

7.4. Incubação

Incubar a 37°C aerobicamente por períodos entre 48 horas e 7 dias.

7.5. Fórmula

Componentes	Concentração (g/L)
Peptona	17,0
Proteose peptona	3,0
Lactose	10,0
Sais biliares número 3	1,5
Cloreto de sódio	5,0
Agar	13,5
Vermelho neutro	0,03
Cristal violeta	0,001

8. Agar m *Enterococcus* (Difco, Becton & Dickison, MD, Estados Unidos)

8.1. Descrição

Meio de cultura empregado para o isolamento e contagem de *Enterococcus* em água e outros materiais através de filtração em membrana ou dispersão em placa.

8.2. Preparo

Misturar 42g do pó a 1000 mL de água estéril. Dissolver o pó sob agitação e ferver por 1 minuto. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos e resfriada a 47°C.

8.3. Armazenagem

Armazenar em placas de Petri por até 7 dias, em temperatura média de 4°C, fora do alcance da luz.

8.4. Incubação

Incubar a 37°C aerobicamente por períodos entre 48 horas e 7 dias.

8.5. Fórmula

Componentes	Concentração (g/L)
Triptose	20,0
Extrato de fungo	5,0
Dextrose	2,0
Fosfato dipotássico	4,0
Azido de sódio	0,4
Agar	10,0
Cloreto de trifetil tetrazólio	0,1

9. Agar Sabouraud Dextrose (Becton & Dickison, MD, Estados EUA)

9.1. Descrição

Meio de cultura empregado para o cultivo de fungos e microrganismos acidófilos.

9.2. Preparo

Misturar 65g do pó a 1000 mL de água estéril. Dissolver o pó sob agitação e ferver por 1 minuto. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos e resfriada a 47°C.

9.3. Armazenagem

Armazenar em placas de Petri por até 7 dias, em temperatura média de 4°C, fora do alcance da luz.

9.4. Incubação

Incubar a 37°C aerobicamente por períodos entre 48 horas e 7 dias.

9.5. Fórmula

Componentes	Concentração (g/L)
Caseína digerida enzimaticamente	10,0
Dextrose	40,0
Agar	15,0

COLORAÇÃO DE GRAM

1. Princípios

É utilizada para o exame microscópico direto das amostras, para a caracterização das bactérias quanto a sua morfologia e quanto as características de sua parede celular. Emprega como corantes o cristal violeta, o iodo de Gram, o descorante (álcool-acetona) e o contracorante (safranina ou fucsina). O cristal violeta (violeta de genciana) serve como coloração primária, unindo-se à parede celular bacteriana após o tratamento com uma solução de iodo fraca, que serve como mordente para a ligação do corante. Algumas espécies bacterianas, devido à natureza química da parede celular, têm a capacidade de reter o cristal violeta, mesmo depois do tratamento com um descorante orgânico, como a mistura de partes iguais de álcool etílico a 95% e acetona.

As bactérias que retêm o corante aparecem negro-azuladas quando observadas ao microscópio e são denominadas gram-positivas. Certas bactérias perdem a coloração primária com cristal violeta quando são tratadas com o descorante, talvez devido ao alto conteúdo lipídico da parede celular, sendo denominadas Gram-negativas. Assim, com a aplicação do contra-corante, apresentam-se avermelhadas quando visualizadas no microscópio.

2. Componentes

a) Cristal Violeta

Componente	Quantidade
Cristal violeta	2 g
Álcool etílico a 95%	20 mL
Oxalato de NH ₄	0,8g
Água destilada	100 mL

b) Iodo de Gram

Componente	Quantidade
Iodeto de potássio	2 g
Cristais de iodo	1g
Água destilada	100 mL

c) Descorante

Componente	Quantidade
Acetona	50 mL
Álcool etílico a 95%	50 mL

d) Contra-coloração

Componente	Quantidade
Safranina	0 2,5 g
Álcool etílico a 95%	100 mL
Água destilada	100 mL

3. Procedimentos

- a) Fazer sobre uma lâmina um esfregaço delgado do material em estudo e deixar secar no ar.
- b) Fixar o material na lâmina, utilizando-se o calor da chama no Bico de Bunsen.
- c) Colocar a lâmina em um suporte para coloração.
- d) Cobrir o esfregaço com a solução de cristal violeta, por 1 minuto. Lavar em água corrente.
- e) Cobrir o esfregaço com a solução de iodo de Gram, por um minuto. Lavar em água corrente.
- f) Aplicar o decolorante por 15 segundos sobre a lâmina.
- g) Imediatamente, cobrir a lâmina com contracorante, por 30 segundos a 1 minuto.
- h) Deixar secar no ar, colocando a lâmina em posição vertical.
- i) Examinar em microscópio óptico, com óleo de imersão, com aumento de x100.

TESTE DA CATALASE

1. Procedimentos

Empregar colônias novas, com 24 a 72 horas de crescimento, preferencialmente de meios que não contenham agar. Com uma alça, colher uma porção da colônia e dispensar sobre uma lâmina de vidro estéril. Adicionar uma gota de peróxido de hidrogênio 15%.

2. Interpretação dos resultados

- a) Reação positiva: formação de bolhas imediata
- b) Reação negativa: ausência de formação de bolhas. Formação de bolhas após 20 a 30 segundos ocorrem pois algumas bactérias apresentam outras enzimas capazes de degradar peróxido de hidrogênio.

TESTE DA OXIDASE – Bactident Oxidase (Merck, Alemanha)

1. Princípios

Os citocromos são proteínas que atuam como último elemento de ligação na cadeia respiratória aeróbia, transferindo hidrogênios ao oxigênio, com formação de água. O sistema citocromo é encontrado em microrganismos aeróbios, ou anaeróbios facultativos. Assim, a prova da oxidase é importante para identificação de microrganismos que carecem da enzima e são anaeróbios obrigatórios. A prova é importante na identificação de espécies pertencentes à Enterobacteriaceae (todas negativas) de bactérias como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Neisseria*, *Campylobacter* e *Pasteurella* (todas positivas). A prova da citocromo-oxidase utiliza corantes que substituem o oxigênio como acceptor artificial de elétrons. No estado reduzido, o corante é incolor; entretanto, em presença de citocromo oxidase e de oxigênio atmosférico, a p-fenilenodiamina é oxidada e forma azul-de-indofenol.

2. Procedimentos

- a) Realizar uma diluição da colônia em água bidestilada
- b) Aplicar o a fita impregnada com o corante
- c) Aguardar de 15 a 20 segundos.

3. Resultados (após 15 a 20 segundos)

- a) Positivo – coloração roxa ou preta.
- b) Negativo – coloração amarela.

TESTE DA FLUORESCÊNCIA

Summanen *et al* (1993) descreve os procedimentos para execução do teste complementar de fluorescência. O emprego de meio de cultura contendo sangue de carneiro ou coelho intensifica a detecção de fluorescência de *Porphyromonas* e *Prevotellas* pigmentadas.

1. Procedimentos

- a) As placas de cultura devem ter sido incubadas pelo menos por 7 dias.
- b) Expor uma placa de cultura bem próxima à luz ultra-violeta.

- c) Aguardar algum tempo.
- d) Observar se as colônias oferecem coloração vermelha
- e) Se o resultado for negativo, adicionar Adicione 0,1mL de metanol 100% a um tubo de Eppendorf, emulsionando uma colônia ou várias colônias de um mesmo microrganismo no metanol. Observe na câmara escura sob luz UW-UV. Se não houver mudança de cor está confirmado o resultado negativo, se desenvolver uma fluorescência vermelha é demonstrado um resultado positivo. Colônias pigmentadas de negro que fluorescem sob a luz UV podem ser supostamente identificadas como pertencentes ao grupo das *P. intermedia/nigrescens* ou *P. melaninogenica*.

KITS DE IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA

1. API 20 Strep - BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France.

1.1. Descrição

Api 20 Strep é um método padronizado que combina 20 testes bioquímicos que permitem a identificação, em grupos ou espécies, da maioria dos *Streptococcus* encontrados na microbiologia médica. A fita do Api 20 Strep consiste em 20 microtubos contendo substratos desidratados para demonstração da atividade enzimática ou fermentação de açúcares. Os testes enzimáticos são inoculados com uma suspensão densa de microrganismos, feita de uma cultura pura, que é utilizada para reidratar os substratos enzimáticos. Os produtos metabólicos finais produzidos durante o período de incubação são revelados através de reações caracterizadas por alterações cromáticas que ocorrem espontaneamente ou por adição de reagentes. Os testes de fermentação são inoculados com um meio enriquecido (API GP Medium) que reconstituem os substratos de açúcares. A fermentação de carboidratos é detectada por uma mudança no indicador de pH. As reações são lidas de acordo com o quadro de leitura do manual do fabricante, e a identificação obtida no catálogo "Api 20 Strep Analytical Profile Index", ou via site do fabricante na internet.

Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de ágar-sangue por 18-24 horas a 37°C, em condições aeróbicas ou anaeróbicas, de acordo com as melhores condições de crescimento das amostras. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de

catalase e requerimento gasoso. Esses procedimentos permitem a identificação primária das amostras como cocos Gram-positivos, catalase negativos e anaeróbios facultativos. Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio para suspensão “Suspension Medium” ou em água destilada estéril, para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 4. Cinco mL de água são colocados no recipiente de incubação para manter a umidade da atmosfera e a tira do Api Staph é colocada dentro da caixa. Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher os microtubos da tira do Api Strep com o inóculo bacteriano preparado até a metade da fita (até o teste da arginina-ADH). A seguir, abre uma ampola de “API GP Medium” e transfere o resto da suspensão para dentro dela, mistura bem, e preenche a segunda metade da fita (testes de ribose-RIB até glicogênio-GLYG). O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37°C por 4 horas. Após o período de incubação, são adicionados os reagentes VP 1 e VP 2 no teste do piruvato de sódio (VP); ZYM A e ZYM B no teste de PYRA até LAP, e NIN no teste HIP. Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas de acordo com o quadro do item. Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Api Strep Analytical Profile Index”, ou no site do fabricante.

2. Rapid ID 32 Strep - BioMérieux SA, Marcy-l’Etoile, France.

2.1 Descrição

Rapid ID 32 A é um sistema de identificação para estreptococos e microrganismos relacionados utilizando testes enzimáticos standardizados e miniaturizados. Cada Kit contém 25 fitas, recipientes para incubação, folhas de resultados e um manual do Kit. Cada fita consiste de 32 cúpulas que são utilizadas para testes e contêm substratos desidratados. Após o período de incubação de 4 horas, as reações podem ser lidas visualmente, e a identificação obtida usando o catálogo “Rapid ID 32 A Analytical Profile Index” ou o site do fabricante na internet.

2.2. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas Ágar sangue. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio líquido “Suspension Medium” ou em água destilada estéril para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 4,0. Uma pipeta estéril é então utilizada para

preencher as cúpulas com o inóculo bacteriano preparado no “Suspension Medium”. Duas gotas de óleo mineral são adicionadas a cúpula URE (1.0). O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37°C anaerobicamente por 4 horas. Após o período de incubação, são adicionados os reagentes VP A e VP B no teste do VP (cúpula 0.0); FB nos testes APPA e GTA (cúpulas 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 e 0.5); e NIN no teste de HIP (cúpula 0.6). Todas as reações são lidas após 5 minutos baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas. Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Rapid ID 32 StrepAnalytical Profile Index” ou a leitura é feita site do fabricante na internet.

3. API Staph - BioMérieux SA, Marcy-l’Etoile, France

3.1. Descrição

Api Staph (# 20500) é um sistema de identificação dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* utilizando testes bioquímicos padronizados. O sistema consiste de uma tira contendo substratos desidratados em microtubos individuais. Os testes são realizados adicionando a cada tubo uma alíquota do meio “Api Staph Medium” que foi inoculado com a amostra bacteriana a ser estudada. Cada Kit contém 25 tiras, recipientes para incubação, ampolas de “Api Staph Medium”, folhas de resultados e um manual do Kit. A identificação das amostras pode ser interpretada no catálogo “Api Staph Analytical Profile Index” ou no site do fabricante na internet.

3.2. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de ágar-sangue por 18-24 horas a 37 °C. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Esses procedimentos permitem a identificação primária das amostras como cocos Gram-positivos, catalase positiva e aeróbios ou anaeróbios facultativos. Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio líquido “Api Staph Medium” para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 0,5. Cinco mL de água são colocados no recipiente de incubação para manter a umidade da atmosfera e a tira do Api Staph é colocada dentro da caixa. Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher os microtubos da tira do Api Staph com o inóculo bacteriano preparado no “Api Staph Medium”, evitando a formação de bolhas. Após preencher toda a tira, os tubos contendo os testes da arginina (ADH) e uréia (URE) são preenchidos com óleo mineral para promover anaerobiose. O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37°C por 18-24 horas. Após o período de

incubação, são adicionados os reagentes VP 1 e VP 2 no teste do piruvato de sódio (VP); NIT 1 e NIT 2 no teste do nitrato de potássio (NIT); e ZYM A e ZYM B no teste do ácido b-naftil fosfato (PAL). Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas de acordo com o quadro do item 2.4. Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Api Staph Analytical Profile Index”.

4. Rapid ID 32 A - BioMérieux SA, Marcy-l’Etoile, France

4.1. Descrição

Rapid ID 32 A é um sistema de identificação para anaeróbios utilizando testes enzimáticos padronizados e miniaturizados. Cada Kit contém 25 fitas, recipientes para incubação, folhas de resultados e um manual do Kit. Cada fita consiste de 32 cúpulas, 29 das quais são utilizadas para testes e contêm substratos desidratados. Após o período de incubação de 4 horas, as reações podem ser lidas visualmente, e a identificação obtida usando o catálogo “Rapid ID 32 A Analytical Profile Index” ou o site do fabricante na internet.

4.2. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas contendo Fastidious Anaerobe Agar mais sangue de carneiro desfibrinado por 24-48 horas a 37°C anaerobicamente. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio líquido “Suspension Medium” ou em água destilada estéril para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 4,0. Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher as cúpulas com o inóculo bacteriano preparado no “Suspension Medium”. Duas gotas de óleo mineral são adicionadas a cúpula URE (1.0). O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37°C em anaerobiose por 4 horas. Após o período de incubação, são adicionados os reagentes NIT 1 e NIT 2 no teste do NIT (cúpula 0.0) para verificar a redução de nitratos; JAMES no teste IND (cúpula 0.1) para verificar a produção de indol; e FB nos testes de PAL a SerA (cúpula 0.2 a 0.E). Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas. Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos

correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Rapid ID 32 A Analytical Profile Index” ou no site do fabricante.

5. Api 20 C AUX

5.1 Descrição

Api 20 C AUX é um sistema de identificação preciso para a maioria dos fungos encontrados na clínica microbiológica. O API 20 C AUX consiste em 20 microtubos contendo substratos desidratados para demonstração da atividade enzimática ou fermentação de açúcares. Os microtubos são inoculados com um meio semi-sólido e os fungos crescerão apenas se forem capazes de utilizar cada substrato. As reações são lidas em comparação com o crescimento controle e identificação é obtida pelo catálogo *Analytical Profile Index* ou usando um programa computadorizado de identificação.

5.2. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de Agar Sabouraud 18-24 horas a 37 °C, em condições aeróbicas ou anaeróbicas, de acordo com as melhores condições de crescimento das amostras. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Esses procedimentos permitem a identificação primária das amostras como cocos Gram-positivos, catalase negativos e anaeróbios facultativos. Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria em 2 mL meio para suspensão “Suspension Medium” ou em água destilada estéril, para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 2. São colocados 100 µ L no tubo “C Medium”. Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher os microtubos da tira do API C AUX com o inóculo bacteriano preparado C Medium. Evite a formação de bolhas. Incubar a 30°C por 48-72 horas. Após o período de incubação checar o crescimento, após 48 h o GLU deve estar mais turvo que o controle (cúpula “0” da galeria) para ser interpretada a leitura de toda galeria. Através do catálogo “Analytical Profile Index” os resultados numéricos obtidos pelas reações podem ser identificados.

6. RapID NH system - Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, GA., USA.

6.1. Descrição

O sistema RapID NH é um método miniaturizado qualitativo empregado para identificação de espécies clinicamente significantes de *Neisseria* e *Haemophilus*, e também *Eikenella* e *Aggregatibacter*, através de substratos convencionais e cromogênico. Cada Kit consiste de 20 recipientes para testes de RapID NH, blocos de anotações para resultados e um manual de instruções. Após 4 horas de incubação as reações são obtidas através da leitura visual. Identificações são realizadas usando cada escore de teste individual, em conjunto com as informações obtidas através da morfologia colonial, coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. O resultado padrão do escore positivo e negativo é usado como base para identificação do teste isolado pela comparação dos resultados obtidos com resultado padrão que é encontrado no manual de dados (*RapID NH System Code Compendium*). O recipiente de teste RapID NH e reagentes devem ser estocados a 2-10°C. O fluido para inoculação RapID (RapID Inoculation Fluid), deve ser estocado a 15-30°C, na embalagem original.

6.2. Procedimentos para identificação

Os microrganismos são subcultivados em placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro por 18 a 24 horas a 37° C. As culturas puras são primariamente checadas pela morfologia da colônia, coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Um swab estéril é usado para inoculação das colônias bacterianas no fluido de inoculação RapID. A suspensão do microrganismo que será testado deve atingir no mínimo o equivalente ao padrão MacFarland 3 (uma suspensão com turbidez menor que o padrão MacFarland 3 pode comprometer o desenvolvimento do teste). As suspensões são agitadas (se necessário) e usadas até 15 minutos do preparo. A película de proteção do recipiente é devidamente deslocada para a inoculação bacteriana. Uma pipeta estéril é introduzida na suspensão bacteriana e todo o conteúdo é transferido para o recipiente de teste, na cúpula do canto direito superior. O recipiente para teste é então selado novamente pela película de proteção, mantendo-o em posição horizontal em superfície plana. Este é gentilmente inclinado, de forma que a suspensão seja distribuída uniformemente nas cúpulas superiores. Em seguida o recipiente é inclinado aproximadamente 45° C durante 4 horas. Após a incubação do recipiente, cada cavidade é examinada quanto à reação enzimática, observando presença ou ausência de coloração, sendo este o primeiro resultado. Ao adicionarmos os reagentes nas cavidades de teste específicas, obtém-se o segundo resultado, através da reação do reagente e observando-se a alteração de cor. O resultado obtido é comparado com o padrão, que é encontrado no manual de dados.

APÊNDICE IV

EXTRAÇÃO DE DNA (kit QIAamp DNA-QIAGEN)



Utiliza-se os tubos e tubos com filtro pertencentes ao kit de extração de DNA.

As quantidades das amostras são padronizadas previamente.

1. Centrifugar as amostras a 8000 rpm por 5 minutos
2. Remover todo o sobrenadante.
3. Colocar 180 μ L do buffer ATL em cada eppendorff. Não encostar no eppendorff e utilizar a mesma ponteira para todos os tubos.
4. Colocar 20 μ L de proteinase K. Troca-se a ponteira pois é pequena a quantidade a ser adicionada.
5. Agitar no vórtex por 1 minuto
6. Deixar os tubos no banho-maria por 30 minutos a 56°C (boiando).
7. Colocar 200 μ L do buffer AL.
8. Agitar no vórtex por 1 minuto.
9. Deixar no banho-maria a 70°C por 10 minutos.
10. Colocar 200 μ L de etanol
11. Agitar no vórtex por 1 minuto.
12. Transferir todo o conteúdo de cada eppendorff para os tubos com filtro (QIAamp mini spin column-QIAGEN).
13. Centrifugar os tubos por 1 min a 8000 rpm.
14. Transferir os filtros para os tubos sem tampa.

15. Colocar 500 μL do buffer AW1 em cada filtro
16. Centrifugar os tubos por 1 min a 8000 rpm
17. Transferir os filtros para os tubos sem tampa
18. Colocar 500 μL do buffer AW2 em cada filtro
19. Centrifugar a 13000 rpm por 3 minutos
20. Transferir os filtros para os tubos sem tampa
21. Colocar 100 μL o buffer AE. Esperar 3 minutos antes de centrifugar
22. Centrifugar os tubos por 1 min a 8000 rpm.
23. O produto desta filtração contém o DNA extraído.

DILUIÇÃO DOS PRIMERS

Quando receber os *primers*, fazer a reidratação dos primers e preparar uma solução de trabalho.

1. Centrifugar o tubo com o primer liofilizado por 1 minuto, 10.000 rpm a 4 °C.
2. Verificar os nMoles e multiplicar por 10. Esta é a quantidade que deve ser adicionada de água miliQ. A concentração final será de 100 μM .
3. Esperar o primer hidratar por 2 minutos.
4. Homogeneizar no vórtex por 15 segundos.

IMPORTANTE

M	m M	μ M	n M	p M	f M
1 M	10^{-3} M	10^{-6} M	10^{-9} M	10^{-12} M	10^{-16} M

A MOLARIDADE expressa a concentração de uma solução em Molar.

1 Molar = 1 mol de soluto em 1L de solução.

Por sua vez,

1 mol de soluto = massa molecular em gramas do soluto.

E, a

Massa molecular do soluto = soma das massas atômicas que compõe o soluto.

Por isso, quando misturamos o primer (pó) que está na concentração em nmol com 1mL de água, vamos obter a concentração da mistura em μM .

$$1 \text{ n mol} / 1 \text{ mL} = 1.10^{-9} \text{ mol} / 1.10^{-3} \text{ L} = 1.10^{-6} \text{ mol/L} = 1.10^{-6} \text{ M} = 1\mu\text{M}$$

PREPARO DAS dNTPs

Caixa da Invitrogen 100mM dNTPSet (cód 10297-018)

Solução Original

Na caixa há quatro tubos com 250 μL de cada dNTP.

Preparo da SOLUÇÃO MÃE a partir da Solução original

Segundo o fabricante, se pipetarmos volumes iguais de cada uma das dNTPs e misturarmos em um Eppendorf, obteremos uma Solução Mãe com uma molaridade de 25mM.

Então, vamos preparar uma solução mãe com V_{FINAL} de 20 μL e molaridade final de 25mM.

5 μL de ANTP + 5 μL de GNTP + 5 μL de CNTP e 5 μL de TNTP

Solução Mãe com $V_{\text{FINAL}} = 20 \mu\text{L}$ e $M_{\text{FINAL}} = 25 \text{ mM}$.

Preparo da SOLUÇÃO DE TRABALHO a partir da Solução Mãe

Esta solução terá um volume final de 100 μL com uma molaridade final de 2,5 mM.

$$M_{\text{mãe}} \times V_{\text{mãe}} = M_{\text{trabalho}} \times V_{\text{trabalho}}$$

$$M_{\text{mãe}} = 25 \text{ mM}, V_{\text{mãe}} = ?$$

$$M_{\text{trabalho}} = 2,5 \text{ mM}, V_{\text{trabalho}} = 100 \mu\text{L}$$

Preciso saber o quanto em volume em tenho que pegar da SOLUÇÃO MÃE e misturar em água milli-Q para obter uma SOLUÇÃO DE TRABALHO a 2,5 mM e num volume de 100 μL .

$$M_{\text{mãe}} \times V_{\text{mãe}} = M_{\text{trabalho}} \times V_{\text{trabalho}}$$

$$25 \text{ mM} \times V_{\text{mãe}} = 2,5 \text{ mM} \times 100 \mu\text{L}$$

$$V_{\text{mãe}} = 10 \mu\text{L}$$

Pegar $V_{mae} + V_{\text{água milliQ}}$ suficiente para completar 100 μ L.

10 μ L $V_{mae} + 90\mu$ L água milli-Q.

100 μ L de SOLUÇÃO DE TRABALHO a 2,5mM.

PREPARO DA AGAROSE

Para preparar o gel de agarose devemos saber o volume do suporte para gel da cuba de eletroforese que iremos usar.

Misturar os seguintes componentes, para obter TBE 1x:

100mL de TBE 10x + 900mL de água destilada

Armazenar em um frasco para meio de cultura.

Esta solução será empregada para preparo da agarose e para preencher a cuba de eletroforese.

PREPARO DO GEL DE AGAROSE CONCENTRAÇÃO 1%

Gel de agarose (Ultra Pure TM Agarose – Invitrogen #15510-019)

Fechar bem a bandeja com os vedantes.

Bandeja Pequena (30mL)

- 30mL de TBE 1%
- 0,30g de agarose.

Bandeja Grande (100mL)

- 100mL de TBE 1%
- 1g de agarose.

1. Colocar no microondas por 1 minuto. Ver se ficou transparente. Caso necessário colocar mais alguns segundos.
2. Esperar esfriar um pouco.

3. Colocar o brometo de etídio (CUIDADO MUITO TÓXICO)
4. Verter na bandeja.
5. Colocar o pente e esperar esfriar.

BROMETO DE ETÍDIO

CUIDADO É MUITO TÓXICO!!!

Preparar uma SOLUÇÃO DE TRABALHO de Brometo de Etídio a uma concentração de 0,5µg/mL.
Para um gel de 100mL, colocamos 50µL.

CUBA DE ELETROFORESE

1. A cuba está com TBE 1x.
2. Verificar a direção de corrida (NEGATIVO PARA POSITIVO)
3. Colocar o gel na cuba com os casulos voltados para o lado NEGATIVO.
4. Verificar se ele está coberto pela solução de TBE 1x.

PREENCHIMENTO DOS CASULOS COM A REAÇÃO DE PCR

1. SELEÇÃO DO MARCADOR

A seleção do marcador depende do tamanho da banda que você vai ter.

Marcador: 100bp DNA Ladder (Invitrogen cat nº 15628-019)

Misturar 3µL do Ladder com 2µL do x6 Loading Dye Solution em uma lâmina de vidro.
Colocar esta mistura no primeiro casulo e no casulo intermediário para que possam servir como controle.

2. COLOCAÇÃO DAS AMOSTRAS NA AGAROSE

Misturar em uma lâmina de vidro 1µL de Loading Dye Solution e 5µL da reação de PCR

3. FONTE DE ELETROFORESE

Programar a corrida para: 80 V e 120mA, por 1 hora a 1,5 hora.

<http://pcrfilme.vilabol.uol.com.br/>