

FUMIO MATOBA JÚNIOR

Detecção da microbiota de canais radiculares de dentes decíduos humanos com necrose pulpar e lesão periapical pelo método *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* e pela cultura microbiana, antes e após preparo biomecânico e uso de curativo de demora à base de hidróxido de cálcio associado à clorexidina

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontopediatria.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Izabel Yoko Ito

Ribeirão Preto - SP

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Matoba-Júnior, Fumio

Detecção da microbiota de canais radiculares de dentes decíduos humanos com necrose pulpar e lesão periapical pelo método *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* e pela cultura microbiana, antes e após preparo biomecânico e uso de curativo de demora à base de hidróxido de cálcio associado à clorexidina. Ribeirão Preto, 2006.

95 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Odontopediatria.

Orientador: Ito, Izabel Yoko

1. *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. 2. Microbiota 3. Dentes decíduos. 4. Curativo de demora. 5. Hidróxido de cálcio. 6. Clorexidina.

FUMIO MATOBA JÚNIOR

Detecção da microbiota de canais radiculares de dentes decíduos humanos com necrose pulpar e lesão periapical pelo método *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* e pela cultura microbiana, antes e após preparo biomecânico e uso de curativo de demora à base de hidróxido de cálcio associado à clorexidina

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Odontopediatria

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dados Curriculares

FUMIO MATOBA JÚNIOR

Nascimento	09 de abril de 1973 – Ituverava – SP
Filiação	Fumio Matoba Maria Pino Matoba
1992 – 1995	Curso de Graduação Universidade de Alfenas – UNIFENAS
2002 – 2004	Especialização em Odontopediatria Associação Odontológica de Ribeirão Preto – AORP
2004	Curso de Aperfeiçoamento no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP
2004	Curso de Aperfeiçoamento no Atendimento Odontológico a Bebês Normais e Especiais Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP
2004 – 2006	Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Odontologia Área de Concentração: Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus pais, *Fumio e Maria Matoba*,
que apesar da distância que nos separam,
sempre pude contar com o incentivo,
compreensão, apoio e amor para a
realização deste sonho. Esta vitória
não é minha, mas nossa. Nada seria
possível sem a ajuda de vocês.

A minha irmã, *Patrícia Pino Matoba*,
pelo amor e carinho. Por ser esta
pessoa maravilhosa, radiante e iluminada.

Amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora **Prof^á. Dr^a. Izabel Yoko Ito,**

Professora, não farei elogios, pois a senhora não precisa deles.

Prefiro lembrar os deliciosos momentos que tive ao seu lado

(guardados para sempre em minha memória). Nas aulas da especialização (nosso 1º contato), no boteco, tomando um chopp com a turma da especialização (a senhora de bonê, e como sempre, tirando fotos para depois dar para gente), na SBPqO, almoçando juntos no banquete do hotel Vaçance e mechendo o esqueleto no coquetel. Em Curitiba, quando fomos jantar com os professores após o congresso, as aulas da Pós e da graduação (excelentes, divertidas, inesquecíveis), os ovos de Páscoa, os sorvetes na geladeira após o almoço, o xanim, as caronas até em casa. E os presentes. Ah! Várias lembranças de suas viagens ao redor do mundo que guardo com o maior carinho.

Professora, foi um privilégio conhecê-la.

Muito obrigado por tudo.

Ao Prof. Dr. Paulo Nelson Filho,

Professor dedicado, conhecedor profundo da Odontopediatria.

Por mostrar como um verdadeiro professor deve atuar junto de seus alunos. Respeitoso, educado, paciente, sempre fornecendo todo seu conhecimento para o melhor desenvolvimento e aprendizado dos acadêmicos e Pós-graduandos. Obrigado pela ajuda neste trabalho.

À Prof^á. Dr^a. Léa Assed Bezerra da Silva,

Pelas aulas brilhantes, onde se vê todo seu ideal e amor à docência, por mostrar que o aluno deve entender e não decorar o assunto.

Professora dinâmica, justa, preocupada com o desenvolvimento da Odontologia.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa de sua Diretora, **Prof^á. Dr^a. Mariza Semprini**.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da coordenadora **Prof^á. Dr^a. Léa Assed Bezerra da Silva**.

Aos professores do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Adilson Thomazinho, Aldevina Campos de Freitas, Alexandra Mussolino de Queiroz, Gisele Faria, José Tarcísio de Lima, Kranya Victória, Díaz Serrano, Léa Assed Bezerra da Silva, Maria Bernadete Stuaní, Maria Conceição, Maria Cristina Borsatto, Mirian Aiko Nakane Matsumoto, Paulo Nelson Filho e Sađa Assed**, pelos ensinamentos acadêmicos.

À **Prof^á. Dr^a. Ana Paula Vieira Colombo**, do Laboratório de Microbiologia Oral da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela colaboração no processamento das amostras na técnica de Biologia Molecular.

À **Prof^á. Dr^a. Magda Feres** e à **Prof^á. Dr^a. Luciene Cristina**, do Centro de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão da Universidade de Guarulhos, pela ajuda no entendimento da técnica de biologia molecular.

À **Prof^á. Dr^a. Maria Cristina Borsatto**, por seus ensinamentos, pela alegria e sorriso contagiante.

Ao pessoal do laboratório, **Evandro Watanabe, Andresa Piacezzi Nascimento, Maraísa Verri Juliane Tanomaru, Stella Lippe**. Sem a ajuda de vocês, este trabalho não seria possível. A todos vocês, meu carinho e gratidão.

Aos amigos, **Renata Queiroz Vilela Lima, Soraya Cheier Dib, Denise Belúcio Ruvierre, Bruno Lobão Soares** que me ajudaram na elaboração deste trabalho. Valeu.

À **Marcel Lima Taça** pela estatística, aulas e lanches nos finais de tarde.

À turma do Mestrado, **Andréa Soares Ortolan**, **Adriana Sasso Stuaní**, **Francisco Wanderlei Garcia de Paula e Silva** e **Valéria Pontelli Navarro** pelo convívio harmonioso e respeitoso.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação, área de concentração em Odontopediatria, pela convivência.

À **Rejane Gomes Cavalheiro Mazer**, secretária do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social, por sua competência, atenção, carinho e ajuda nesta reta final. Obrigado.

Aos funcionários da Clínica Infantil, **Benedita Viana Rodrigues**, **José Aparecido Neves** e **Vera Ribeiro do Nascimento**, pelo profissionalismo, amizade e desprendimento com quem sempre me auxiliaram.

Às secretárias da Seção de Pós-Graduação **Isabel Crisitna Galino Sola** e **Regiane Cristina Moi Sacilotto** pela atenção, cordialidade e as caronas da **Isabel**.

Aos funcionários Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, **Fátima Aparecida Jacinto Daniel**, **Nilva Aparecida Afonso Ruggiero** e **Marco Antônio dos Santos** pela amizade e carinho com quem sempre me trataram.

Aos **pacientes** e seus **familiares**, pelo respeito, confiança e carinho que proporcionaram ao atendimento momentos de puro prazer e felicidade.

Ao **Julio César de Matos**, **Cláudia Regina Corrêa de Matos** e **Rosemary Alves** pela competência e dedicação na diagramação e impressão deste trabalho.

À **CAPES** – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO -----	11
2 PROPOSIÇÃO -----	17
3 MATERIAL E MÉTODO -----	19
3.1 PROCEDIMENTOS CLÍNICOS-----	21
3.2 PRIMEIRA COLHEITA MICROBIOLÓGICA (PRÉ-TRATAMENTO)-----	22
3.3 SEGUNDA COLHEITA MICROBIOLÓGICA (PÓS-TRATAMENTO)-----	25
3.4 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS DA CULTURA MICROBIANA -----	26
3.5 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS DO MÉTODO MOLECULAR -----	
4 RESULTADOS -----	44
5 DISCUSSÃO-----	55
6 CONCLUSÃO -----	62
REFERÊNCIAS -----	64
APÊNDICES -----	80
ANEXOS -----	89

RESUMO

Matoba-Júnior, F. **Detecção da microbiota de canais radiculares de dentes decíduos humanos com necrose pulpar e lesão periapical pelo método *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* e pela cultura microbiana, antes e após preparo biomecânico e uso de curativo de demora à base de hidróxido de cálcio associado à clorexidina.** 2006. 95f. Dissertação – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2006.

O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vivo*, por meio da técnica de cultura e do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, a microbiota de 38 canais radiculares de dentes decíduos humanos portadores de necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente, em crianças de 3 a 7 anos de idade, antes e após preparo biomecânico e uso de curativo de demora com pasta à base de hidróxido de cálcio (pasta Calen[®]) associada ao digluconato de clorexidina. Após a abertura coronária, foi efetuada a 1ª colheita microbiológica de cada canal radicular, por meio do uso de lima endodôntica e cones de papel absorvente. A técnica de biologia molecular foi efetuada utilizando 35 sondas genômicas de DNA. Após o preparo biomecânico e o curativo de demora mantido por 14 dias, este foi removido, e o dente restaurado com sistema resinoso (canal vazio), por 7 dias, quando foi efetuada a 2ª colheita, de maneira similar à primeira. Os resultados foram submetidos ao teste t de Student pareado. Pela técnica de cultura, houve diferenças estatisticamente significante entre os momentos pré e pós com relação aos microrganismos anaeróbios, aeróbios e estreptococos do grupo mutans. Após o preparo biomecânico e manutenção do curativo de demora por 14 dias, houve redução do número de unidades formadoras de colônia entre todos os grupos. Pela técnica de biologia molecular, não houve diferenças estatisticamente significante entre os momentos pré e pós com relação aos grupos bacterianos e aos escores. *Neisseria mucosa* e *Fusobacterium nucleatum* *sit polymorphum* foram as espécies mais prevalentes tanto no instante pré como pós na biologia molecular. Assim, pôde-se concluir que nos canais radiculares de dentes decíduos humanos com necrose pulpar e lesão periapical ocorre a presença de diversas espécies e grupos bacterianos, caracterizando uma infecção polimicrobiana.

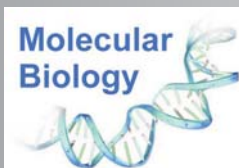
Palavras-chave: *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, Microbiota, Dentes decíduos, Curativo de demora, Hidróxido de cálcio, Clorexidina.

ABSTRACT

Matoba-Júnior, F. **Detection of microbiota in the root canals of human deciduous teeth with pulp necrosis and periapical lesion by the *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* method and by microbial culture, before and after biomechanical preparation and utilization of calcium hydroxide root canal dressing associated with chlorhexidine.** 2006. 95 f. Dissertation – Ribeirão Preto Dental School, University of São Paulo, 2006.

This study evaluated, *in vivo*, by the culture technique and the *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* technique, the microbiota of 38 root canals of human deciduous teeth with pulp necrosis and radiographically visible periapical lesion in children aged 3 to 7 years, before and after biomechanical preparation and utilization of calcium hydroxide root canal dressing (Calen[®] paste) associated with chlorhexidine digluconate. After coronal opening, the first microbiological collection of each root canal was performed by utilization of an endodontic file and absorbent paper points. The molecular biology technique was applied using 35 genomic DNA probes. After biomechanical preparation and maintenance of the root canal dressing for 14 days, it was removed and the tooth was restored with resin system (empty root canal) for 7 days, when the second collection was performed in the same way. The results were submitted to the paired Student's t test. According to the culture technique, there were statistically significant differences between both periods with regard to anaerobic and aerobic microorganisms and mutans *Streptococcus* group. After biomechanical preparation and maintenance of the root canal dressing for 14 days, the number of colony forming units was reduced for all groups. According to the molecular biology technique, there were no statistically significant differences between periods with regard to the bacterial groups and scores. *Neisseria mucosa* and *Fusobacterium nucleatum* sit *polymorphum* were the predominant species at both periods in the molecular biology analysis. Thus, it was concluded that the root canals of human deciduous teeth with pulp necrosis and periapical lesion present several species and bacterial groups, thus characterizing a polymicrobial infection.

Key words: *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, Microbiota, Deciduous teeth, Root canal dressing, Calcium hydroxide, Chlorhexidine.



1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

De acordo com Kakehashi et al. (1965), os microrganismos presentes nos canais radiculares desempenham um papel de fundamental importância no desenvolvimento de lesões periapicais. Esta microbiota tem sido amplamente avaliada em dentes permanentes com necrose pulpar (Sundqvist, 1992; Tani-Ishii et al., 1994; Abou-Rass e Bogen, 1998; Jung et al., 2001; Fouad et al., 2002; Pinheiro et al., 2003; Rôças et al., 2003; Gomes et al., 2004; Siqueira et al., 2004; Nair et al., 2005; Saito et al., 2006; Sakamoto et al., 2006).

Ainda que mais de 300 espécies microbianas tenham sido isoladas/detectadas nas infecções endodônticas, um grupo mais restrito, composto de 15 a 30 espécies, tem sido envolvido nas infecções endodônticas (Siqueira, 2002; Siqueira e Rôças, 2005). Geralmente, ocorre a interação entre 4 a 7 espécies bacterianas (van Winkelhoff, 1985; Baumgartner e Falkler Jr., 1991).

Até a década de 1970, a maioria dos microrganismos isolados dos canais radiculares era composta por aeróbios e anaeróbios facultativos (Shovelton, 1964; Seltzer, 1988; Assed et al., 1996). Quando técnicas de cultura estritamente anaeróbias passaram a ser utilizadas, decorrentes do avanço da Ciência e Tecnologia nos últimos 20 anos (Sundqvist, 1992), observou-se que os microrganismos predominantes nas infecções do sistema de canais radiculares dos dentes permanentes com lesão periapical crônica são os anaeróbios obrigatórios (Kantz e Henry, 1974; Sundqvist, 1976; Seltzer, 1988; Haapasalo, 1989; Bergenholtz e Crawford, 1989; Baumgartner e Falkler Jr., 1991; Tronstad, 1992; Le Goff et al., 1997; Abou-Rass e Bogen, 1998; Onçag et al., 2003; Socransky et al., 2004; Siqueira et al., 2004), particularmente os Gram-negativos (Tani-Ishii et al., 1994; Assed et al., 1996). Estudos longitudinais realizados em animais de laboratório têm demonstrado que, com o tempo, a proporção de anaeróbios obrigatórios aumenta, enquanto a de microrganismos facultativos diminui (Fabricius et al., 1982; Yamasaki et al., 1992; Tani-Ishii et al., 1994).

Além disso, dentes com necrose pulpar e lesão periapical crônica visível radiograficamente apresentam microrganismos disseminados por todo o sistema de canais radiculares, incluindo a luz do canal radicular, canais acessórios, laterais e secundários, túbulos dentinários, ramificações do delta apical, forame apical, áreas de reabsorção do cemento e tecidos periapicais (Shovelton, 1964; Hobson, 1970; Byström et al., 1987; Nair et al., 1990; Leonardo et al., 2002; Leonardo, 2005).

As bactérias Gram-negativas apresentam um extenso arsenal de virulência, o qual inclui produtos e subprodutos do metabolismo como enzimas proteolíticas, citotoxinas e hemolisinas (Holt e Bramanti, 1991; Socransky e Haffajee, 1991), além de componentes de sua parede celular como as endotoxinas (lipopolissacarídeos - LPS) e proteoglicanas (McGee et al., 1992; Barthel et al., 1997; Buck et al., 2001; Silva et al., 2004).

O LPS é liberado durante a ocorrência de estresse celular, multiplicação ou morte bacteriana, estimulando a reabsorção óssea *in vitro* (Hausmann et al., 1970; Nair et al., 1983; Hong et al., 2004) e *in vivo* (Umezue et al., 1989; Silva et al., 2002; Nelson-Filho et al., 2002; Hong et al., 2004) ocasionando, também, uma reação inflamatória (Dahlen e Bergenholtz, 1980; Rietschel e Brade, 1992; Silva et al., 2002; Silva et al., 2004). Assim, nos dias atuais a terapêutica endodôntica adotada não deve ter como objetivo apenas reduzir e/ou eliminar a infecção do sistema de canais radiculares e prevenir a reinfecção, mas também inativar a endotoxina (Silva et al., 2002; Nelson-Filho et al., 2002; Silva et al., 2004; Leonardo, 2005; Assed, 2005).

Nos últimos 10 anos, métodos moleculares têm sido utilizados para detecção de espécies microbianas não cultiváveis ou que são difíceis de identificar por métodos convencionais de cultura (Conrads et al., 1997; Munson et al., 2002; Siqueira et al., 2002a; Baumgartner et al., 2003; Siqueira et al., 2004; de Souza et al., 2005; Siqueira e Rôças, 2005; Saito et al., 2006; Sakamoto et al., 2006). Estes métodos fazem a identificação das espécies bacterianas sem a necessidade de cultivá-las, isolá-las ou utilizar testes bioquímicos (Sunde et al., 2000; Siqueira et al., 2000a), além de evidenciar a ocorrência de espécies não cultiváveis e, até então, não caracterizadas (Siqueira, 2003; Siqueira e Rôças, 2005; Saito et al., 2006; Sakamoto et al., 2006).

Os métodos moleculares, que incluem o *Dot-Blot Hybridization* (Jung et al., 2000, 2001), a técnica da *Reação de Polimerase em Cadeia – PCR* (Mullis et al., 1986; Munson et al., 2002; Siqueira et al., 2004), o *Nested - PCR* (Rôças et al., 2003; Baumgartner et al., 2003; Siqueira e Rôças, 2003) o *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* (Socransky et al., 1994; Moraes et al., 2002; Siqueira et al., 2002b), entre outros, podem trazer novas informações a respeito da prevalência de microrganismos presentes nas infecções de canais radiculares (Siqueira et al., 2000a), levando a instituição de terapêuticas direcionadas e, portanto, mais eficazes. Algumas espécies bacterianas nunca antes isoladas de canais radiculares de dentes infectados foram detectadas por técnicas moleculares. É o caso da *Tannerella forsythia* (Conrads et al., 1997; Gonçalves e Mouton, 1999; Roças et al., 2001; Siqueira et al., 2001b;

Jacobovitz, 2003), do *Treponema denticola* (Siqueira et al., 2000b; Roças et al., 2001), *Treponema socranskii* (Siqueira et al., 2001b; Jung et al., 2001), *Treponema vincentii* (Roças et al., 2003), *Treponema maltophilum* (Jung et al., 2001; Siqueira e Rôças, 2003b), *Treponema lecithinolyticum* (Siqueira e Rôças, 2003b), *Treponema parvum* (Rôças e Siqueira, 2005), *Prevotella tanneriae* (Xia et al., 2000), *Dialister pneumosintes* (Siqueira e Rôças, 2002; Sakamoto et al., 2006), *Dialister invisus* (Munson et al., 2002; Siqueira e Rôças, 2005; Saito et al., 2006; Sakamoto et al., 2006), *Olsenella uli* (Munson et al., 2002; Siqueira e Rôças, 2005) e *Filifactor alocis* (Siqueira e Rôças, 2003a; Saito et al., 2006), além de outras espécies bacterianas exigentes, como é o caso da *Porphyromonas endodontalis* (Machado de Oliveira et al., 2000; Siqueira et al., 2001a), *Slackia exigua* (Hashimura et al., 2001), *Mogibacterium timidum* (Hashimura et al., 2001) e *Eubacterium saphenum* (Hashimura et al., 2001).

O método *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foi introduzido em 1994 por Socransky et al., e se constitui em um método para hibridação de múltiplas amostras de DNA contra múltiplas sondas de DNA, sobre um único suporte de membrana. Assim, este método permite determinar, simultaneamente, a presença de múltiplas espécies bacterianas, em uma única ou em várias amostras clínicas (Socransky et al., 1994), mesmo que estas espécies bacterianas estejam em baixa proporção. A amplificação do DNA não é necessária para efetuar a identificação (Sunde et al., 2000; Gatti et al., 2000). Poucos estudos foram realizados com o uso deste método para investigar a microbiota de infecções endodônticas em dentes permanentes (Gatti et al., 2000; Siqueira et al., 2000a, 2001b, 2002a, 2002b; Sunde et al., 2000; Zehnder, 2001; Moraes et al., 2002; de Souza et al., 2005).

Com relação aos dentes decíduos, há poucos trabalhos publicados avaliando a microbiota de dentes decíduos portadores de necrose pulpar e lesão periapical crônica utilizando técnicas de cultura ou microscopia óptica após coloração de Brown & Brenn, e apenas um trabalho empregando a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* em dentes decíduos (Ruvierre, 2005), relatando que a microbiota é semelhante àquela encontrada em dentes permanentes (Cohen et al., 1960; Marsh e Largent, 1967; Hobson, 1970; Tomić-Karovic e Jelinek, 1971; Brook et al., 1981; Toyoshima et al., 1988; Sato et al., 1993; Godoy, 1999; Souza-Gugelmim et al., 2001; Faria, 2001; Onçag et al., 2003; Pazelli et al., 2003), ou seja, predominantemente anaeróbia Gram-negativa, disseminada por todo o sistema de canais radiculares e áreas de rizólise (Godoy, 1999).

No que tange à terapia endodôntica, principalmente em casos com necrose pulpar e lesão crônica periapical visível radiograficamente, a literatura mostra que a limpeza e

modelagem químico-mecânica reduzem o número de bactérias nos canais radiculares (Byström e Sundqvist, 1981; Gomes et al., 1996; Peters et al., 2002; Zerella et al., 2005). Porém, é impossível obter a completa desinfecção em todos os casos (Byström e Sundqvist, 1981; Orstavik et al., 1991; Peters et al., 2002; Chavéz de Paz et al., 2003; Ferrari et al., 2005; Nair et al., 2005). Devido a isto, bactérias remanescentes têm sido os responsáveis pelo fracasso endodôntico (Sjögren et al., 1990; Molander et al., 1998; Sundqvist et al., 1998). Estes microrganismos remanescentes, no entanto, podem ser controlados pela colocação de um curativo de demora entre sessões (Byström et al., 1985; Orstavik et al., 1991; Chong e Pitt Ford, 1992). A escolha de um agente antimicrobiano como medicação intracanal é tão importante quanto à instrumentação e irrigação dos canais na remoção de patógenos (Tang et al., 2004).

Em relação aos diferentes medicamentos endodônticos utilizados, o hidróxido de cálcio, desde sua introdução por Hermann (1920), tem sido a medicação mais estudada, discutida e empregada como curativo de demora entre sessões devido a propriedades que incluem ação antibacteriana (Georgopoulou et al., 1993; Assed, 1994; Leonardo, 2005), ação anti-exsudativa (Heithersay, 1970; Allard et al., 1987), ação indutora da formação de tecido mineralizado (Schroder, 1985, Silva et al., 1997), biocompatibilidade (Silva, 1988; Holland e Souza, 1998; Nelson-Filho et al., 1999; Leonardo, 2005), propriedade de dissolução de tecidos necróticos (Hasselgren et al., 1988) e de hidrolisar o LPS bacteriano *in vitro* (Safavi e Nichols, 1994; Barthel et al., 1997; Zuccolotto, 2003) e *in vivo* (Silva et al., 2002; Nelson-Filho et al., 2002; Tanomaru et al., 2003; Oliveira et al., 2005), entre outros.

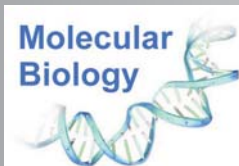
Entre os curativos de demora à base de hidróxido de cálcio disponíveis, está a pasta Calen[®] (S. S. White - Artigos Dentários Ltda. - Rio de Janeiro - RJ - Brasil). Um produto à base de hidróxido de cálcio associado a um veículo viscoso, o polietilenoglicol "400", que mantém o hidróxido de cálcio por mais tempo na área desejada, prolongando sua ação (Benatti Neto, 1984; Leonardo et al., 1993; Leonardo, 2005). Apresenta pH em torno de 12,4 (Silva, 1988; Nelson-Filho, 1996), diminui a solubilização da pasta (Benatti Neto, 1984) e aumenta sua penetrabilidade na dentina radicular (Leonardo et al., 1993). Além disso, essa pasta apresenta elevada atividade antibacteriana (Leonardo, 2005) e é biocompatível (Leonardo et al., 1993; Nelson-Filho et al., 1999).

No entanto, diferentes substâncias têm sido associadas ao hidróxido de cálcio, na tentativa de melhorar algumas de suas propriedades como radiopacidade, viscosidade,

escoamento, espectro de ação antimicrobiano, velocidade de dissociação iônica e outras propriedades físico-químicas, favorecendo também as condições clínicas para seu emprego (Basrani et al., 2004; Leonardo, 2005).

Entre estas substâncias, destaca-se o gluconato de clorexidina (CHX), agente antimicrobiano do grupo das biguanidas, e que tem sido pesquisado como uma nova alternativa de associação ao hidróxido de cálcio no uso para curativo de demora (Delgado, 2002; Rabêlo, 2003; Pazelli et al., 2003; Rosenthal et al., 2004; de Rossi et al., 2005; Zerella et al., 2005), visando aumentar sua ação antibacteriana contra microrganismos resistentes ao hidróxido de cálcio (Heling et al., 1992; White et al., 1997; Siqueira et al., 1998; Waltimo et al., 1999; Basrani et al., 2002; Almyroudi et al., 2002; Evans et al., 2003; Podbielski et al., 2003; Basrani et al., 2004; Schäfer e Bössmann, 2005). Embora isoladamente não seja capaz de inativar o LPS bacteriano (Aibel e Stevens, 1999; Buck et al., 2001; Silva et al., 2004) e não apresentar a capacidade de dissolução dos tecidos (Zehnder et al., 2003; Naenni et al., 2004; Okino et al., 2004), a clorexidina apresenta substantividade (Jenkins et al., 1988; White et al., 1997; Leonardo et al., 1999; Komorowski et al., 2000; Lenet et al., 2000; Rosenthal et al., 2004), biocompatibilidade (Southard et al., 1989; Delgado, 2002; Tanomaru-Filho et al., 2002; Dammaschke et al., 2005), baixa toxicidade (Loe et al., 1970; Cannell, 1981; Greenstein et al., 1986; Jeansonne e White, 1994; Yesilsoy et al., 1995) e amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, aeróbios, anaeróbios, leveduras e fungos (Heling et al., 1992; Vahdaty et al., 1993; Jeansonne e White, 1994; Schäfer e Bössmann, 2001; Vianna et al., 2004). Além disto, a clorexidina apresenta ser eficaz mesmo em baixas concentrações contra os microrganismos mais frequentemente encontrados nas infecções endodônticas (Ohara et al., 1993; D’Arcangelo et al., 1999; Ferreira et al., 2002; do Amorim et al., 2004). A associação do hidróxido de cálcio a CHX resulta em um efeito antimicrobiano sinérgico maior que o uso isolado do hidróxido de cálcio (Waltimo et al., 1999; Evans et al., 2003; Podbielski et al., 2003; Rabêlo, 2003; Zerella et al., 2005). Estudos *in vitro* foram realizados utilizando esta associação sem observar efeitos adversos sobre a solubilidade ou atividade de ambas as substâncias (Geurtsen e Leyhausen, 1997; Fava e Saunders, 1999; Rabêlo, 2003; Podbielski et al., 2003; Basrani et al., 2004).

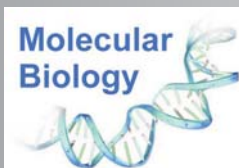
Pelo exposto, a análise da microbiota de dentes decíduos humanos portadores de necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente por métodos moleculares e cultura microbiana, pré e pós-tratamento, são necessários.



2 Proposição

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a microbiota de canais radiculares de dentes decíduos humanos portadores de necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* e pela cultura microbiana, antes e após preparo biomecânico e uso de curativo de demora com pasta à base de hidróxido de cálcio (pasta Calen[®]) associada ao digluconato de clorexidina.



3 Material e Método

3 MATERIAL E MÉTODO

Após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo nº 2004.1.571.58.5 – Anexo A) iniciou-se a seleção dos casos.

CrITÉRIOS de Inclusão

Participaram da pesquisa pacientes de ambos os gêneros, com idade entre 3 a 7 anos, com boa saúde geral, que compareceram à Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para tratamento odontológico e que não tinham sido submetidos à antibioticoterapia há pelo menos 3 meses.

Os responsáveis pelos pacientes foram informados a respeito da pesquisa, incluindo seus objetivos, riscos e benefícios. Aqueles que concordaram com a participação do menor no estudo, assinaram um Termo de Consentimento livre e esclarecido (Anexo B). Em seguida, os pacientes foram avaliados quanto à sua saúde geral por meio de uma anamnese detalhada (Apêndice A). No momento da realização da pesquisa, os pacientes não apresentavam alterações sistêmicas que possam interferir no estudo.

Foram selecionados 38 canais radiculares de dentes decíduos (4 incisivos laterais superiores, 3 molares superiores e 2 molares inferiores) portadores de necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente na região de osso da bi ou trifurcação e/ou região periapical (**Figura 1-A**).

Os dentes selecionados apresentavam, ao exame clínico e radiográfico, lesões de cárie de extensão e profundidade variadas (**Figura 1-B**), porém com estrutura coronária que possibilitasse o isolamento do campo operatório e posterior restauração, além de raízes íntegras ou apresentando no máximo um terço de rizólise, ausência de bolsa periodontal, necessidade de tratamento endodôntico e sem intervenção prévia nos canais radiculares. Foram excluídos os dentes com necessidade de tratamento endodôntico em decorrência de traumatismos dentais.

3.1 PROCEDIMENTOS CLÍNICOS

Para a realização do exame radiográfico foram utilizados filmes periapicais Ultraspeed (Eastman Kodak Comp. - Rochester - New York - USA) de tamanho 0 ou 2, conforme a abertura bucal do paciente, aparelho de RX (Dabi Atlante Indústrias Médico-Odontológicas Ltda - Ribeirão Preto - SP - Brasil), com 70 KVp e 10mA, com tempo de exposição de 0,6 segundos. As radiografias foram reveladas pelo método tempo/temperatura e arquivadas em cartelas de plástico.

Todo o instrumental e material utilizados nos procedimentos operatórios foram esterilizados em autoclave a 120°C, durante 20 minutos (Ito et al., 1998).

Após a anti-sepsia da cavidade bucal (**Figura 1-C**) com 5,0 - 10,0ml de solução de digluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard - Colgate-Palmolive Ind. Brasileira - Osasco - SP - Brasil), sob a forma de bochecho por 1 minuto, ou sob a forma de embrocção com gaze em crianças sem coordenação motora para a realização do bochecho, foi realizada a anestesia local com Mepivacaína a 2% (DFL Ind. e Comércio Ltda - Rio de Janeiro - RJ - Brasil) e o isolamento com lençol de borracha - **Figura 1-D** - (Madeitex Ind. e Comércio de Artefatos de Látex Ltda - São José dos Campos - SP - Brasil), seguidos de anti-sepsia do campo operatório com gaze esterilizada embebida em solução de digluconato de clorexidina a 2% (Farmácia - Ensino, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Ribeirão Preto - São Paulo - Brasil).

Inicialmente, foi removido todo o tecido cariado por meio de escavadores de dentina afiados (**Figura 1-E**) e brocas esféricas lisas em baixa rotação, de diâmetro compatível com o tamanho da cavidade e realizado nova anti-sepsia do campo operatório com digluconato de clorexidina a 2%. A cirurgia de acesso aos canais radiculares foi efetuada utilizando pontas diamantadas esféricas, de diâmetro compatível com o tamanho do dente (KG Sorensen - Ind. e Comércio - São Paulo - SP - Brasil) em alta rotação e broca Endo - Z (Les Fils d' August - Maillefer - Suíça) para alta rotação, refrigeradas a água e ar. O desgaste compensatório (**Figuras 1-F e G**) foi realizado com pontas diamantadas tronco-cônicas com ponta inativa número 3080 ou 3082 (KG Sorensen - Ind. e Comércio - São Paulo - SP - Brasil), em alta rotação, sob refrigeração. Visando eliminar os detritos da câmara pulpar, originados durante a cirurgia de acesso, foi efetuada a irrigação/sucção com soro fisiológico esterilizado (Disciplina de Microbiologia - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP - USP). Foi realizada então, a primeira colheita para exame microbiológico (1ª amostra microbiológica).

3.2 PRIMEIRA COLHEITA MICROBIOLÓGICA (PRÉ-TRATAMENTO)

Durante a colheita do material dos canais radiculares, se estes estivessem secos eram inundados com soro fisiológico esterilizado, para facilitar a colheita do material. Com base na radiografia para diagnóstico, uma lima tipo K (Dentsply - Maillefer Instruments S.A. - Ballaigues - Suíça) de calibre compatível com o diâmetro do canal radicular (**Figura 1-H**) foi posicionada cuidadosamente, de forma progressiva no sentido coroa-ápice, sem pressão, a 1mm aquém do ápice radiográfico ou do limite do bisel de rizólise. Foi realizado um discreto movimento de limagem sobre as paredes dentinárias, com a finalidade de remover resíduos de dentina contaminados. A parte ativa da lima contendo as raspas de dentina foi seccionada (**Figura 1-I**) com alicate de corte (Golgran) esterilizado e colocada em um tubo de 12x125mm contendo 2,5ml de Fluido de Transporte Reduzido - RTF (Syed e Loesche, 1972). Em seguida, foram introduzidos seqüencialmente, em cada canal radicular, 2 cones de papel absorvente (EndoPoints), esterilizados, de número compatível com o diâmetro do canal radicular e no mesmo limite alcançado pela lima tipo K (**Figura 1-J**). Após manutenção no canal radicular por 1 minuto, cada cone foi removido e transferido para o mesmo tubo contendo a lima (**Figuras 1-K e L**) o qual, em seguida, foi encaminhado para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas – FCFRP-USP para processamento. Esta primeira colheita tem como objetivo avaliar o nível de bactérias anaeróbias e aeróbios totais, anaeróbios pigmentados de negro e *Streptococcus* do grupo mutans (SGM).

Após a colheita do material, os dentes foram submetidos ao tratamento endodôntico que será descrito a seguir.

Preparo biomecânico dos canais radiculares

Obtida a primeira amostra, foi realizada a neutralização progressiva do conteúdo séptico-tóxico de acordo com a técnica clássica, preconizada por Leonardo (2005), no sentido coroa-ápice sem pressão. As limas tipo K, de número compatível com o diâmetro do canal, foram progressivamente introduzidas no canal radicular, associadas a uma copiosa irrigação/aspiração/inundação com solução de hipoclorito de sódio titulada a 2,5% (Solução de Labarraque), com pH 12,0 (Farmácia de Manipulação DaTerra – Ribeirão Preto – SP - Brasil), acondicionada em tubetes de anestésico esterilizados, mantidos em recipiente fechado, ao abrigo de luz, à temperatura de 4°C durante no máximo 1 mês, conforme sugerido

por Piskin e Turkun (1995). A solução foi introduzida no canal radicular com seringa Carpule (S. S. White - Artigos Dentários Ltda. - Rio de Janeiro - RJ - Brasil), provida de agulha descartável curta calibre 30G (Gengibrás - 27G Ibras CBO - Ind. Brás. - São Paulo - SP - Brasil).

A seguir, com base na radiografia para diagnóstico, e com uma lima tipo K em posição situada a 3,0mm aquém do ápice radiográfico ou do limite do bisel de rizólise, nova tomada radiográfica foi efetuada, para a determinação do Comprimento Real do Dente (CRD). Foi então realizada a odontometria, situada a 1,0mm aquém do ápice radiográfico ou do limite do bisel de rizólise, ou seja, no Comprimento Real de Trabalho (CRT). O conteúdo séptico/tóxico do restante do canal foi neutralizado e removido de acordo com o CRD, com auxílio do Instrumento Apical Foraminal (IAF), que é o primeiro instrumento que penetra no CRD e fica justo na parede do canal, fazendo o desbridamento foraminal.

O preparo biomecânico foi realizado por meio da técnica Escalonada com Recuo Progressivo Anatômico, com limas tipo K, utilizadas seqüencialmente, (a primeira mais três limas), iniciando-se com a identificação da primeira lima que se prender às paredes dentinárias ao nível apical no CRT (Instrumento Apical Inicial - IAI). A instrumentação foi acompanhada de abundante irrigação/aspiração/inundação com solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, em um volume de 3,6ml a cada troca de instrumento, no mínimo até a lima 35. A seguir, foi utilizado o IAF para a remoção de possíveis raspas de dentina contaminada compactadas a esse nível.

Como “toalete final” do canal radicular, foi efetuada a secagem dos canais radiculares por meio de aspiração e uso de cones de papel absorvente esterilizados, seguida da aplicação de solução de ácido etilenodiaminotetracético a 14,3%, tamponado em pH 7,4 (EDTA - Odahcan Herpo Produtos Dentários Ltda. - Rio de Janeiro - RJ - Brasil), acondicionado em tubetes de anestésico autoclavados, até que todo o canal radicular fosse preenchido. O EDTA foi agitado com uma lima tipo K por três minutos no CRT, com movimentos circulares e de vaivém e, em seguida, neutralizado com nova irrigação com 3,6ml de solução de hipoclorito de sódio a 2,5%. A última irrigação foi efetuada com 3,6ml de solução salina esterilizada, a fim de evitar a ocorrência de reação entre o hipoclorito de sódio e a clorexidina contida no curativo de demora, com provável escurecimento dental. Foi então efetuada a secagem dos canais, por meio de aspiração e uso de cones de papel absorvente esterilizados, compatíveis com o último instrumento utilizado (Instrumento Memória).

Curativo de demora

Como curativo de demora foi utilizada uma pasta à base de hidróxido de cálcio (pasta Calen[®] - S. S. White - Artigos Dentários Ltda. - Rio de Janeiro - RJ - Brasil) associada à solução de gluconato de clorexidina (CHX) a 1,0%, preparada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. De acordo com o fabricante, a pasta Calen[®] apresenta a seguinte composição por tubete:

Hidróxido de cálcio p. a.....	2,5g
Óxido de zinco p. a.....	0,5g
Colofônio.....	0,05g
Polietileno glicol “400”.....	0,05g

Para o preparo da pasta Calen[®] - CHX a 1,0%, foram pesados 10,0g da pasta Calen[®] em balança eletrônica de precisão (Modelo AL 500 - Marte balanças, equipamentos e aparelhos de precisão Ltda.), e pipetados 0,5ml de solução de digluconato de clorexidina a 20,0% (Procedência: Índia; Lote: 3CG099; Validade: 7-2006).

As substâncias foram misturadas e homogeneizadas em placa de vidro esterilizada, utilizando uma espátula número 36, também esterilizada, em câmara de fluxo laminar, no Laboratório da Disciplina de Microbiologia - FCFRP-USP. A seguir, a pasta resultante foi acondicionada em tubetes de anestésico de vidro autoclavados, e mantida em geladeira.

Os canais radiculares foram preenchidos com esta pasta por meio de seringa especial com êmbolo rosqueável (ML - S. S. White - Artigos Dentários Ltda. - Rio de Janeiro - RJ - Brasil), provida de agulha longa calibre 27G, com tope de borracha na medida do CRT (**Figura 1-M e N**). Foi realizado um pequeno extravasamento da pasta para os tecidos periapicais, por meio do posicionamento da agulha ao nível do forame apical e pela suave compressão com mecha de algodão esterilizada na entrada do canal radicular, objetivando atingir o biofilme bacteriano apical. O completo preenchimento dos canais radiculares com a pasta, bem como o ligeiro extravasamento, foi confirmado radiograficamente e, em seguida, colocado uma mecha de algodão esterilizada na entrada dos canais radiculares e uma base de cimento de ionômero de vidro (Vidrion F - S. S. White - Artigos Dentários Ltda. - Rio de Janeiro - RJ - Brasil). O dente foi restaurado com sistema resinoso (Single Bond - 3M ESPE; Resina composta Z-100 - 3M), utilizando-se a técnica de inserção por incremento e tempo de fotopolimerização de 40 segundos por camada (**Figura 1-O e P**).

Decorridos 14 dias da colocação do curativo de demora, sob nova condição de anestesia, isolamento absoluto e anti-sepsia, foi removido o selamento coronário e em seguida o curativo de demora por meio de abundante irrigação/aspiração com solução salina esterilizada, coadjuvada com o último instrumento utilizado no preparo biomecânico dos canais radiculares (Instrumento Memória), no CRT, e com o IAF, no CRD. Na seqüência, os canais radiculares foram secos por meio de aspiração, complementados com o uso de cones de papel absorvente esterilizados. Os canais radiculares foram mantidos vazios, com a colocação de uma mecha de algodão esterilizada na câmara pulpar efetuando-se, em seguida, uma nova restauração de resina composta, da mesma maneira descrita anteriormente.

3.3 SEGUNDA COLHEITA MICROBIOLÓGICA (PÓS-TRATAMENTO)

Após 7 dias de manutenção dos canais radiculares vazios, foram realizados novamente os procedimentos de anestesia local, isolamento do campo operatório, anti-sepsia e remoção da restauração, a fim de efetuar a segunda colheita (2ª amostra microbiológica), de maneira similar à descrita para a primeira. Esta segunda colheita tem como objetivo a identificação e contagem de microrganismos, a fim de avaliar a eficácia do preparo biomecânico e do curativo de demora com pasta Calen[®] associada ao digluconato de clorexidina.

Após a segunda colheita, foi efetuada a reinstrumentação do canal radicular por meio do último instrumento utilizado no preparo biomecânico (Instrumento Memória). O canal radicular foi então submetido a abundante irrigação/aspiração com solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, secagem, preenchimento com solução de EDTA agitada por 3 minutos, nova irrigação com hipoclorito de sódio a 2,5%, secagem por meio de aspiração, complementadas com cones de papel absorvente esterilizados, e obturação definitiva dos canais radiculares com pasta Calen[®] espessada com o pó do óxido de zinco, de acordo com a técnica descrita por Silva e Leonardo (1995) e Assed (2005). Após novo exame radiográfico, foi colocada uma camada de cimento de hidróxido de cálcio (Dycal - Dentsply Indústria e Comércio Ltda. - Petrópolis - RJ - Brasil) sobre a furca e entrada dos canais radiculares, seguida de uma base de cimento de ionômero de vidro (Vidrion F - S. S. White - Artigos Dentários Ltda. - Rio de Janeiro - RJ - Brasil). Os dentes posteriores foram restaurados com amálgama de prata (Velvalloy - S. S. White - Artigos Dentários Ltda. - Rio de Janeiro - RJ - Brasil) e os dentes anteriores restaurados com sistema resinoso (Single Bond - 3M ESPE; Resina composta Z-100 - 3M).

3.4 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS DA CULTURA MICROBIANA

Fluido de Transporte Reduzido (RTF)

O RTF é uma solução utilizada para o transporte de material biológico para o processamento microbiológico. Preparado de acordo com Syed e Loesche (1972) apresenta a seguinte composição:

Solução salina 1.....	75,0ml
Solução salina 2.....	75,0ml
Carbonato de sódio (Merck) solução a 8,0%.....	5,0ml
Ditiotreitol (Sigma-D/0632) solução a 1%.....	20,0ml
Água destilada..... qsp.....	1000,0ml

Solução salina 1

Fosfato dipotássico.....	Reagen.....	0,6g
Água destilada.....	qsp.....	100,0ml

Solução salina 2

Cloreto de sódio.....	Merck.....	2,0g
Fosfato monopotássico.....	Merck.....	0,6g
Sulfato de amônio.....	Reagen.....	2,0g
Sulfato de magnésio.....	Merck.....	0,25g
Água destilada.....	qsp.....	100,0ml

Volumes suficientes de cada uma das soluções foram colocados em cálices, nos quais água destilada foi adicionada até completar 1000ml, homogeneizados e distribuídos em tubos de ensaio de 12x125mm, em volumes de 2,0ml, e esterilizados em autoclave a 120°C, durante 20 minutos. Após a esterilização, os tampões de algodão foram substituídos por rolhas de borracha esterilizadas, com as soluções ainda quentes, evitando assim a reoxidação. Estas soluções foram conservadas à temperatura ambiente e ao abrigo de luz.

Meios de cultura

Ágar Sangue (As)

Tryptic Soy Agar (Difco) – Tsa

Digesto pancreático de caseína.....	15,0g
Digesto enzimático de soja.....	5,0g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Ágar.....	15,0g
Água destilada.....	1000,0ml

Para o preparo deste meio, foram adicionados 500,0ml de água destilada a 40,0g de *Tryptic Soy Agar* (Difco), em balão de 1000,0ml, autoclavada a 120°C durante 20 minutos. Após o resfriamento até aproximadamente 50°C, foram adicionados, assepticamente, 5,0% de sangue desfibrinado de coelho, 5,0µg/ml de hemina (Sigma) e 1,0µg/ml de menadiona (Sigma). A seguir, o meio foi distribuído assepticamente em placas de Petri de 10x60mm esterilizadas, em volumes de 5,0ml por placa.

Este meio de cultura foi empregado para o isolamento de microrganismos aeróbios nutricionalmente exigentes, de difícil desenvolvimento.

Ágar Sangue enriquecido com Menadiona e Hemina (AsK), de acordo com Tchaou et al. (1995)

Tryptic Soy Agar (Difco) – Tsa

Digesto pancreático de caseína.....	15,0g
Digesto enzimático de soja.....	5,0g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Agar.....	15,0g
Água destilada.....	1000,0ml

Para o preparo deste meio, foram adicionados 500,0ml de água destilada a 40,0g de *Tryptic Soy Agar* (Difco), em balão de 1000,0ml, autoclavada a 120°C durante 20 minutos. Após o resfriamento até aproximadamente 50°C, foram adicionados, assepticamente, 5,0% de sangue desfibrinado de coelho, 5,0µg/ml de hemina (Sigma) e 1,0µg/ml de menadiona

(Sigma). A seguir, o meio foi distribuído assepticamente em placas de Petri de 10x60mm esterilizadas, em volumes de 5,0ml por placa.

Este meio de cultura foi empregado para a contagem de unidades formadoras de colônia (ufc) de microrganismos anaeróbios, nutricionalmente exigentes.

Ágar Sacarose Bacitracina (SB₂₀)

Casitone.....	Difco.....	15,0g
Extrato de levedura.....	Difco.....	5,0g
L-Cisteína.....	Merck.....	0,2g
Sulfito de sódio.....	Merck.....	0,1g
Acetato de sódio	Reagen.....	20,0g
Sacarose.....	Açúcar cristal.....	200,0g
Ágar-ágar	Difco.....	5,0g
Água destilada	qsp.....	1000,0ml

Os componentes do meio de cultura, com exceção do ágar e da sacarose, foram dissolvidos em um cálice em 1000,0ml de água destilada, e homogeneizados com o auxílio de um bastão de vidro, e divididos em quatro alíquotas iguais. O ágar foi pesado e colocado em balões de Erlenmeyer, aos quais foi adicionado, aos poucos, o caldo obtido, homogeneizando por agitação e lavando as paredes do balão. A sacarose foi em seguida adicionada ao meio de cultura e os balões foram tamponados com algodão (bucha), identificados e autoclavados durante 20 minutos, a 120°C. Após o resfriamento até cerca de 50°C, foi adicionado ao meio de cultura 1,0% da solução de Bacitracina-Sigma (0,0033mg~10,0ml de água), seguido de homogeneização. Por fim, o meio foi distribuído assepticamente em placas de Petri 60x15mm, esterilizadas, em volumes de cerca de 20,0ml por placa. As placas foram utilizadas até o período máximo de 7 dias uma vez que, decorrido este período, a bacitracina perde a sua atividade antimicrobiana.

Este meio de cultura, preparado de acordo com Torres (1991) foi empregado para o isolamento e determinação de ufc de *Streptococcus* do grupo mutans (SGM).

Tioglicolato de Sódio sem Indicador e sem Glicose (Tio's)

Extrato de levedura.....	5,0g
Casitone.....	15,0g
Cistina - L.....	0,25g
Cloreto de sódio.....	2,5g
Ácido tioglicólico.....	0,3ml
Ágar.....	0,75g

Para o preparo deste meio foram pesados 24,0g de *Thioglycollate medium without Dextrose or Indicator* (Difco), colocados em balão de Erlenmeyer com um litro de água destilada. Após homogeneização e fusão do ágar, foram distribuídos em tubos de 15x125mm, em volumes de cerca de 10,0ml, esterilizados a 120°C por 20 minutos.

Este meio permite detectar a presença de microrganismos não adnumeráveis, ou seja, presentes em números inferiores a 20ufc/ml.

2) Conservação dos meios de cultura

Após a solidificação do meio, as placas foram armazenadas em refrigerador a cerca de 4°C, em posição invertida, em contêiner de plástico tipo *Tupperware*.

3) Incubação dos meios de cultura

As placas com o meio AsK foram incubadas em condições de anaerobiose, obtidas por meio do emprego do sistema Gaspak (Probac do Brasil), em jarras (Permutation), seladas hermeticamente, durante 7 a 10 dias, a 37°C.

As placas contendo o meio SB₂₀ foram incubadas em condições de microaerofilia, obtidas mediante o sistema de chama de vela, em jarra hermeticamente vedada, por 3 dias, a 37°C.

As placas de As foram incubadas em aerobiose diretamente em estufa à temperatura de 32 a 37°C, por 24 a 48 horas.

4) Processamento microbiológico

Aos tubos de ensaio contendo as amostras de material (cones de papel e lima), tubo-mãe, foram adicionadas 4 a 6 pérolas de vidro de 1,0mm de diâmetro e uma aleta metálica (**Figura 2-A e B**), sendo os tubos submetidos à agitação por 2 minutos em mixer (Mixtron -

Toptronix - São Paulo - SP - Brasil), em velocidade máxima, com a finalidade de dessorção dos microrganismos (**Figura 2-C e D**). A seguir, uma alíquota de 1,0ml da suspensão foi transferida para tubos Eppendorf (Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22339 - Hamburg, Germany) para o teste de Biologia Molecular (**Figura 2-E e F**). O restante da suspensão foi submetido a diluições decimais seriadas, até 10^{-4} , em solução salina em fluxo laminar (**Figura 2-G**). Volumes de 50,0 μ l da amostra pura e de cada diluição foram depositados em placas com o auxílio de pipeta automática, contendo os meios As, AsK e SB₂₀ (**Figura 2-H**). Aos tubos-mãe foram adicionados cerca de 5,0ml de meio Tio's, com a finalidade de detectar os microrganismos presentes em níveis inferiores a 20ufc/ml (**Figura 2-I e J**).

Decorrido o período de incubação, as colônias foram contadas com o auxílio de microscópio estereoscópico (Nikon) e os valores anotados em fichas para cálculo do número de ufc de microrganismos por ml da suspensão.

Os SGM foram identificados em nível de espécie, conforme descrito por Ito et al. (1993).

3.5 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS DO MÉTODO MOLECULAR

Preparo das amostras

Os Eppendorf contendo as amostras foram centrifugados (**Figura 3-A**) a 4.000rpm durante 15 minutos a 8°C (Rotina 35R - Hettich - Zentrifugen). Após a centrifugação, o sobrenadante foi vertido em tubo de ensaio e descartado (**Figura 3-B**). A seguir, foram adicionados com pipetador automático 150µL de tampão Tris e submetidos à agitação manual vigorosa, a fim de suspender o sedimento. Com o auxílio de uma pipeta automática foram adicionados 150µL de NaOH a 0,5M, seguido também por agitação manual vigorosa (**Figuras 3-C e D**).

Os Eppendorf contendo as amostras foram armazenados em geladeira a 4°C (**Figuras 3-E e F**).

Extração do DNA

Como anteriormente descrito por Socransky et al. (1994) e modificado por Haffajee et al. (1997), as suspensões dos tubos foram fervidas em banho-maria por 10 minutos. Após a fervura, as suspensões foram neutralizadas com a adição de 0,8ml de 5M de acetato de amônia (77g em 200ml de água destilada esterilizada). Desta forma, as células bacterianas foram lisadas e o DNA suspenso na solução. Na primeira fase de montagem do “checkerboard”, a placa metálica contendo 30 canaletas, denominada “Minislot 30” (Immunetics, Cambridge, MA, USA), foi colocada sobre uma membrana de nylon (15x15cm) com carga positiva (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) e o conjunto aparafusado sobre uma base de acrílico (**figuras 4-A e B**). Cada suspensão contendo DNA livre foi depositada nas fendas do “Minislot 30” e o DNA foi concentrado na membrana de nylon (**Figura 4-C**). A seguir, a membrana foi removida do aparato e exposta ao calor (120°C), durante 20 minutos para a fixação do DNA (**Figuras 4-D e E**). Em cada membrana foram depositadas 28 amostras, sendo as duas últimas canaletas reservadas para a colocação dos controles, representados por uma suspensão contendo todas as espécies microbianas avaliadas em duas concentrações (10^5 e 10^6 células bacterianas).

Preparo das sondas de DNA

As sondas de DNA foram confeccionadas usando o kit “random primer digoxigenin labelling” (Roche Molecular Systems, Inc., Alameda, CA), como descrito por Feinberg e Vogelstein (1983). A tabela 1 apresenta as 35 sondas de DNA empregadas, específicas para as espécies avaliadas neste estudo, selecionadas de acordo com a sua associação com diferentes tipos de infecções endodônticas (Haffajee e Socransky, 1994; Moore e Moore, 1994).

Tabela 1 - Espécies bacterianas utilizadas na confecção das sondas genômicas de DNA

Espécies bacterianas	Procedência da cepa	Morfotipo	Fisiologia
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> sorotipo <i>a</i>	ATCC 43718	Bastonete Gram-negativo	Facultativo
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> sorotipo <i>b</i>	ATCC 29523	Bastonete Gram-negativo	Facultativo
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	ATCC 23860	Bastonete Gram-positivo	Facultativo
<i>Actinomyces israelii</i>	ATCC 12102	Bastonete Gram-positivo	Facultativo
<i>Actinomyces naeslundii</i> I	ATCC 12104	Bastonete Gram-positivo	Facultativo
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	ATCC 17929	Bastonete Gram-positivo	Facultativo
<i>Actinomyces viscosus</i>	ATCC 43146	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Campylobacter rectus</i>	ATCC 33238	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	ATCC 33624	Bastonete Gram-negativo	Facultativo
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	ATCC 33596	Bastonete Gram-negativo	Facultativo
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	ATCC 33612	Bastonete Gram-negativo	Facultativo
<i>Eikenella corrodens</i>	ATCC 23834	Bastonete Gram-negativo	Facultativo
<i>Eubacterium nodatum</i>	ATCC 33099	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Eubacterium saburreum</i>	ATCC 33271	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sit <i>nucleatum</i>	ATCC 25586	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sit <i>polymorphum</i>	ATCC 10953	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	ATCC 33693	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Neisseria mucosa</i>	ATCC 19696	Coco Gram-negativo	Aeróbio
<i>Peptostreptococcus micros</i>	ATCC 33270	Coco Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Prevotella intermedia</i>	ATCC 25611	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Prevotella melaninogenica</i>	ATCC 25845	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Prevotella nigrescens</i>	ATCC 33563	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC 11827	Bastonete Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Selenomonas noxia</i>	ATCC 43541	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Streptococcus anginosus</i>	ATCC 33397	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Streptococcus constellatus</i>	ATCC 27823	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Streptococcus gordonii</i>	ATCC 10558	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Streptococcus intermedius</i>	ATCC 27335	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Streptococcus mitis</i>	ATCC 49456	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Streptococcus oralis</i>	ATCC 35037	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Streptococcus sanguinis</i>	ATCC 10556	Coco Gram-positivo	Facultativo
<i>Tannerella forsythia</i>	ATCC 43037	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Treponema denticola</i>	†B1	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Veillonella parvula</i>	ATCC 10790	Coco Gram-negativo	Anaeróbio

†Cepa B1, Forsyth Institute, Boston, MA.

ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD)

Destas 35 sondas, 17 espécies são anaeróbias (12 Gram-negativo e 5 Gram-positivo), outras 17 sondas são facultativos (11 Gram-positivo e 6 Gram-negativo) e 1 sonda é aeróbia.

As cepas foram cedidas pelo Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ e pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), estando disponíveis no Laboratório de Microbiologia Oral da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

Previamente ao uso, as sondas foram testadas com uma mistura controle contendo as espécies avaliadas, numa concentração de 10^4 células bacterianas. Este procedimento foi efetuado a fim de oferecer a mesma sensibilidade para a detecção de cada espécie, isto é, suas concentrações foram ajustadas de modo que a intensidade dos sinais de todas as sondas seja semelhante. Além disso, cada sonda foi testada com uma bateria de cepas bacterianas da coleção de isolados do Laboratório de Microbiologia Oral para a avaliação da especificidade de cada uma delas.

Hibridação das membranas com as sondas de DNA

Após a fixação do DNA nas membranas, essas foram pré-hibridadas a 42°C , durante 1 hora, em uma solução de 50% de formamida, 5 x SSC (1 SSC = 150mM NaCl, 15mM citrato de sódio, pH 7.0), 1% de caseína, 25mM de fosfato de sódio (pH 6.5) e 0,5mg/ml de RNA de levedura. Em seguida, cada membrana foi colocada sob a placa acrílica do aparelho “Miniblotter 45” (Immunetics), de maneira que as linhas contendo o DNA fixado fiquem em uma posição perpendicular as canaletas do “Miniblotter 45” (**Figura 4-F**).

O “Miniblotter 45” contém 45 canaletas onde, em cada uma delas, foi colocada uma sonda de DNA. Cada canaleta foi preenchida com 130 μL de uma determinada sonda (**Figura 4-G**), contida em uma solução de hibridação (45% formamida, 5xSSC, 20mM de fosfato de sódio - pH 6.5, 0,2mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano, 1% de caseína e 20ng/mg de sonda de DNA). As sondas hibridam perpendicularmente às linhas contendo o DNA bacteriano, propiciando um formato xadrez, com as amostras de DNA horizontais e as sondas verticais. O aparato contendo as membranas foi colocado em um saco plástico, para evitar a desidratação das mesmas. A hibridação das amostras nas membranas com as sondas foi realizada a 42°C , durante um período mínimo de 16 horas (**Figura 4-H**).

Detecção das espécies bacterianas

Após a hibridação com as sondas, a membrana foi removida do “Miniblotter 45” e lavada durante 5 minutos em temperatura ambiente, seguido de duas lavagens de 20 minutos cada a 68°C (**Figura 4-I e J**), em uma solução contendo 20mM fosfato, 1mM EDTA e 1% SDS, com o objetivo de remover as sondas que não hibridaram completamente. Após este procedimento, as membranas foram imersas durante 1 hora em uma solução de bloqueio (**Figura 4-K**) contendo 0,1M de ácido maléico, 3M de cloreto de sódio, 0,2M de hidróxido de sódio, 0,3% de Tween 20 e 0,5% de caseína em pH 8.0. A seguir, foram imersas durante 30

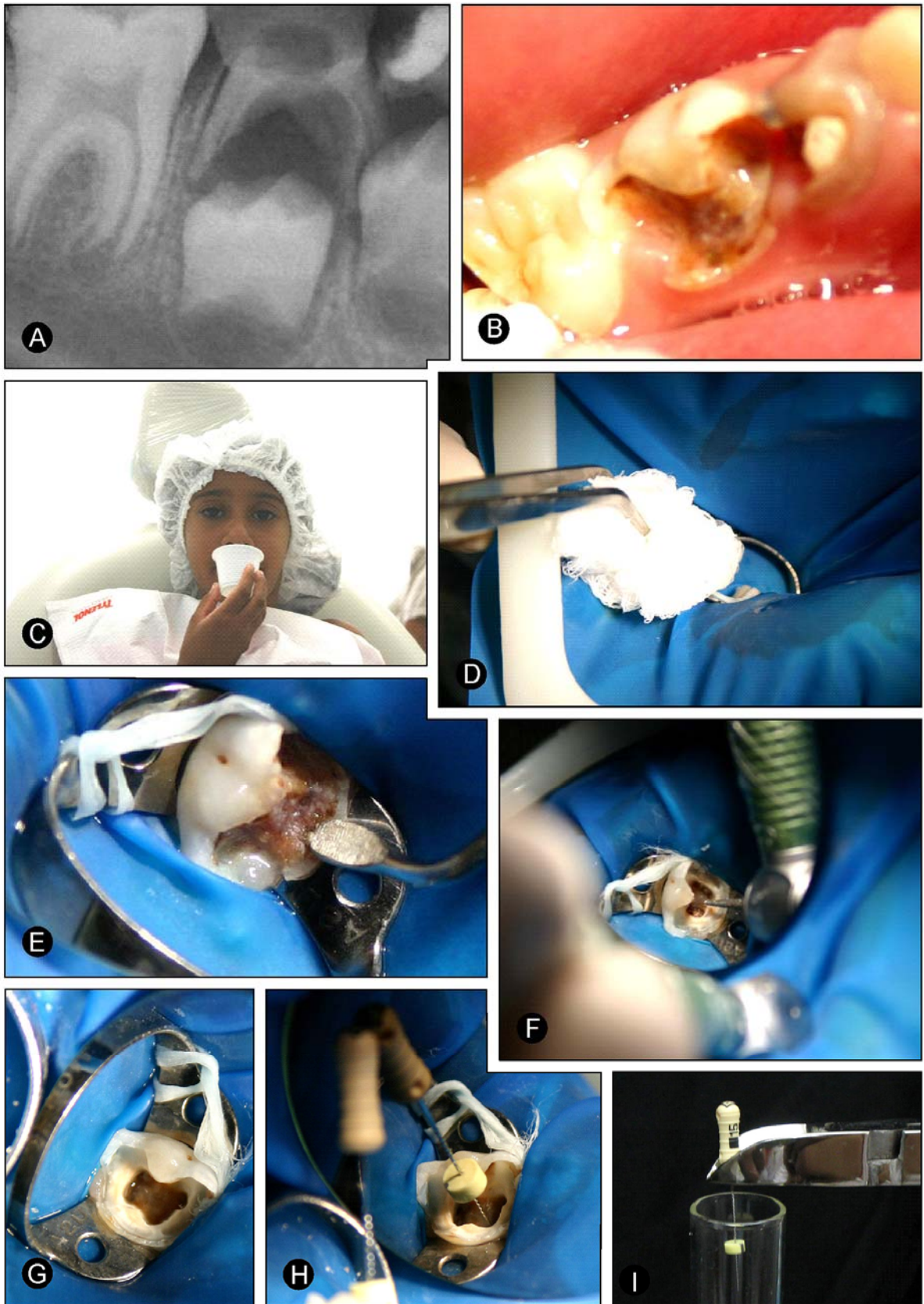
minutos na mesma solução, agora contendo também o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina – **Figura 4-L** - (Roche Molecular Systems, Inc., Alameda, CA), em uma diluição de 1/25.000 (Engler-Blum et al., 1993).

Posteriormente, as membranas foram lavadas com uma solução de 0,1M de ácido maléico, 3M de cloreto de sódio, 0,2M de hidróxido de sódio e 0,3% de Tween 20, em pH 8.0, 2 vezes durante 15 minutos e uma vez durante 5 minutos em 50mM Tris HCl e 50mM de cloreto de sódio em pH 9.5 (**Figura 4-M**). As membranas foram então incubadas em uma solução contendo o substrato para a enzima CDP-Star[®] (Amersham Pharmacia Biotech), durante 45 minutos (**Figura 4-N**).

Finalmente, as membranas foram colocadas em um cassete de autoradiografia (**Figura 4-O**), sob um filme radiográfico (Kodak X-OMAT, Rochester-NY - USA) durante aproximadamente 40 minutos e, a seguir, revelados para a detecção dos sinais de quimioluminescência. Ao final, foi obtido um filme radiográfico com os sinais detectados pelas sondas de DNA, onde as linhas horizontais representam as amostras e as verticais as sondas de DNA, propiciando um formato de “tabuleiro de xadrez” (**Figuras 4-P e 5**).

Figura 1 – Procedimentos clínicos

- A-** Radiografia periapical para diagnóstico
- B-** Aspecto clínico inicial
- C -** Anti-sepsia da cavidade bucal com solução de gluconato de clorexidina a 0,12%
- D -** Isolamento do campo operatório com dique de borracha e anti-sepsia com gluconato de clorexidina a 2,0%
- E -** Remoção do tecido cariado
- F-** Abertura coronária evidenciando o desgaste compensatório
- G –** Abertura finalizada, pronto para a realizar a colheita
- H –** Colheita microbiológica com lima endodôntica tipo K
- I –** Lima sendo seccionada e colocada em tubo de ensaio contendo RTF



continuação

Figura 1 – Procedimentos clínicos

- J** – Colheita microbiológica com cone de papel
- K** – Cone de papel sendo colocado no mesmo tubo contendo a lima
- L** – Tubo de ensaio contendo o material a ser analisado
- M e N** – Colocação do curativo de demora
- O e P** – Dente restaurado

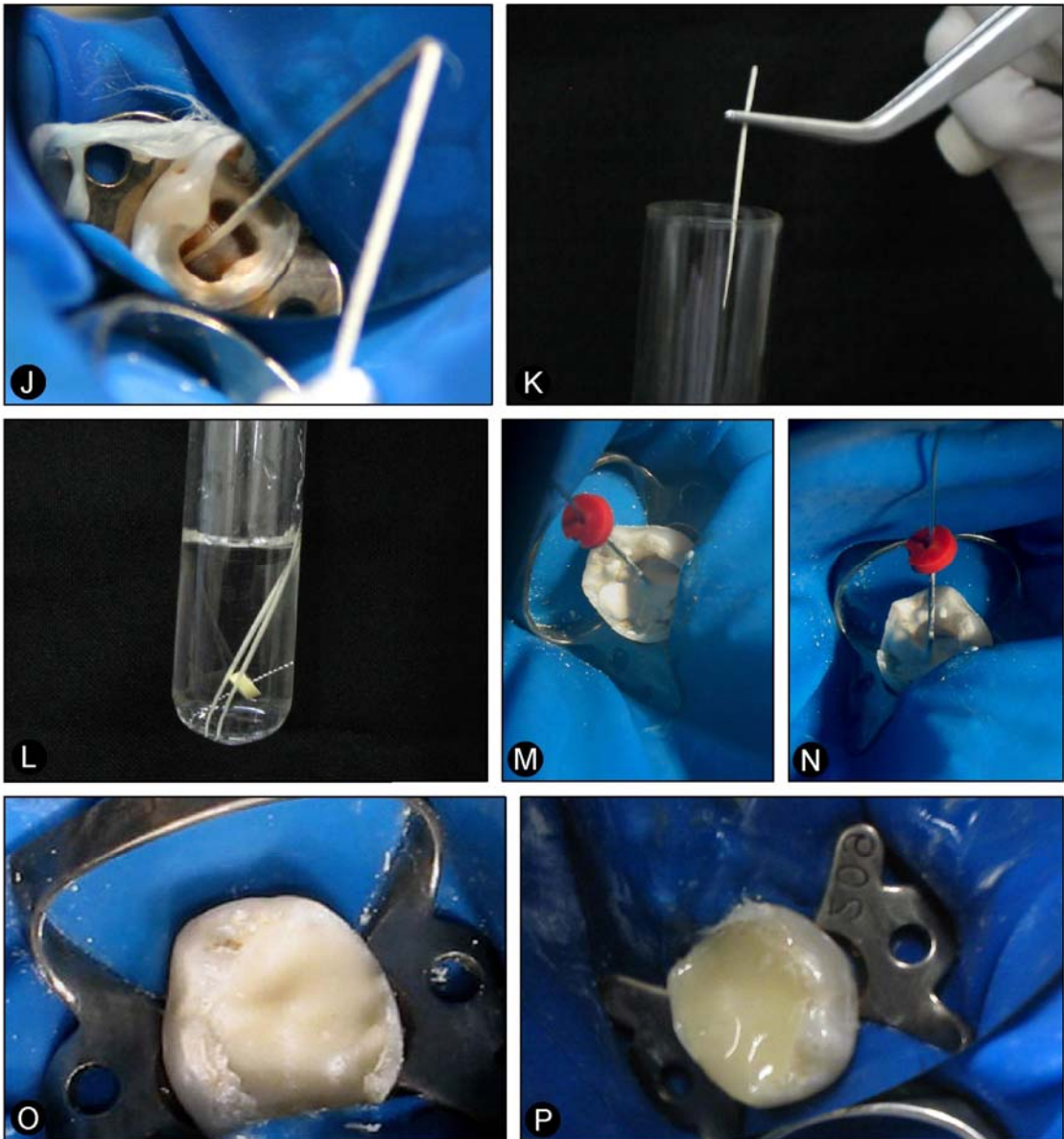


Figura 2 – Processamento laboratorial das amostras para a técnica de cultura

- A e B-** Colocação de pérolas de vidro e aleta de metal no tubo contendo as amostras
- C e D-** Agitação em mixer durante 2 minutos
- E e F -** Retirada de 1,0mL da suspensão para o teste de biologia molecular e sua transferência para Eppendorf
- G -** Suspensão remanescente sendo submetida a diluições decimais seriadas até 10^{-4}
- H -** Volumes de 50 μ L sendo depositados nos meios de cultura
- I e J-** Tubo-mãe sendo adicionado o meio Tio's

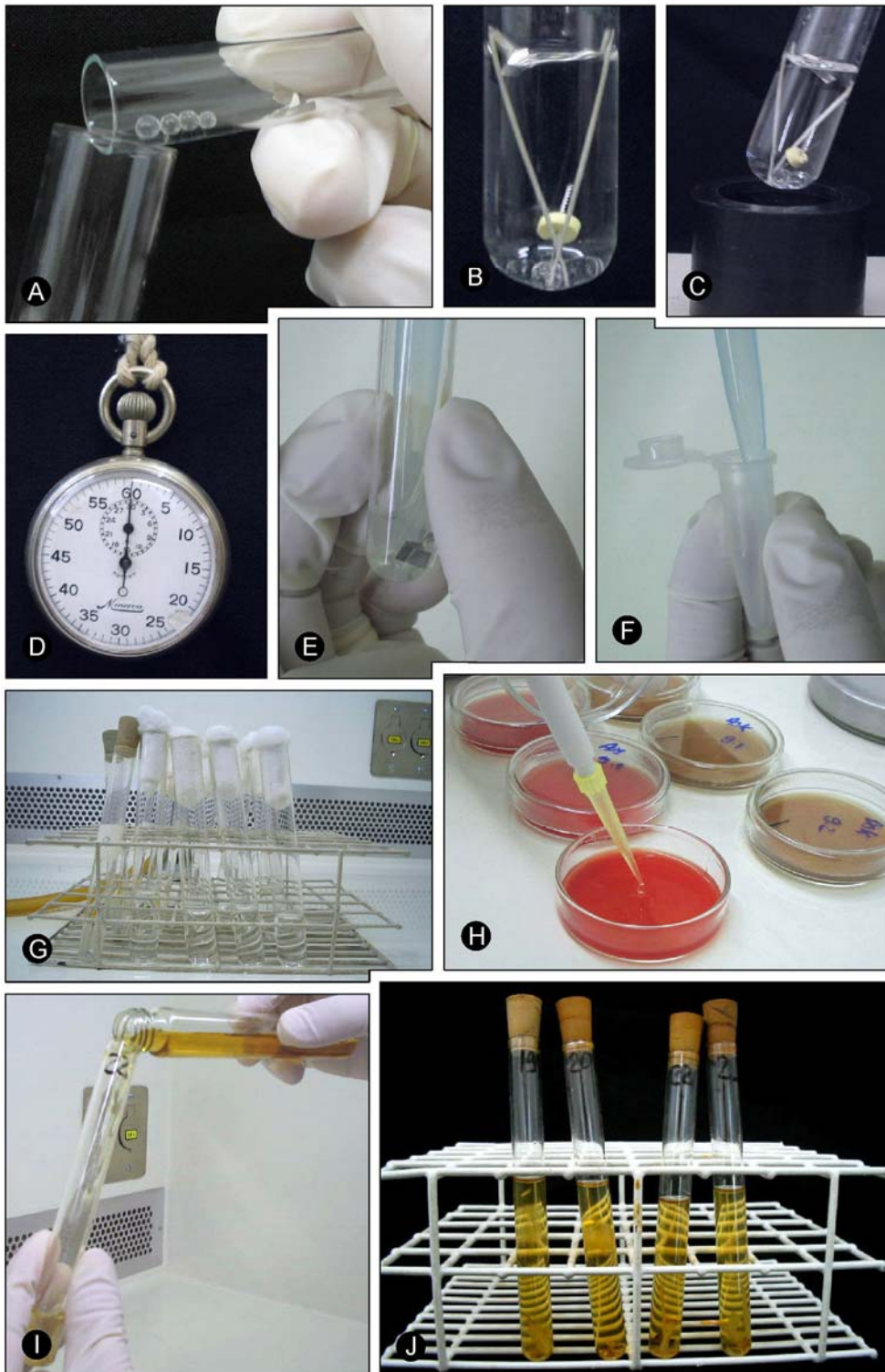


Figura 3 – Processamento laboratorial das amostras para a técnica de biologia molecular

- A-** Centrifugação das amostras a 4.000rpm durante 15 minutos a 8° C
- B-** remoção do sobrenadante
- C -** Adição de 150µL de tampão Tris
- D -** Adição de 150µL de NaOH a 0,5M
- E –F-** Estocagem das amostras

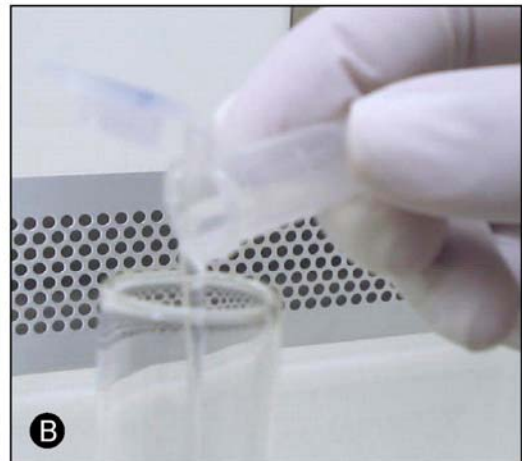
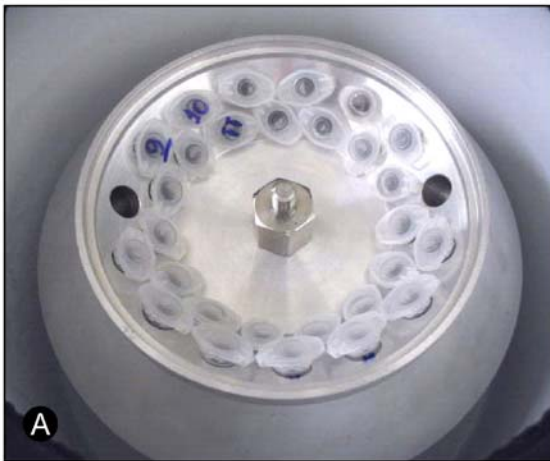
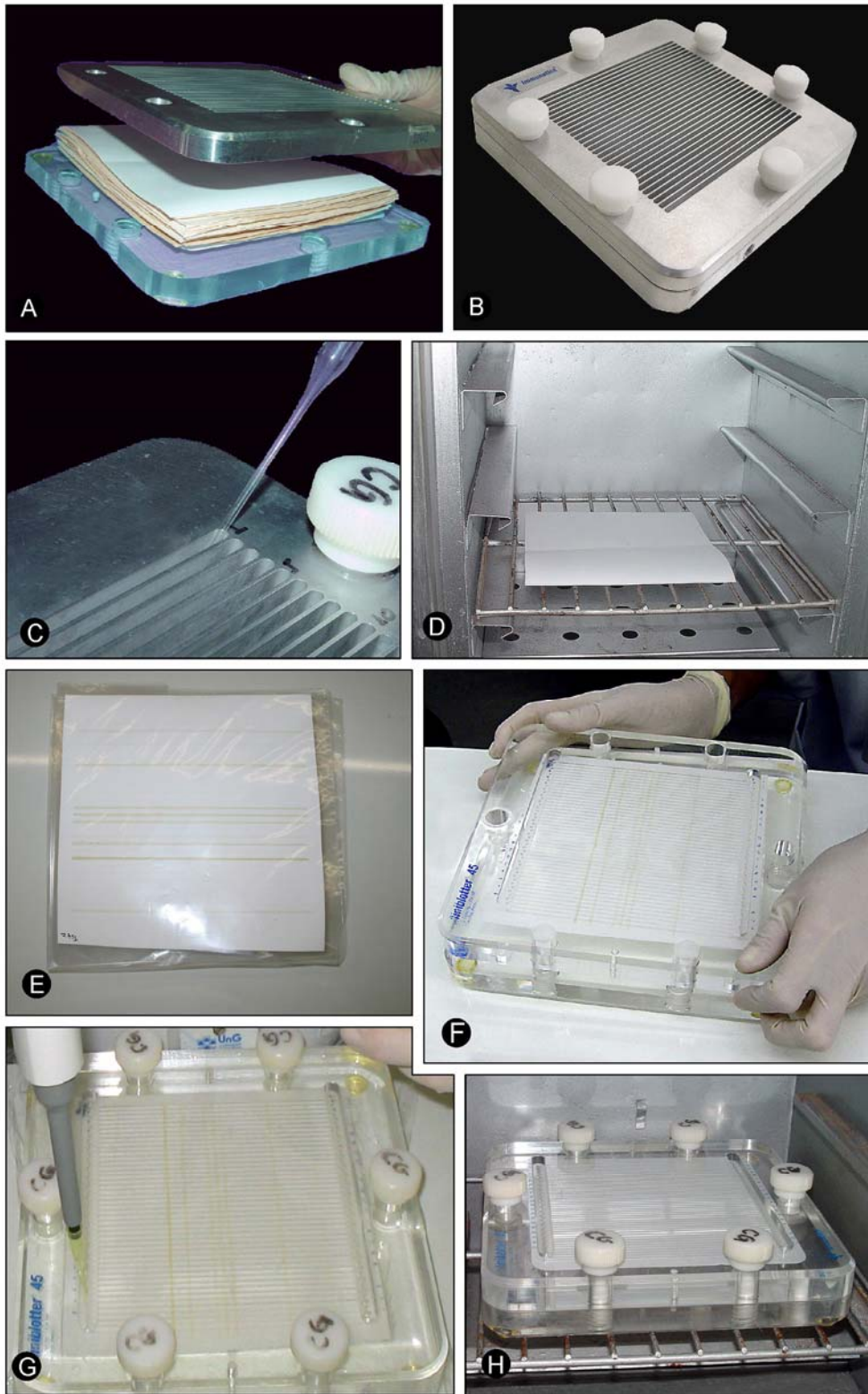


Figura 4 – Etapas da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*

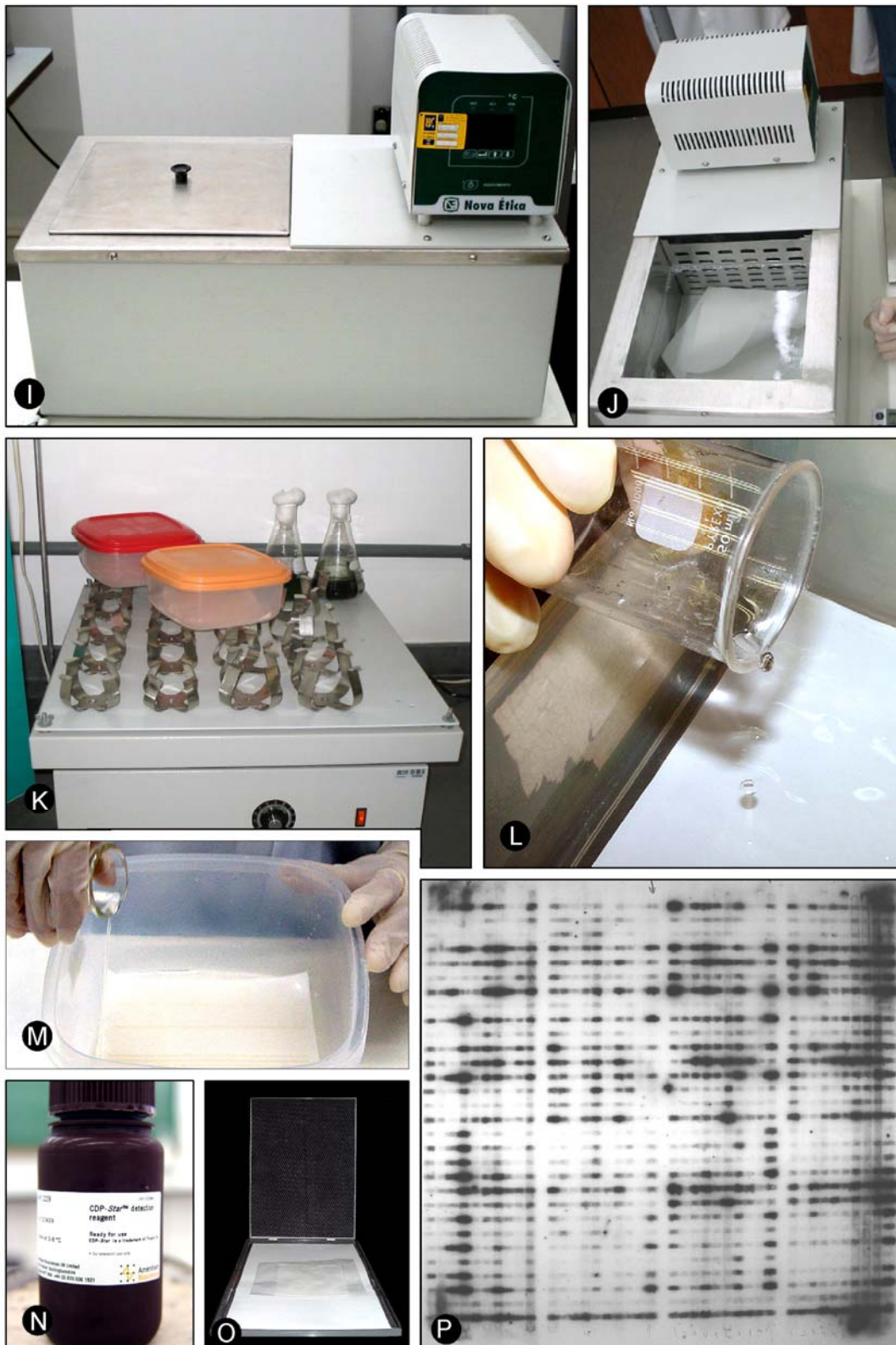
- A-** Introdução da membrana de nylon (15x15cm) com carga positiva e cerca de 12 a 15 papéis de filtro no MiniSlot 30
- B-** O conjunto aparafusado
- C -** Deposição das amostras nas canaletas do dispositivo, após a desnaturação da suspensão
- D -** Exposição da membrana ao calor (120°C – 20 minutos) para fixação do DNA
- E -** Amostras de DNA fixadas na membrana
- F-** Introdução da membrana no MiniBlotter 45 evidenciando que as amostras de DNA estão dispostas perpendicularmente às canaletas do dispositivo
- G –** Preenchimento das canaletas com as 35 sondas
- H –** Hibridação por 16 horas a 42°C



Continuação

Figura 4 – Etapas da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*

- I e J** – Lavagem da membrana com solução de Tampão fosfato (68°C – 40 minutos) para remoção das sondas que não hibridaram
- K** – Imersão da membrana na solução de bloqueio durante 1 hora em um agitador
- L** – Acréscimo do anti-corpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase Alcalina (30 minutos)
- M** – Lavagem da membrana com solução para remoção inespecífica do anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina
- N** – Substrato CDP-Star® para a enzima fosfatase alcalina
- O** – Cassete de autoradiografia contendo o filme radiográfico
- P** – Detecção dos sinais de quimioluminescência no filme radiográfico



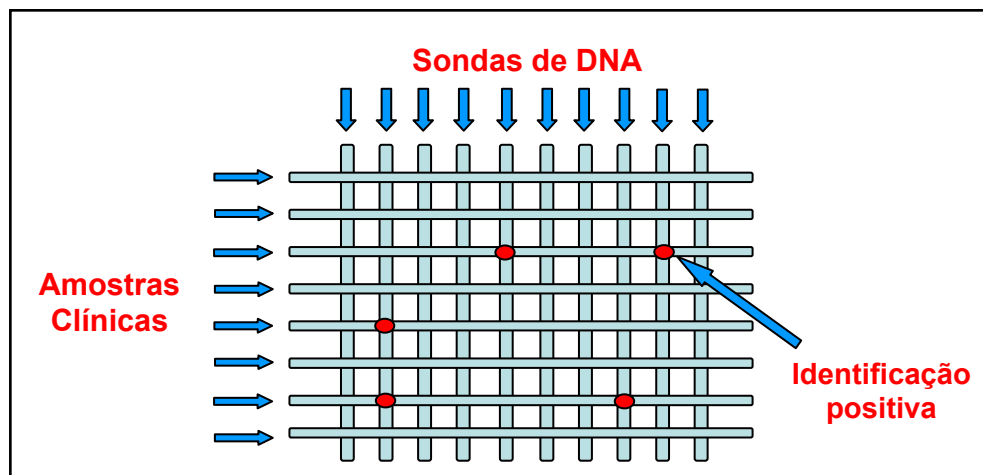


Figura 5 – Hibridação do *Checkerboard*

A leitura dos resultados foi semi-quantitativa, realizada por meio de comparação dos sinais das amostras dos canais radiculares com os sinais das amostras controle. Essa comparação foi realizada a partir do DNA de todas as bactérias que estão sendo pesquisadas, e colocadas nas duas últimas canaletas do “Minislot 30”, que equivalem a 100.000 (10^5) e 1.000.000 (10^6) de células. Desta forma, foi obtido um número de células bacterianas aproximado, em cada amostra, para cada uma das espécies bacterianas avaliadas.

Todas as avaliações foram realizadas por um único examinador calibrado. Os resultados obtidos foram anotados em fichas específicas.

A fim de facilitar a leitura semi-quantitativa dos sinais, a intensidade da infecção por diferentes espécies em cada canal radicular foram avaliadas estabelecendo-se os seguintes escores:

- 0: quando não houver detecção do sinal de quimioluminescência.
- 1: quando apresentar quantidades $< 10^5$ células.
- 2: quando apresentar quantidades $= 10^5$ células.
- 3: quando apresentar quantidades entre 10^5 e 10^6 células (média de 550.000).
- 4: quando apresentar quantidades $= 10^6$ células.
- 5: quando apresentar quantidades $> 10^6$ células.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi efetuada a comparação dos resultados obtidos nas colheitas pré e pós tratamento.

Para tal, utilizou-se a análise descritiva dividida de acordo com as variáveis de cultura e de biologia molecular. Nos dois casos, foi necessário estudar as variáveis na escala logarítmica (base 10) para que os testes estatísticos pudessem ser utilizados. Em virtude da existência de valores nulos, foi utilizada a transformação $\log(x+1)$, onde x representa a variável original.

Foi utilizado também, o teste t de Student pareado (Snedecor e Cochran, 1976) para todas as variáveis na escala logarítmica, para isto, utilizou-se a transformação $\log(x+1)$, onde x representa a variável original. Para analisar os resultados da biologia molecular utilizou-se a soma dos escores dos grupos de bactérias (anaeróbios, aeróbios, facultativos). A única exceção ocorreu para o escore do exame de biologia molecular das bactérias aeróbias, onde foi utilizado o teste de Wilcoxon (Sprent, 1993). Em todos os testes o nível de significância adotado foi $\alpha=0,05$. Para complementar a análise, todas as variáveis foram categorizadas em presença/ausência de bactérias e depois foi aplicado o teste de McNemar (Agresti, 2002), nos casos onde era possível, para comparar os instantes pré e pós.

As variáveis do estudo podem ser divididas de acordo com a técnica de cultura e de biologia molecular. Todas elas foram medidas em dois momentos (pré e pós):

- Cultura:
 - anpre: quantidade de bactérias anaeróbias no pré;
 - anpos: quantidade de bactérias anaeróbias no pós;
 - bpbpre: quantidade de bactérias BPB no pré;
 - bpbpos: quantidade de bactérias BPB no pós;
 - apre: quantidade de bactérias aeróbias no pré;
 - apos: quantidade de bactérias aeróbias no pós;
 - estpre: quantidade de estreptococos no pré;
 - estpos: quantidade de estreptococos no pós;
 - totalpre: quantidade total de bactérias no pré;
 - totalpos: quantidade total de bactérias no pós;

- **Biologia molecular:**
 - bmanpre: soma dos escores de sondas de bactérias anaeróbias no pré;
 - bmanpos: soma dos escores de sondas de bactérias anaeróbias no pós;
 - bmfpre: soma dos escores de sondas de bactérias facultativas no pré;
 - bmfpos: soma dos escores de sondas de bactérias facultativos no pós;
 - bmapre: soma dos escores de sondas de bactérias aeróbias no pré;
 - bmapos: soma dos escores de sondas de bactérias aeróbias no pós;



4 Resultados

5 RESULTADOS

1) Cultura

O resultado final deste experimento constou de 19 amostras (38 canais radiculares). Foram realizadas colheitas pré e pós tratamento.

Os números das unidades formadoras de colônia (ufc) das amostras colhidas antes do início do tratamento e 7 dias após a remoção do curativo de demora estão apresentados na tabela 1.

De acordo com a tabela 1, a prevalência inicial dos microrganismos anaeróbios foi de 94,73%, em números variando de 60 a 446.000ufc/ml. Em 10 casos (52,63%) foram quantificados BPB. Os microrganismos aeróbios estavam presentes em 18 canais radiculares (94,73%), em números variando entre 60 a 202.000ufc/ml. Os SGM estavam presentes em 10 canais radiculares (52,63%), em números variando de 20 a 4.800ufc/ml. O meio Tio's foi positivo em todos os casos.

Na 2ª colheita, obtida após o preparo biomecânico e aplicação do curativo de demora com pasta Calen[®] CHX-1,0%, nota-se a diminuição do número de ufc. Apesar dos anaeróbios estarem presentes em 16 canais radiculares (84,21%), variando de 20 a 72.000ufc/ml, apresenta-se em menor número que na colheita inicial. Lembrando que a 2ª colheita foi realizada 7 dias após da remoção do curativo de demora. Os BPB estavam presentes em 8 canais radiculares (42,10%). Dezesesseis canais radiculares (84,21%) foram positivos para aeróbios, em números de 20 a 47.000ufc/ml. Os SGM estavam presentes em 5 canais radiculares (26,31%) com variação de 20 a 100ufc/ml. O meio Tio's foi positivo para 17 canais radiculares (89,47%).

As medidas-resumo das variáveis mensuradas pelo exame de cultura, na escala original e na escala logarítmica, podem ser vistas no Apêndice B. A necessidade da utilização da transformação logarítmica fica clara utilizando o Gráfico 1 (Apêndice C), onde se observa um comportamento simétrico das variáveis transformadas. Também neste gráfico, observa-se que só não há indícios de diferença entre os instantes pré e pós para a variável BPB.

1.1) Variáveis numéricas transformadas

Os resultados do teste t pareado para comparação dos instantes pré e pós podem ser vistos na Tabela 2 e mostram que só não houve diferença estatisticamente significativa para a variável BPB ($p=0,126$). Nas demais variáveis pode-se afirmar que houve uma queda média estatisticamente significativa.

Tabela 2 - Resultados do teste t de Student pareado para as variáveis do exame de cultura

Variáveis	Diferença média	Desvio- padrão	Erro- padrão	t	gl	p	Intervalo de confiança (95%)	
	(pré-pós)						Limite inferior	Limite superior
Anaeróbios	1.4	2.1	0.5	2.9	18	0.011	0.4	2.4
BPB	0.8	2.1	0.5	1.6	18	0.126	-0.2	1.8
Aeróbios	1.1	1.9	0.4	2.5	18	0.020	0.2	2.1
SGM	0.9	1.6	0.4	2.4	18	0.029	0.1	1.6
Total de bactérias	1.4	2.0	0.5	2.9	18	0.009	0.4	2.3

1.2) Variáveis categorizadas em presença/ausência

As tabelas após a categorização estão identificadas abaixo:

- Presença de bactérias anaeróbias (Tabela 3): apenas 2 canais passaram de positivo para negativo;
- Presença de bactérias do tipo BPB (Tabela 4): não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,774$) entre os instantes pré e pós;
- Presença de bactérias aeróbias (Tabela 5): apenas 2 canais passaram de positivo para negativo;
- Presença de estreptococos (Tabela 6): não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,180$) entre os instantes pré e pós;
- Presença de pelo menos um tipo de bactéria (Tabela 7): apenas 2 canais passaram de positivo para negativo.

Tabela 3 - Distribuição conjunta pré vs pós da presença de bactérias anaeróbias utilizando o exame de cultura

Anaeróbios Pré	Anaeróbios Pós		Total
	negativo	positivo	
negativo	1	0	1
positivo	2	16	18
Total	3	16	19

Tabela 4 - Distribuição conjunta pré vs pós da presença de bactérias do tipo BPB utilizando o exame de cultura

BPB pré	BPB pós		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	4	5	9
Positivo	7	3	10
Total	11	8	19

Teste de McNemar $p=0,774$

Tabela 5 - Distribuição conjunta pré vs pós da presença de bactérias aeróbias utilizando o exame de cultura

Aeróbios Pré	Aeróbios Pós		Total
	negativo	positivo	
negativo	1	0	1
positivo	2	16	18
Total	3	16	19

Tabela 6 - Distribuição conjunta pré vs pós da presença de estreptococos utilizando o exame de cultura

Estreptococos Pré	Estreptococos Pós		Total
	negativo	positivo	
negativo	7	2	9
positivo	7	3	10
Total	14	5	19

Teste de McNemar $p=0,180$

Tabela 7 - Distribuição conjunta pré vs pós da presença de pelo menos um tipo de bactéria utilizando o exame de cultura

Total de bactérias Pré	Total de bactérias Pós		Total
	negativo	positivo	
negativo	1		1
positivo	2	16	18
Total	3	16	19

2) *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*

O resultado final deste experimento constou de 14 amostras (28 canais radiculares). Deste estudo, 5 amostras se perderam quando da realização de procedimentos técnicos. Foram realizadas colheitas pré e pós tratamento. Os resultados das 35 sondas podem ser observados no Anexo C e Apêndice D.

Das 35 sondas utilizadas, 31 (88,57%) foram positivas na 1ª colheita, sendo identificadas de 1 a 31 espécies bacterianas por amostra, média de 5,71. Na 2ª colheita 13 (37,14%) sondas foram positivas com 1 a 6 espécies bacterianas por amostra, média de 2,64 (Tabela 8 e 9).

Tabela 8 - Prevalência de espécies bacterianas na 1ª colheita

Espécies	Número de amostras positivas	Prevalência (%)
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans a</i>	2	14,28
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans b</i>	2	14,28
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	2	14,28
<i>Actinomyces israelii</i>	2	14,28
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	2	14,28
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	2	14,28
<i>Actinomyces viscosus</i>	-	-
<i>Campylobacter rectus</i>	3	21,42
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	3	21,42
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	1	7,14
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	1	7,14
<i>Eubacterium nodatum</i>	1	7,14
<i>Eikenella corrodens</i>	2	14,28
<i>Eubacterium saburreum</i>	2	14,28
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	2	14,28
<i>Fusobacterium nucleatum sit polymorphum</i>	7	50,00
<i>Fusobacterium nucleatum sit nucleatum</i>	1	7,14
<i>Neisseria mucosa</i>	14	100,00
<i>Peptostreptococcus micros</i>	-	-
<i>Prevotella melaninogenica</i>	5	35,71
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1	7,14
<i>Prevotella intermedia</i>	1	7,14
<i>Prevotella nigrescens</i>	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	2	14,28
<i>Selenomonas noxia</i>	2	14,28
<i>Streptococcus anginosus</i>	2	14,28
<i>Streptococcus constellatus</i>	-	-
<i>Streptococcus mitis</i>	2	14,28
<i>Streptococcus oralis</i>	2	14,28
<i>Streptococcus sanguinis</i>	2	14,28
<i>Streptococcus gordonii</i>	4	28,57
<i>Streptococcus intermedius</i>	2	14,28
<i>Tannerella forsythia</i>	1	7,14
<i>Treponema denticola</i>	3	21,42
<i>Veillonella parvula</i>	2	14,28

Tabela 9 - Prevalência de espécies bacterianas na 2ª colheita

Espécies	Número de amostras positivas	Prevalência (%)
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans a</i>	-	-
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans b</i>	-	-
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	-	-
<i>Actinomyces israelii</i>	-	-
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1	7,14
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	-	-
<i>Actinomyces viscosus</i>	1	7,14
<i>Campylobacter rectus</i>	1	7,14
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	-	-
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	1	7,14
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	-	-
<i>Eubacterium nodatum</i>	-	-
<i>Eikenella corrodens</i>	-	-
<i>Eubacterium saburreum</i>	-	-
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	-	-
<i>Fusobacterium nucleatum sit polymorphum</i>	6	42,85
<i>Fusobacterium nucleatum sit nucleatum</i>	2	14,28
<i>Neisseria mucosa</i>	14	100,00
<i>Peptostreptococcus micros</i>	-	-
<i>Prevotella melaninogenica</i>	2	14,28
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	2	14,28
<i>Prevotella intermedia</i>	-	-
<i>Prevotella nigrescens</i>	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	7,14
<i>Selenomonas noxia</i>	-	-
<i>Streptococcus anginosus</i>	-	-
<i>Streptococcus constellatus</i>	1	7,14
<i>Streptococcus mitis</i>	-	-
<i>Streptococcus oralis</i>	-	-
<i>Streptococcus sanguinis</i>	-	-
<i>Streptococcus gordonii</i>	4	28,57
<i>Streptococcus intermedius</i>	-	-
<i>Tannerella forsythia</i>	-	-
<i>Treponema denticola</i>	-	-
<i>Veillonella parvula</i>	1	7,14

Dentre as 31 sondas encontradas na 1ª colheita, 16 (94,1%) eram espécies facultativas. Destas, 6 (100,0%) eram facultativos Gram-negativo e 10 (90,9%) eram facultativos Gram-positivo. As espécies anaeróbias somaram 14 (82,3%) sondas. Onze (91,6%) espécies anaeróbias Gram-negativa e 3 (60,0%) espécies anaeróbias Gram-positivo. A sonda aeróbia estava presente em 100,0%.

Já para a 2ª colheita, das 13 sondas encontradas, 8 (47,0%) espécies eram anaeróbias. Destas, 6 (50,0%) eram anaeróbios Gram-negativo e 2 (40,0%) anaeróbios Gram-positivo. Os facultativos somaram 4 (23,5%). Destes, 3 (27,2%) eram facultativos Gram-positivo e 1 (16,6%) eram facultativos Gram-negativo. A sonda aeróbia estava presente em 100,0%.

Ainda de acordo com a tabela 8 e 9, na 1ª colheita as espécies mais prevalentes foram: *Neisseria mucosa* (100,0%), *Fusobacterium nucleatum* sit *polymorphum* (50,0%), *Prevotella melaninogenica* (35,7%) e *Streptococcus gordonii* (28,5%). Na 2ª colheita foram as seguintes espécies mais prevalentes: *Neisseria mucosa* (100,0%), *Fusobacterium nucleatum* sit *polymorphum* (42,8%), *Streptococcus gordonii* (28,5%), *Prevotella melaninogenica* (14,2%) e *Porphyromonas gingivalis* (14,2%).

Duas sondas, *Peptostreptococcus micros* e *Prevotella nigrescens* não foram detectadas em nenhuma das duas colheitas.

Com relação à avaliação semi-quantitativa do número de células bacterianas, a infecção variou do escore 0 ao escore 5. Os resultados do escore para a 1ª e 2ª colheita, podem ser observados nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10 – Escore 1ª colheita

Escore	Total	%
0	130	61,9
1	24	11,4
2	4	1,9
3	12	5,7
4	23	10,9
5	17	8,0
Total	210	100,0

Tabela 11 – Escore 2ª colheita

Escore	Total	%
0	173	82,3
1	19	9,0
2	6	2,8
3	2	0,9
4	10	4,7
5	-	-
Total	210	100,0

As medidas-resumo das variáveis originais e transformadas podem ser vistas no Apêndice E. Pelo Gráfico 2 (Apêndice F) é possível verificar que quase não ocorre mudança para o escore das bactérias aeróbias, também não é possível dizer que há indícios de que as médias dos momentos pré e pós são diferentes, basta observar que o intervalo de confiança aproximado (média \pm 2 EP) passa pelo valor nulo em todos os casos.

2.1) Variáveis numéricas transformadas

Os resultados do teste t de Student pareado podem ser vistos na Tabela 12 e mostram que não houve diferença estatisticamente significativa, sendo que os valores da população em questão para a diferença do escore são:

- anaeróbias: a diferença média está entre os valores de $-0,18$ e $0,50$ na escala logarítmica (base 10) com 95% de confiança;
- facultativas: a diferença média está entre os valores de $-0,19$ e $0,58$ na escala logarítmica (base 10) com 95% de confiança.

Tabela 12 - Resultados do teste t de Student pareado para as variáveis do método de biologia molecular

Variáveis	Diferença média	Desvio-padrão	Erro-padrão	t	gl	p	Intervalo de confiança (95%)	
	pré-pós						Limite inferior	Limite superior
Anaeróbios	0.16	0.59	0.16	1.02	13	0.325	-0.18	0.50
Facultativos	0.20	0.66	0.18	1.11	13	0.285	-0.19	0.58

2.2) Variáveis categorizadas em presença/ausência

As tabelas aqui foram construídas apenas para as bactérias anaeróbias e para as facultativas, pois nenhum canal apresentou escore nulo para as bactérias aeróbias. As tabelas são:

- anaeróbias (Tabela 13): 2 canais passaram de positivo para negativo e 1 passou de negativo para positivo;
- facultativas (Tabela 14): 4 canais passaram de positivo para negativo e 4 de negativo para positivo, o resultado do teste foi não significativo, $p=1,00$.

Tabela 13 - Distribuição conjunta pré vs pós da presença de bactérias anaeróbias pelo método de biologia molecular

Anaeróbias BM Pré	Anaeróbias BM Pós		Total
	negativo	positivo	
negativo	4	1	5
positivo	2	7	9
Total	6	8	14

Tabela 14 - Distribuição conjunta pré vs pós da presença de bactérias facultativas pelo método de biologia molecular

Facultativas Pré	Facultativas Pós		Total
	negativo	positivo	
negativo	5	4	9
positivo	4	1	5
Total	9	5	14

Teste de McNemar $p=1,00$

2.3) Escore das bactérias aeróbias

Neste caso foi utilizado o teste de Wilcoxon, os resultados podem ser vistos na Tabela 15 e demonstram que não ocorreu diferença estatisticamente significativa.

Tabela 15 - Teste de Wilcoxon da quantidade do escore de bactérias aeróbias pelo método de biologia molecular

Pares	N
pos<pre	3
pos>pre	3
empates	8
Total	14

Teste de Wilcoxon $p=1$



5 Discussão

5 DISCUSSÃO

Na terapia endodôntica, o desenvolvimento de estratégias efetivas está na dependência da compreensão da microbiota patogênica no sistema de canais radiculares. A identificação desta microbiota tem sido tradicionalmente realizada por meio de técnicas microbiológicas e testes bioquímicos, considerados por muitos até pouco tempo, como sendo o padrão ouro na identificação de bactérias em amostras clínicas. A importância de técnicas como a cultura microbiológica está no fato de identificar e quantificar os microrganismos metabolicamente ativos.

Sendo assim, nossos resultados empregando a técnica de cultura foram encontrados microrganismos anaeróbios, aeróbios, BPB e SGM, o que está de acordo com outros trabalhos que mostram que em dentes com necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente ocorre a presença de uma infecção polimicrobiana (Toyoshima et al., 1988; Sato et al., 1993; Faria, 2001; Pazelli et al., 2003; Ruvière, 2005). A literatura mostra que o mesmo ocorre em dentes permanentes (Haapasalo, 1989; Sundqvist et al., 1989; Baumgartner e Falkler Jr., 1991; Siqueira et al., 2003).

Em relação aos instantes pré (1ª colheita) e pós (2ª colheita) houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, exceção feita aos BPB.

Na 1ª colheita, os anaeróbios estavam presentes em 18 canais (94,7%) o que está próximo de valores encontrados em outros trabalhos. Sato et al. (1993) encontraram (91,0%), Faria (2001) encontrou 100,0% e Pazelli et al. (2003) encontraram 96,8%. Na dentição permanente, Assed et al. (1996), Sundqvist et al. (1989) e Peters et al. (2002) detectaram 96,0; 91,4 e 87,0%, respectivamente.

Os aeróbios estavam presentes também em 94,7%. Esta proporção elevada foi encontrada por Pazelli et al. (2003) com 93,5% e em menor proporção por Sato et al. (1993) e Faria (2001).

Os SGM foram encontrados em 52,6%. Faria (2001) encontrou 30,0% e Pazelli et al. (2003) encontraram 48,4%. Destes 52,6%, pode-se identificar a presença de *Streptococcus sobrinus* em 10,52% das amostras. Faria (2001) encontrou 5,0%, Pazelli et al. (2003), no entanto, não encontraram este microrganismo. Em dentes permanentes, outros autores também encontraram estreptococos do grupo mutans: Baumgartner e Falkler Jr. (1991) 33,4%; Pinheiro (1991) 72,0% e Assed et al., (1996) em 52,0% dos casos.

Quanto aos BPB, estão implicados no desenvolvimento de abscessos apicais e são essenciais na inflamação purulenta (Griffiee et al., 1980; van Winkelhoff et al., 1985;

Sundqvist et al., 1989). Sua alta atividade proteolítica é um fator de virulência devido a suas proteinases que afetam as proteínas do plasma envolvidas nos processos de defesa (Sundqvist et al., 1989). Tem sido associados ao aparecimento de sinais e sintomas nas doenças periapicais (Gomes et al., 1996). Neste estudo foi encontrado 52,6% de BPB. Estes resultados diferem dos encontrados por Tomic-Karovic e Jelinek (1971), Faria (2001) e Pazelli et al. (2003) que detectaram, respectivamente, 36,0; 30,0 e 35,5%. Porém, se assemelham aos encontrados em dentes permanentes por Baumgartner e Falkler Jr. (1991), Pantera Jr. et al. (1988) e Assed et al. (1996) que verificaram que estes microrganismos estavam presentes em 50,0; 49,0 e 60,0% dos casos, respectivamente. Ruvierre (2005) pelo método de biologia molecular encontrou 51,0%.

O meio Tio's, que detecta microrganismos presentes em números inferiores a 20ufc/ml, foi positivo em todos os casos.

É importante ressaltar, que ao término dos procedimentos de endodontia, o dente em questão era restaurado com sistema resinoso após a colocação de uma mecha de algodão esterilizada na entrada dos canais radiculares, seguido por uma base de cimento de ionômero de vidro. Isto se faz necessário, uma vez que a literatura mostra que um selamento inadequado poderá levar à infiltrações bacterianas ao longo das margens das restaurações com conseqüente falha do tratamento endodôntico (Barkhordar e Stark, 1990; Kazemi et al., 1994; Siqueira et al., 2001; Zaia et al., 2002; Ricucci e Bergenholtz, 2003).

O emprego de técnicas endodônticas em dentes portadores de necrose pulpar e periapicopatias crônicas adequadas eliminam um grande número de bactérias, permitindo obter-se considerável porcentagem de sucesso no tratamento endodôntico, em torno de 84 a 93% (Byström et al., 1987; Sjögren et al., 1997). Porém, algumas áreas dos canais radiculares não são atingidas pelos instrumentos endodônticos e tampouco por soluções irrigadoras (Zamany et al., 2003). Estas bactérias remanescentes, não atingidas pelo preparo químico-mecânico podem manter o processo inflamatório, mesmo após o tratamento endodôntico (Lin et al., 1991; Ribeiro e Consolaro, 2000). Assim, alguns trabalhos clínicos têm mostrado que um terço a metade dos canais permanecem infectados após a instrumentação e irrigação (Cvek et al., 1976; Byström e Sundqvist, 1983, 1985; Orstavik et al., 1991; Sjögren et al., 1997; Dalton et al., 1998; Molander et al., 1999; Tan e Messer, 2002; Usman et al., 2004; Baugh e Wallace, 2005). Devido a esta possibilidade, medicações intracanaís têm sido advogadas a fim de alcançar a desinfecção e erradicação dos microrganismos nos túbulos dentinários. Este curativo de demora requer um tempo suficiente para ser eficaz (Nerwich et al., 1993; Hosoya et al., 2001), sendo por isto, não aconselhável a obturação em uma única sessão (Sjögren et

al., 1997; Nair et al., 2005). Quando o preparo biomecânico é combinado com um curativo de demora as bactérias podem ser eliminadas dos canais radiculares (Byström et al., 1985; Sjögren et al., 1991).

No entanto, recentes estudos questionam a eficácia do emprego do hidróxido de cálcio na redução do número de bactérias nos sistemas de canais mesmo após um tempo prolongado de utilização (Evans et al., 2002; Haapasalo et al., 2000; Portenier et al., 2002; Peters et al., 2002; Soares et al., 2005). Portanto, um curativo de demora alternativo tem sido pesquisado a fim de melhorar a erradicação bacteriana antes da obturação (Basrani et al., 2004; Wuerch et al., 2004; Abdullah et al., 2005). Em nosso estudo foi utilizada a pasta Calen[®] associada à CHX-1,0%. Esta associação objetiva obter um sinergismo no efeito antimicrobiano sem aumentar a toxicidade. Podbielski et al. (2003) relataram que esta associação promove um sinergismo antibacteriano quando utilizado contra *E. faecalis*, *Peptostreptococcus micros* e *Streptococcus intermedius*. Almyroudi et al. (2002) e Gomes et al. (2003) também relataram este efeito contra as cepas de *E. faecalis*. A CHX, um agente antimicrobiano de amplo espectro apresenta ser eficaz contra cepas resistentes ao hidróxido de cálcio (Delany et al., 1982; Ohara et al., 1993; White et al., 1997). De acordo com Basrani et al. (2004) a associação da CHX ao hidróxido de cálcio não altera o pH, não afeta a radiopacidade do hidróxido de cálcio, aumenta o tempo de trabalho além de aumentar significativamente a viscosidade da pasta. Resultados semelhantes foram obtidos por Rabêlo (2003) e Siren et al. (2004). A solubilidade do hidróxido de cálcio associado à CHX é menor do que com água destilada (Waltimo et al., 1999).

Em nossa 2ª colheita, realizada após 7 dias (Reit et al., 1999) da retirada do curativo de demora foram os seguintes resultados encontrados: anaeróbios (84,2%), BPB (42,1%), aeróbios (84,2%) e SGM (26,3%). Apesar da alta prevalência encontrada, as unidades formadoras de colônia para cada grupo foram muito menores que na 1ª colheita. O meio Tio's foi positivo para 17 (89,4%) casos. Nossos resultados diferem dos encontrados por Pazelli et al. (2003), que apresentaram anaeróbios (31,3%), BPB (0,0%), aeróbios (53,3%) e estreptococos (0,0%). Esta diferença poderia ser explicada, pois, em seu trabalho a 2ª colheita foi realizada após 48 a 72 horas após a remoção do curativo de demora e este foi mantido por um tempo maior, de 21 a 30 dias.

Ainda hoje, a identificação de bactérias é efetuada por meios de procedimentos convencionais baseados no fenótipo. Porém, a especificidade do diagnóstico microbiológico é essencial p/ evitar resultados falso-positivos. Estudos de cultura são limitados, e segundo Ward et al. (1990) menos de 20,0% das bactérias no ambiente são cultiváveis. Este percentual se eleva para 50,0% quando técnicas de cultivo são usadas na identificação de bactérias da cavidade bucal (Socransky et al., 1963). Além disto, é estimado que mesmo com os melhores métodos disponíveis, apenas 0,001% a 15,0% das bactérias no geral são cultivadas (Olsen, 1990; Ward et al., 1990; Amann et al., 1995). Isto sugere que um grande número de microrganismos ainda não foi cultivado por métodos convencionais (Rolph et al., 2001; Sakamoto et al., 2005). Portanto, é provável que microrganismos não cultiváveis estejam presentes nas infecções endodônticas desempenhando um importante papel na patogênese das lesões. Por isto, técnicas de biologia molecular para o estudo da microbiota têm mostrado um avanço significativo na identificação de novos microrganismos. A identificação clássica por meio do fenótipo tem sido substituída pela de identificação do genótipo. Estas técnicas apresentam uma informação confiável a respeito da prevalência de microrganismos (Bergenholtz e Spangberg, 2004). No entanto, apresentam também, desvantagens: não podem diferenciar entre as viáveis e não viáveis e no caso do *Checkerboard*, detecta a presença mediante uma sonda específica, não podendo identificar o inesperado.

Na técnica de biologia molecular, foram encontrados microrganismos anaeróbios, facultativos e aeróbios. Entre os grupos da 1ª e 2ª colheitas não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes. Com relação aos escores, também não houve diferenças estatisticamente significantes entre a 1ª e 2ª colheitas.

Todos os 28 (100,0%) canais radiculares apresentaram evidência de sinal positivo para pelo menos uma sonda. Ruvière (2005) encontrou 96,1% utilizando está mesma técnica. Em dentes permanentes, de Souza et al. (2005), Siqueira et al. (2000a) mostraram que todos os canais foram positivos para pelo menos uma espécie.

Das 35 sondas utilizadas, 31 (88,5%) foram positivas na 1ª colheita e 13 (37,1%) positivas na 2ª colheita. Ruvière (2005) para 34 sondas encontrou 82,3% (28 sondas) de sinal positivo. Em dentes permanentes, de Souza et al. (2005) encontraram em 44 sondas, 42 (95,4%) de sinal positivo, Siqueira et al. (2000a) em 42 sondas, detectaram 22 (52,3%) de sinal positivo.

Este estudo apresentou um número médio de espécies encontrados na 1ª colheita de 5,7 (1 a 31 espécies bacterianas). Ruvière (2005) encontrou 0 a 27 espécies bacterianas (11,4), enquanto em dentes permanentes, de Souza et al. (2005) e Siqueira et al. (2000a) encontraram

5 a 33 espécies (17,3) e 1 a 17 espécies (4,7) respectivamente. Todos utilizando a técnica do *Checkerboard*. Em dentes permanentes com a utilização da técnica de cultura, Sundqvist (1992) encontrou uma média de 5,4 e Peters et al. (2002) uma média de 5,1. Em dentes decíduos utilizando a cultura, Marsh e Largent (1967) encontraram uma média de 2,8 espécies por dente.

Na 2ª colheita, foi encontrado uma média de 2,6 (1 a 6 espécies), enquanto de Souza et al. (2005) utilizando curativo a base de hidróxido de cálcio encontraram uma média de 8,3 espécies por canal.

Em relação aos grupos bacterianos na 1ª colheita, os anaeróbios estavam presentes em 82,3%, os facultativos em 94,1% e os aeróbios em 100,0% das amostras. Já Ruvierre (2005) encontrou anaeróbios em 81,2% e os facultativos em 83,3%. Em seu trabalho não foram pesquisados sondas aeróbias.

Na prevalência inicial de microrganismos, nossos resultados foram diferentes dos encontrados por Ruvierre (2005). Neste estudo, os mais prevalentes foram *Neisseria mucosa* (100,0%), *Fusobacterium nucleatum* sit *polymorphum* (50,0%), *Prevotella melaninogenica* (35,7%) e *Streptococcus gordonii* (28,5%). Enquanto Ruvierre (2005) encontrou *Campylobacter rectus* (90,2%), *Treponema denticola* (88,2%), *Streptococcus intermedius* (76,5%) e *Gemella morbillorum* (72,5%). Na 2ª colheita também *Neisseria mucosa* (100,0%) e *Fusobacterium nucleatum* sit *polymorphum* (42,8%) foram encontrados em altas proporções.

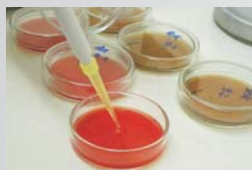
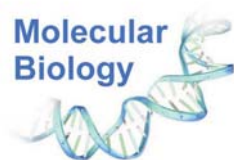
Espécies de *Fusobacterium* sp. são um dos microrganismos mais prevalentes em dentes com necrose pulpar e lesão periapical (Fouad et al., 2003; Sundqvist, 1992). As fusobactérias são capazes de co-agregar com a maioria das outras bactérias bucais, e acredita-se, que sejam importantes organismos de ponte entre os colonizadores iniciais e tardios do biofilme (Kolenbrander et al., 1990). Enquanto que a *Neisseria mucosa*, um microrganismo aeróbio, coco gram-negativo, é isolado da maioria das áreas da cavidade bucal. Neste estudo, foi encontrado em 100,0% das amostras da 1ª e 2ª colheita. Em outro trabalho, de Souza et al. (2005) encontraram 70,0% deste microrganismo na 1ª colheita, e após a utilização de um curativo de demora a base de hidróxido de cálcio obtiveram uma leve redução de sua prevalência. *Prevotella melaninogenica* com 35,7% de prevalência na 1ª colheita foi semelhante ao encontrado por Ruvierre (2005) com 37,3%. Os *Streptococcus gordonii* apresentaram a mesma proporção tanto na 1ª como na 2ª colheita. Estes microrganismos são colonizadores iniciais e produtores de polissacáride extracelular (PEC). Ruvierre (2005) encontrou uma prevalência de 54,9%. Para de Souza et al. (2005), esta foi uma das espécies menos prevalentes.

Algumas bactérias exigentes e de difícil identificação por meio da técnica de cultura foram encontrados, como foi o caso da *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. O que está de acordo com outros trabalhos de Siqueira et al. (2001b) e Roças et al. (2001). Estes dois microrganismos periodontopatogênicos fazem parte do complexo vermelho elaborado por Socransky et al. (1998). Em contra partida, alguns microrganismos encontrados por técnicas de cultura e biologia molecular como *Peptostreptococcus micros* e *Prevotella nigrescens* não foram detectados neste estudo.

A leitura semi-quantitativa dos sinais de quimioluminescência mostrou a presença do escore 0 a 5. Ruvierre (2005) encontrou o escore 0 a 3.

Entre os diversos trabalhos relatados, notaram-se muitas divergências. Vários fatores podem estar relacionados, como a sensibilidade da técnica empregada, uso de diferentes métodos experimentais, concentrações, períodos de análise, diferentes métodos de cultivo bacteriano, diversidade entre as populações estudadas (países diferentes), técnica de colheita do material, entre outros.

Pelo exposto, há de considerar que não há um método único capaz de recuperar todos os microrganismos de um sítio, por isto, torna-se importante o uso de técnicas de biologia molecular associado a técnicas de cultura a fim de levar ao completo conhecimento da microbiota endodôntica e assim, obter novas estratégias de combate à infecção proporcionando um melhor prognóstico ao tratamento endodôntico.



6 conclusão

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- Pela técnica de cultura, houve diferenças estatisticamente significante entre os momentos pré e pós com relação aos microrganismos anaeróbios, aeróbios e estreptococos do grupo mutans.
- Houve redução média do número de unidades formadoras de colônia entre os grupos anaeróbios, aeróbios, bacilos pigmentados de negro e estreptococos do grupo mutans após o preparo biomecânico e manutenção do curativo de demora por 14 dias.
- Os microrganismos mais prevalentes nos canais radiculares de dentes decíduos com necrose pulpar e lesão periapical obtidos pela técnica de cultura, tanto nos instantes pré como pós, foram os anaeróbios e os aeróbios.
- Pela técnica de biologia molecular, não houve diferenças estatisticamente significante entre os momentos pré e pós com relação aos grupos bacterianos.
- Não houve diferenças estatisticamente significante entre os momentos pré e pós, com relação aos escores.
- Pela técnica de biologia molecular, *Neisseria mucosa* e *Fusobacterium nucleatum* sit *polymorphum* foram as espécies mais prevalentes tanto no instante pré como pós.



Referências

REFERÊNCIAS*

- Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod.* 2005;31:30-6.
- Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J.* 1998;31:39-47.
- Agrest A. *Categorical data analysis.* New York: Wiley; 2002.
- Aibel K, Stevens R. Effect of chlorhexidine on Il-6 induction by LPS [abstract]. *J Endod.* 1999;25:283.
- Allard U, Stromberg U, Stromberg T. Endodontic treatment of experimentally induced apical periodontitis in dogs. *Endod Dent Traumatol.* 1987;3:240-4.
- Almyroudi A, Mackenzie D, McHugh S, Saunders WP. The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an in vitro study. *J Endod.* 2002;28:163-7.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 1995;59:143-69.
- Assed S. Prevalência de microrganismos em canais radiculares de dentes humanos com reação periapical crônica. Efeito do preparo biomecânico e do curativo de demora. Imunofluorescência indireta e cultura [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 1994.
- Assed S, Ito IY, Leonardo MR, Silva LAB, Lopatin DE. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. *Endod Dent Traumatol.* 1996;12:66-9.
- Assed S. *Odontopediatria: Bases científicas para a prática clínica.* São Paulo: Artes Médicas; 2005.
- Barkhordar RA, Stark MM. Sealing ability of intermediate restorations and cavity design used in endodontics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1990;69:99-101.
- Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endod J.* 1997;30:155-9.
- Basrani B, Ghanem A, Tjaderhane L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. *J Endod.* 2004;30:413-7.
- Basrani B, Santos JM, Tjaderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, et al. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94:240-5.

* Normas internas do Programa de Pós-graduação em Odontopediatria da FORP-USP (2004).

- Baugh D, Wallace J. The role of apical instrumentation in root canal treatment: a review of the literature. *J Endod.* 2005;31:333-40.
- Baumgartner JC, Falkler WA Jr. Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. *J Endod.* 1991;17:380-3.
- Baumgartner JC, Khemaleelakul S-U, Xia T. Identification of *Spirochetes (Treponemes)* in endodontic infections. *J Endod.* 2003;29:794-7.
- Benatti Neto C. Tratamento de perfurações radiculares com pastas de hidróxido de cálcio e iodofórmio – Emprego de diferentes veículos – estudo histológico em dentes de cães [tese]. Bauru: Universidade de São Paulo; 1984.
- Bergenholtz G, Crawford JJ. Endodontic microbiology. In: Walton RE, Torabinejad M, editors. *Principles and practice of endodontics*. Philadelphia: Saunders; 1989. p. 268-82.
- Bergenholtz G, Spangberg L. Controversies in Endodontics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15:99-114.
- Brook I, Grimm S, Kielich RB. Bacteriology of acute periapical abscess in children. *J Endod.* 1981;7:378-80.
- Buck RA, Cai J, Eleazer PD, Staat RH, Hurst HE. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. *J Endod.* 2001;27:325-7.
- 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.
- Byström A, Happonen RP, Sjögren U, Sundqvist G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Endod Dent Traumatol.* 1987;18:58-63.
- 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.
- Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1983 ;55:307-12.
- Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J.* 1985;18:35-40.
- Cannell JS. The use of antimicrobials in the mouth. *J Int Med Res.* 1981;9:277-82.
- Chavez De Paz LE, Dahlen G, Molander A, Moller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J.* 2003;36:500-8.
- Chong BS, Pitt Ford TR. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J.* 1992;25:97-106.

- Cohen MM, Joress SM, Calisti LP, Mass B. Bacteriologic study of infected deciduous molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1960;3:1382-6.
- Conrads G, Gharbia SE, Gulabivala K, Lampert F, Shah HN. The use of a 16s rDNA PCR for the detection of endodonto-pathogenic bacteria. *J Endod.* 1997;23:433-8.
- Cvek M, Hollender L, Nord CE. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. VI. A clinical, microbiological and radiological evaluation of treatment in one sitting of teeth with mature or immature root. *Odontol Revy.* 1976;27:93-108.
- Dahlen G, Bergenholtz G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *J Dent Res.* 1980;59:1033-40.
- Dalton BC, Orstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M. Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. *J Endod.* 1998;24:763-7.
- Dammaschke T, Schneider U, Stratmann U, Yoo JM, Schafer E. Effect of root canal dressings on the regeneration of inflamed periapical tissue. *Acta Odontol Scand.* 2005;63:143-52.
- D'Arcangelo C, Varvara G, De Fazio P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. *J Endod.* 1999;25:351-3.
- Delany GM, Patterson SS, Miller CH, 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.
- Delgado SEM. Estudo da biocompatibilidade de uma pasta à base de hidróxido de cálcio associada à clorexidina a 1,0%, no tecido conjuntivo subcutâneo da pata de ratos [dissertação]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2002.
- de Rossi A, Silva LA, Leonardo MR, Rocha LB, Rossi MA. Effect of rotary or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide/1% chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;99:628-36.
- de Souza CA, Teles RP, Souto R, Chaves MA, Colombo AP. Endodontic therapy associated with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiologic evaluation by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. *J Endod.* 2005;31:79-83.
- do Amorim CV, Aun CE, Mayer MP. Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol. *Pesqui Odontol Bras.* 2004;18:242-6.
- Engler-Blum G, Meier M, Frank J, Muller GA. Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than 32P-based hybridizations. *Anal Biochem.* 1993;210:235-44.
- Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod.* 2003;29:338-9.

- 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.
- Fabricius L, Dahlén G, Omán AE, Moller AJR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied time of closure. *Scand J Dent Res*. 1982;90:134-44.
- Faria G. Prevalência de microrganismos em canais radiculares de dentes decíduos de humanos portadores de necrose pulpar e lesão periapical: Efeito do preparo biomecânico e do curativo de demora à base de hidróxido de cálcio [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2001.
- Fava LR, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J*. 1999;32:257-82.
- 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.
- Ferreira CM, da Silva Rosa OP, Torres SA, Ferreira FB, Bernardinelli N. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. *Braz Dent J*. 2002;13:118-22.
- Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, et al. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol*. 2002;40:3223-31.
- Fouad AF, Kum KY, Clawson ML, Barry J, Abenoja C, Zhu Q, Caimano M, Radolf JD. Molecular characterization of the presence of *Eubacterium* spp and *Streptococcus* spp in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18:249-55.
- Gatti JJ, Dobeck JM, Smith C, White RR, Socransky SS, Skobe Z. Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA-DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol*. 2000;16:197-204.
- Georgopoulou M, Kontakiotis E, Nakou M. In vitro evaluation of the effectiveness of calcium hydroxide and paramonochlorophenol on anaerobic bacteria from the root canal. *Endod Dent Traumatol*. 1993;9:249-53.
- Geurtsen W, Leyhausen G. Biological aspects of root canal filling materials--histocompatibility, cytotoxicity, and mutagenicity. *Clin Oral Investig*. 1997;1:5-11.
- Godoy VL. Distribuição de bactérias planctônicas, colônias bacterianas e biofilmes microbianos em dentes decíduos com pulpíte e/ou necrose pulpar [tese]. Bauru: Universidade de São Paulo; 1999.
- Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J*. 1996;29:69-75.
- Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J*. 1996;29:235-41.

- Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19:71-6.
- Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, 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;36:267-75.
- Gonçalves RB, Mouton C. Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in infected root canals. *J Endod.* 1999;25:336-40.
- Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol.* 1986;57:370-7.
- Griffie MB, Patterson SS, Miller CH, Kafrawy AH, Newton CW. The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1980;50:457-61.
- Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM, Orstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J.* 2000 ;33:126-31.
- Haapasalo M. *Bacteroides* spp. in dental root canal infections. *Endod Dent Traumatol.* 1989;5:1-10.
- Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1997;24:324-34.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiologic agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000.* 1994;5:78-111.
- Hashimura T, Sato M, Hoshino E. Detection of *Slackia exigua*, *Mogibacterium timidum* and *Eubacterium saphenum* from pulpal and periradicular samples using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. *Int Endod J.* 2001;34:463-70.
- Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *J Endod.* 1988;14:125-7.
- Hausmann E, Raisz LG, Miller WA. Endotoxin: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Science.* 1970;168:862-4.
- Heithersay GS. Stimulation of root formation in incompletely developed pulpless teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1970;29:620-30.
- 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;25:20-4.
- Hobson P. Pulp treatment pf deciduos teeh. Factors affecting diagnosis and treatment. *Br Dent J.* 1970;128:232-8.

- Holland R, Souza V. Tratamento conservador da polpa dental. In: Leonardo MR, Leal JM, editores. Endodontia: tratamento de canais radiculares. São Paulo: Médica Panamericana; 1998. p. 63-75.
- Holt SC, Bramanti TE. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis [Review]. Crit Rev Oral Biol Med. 1991;2:177-281.
- Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, Chen CS, Lin LD, Wang JS. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. J Oral Pathol Med. 2004;33:162-9.
- Hosoya N, Takahashi G, Arai T, Nakamura J. Calcium concentration and pH of the periapical environment after applying calcium hydroxide into root canals in vitro. J Endod. 2001;27:343-6.
- Ito IY, Costa A, Baracchini O. Emprego de gema de ovo no isolamento de *Staphylococcus aureus*. An Microbiol. 1969;16:189-92.
- Ito IY, Albuquerque Jr. RF, Alonso-Verri R. Estreptococos: modificação na técnica de identificação das cepas isoladas da cavidade oral. In: Anais da 15ª Jornada Odontológica de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 1993; Ribeirão Preto, BR. São Paulo: Editora ; 1993. p.5.
- Ito IY, Souza-Gugelmin MCM, Lima SNM. Assepsia e anti-sepsia em endodontia. Biossegurança: controle de infecção. In: Leonardo MR, Leal JM, editores. Endodontia: tratamento de canais radiculares. São Paulo: Panamericana; 1998. p. 261-97.
- Jacobovitz M. Biologia Molecular - Técnica PCR. Monitoração do efeito de curativos de demora à base de hidróxido de cálcio na microbiota de canais radiculares em dentes de humanos portadores de lesão periapical crônica [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2003.
- Jeanson MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. J Endod. 1994;20:276-8.
- Jenkins S, Addy M, Wade W. The mechanism of action of chlorhexidine. A study of plaque growth on enamel inserts in vivo. J Clin Periodontol. 1988;15:415-24.
- Jung IY, Choi BK, Kum KY, Roh BD, Lee SJ, Lee CY, Park DS. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. J Endod. 2000;26:599-604.
- Jung I-Y, Choi B-K, Kum K-Y, Yoo Y-J, Yoon T-C, Lee S-J, et al. Identification of oral *Spirochetes* at the species level and their association with other bacteria in endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001;92:329-34.
- Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965;20:340-9.
- Kantz WE, Henry CA. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact chambers of non-vital teeth in man. Arch Oral Biol. 1974;19:91-6.

- Kazemi RB, Safavi KE, Spangberg LS. Assessment of marginal stability and permeability of an interim restorative endodontic material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;78:788-96.
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LV. Intrageneric coaggregation among strains of human oral bacteria: potential role in primary colonization of the tooth surface. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56:3890-4.
- Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. *J Endod.* 2000;26:315-7.
- Le Goff A, Bunetel L, Mouton C, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. *Oral Microbiol Immunol.* 1997;12:318-22.
- Lenet BJ, Komorowski R, Wu XY, Huang J, Grad H, Lawrence HP, Friedman S. Antimicrobial substantivity of bovine root dentin exposed to different chlorhexidine delivery vehicles. *J Endod.* 2000;26:652-5.
- Leonardo MR, da Silva LA, Leonardo Rde T, Utrilla LS, Assed S. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. *J Endod.* 1993;19:348-52.
- Leonardo MR, Rossi MA, Silva LAB, Ito IY, Bonifácio KC. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *J Endod.* 2002;28:815-8.
- Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifacio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod.* 1999;25:167-71.
- Leonardo MR. *Endodontia: Tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos.* São Paulo: Artes Médicas; 2005.
- Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gangler P, Langeland K. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991;71:603-11.
- Loe H, Schiott CR. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res.* 1970;5:79-83.
- Machado de Oliveira JC, Siqueira JF Jr, Alves GB, Hirata R Jr, Andrade AF. Detection of *Porphyromonas endodontalis* in infected root canals by 16s rRNA gene-directed polymerase chain reaction. *J Endod.* 2000;26:729-32.
- Marsh SJ, Largent MD. A bacteriological study of the pulp canals of infected primary molars. *J Dent Child.* 1967;34:460-70.
- Mc Gee JOD, Isaacson PG, Wright NA. *Oxford textbook of pathology. Principles of pathology.* Oxford: University Press; 1992.

- Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1998;31:1-7.
- Molander A, Reit C, Dahlen G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide in root canals pretreated with 5% iodine potassium iodide. *Endod Dent Traumatol*. 1999;15:205-9.
- Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontology* 2000. 1994;5:66-77.
- Moraes SR, Siqueira JF Jr, Colombo AP, Rôças IN, de S, Domingues R. Comparison of the effectiveness of bacterial culture, 16S rDNA directed polymerase chain reaction, and checkerboard DNA-DNA hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic infections. *J Endod*. 2002;28:86-9.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263-73.
- Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res*. 2002;81:761-6.
- Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod*. 2004;30:785-7.
- Nair BC, Mayberry WR, Dziak R, Chen PB, Levine MJ, Hausmann E. Biological effects of a purified lipopolysaccharide from *Bacteroides gingivalis*. *J Periodontal Res*. 1983;18:40-9.
- Nair PNR, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod*. 1990;16:580-8.
- Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;99:231-52.
- Nelson-Filho P. Avaliação da resposta inflamatória, após injeção de diferentes pastas à base de hidróxido de cálcio, no tecido conjuntivo subcutâneo e na cavidade peritoneal de camundongos isogênicos [dissertação]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 1996.
- Nelson Filho P, Silva LA, Leonardo MR, Utrilla LS, Figueiredo F. Connective tissue responses to calcium hydroxide-based root canal medicaments. *Int Endod J*. 1999;32:303-11.
- Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LAB, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod*. 2002;28:694-6.
- Nerwich A, Figdor D, Messer HH. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod*. 1993;19:302-6.
- Ohara P, Torabinejad M, Kettering JD. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. *Endod Dent Traumatol*. 1993;9:95-100.

- Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J.* 2004;37:38-41.
- Oliveira LD, Leao MV, Carvalho CA, Camargo CH, Valera MC, Jorge AO, Unterkircher CS. In vitro effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. *J Dent.* 2005;33:107-14.
- Olsen GJ. Microbial ecology. Variation among the masses. *Nature.* 1990;345:20.
- Onçag O, Hosgor M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J.* 2003;36:423-32.
- Orstavik 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.
- Pantera EA Jr, Zambon JJ, Shih-Levine M. Indirect immunofluorescence for the detection of *Bacteroides* species in human dental pulp. *J Endod.* 1988;14:218-23.
- Pazelli LC, de Freitas AC, Ito IY, de Souza-Gugelmin MC, Medeiros AS, Nelson-Filho P. Prevalência de microrganismos em canais radiculares de dentes decíduos de humanos com necrose pulpar e lesão periapical crônica. *Pesqui Odontol Bras.* 2003;17:367-71.
- Peters LB, van Winkelhoff AJ, Buijs JF, Wesselink PR. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *Int Endod J.* 2002;35:13-21.
- Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003;36:1-11.
- Pinheiro FM, Galiotti FA, Ono F, Ito IY, Costa WF. Efeito da instrumentação manual e ultrassônica na redução de unidade formadora de colônia do canal radicular. In: VII Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica. Águas de São Pedro: SBPqO; 1991. p. 70.
- Piskin B, Turkun M. Stability of various sodium hypochlorite solutions. *J Endod.* 1995;21:253-5.
- Podbielski A, Spahr A, Haller B. Additive antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on common endodontic bacterial pathogens. *J Endod.* 2003;29:340-5.
- Portenier I, Haapasalo H, Orstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. *J Endod.* 2002;28:634-7.
- Rabêlo RTS. Penetrabilidade de diferentes pastas à base de hidróxido de cálcio na dentina radicular de dentes decíduos e permanentes. Avaliação do pH e da liberação de íons cálcio [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2003.

- Reit C, Molander A, Dahlen G. The diagnostic accuracy of microbiologic root canal sampling and the influence of antimicrobial dressings. *Endod Dent Traumatol.* 1999;15:278-83.
- Ribeiro FC, Consolaro A. Bactérias nas estruturas mineralizadas de dentes com necrose pulpar e granuloma apical. *Rev Dent Press Biol Oral.* 2000;1:17-30
- Ricucci D, Bergenholtz G. Bacterial status in root-filled teeth exposed to the oral environment by loss of restoration and fracture or caries a histobacteriological study of treated cases. *Int Endod J.* 2003;36:787-802.
- Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Scient Am.* 1992;267:54-61.
- Rôças IN, Siqueira JF Jr, Andrade AF, de Uzeda M. Oral treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR. *Int Endod J.* 2003;36:20-6.
- Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR, Coelho AM. "Red complex" (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91:468-71.
- Rôças IN, Siqueira JF Jr. Occurrence of two newly named oral treponemes - *Treponema parvum* and *Treponema putidum* - in primary endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2005;20:372-5.
- 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.
- Ruvière DB. *Biologia molecular: Utilização da técnica checkerboard DNA-DNA hybridization para a identificação da microbiota de canais radiculares de dentes decíduos, em humanos [dissertação].* Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2005.
- Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J Endod.* 1994;20:127-9.
- Saito D, Leonardo Rde T, Rodrigues JL, Tsai SM, Hofling JF, Goncalves RB. Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. *J Med Microbiol.* 2006;55:101-7.
- Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21:112-22.
- Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. Molecular analysis of human oral microbiota. *J Periodontal Res.* 2005;40:277-85.
- Sato T, Hoshino E, Uematsu H, Noda T. Predominant obligate anaerobes in necrotic pulps of human deciduous teeth. *Microb Ecol Health Dis.* 1993;6:269-75.
- Schafer E, Bossmann K. Antimicrobial efficacy of chloroxylenol and chlorhexidine in the treatment of infected root canals. *Am J Dent.* 2001;14:233-7.

Schafer E, Bossmann K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2005;31:53-6.

Schroder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J Dent Res*. 1985;64 Spec No:541-8.

Seltzer S. *Endodontology: biologic considerations in endodontic procedures*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1988.

Shovelton DS. The presence and distribution of microorganisms within non-vital teeth. *Br Dent J*. 1964;117:101-7.

Siegel S. *Estatística não-paramétrica para a ciência do comportamento*. São Paulo: McGraw-Hill; 1975.

Silva LAB. Rizogênese incompleta – Efeitos de diferentes pastas à base de hidróxido de cálcio na complementação radicular e na reparação periapical em dentes de cães – Estudo histopatológico [dissertação]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 1988.

Silva LAB, Leonardo MR. Qual a orientação para o tratamento endodôntico dos dentes decíduos? *Rev Assoc Paul Cirurg Dent*. 1995;49:385.

Silva LA, Leonardo MR, Assed S, Tanomaru Filho M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. *Braz Dent J*. 2004;15:109-14.

Silva LA, Leonardo MR, da Silva RS, Assed S, Guimaraes LF. Calcium hydroxide root canal sealers: evaluation of pH, calcium ion concentration and conductivity. *Int Endod J*. 1997;30:205-9.

Silva LAB, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin *in vivo*. *J Endod*. 2002;28:94-8.

Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod*. 1998;24:414-6.

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

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Santos KR. Detection of *Treponema denticola* in endodontic infections by 16s rRNA gene directed polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 2000b;15:335-7.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Oliveira JC, Santos KR. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod*. 2001a;27:563-6.

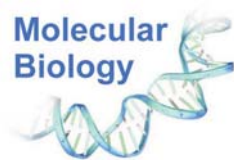
Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001b;92:451-7.

- Siqueira JF Jr, Rôças IN, Abad EC, Castro AJ, Gahyva SM, Favieri A. Ability of three root-end filling materials to prevent bacterial leakage. *J Endod.* 2001c ;27:673-5.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. *Actinomyces* species, *Streptococci*, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. *J Endod.* 2002a;28:168-72.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN, de Uzeda M, Colombo AP, Santos KR. Comparison of 16S rDNA-based PCR and checkerboard DNA-DNA hybridization for detection of selected endodontic pathogens. *J Med Microbiol.* 2002b;51:1090-6.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN. *Dialister pneumosintes* can be a suspected endodontic pathogen. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94:494-8.
- Siqueira JF Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94:281-93.
- Siqueira JF Jr. Taxonomic changes of bacteria associated with endodontic infections. *J Endod.* 2003;29:619-23.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN. *Campylobacter gracilis* and *Campylobacter rectus* in primary endodontic infections. *Int Endod J.* 2003;36:174-80.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN. Detection of *Filifactor alocis* in endodontic infections associated with different forms of periradicular diseases. *Oral Microbiol Immunol.* 2003a;18:263-5.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN. PCR-based identification of *Treponema maltophilum*, *T amylovorum*, *T medium*, and *T lecithinolyticum* in primary root canal infections. *Arch Oral Biol.* 2003b;48:495-502.
- Siqueira JF Jr, Rôças 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.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN, Alves FR, Santos KR. Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: a molecular investigation. *J Endod.* 2004;30:638-43.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3314-9.
- Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997;30:297-306.
- 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.
- Sjögren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod.* 1990;16:498-504.

- Snedecor GW e Cochran WG. Statistical methods. Ames: Iowa State University Press; 1967.
- Socransky SS, Gibbons RJ, Dale AC, Bortnick L, Rosenthal E, MacDonald JB. The microbiota of the gingival crevice area of man. I. Total microscopic and viable counts and counts of specific organisms. *Arch Oral Biol.* 1963;8:275-80.
- Socransky SS, Haffajee AD. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment [Review]. *J Periodontol Res.* 1991;26:195-212.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25:134-44.
- Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, Goodson JM. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19:352-62.
- Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Biotechniques.* 1994;17:788-92.
- Southard SR, Drisko CL, Killooy WJ, Cobb CM, Tira DE. The effect of 2% chlorhexidine digluconate irrigation on clinical parameters and the level of *Bacteroides gingivalis* in periodontal pockets. *J Periodontol.* 1989;60:302-9.
- Souza-Gugelmim MCM, Nelson-Filho P, Faria G, Palhares JC, Froner JC, Silva LAB, Ito IY. Determinação da microbiota de canais radiculares de dentes decíduos e permanentes portadores de necrose pulpar e lesão periapical, por meio da coloração de Gram. *Stoma* 2001;60:26-30.
- Sprent P. Applied nonparametric statistical methods. London: Chapman e Hall; 1993.
- Sunde PT, Tronstad L, Eribe ER, Lind PO, Olsen I. Assessment of periradicular microbiota DNA-DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol.* 2000;16:191-6.
- Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol.* 1992;7:257-62.
- Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps [dissertation]. Umea: Umea University; 1976.
- Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85:86-93.
- Sundqvist G, Johansson E, Sjogren U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *J Endod.* 1989;15:13-9.
- Syed SA, Loesche WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl Microbiol.* 1972;24:638-44.

- Tan BT, Messer HH. The quality of apical canal preparation using hand and rotary instruments with specific criteria for enlargement based on initial apical file size. *J Endod.* 2002;28:658-64.
- Tang G, Samaranayake LP, Yip HK. Molecular evaluation of residual endodontic microorganisms after instrumentation, irrigation and medication with either calcium hydroxide or Septomixine. *Oral Dis.* 2004;10:389-97.
- Tani-Ishii N, Wang C-T, Tanner A, Stashenko P. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 1994;9:129-35.
- Tanomaru Filho M, Leonardo MR, da Silva LA. Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. *J Endod.* 2002;28:295-9.
- Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J.* 2003;36:733-9.
- Tchaou WS, Turng BF, Minah GE, Coll JA. In vitro inhibition of bacteria from root canals of primary teeth by various dental materials. *Pediatr Dent.* 1995;17:351-5.
- Tomic-Karovic K, Jelinek E. Comparative study of the bacterial flora in the surroundings, the root canals and sockets of deciduous molars. *Int Dent J.* 1971;21:375-88.
- Torres SA. Avaliação do ágar SB₂₀ e MSB na contagem de estreptococos do grupo mutans na saliva e na placa dental de adolescentes [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 1991.
- Toyoshima Y, Fukushima H, Inoue J-I, Sasaki Y, Yamamoto K, Katao H, Ozaki K, Moritani Y, Saito T, Hieda T, Sagawa HA. A bacteriological study of periapical pathosis on deciduous teeth. *JPN J Pedod.* 1988;26:449-58.
- Tronstad L. Recent development in endodontic research. *Scand J Dent Res.* 1992;100:52-9.
- Umezumi A, Kaneko N, Toyama Y, Watanabe Y, Itoh H. Appearance of osteoclasts by injections of lipopolysaccharides in rat periodontal tissue. *J Periodontal Res.* 1989;24:378-83.
- Usman N, Baumgartner JC, Marshall JG. Influence of instrument size on root canal debridement. *J Endod.* 2004;30:110-2.
- Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. *Endod Dent Traumatol.* 1993;9:243-8.
- van Winkelhoff AJ, Carlee AW, de Graaff J. *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. *Infect Immun.* 1985;49:494-8.
- 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.

- 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.
- Ward DM, Weller R, Bateson MM. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*. 1990;345:63-5.
- White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod*. 1997;23:229-31.
- Wuerch RM, Apicella MJ, Mines P, Yancich PJ, Pashley DH. Effect of 2% chlorhexidine gel as an intracanal medication on the apical seal of the root-canal system. *J Endod*. 2004;30:788-91.
- Xia T, Baumgartner JC, David LL. Isolation and identification of *Prevotella tanneriae* from endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol*. 2000;15:273-5.
- Yamasaki M, Nakane A, Kumazawa M, Hashioka K, Horiba N, Nakamura H. Endotoxin and gram-negative bacteria in rat periapical lesions. *J Endod*. 1992;18:501-4.
- Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endod*. 1995;21:513-5.
- Zaia AA, Nakagawa R, De Quadros I, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. An in vitro evaluation of four materials as barriers to coronal microleakage in root-filled teeth. *Int Endod J*. 2002;35:729-34.
- Zamany A, Safavi K, Spangberg LS. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;96:578-81.
- 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;92:440-5.
- Zehnder M, Grawehr M, Hasselgren G, Waltimo T. Tissue-dissolution capacity and dentin-disinfecting potential of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;96:608-13.
- 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. Epub 2005 Oct 12.
- Zuccolotto CEBG. Detecção de TNF- α , IL-1 e Nitrito produzidos em cultura de monócitos expostos à endotoxina (LPS), associada ou não ao hidróxido de cálcio [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2003.



Apêndices

APÊNDICE A – Ficha de Identificação e Anamnese

Projeto: Detecção da microbiota de canais radiculares de dentes decíduos humanos com necrose pulpar e lesão periapical pelo método *checkerboard DNA-DNA hybridization* e pela cultura microbiana, antes e após preparo biomecânico e uso de curativo de demora à base de hidróxido de cálcio associado à clorexidina.

P.G. Fumio Matoba Júnior / Prof^a. Dr^a. Izabel Yoko Ito

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

1. N° PASTA:
2. DENTE:
3. Nome completo:
4. Apelido:
5. Idade:anos e meses
6. Data de Nascimento:
7. Sexo: M () F ()
8. Peso: 9. Altura:
10. Naturalidade:
11. Nome da mãe:
12. Nome do pai:
13. Início do tratamento:/...../.....
14. Data da radiografia de controle: //
15. Endereço: n°
16. Bairro:
17. CEP:
18. Cidade:
19. Estado: 20. Telefone: ()

ANAMNESE

1. Qual a queixa principal?
2. Já foi ao dentista alguma vez? afirma () nega ()
3. Para quê?
4. Já recebeu anestesia odontológica? afirma () nega ()
5. Teve algum problema? afirma () nega () Qual?
6. Está sob cuidado médico? afirma () nega ()
7. Desde quando? Porquê?
8. Sofreu alguma doença grave ou operação? afirma () nega () Qual?
9. Está tomando algum medicamento? afirma () nega () Qual?
10. É alérgico a algum medicamento ou substância? afirma () nega ()
11. Qual?
12. Já tomou algum antibiótico? afirma () nega () Qual?
13. Quando? Motivo:
14. Possui alguma desordem sanguínea tipo anemia? afirma () nega ()
15. Quando se corta, o sangue demora a coagular? afirma () nega ()

16. Possui alguma história de problemas cardíacos? afirma () nega ()
17. Qual?
18. Possui alguma história de infecção das vias urinárias, bexiga ou rins? afirma () nega ()
19. Tem ou teve hepatite? afirma () nega ()
20. Tem ou teve tuberculose? afirma () nega ()
21. Tem ou teve febre reumática? afirma () nega ()
22. Seu filho(a) ou alguém da família é diabético? afirma () nega ()
23. Seu filho possui história de epilepsia, convulsões ou desmaios? afirma () nega ()
24. Possui alguma doença pulmonar (asma, bronquite, falta de ar)? afirma () nega ()
25. Seu filho sofreu alguma variação de peso ultimamente? afirma () nega ()
26. Seu filho possui com freqüência aftas ou boqueiras? afirma () nega ()
27. Possui alguma história de herpes labial? afirma () nega ()
28. Seu filho possui algum problema não relacionado acima o qual gostaria de deixar registrado?
afirma () nega () Qual?
29. Data do último tratamento odontológico: Local:

EXAME INTRABUCAL

1. Edema: Presente () Ausente () Local:
2. Fístula: Presente () Ausente () Local:
3. Odor: Presente () Ausente ()
4. Dor: Provocada () Espontânea () Percussão () Dente:
5. Mobilidade: Presente () Ausente ()
6. Higiene Bucal: Boa () Regular () Má ()
7. Biofilme Dental: Ausente () Presente em condições normais () Grande quantidade ()
8. Gengiva sadia () Gengiva inflamada e com sangramentos () Presença de cálculos ()

EXAME RADIOGRÁFICO

	INICIAL	FINAL
Rizólise	() 1/3 () 2/3 () +2/3	() 1/3 () 2/3 () +2/3
Lâmina Dura	() Normal () Interrompida	() Normal () Interrompida
Rarefação Óssea Periapical	() Ausente () Presente	() Ausente () Presente
Reabsorção Interna	() Ausente () Presente	() Ausente () Presente
Calcificações Distróficas	() Ausente () Presente	() Ausente () Presente

Todas as informações prestadas por mim são verdadeiras e estou ciente e de acordo sobre a importância de não omitir nenhum detalhe das perguntas acima.

Assinatura dos pais ou responsável

Data: ___/___/___

APÊNDICE B – Tabelas Cultura

Tabela B.1 - Medidas-resumo das variáveis do exame de cultura

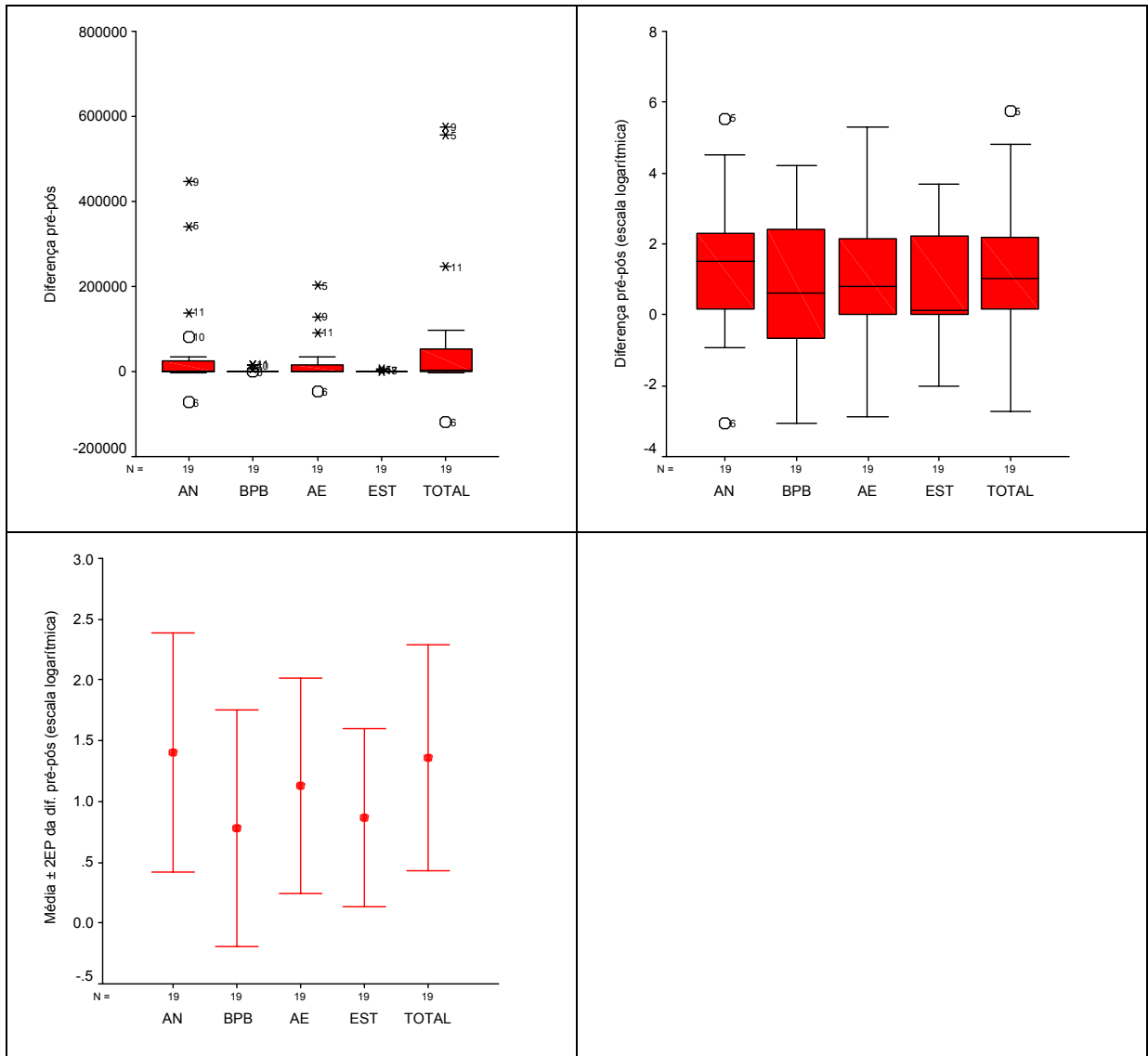
Variável	Momento	N	Média	Desvio-padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Anaeróbios	pré	19	58057	124623	1600	0	446000
	pós	19	4392	16406	180	0	72000
	pré-pós	19	53666	127765	1320	-71940	445980
BPB	pré	19	2183	5044	160	0	17000
	pós	19	89	273	0	0	1200
	pré-pós	19	2094	5069	120	-1200	17000
Aeróbios	pré	19	27014	54584	1530	0	202000
	pós	19	3002	10685	140	0	47000
	pré-pós	19	24012	57032	840	-46940	202000
Estreptococos	pré	19	477	1154	20	0	4800
	pós	19	13	27	0	0	100
	pré-pós	19	465	1159	20	-100	4800
Total de bactérias	pré	19	87732	178085	4640	0	574990
	pós	19	7496	27347	420	0	120200
	pré-pós	19	80236	183773	4220	-119980	574610

Tabela B.2 – Medidas-resumo das variáveis do exame de cultura em escalalogarítmica (base 10)

Variável	Momento	N	Média	Desvio-padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Anaeróbios	pré	19	3.5	1.4	3.2	0.0	5.6
	pós	19	2.1	1.3	2.3	0.0	4.9
	pré-pós	19	1.4	2.1	1.5	-3.1	5.5
BPB	pré	19	1.6	1.6	2.2	0.0	4.2
	pós	19	0.8	1.0	0.0	0.0	3.1
	pré-pós	19	0.8	2.1	0.6	-3.1	4.2
Aeróbios	pré	19	3.3	1.3	3.2	0.0	5.3
	pós	19	2.1	1.2	2.1	0.0	4.7
	pré-pós	19	1.1	1.9	0.8	-2.9	5.3
Estreptococos	pré	19	1.3	1.4	1.3	0.0	3.7
	pós	19	0.4	0.7	0.0	0.0	2.0
	pré-pós	19	0.9	1.6	0.1	-2.0	3.7
Total de bactérias	pré	19	3.8	1.4	3.7	0.0	5.8
	pós	19	2.4	1.4	2.6	0.0	5.1
	pré-pós	19	1.4	2.0	1.0	-2.7	5.7

APÊNDICE C – Gráfico Cultura

Gráfico 1 - Box plots e Média ± 2EP da diferença pré-pós das variáveis medidas pelo exame de cultura



Apêndice D – Resultados da biologia molecular

Amostra	1º Colheita			2º Colheita		
	Anaeróbios	Facultativos	Aeróbios	Anaeróbios	Facultativos	Aeróbios
1	-	-	<i>N. mucosa</i> <10 ⁵	-	<i>C. ochracea</i> <10 ⁵	<i>N. mucosa</i> <10 ⁵
2	<i>C. rectus</i> <10 ⁵	-	<i>N. mucosa</i> <10 ⁵	-	-	<i>N. mucosa</i> <10 ⁵
3	-	<i>C. gingivalis</i> <10 ⁵	<i>N. mucosa</i> <10 ⁵	-	-	<i>N. mucosa</i> <10 ⁵
4	-	-	<i>N. mucosa</i> <10 ⁵	-	-	<i>N. mucosa</i> <10 ⁵
5	<i>C. rectus</i> <10 ⁵	-	<i>N. mucosa</i> <10 ⁵	<i>F. nucleatum nucleatum</i> <10 ⁵	-	<i>N. mucosa</i> <10 ⁵
	<i>F. nucleatum polymorphum</i> <10 ⁵	-	-	<i>F. nucleatum polymorphum</i> <10 ⁵	-	-
6	<i>P. melaninogenica</i> <10 ⁵	-	<i>N. mucosa</i> entre 10 ⁵ e 10 ⁶	<i>P. gingivalis</i> <10 ⁵	-	<i>N. mucosa</i> =10 ⁵
7	-	-	<i>N. mucosa</i> <10 ⁵	<i>F. nucleatum nucleatum</i> <10 ⁵	-	<i>N. mucosa</i> =10 ⁵
	<i>E. saburreum</i> <10 ⁵	<i>A. actinomycetemcomitans</i> a <10 ⁵	-	<i>P. melaninogenica</i> <10 ⁵	-	-
	<i>F. periodonticum</i> entre 10 ⁵ e 10 ⁶	<i>A. actinomycetemcomitans</i> b <10 ⁵	-	<i>F. nucleatum nucleatum</i> <10 ⁵	-	-
	<i>F. nucleatum polymorphum</i> =10 ⁶	<i>A. naeslundii</i> I entre 10 ⁵ e 10 ⁶	-	-	-	-
	<i>P. acnes</i> >10 ⁵	<i>A. israelii</i> >10 ⁵	-	-	-	-
	<i>P. melaninogenica</i> =10 ⁶	<i>A. gerencseriae</i> >10 ⁶	-	-	-	-
	<i>S. noxia</i> =10 ⁵	<i>A. odontolyticus</i> >10 ⁶	-	-	-	-
	<i>T. denticola</i> =10 ⁶	<i>C. gingivalis</i> <10 ⁵	-	-	-	-
	-	<i>E. corrodens</i> =10 ⁶	-	-	-	-
	-	<i>S. anginosus</i> <10 ⁵	-	-	-	-
	-	<i>S. intermedius</i> entre 10 ⁵ e 10 ⁶	-	-	-	-
	-	<i>S. gordonii</i> <10 ⁵	-	-	-	-
	-	<i>S. oralis</i> <10 ⁵	-	-	-	-
	-	<i>S. sanguinis</i> entre 10 ⁵ e 10 ⁶	-	-	-	-
8	<i>V. parvula</i> entre 10 ⁵ e 10 ⁶	<i>S. mitis</i> entre 10 ⁵ e 10 ⁶	<i>N. mucosa</i> >10 ⁶	<i>A. viscosus</i> <10 ⁵	-	<i>N. mucosa</i> =10 ⁶
	<i>T. forsythia</i> >10 ⁶	<i>A. actinomycetemcomitans</i> a entre 10 ⁵ e 10 ⁶	-	-	-	-
	<i>C. rectus</i> >10 ⁶	<i>A. actinomycetemcomitans</i> b entre 10 ⁵ e 10 ⁶	-	-	-	-
	<i>E. nodatum</i> <10 ⁵	<i>A. naeslundii</i> I =10 ⁶	-	-	-	-
	<i>E. saburreum</i> <10 ⁵	<i>A. israelii</i> >10 ⁶	-	-	-	-
	<i>F. periodonticum</i> =10 ⁵	<i>A. gerencseriae</i> >10 ⁶	-	-	-	-
	<i>F. nucleatum polymorphum</i> >10 ⁶	<i>A. odontolyticus</i> >10 ⁶	-	-	-	-
	<i>F. nucleatum nucleatum</i> =10 ⁶	<i>C. gingivalis</i> =10 ⁶	-	-	-	-
	<i>P. intermedia</i> >10 ⁶	<i>C. ochracea</i> <10 ⁵	-	-	-	-
	<i>P. acnes</i> >10 ⁶	<i>C. sputigena</i> =10 ⁶	-	-	-	-
	<i>P. gingivalis</i> >10 ⁶	<i>E. corrodens</i> <10 ⁵	-	-	-	-
	<i>P. melaninogenica</i> >10 ⁶	<i>S. anginosus</i> =10 ⁶	-	-	-	-
	<i>S. noxia</i> =10 ⁶	<i>S. intermedius</i> =10 ⁶	-	-	-	-
	<i>T. denticola</i> >10 ⁶	<i>S. gordonii</i> =10 ⁶	-	-	-	-
	-	<i>S. oralis</i> =10 ⁶	-	-	-	-
9	<i>V. parvula</i> >10 ⁶	<i>S. sanguinis</i> =10 ⁶	<i>N. mucosa</i> >10 ⁶	<i>F. nucleatum polymorphum</i> =10 ⁵	<i>S. gordonii</i> <10 ⁵	<i>N. mucosa</i> =10 ⁶
	-	<i>S. mitis</i> =10 ⁶	-	-	-	-

Amostra	1º Colheita			2º Colheita		
	Anaeróbios	Facultativos	Aeróbios	Anaeróbios	Facultativos	Aeróbios
10	<i>F. nucleatum polymorphum</i> =10 ⁶	-	<i>N. mucosa</i> =10 ⁶	<i>F. nucleatum polymorphum</i> =10 ⁶	<i>A. odontolyticus</i> entre 10 ⁵ e 10 ⁶	<i>N. mucosa</i> =10 ⁶
11	<i>P. melaninogenica</i> =10 ⁶	-	<i>N. mucosa</i> =10 ⁶	<i>V. parvula</i> entre 10 ⁵ e 10 ⁶	<i>S. constellatus</i> <10 ⁵	<i>N. mucosa</i> =10 ⁶
12	<i>F. nucleatum polymorphum</i> <10 ⁵	<i>S. gordonii</i> entre 10 ⁵ e 10 ⁶	<i>N. mucosa</i> =10 ⁶	<i>C. rectus</i> <10 ⁵	<i>S. gordonii</i> <10 ⁵	<i>N. mucosa</i> =10 ⁶
13	<i>F. nucleatum polymorphum</i> <10 ⁵	<i>S. gordonii</i> =10 ⁵	<i>N. mucosa</i> entre 10 ⁵ e 10 ⁶	<i>F. nucleatum polymorphum</i> =10 ⁵	-	<i>N. mucosa</i> =10 ⁶
14	<i>F. nucleatum polymorphum</i> =10 ⁵	-	<i>N. mucosa</i> entre 10 ⁵ e 10 ⁶	<i>F. nucleatum polymorphum</i> =10 ⁶	<i>S. gordonii</i> <10 ⁵	<i>N. mucosa</i> =10 ⁶
	<i>P. melaninogenica</i> =10 ⁶	5 (35,71%)	14 (100,00%)	<i>P. acnes</i> <10 ⁵	5 (35,71%)	<i>N. mucosa</i> =10 ⁶
	<i>T. denticola</i> =10 ⁶	9 (64,28%)		<i>P. gingivalis</i> <10 ⁵		
				<i>P. melaninogenica</i> =10 ⁶		
				<i>F. nucleatum polymorphum</i> <10 ⁵		
				8 (57,14%)		14 (100,00%)

APÊNDICE E – Tabelas biologia molecular

Tabela E.1 - Medidas-resumo do exame de biologia molecular

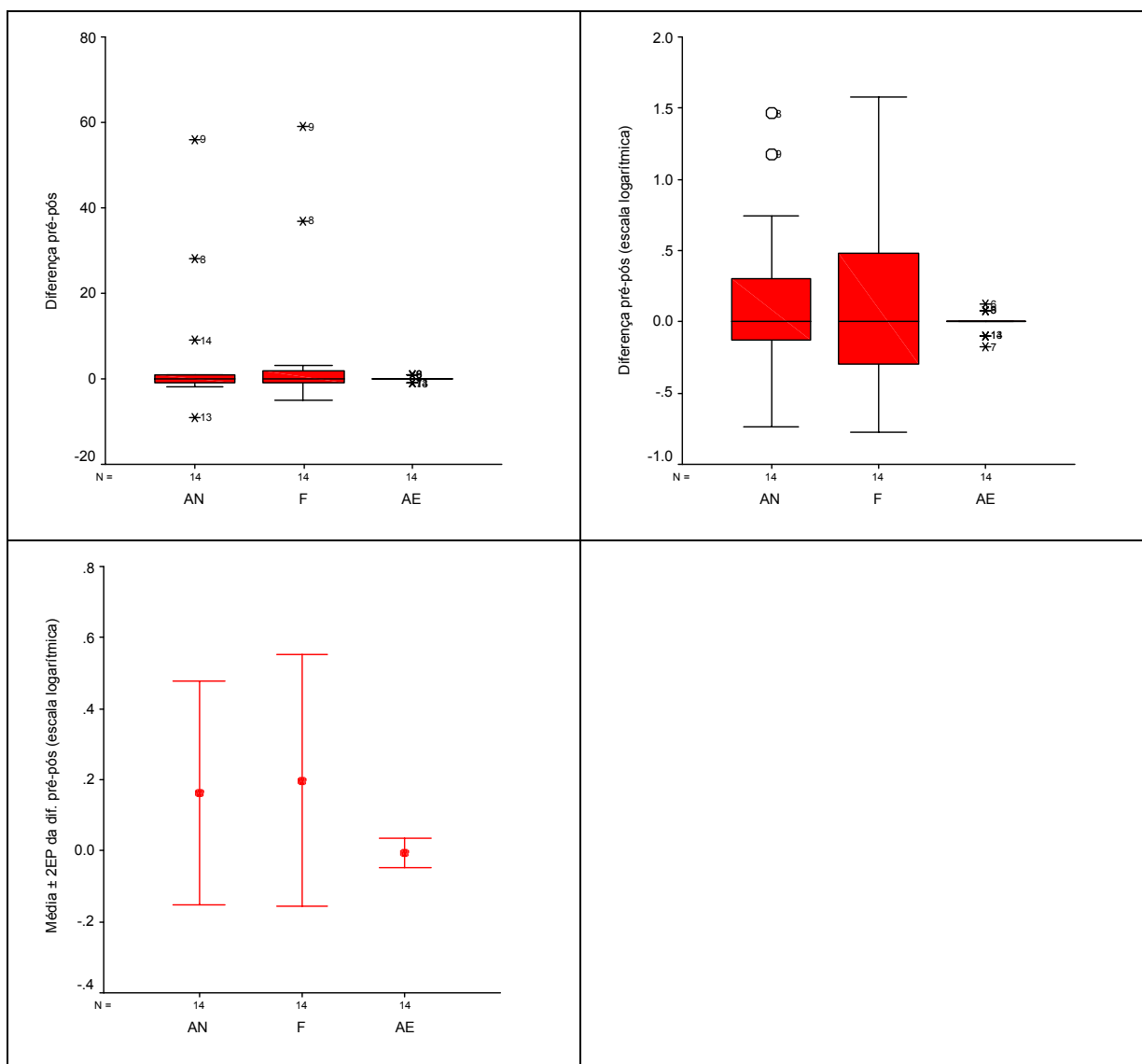
Variável	Momento	N	Média	Desvio-padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Anaeróbios	pré	14	8	17	1	0	59
	pós	14	2	3	1	0	10
	pré-pós	14	6	17	0	-9	56
Facultativos	pré	14	7	18	0	0	60
	pós	14	1	1	0	0	5
	pré-pós	14	7	18	0	-5	59
Aeróbios	pré	14	3	2	3	1	5
	pós	14	3	1	3	1	4
	pré-pós	14	0	1	0	-1	1

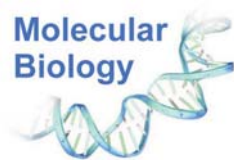
Tabela E.2 - Medidas-resumo do exame de biologia molecular na escala logarítmica (base 10)

Variável	Momento	N	Média	Desvio-padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Anaeróbios	pré	14	0.49	0.59	0.30	0.00	1.78
	pós	14	0.33	0.36	0.30	0.00	1.04
	pré-pós	14	0.16	0.59	0.00	-0.74	1.46
Facultativos	pré	14	0.34	0.60	0.00	0.00	1.79
	pós	14	0.14	0.23	0.00	0.00	0.78
	pré-pós	14	0.20	0.66	0.00	-0.78	1.58
Aeróbios	pré	14	0.52	0.20	0.60	0.30	0.78
	pós	14	0.53	0.19	0.59	0.30	0.70
	pré-pós	14	-0.01	0.08	0.00	-0.18	0.12

APÊNDICE F – Gráfico biologia molecular

Gráfico 2 - Box plots e Média ± 2EP da diferença pré-pós das variáveis medidas pelo exame de biologia molecular





Anexos

ANEXO A – Termo de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Avenida do Café, s/nº - Telefone: (016) 602-3970
14040-904 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Fax: (016) 633-0999

CEP/26204/FORP/090804
MLCK/mlck

Prezada Professora,

Ref. Processo nº 2004.1.571.58.5

De ordem da Senhora Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, informamos que o referido Comitê, em sua 52ª Sessão realizada no dia 06 de agosto de 2004, deliberou aprovar o Projeto de Pesquisa envolvendo seres humanos intitulado: **"Detecção da microbiota de canais radiculares de dentes decíduos com necrose pulpar e lesão periapical pelo método *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, antes e após curativo de demora com pasta à base de hidróxido de cálcio/clorexidina"**, a ser desenvolvido por Vossa Senhoria, na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, devendo o atestado para publicação final, ser expedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa, após a entrega e aprovação do Relatório Final pelo referido Comitê.

Na oportunidade, lembramos da necessidade de apresentar a este Comitê, o **Relatório Parcial** em **31 de maio de 2005** e o **Relatório Final** no dia **28 de fevereiro de 2006**.

Atenciosamente,



Maria Lúcia Câmara Kühn
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Izabel Yoko Ito
Professora Doutora do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas -
FCFRP - USP

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO**

Eu,, CPF na qualidade de autorizo o menor em tratamento odontológico nesta Instituição, a participar da pesquisa: Detecção da microbiota de canais radiculares de dentes decíduos humanos com necrose pulpar e lesão periapical pelo método *checkerboard DNA-DNA hybridization* e pela cultura microbiana, antes e após preparo biomecânico e uso de curativo de demora à base de hidróxido de cálcio associado ao à clorexidina, conduzido pelo Pós-Graduando Fumio Matoba Júnior - Área de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Izabel Yoko Ito.

O propósito do estudo é identificar, por meio de técnica genética, as bactérias predominantes nos canais de dentes de leite, com infecção, com o intuito de direcionar tratamento adequado, colaborando assim para a elevação dos índices de sucesso do tratamento de canal em dentes de leite.

Estou ciente de que esta pesquisa é científica e poderá ser publicada em jornais, revistas e/ou congressos científicos no país e no exterior, mantendo-se o sigilo e respeitando-se o Estatuto da Criança e do Adolescente. Declaro que fui devidamente esclarecido(a) de forma oral e escrita que:

- 1) O material colhido do canal será utilizado para uma pesquisa na área odontológica, onde serão identificadas as bactérias presentes no canal radicular que causaram a morte do nervo e lesão óssea. Esta pesquisa vai auxiliar os cirurgiões-dentistas na escolha do melhor tratamento;
- 2) Serão realizadas radiografias do dente em questão;
- 3) A colheita do material será realizada por profissional, utilizando-se limas e cones de papel absorvente devidamente esterilizado e preparado para este procedimento. Duas colheitas estão programadas;
- 4) Este procedimento não irá causar nenhum prejuízo à integridade física ou moral da criança, e não causará desconforto ou risco;
- 5) Após a primeira colheita do material, o paciente será submetido à instrumentação do canal coadjuvada com solução irrigadora de hipoclorito de sódio a 2,5%, uso do curativo

de demora por 14 dias à base de hidróxido de cálcio (pasta Calen[®]) associado à clorexidina a 1%. Após este período, o curativo será removido e o canal mantido vazio por 07 dias. Decorridos este prazo será efetuada a segunda colheita seguida da obturação do canal.

6) Tenho plena liberdade de recusar que o paciente sob minha responsabilidade participe desta pesquisa, assim como tenho a liberdade de retirá-lo a qualquer momento, sem nenhuma penalização ou prejuízo;

7) Os pesquisadores se comprometem a prestar assistência, caso ocorra algum problema relacionado à execução da parte clínica do Projeto de Pesquisa (C.D. Fumio Matoba Júnior - Av. do Café, S/N - Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social, FORP - USP, telefones: 3602-3995 ou 3602-4138);

8) Não é previsto o ressarcimento de despesas ou indenizações, já que a conduta de coleta de material do canal do dente não é agressiva à saúde física ou moral;

9) Estou ciente de que esta pesquisa tem como responsável a Prof^a. Dr^a. Izabel Yoko Ito e o C.D. Fumio Matoba Júnior.

Assino este documento de livre e espontânea vontade, estando ciente do seu conteúdo.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 200__.

Assinatura do pai / mãe / responsável

Prof^a. Dr^a. Izabel Yoko Ito

C.D. Fumio Matoba Júnior

Anexo C - Resultados da biologia molecular

Amostras	A. a a	A. a b	A naeslund	A viscosus	A israeli	A gerencse	A odonto	T forsyth	C rectus	C gingi	C ochrace	C sputig	E nodatum
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
23	1	1	3	0	5	5	5	5	0	0	1	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	3	3	4	0	5	5	5	5	5	5	4	1	4
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	0

Continuação

Autorização para reprodução

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

Fumio Matoba Júnior

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social
Ribeirão Preto/Agosto 2006
Avenida do Café, s/n - CEP 14040-904
e-mail: fumiojunior@forp.usp.br

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)