

**ELIANA BARBOSA DE SOUZA**

**Efeito da terapia fotodinâmica na desinfecção do sistema de canais radiculares  
*in vivo***

São Paulo  
2011

**ELIANA BARBOSA DE SOUZA**

**Efeito da terapia fotodinâmica na desinfecção do sistema de canais radiculares**

***in vivo***

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. João Humberto Antoniazzi

São Paulo  
2011

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

Catálogo da Publicação  
Serviço de Documentação Odontológica  
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Souza, Eliana Barbosa de

Efeito da terapia fotodinâmica na desinfecção do sistema de canais radiculares *in vivo* [versão corrigida] / Eliana Barbosa de Souza; orientador João Humberto Antoniazzi. -- São Paulo, 2011.

73p. : fig., graf.; 30 cm.

Tese -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Endodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida de acordo com sugestões da Banca Examinadora em 26/07/2011

1. Desinfecção do canal radicular – Terapia fotodinâmica. 2. Endodontia. I. Antoniazzi, João Humberto. II. Título.

Souza EB. Efeito da terapia fotodinâmica na desinfecção do sistema de canais radiculares *in vivo*. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em:    /    /2011

**Banca Examinadora**

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Dedico essa obra:

à minha mãe **Elisabeth**;

minhas irmãs **Naná, Elaine e Raquel**;

meu sobrinho **Otávio**;

minha tia **Nanci**;

meu pai **Edgard**;

ao **Sérgio**;

meus amigos: **Silvia, Fernanda, Leonardo, Nathalia, Andréa, Sueli, Crystiane**;

às pessoas que acreditaram em mim: **Prof. José Luiz, Maine, Patrícia Ferrari,**

**Profa. Maria Regina, Profa Silvana, Profs. Giulio, Igor, Celso**;

e ao meu orientador **Prof. João Humberto Antoniazzi** por toda confiança, apoio,  
carinho, paciência, dedicação e ensinamentos;

a **Deus**.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. João Humberto Antoniazzi pela orientação deste trabalho e todos os ensinamentos como professor e ser humano, por sua bondade e dedicação.

À Profa. Dra. Maria Regina L. Simionato por todo apoio, confiança, paciência, amizade e oportunidades a mim conferidos.

À Profa. Dra. Andrea Colombo por todo o treinamento laboratorial, amizade e incansável cooperação e participação neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Rodrigues pelos seus ensinamentos, participação e disponibilidade durante a execução deste trabalho.

À Profa Silvana Cai pela disponibilidade de seu laboratório durante os procedimentos e carinho.

À Rosana Prisco por sua inestimável colaboração com a análise estatística deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Luiz Lage-Marques pela colaboração e resolução de problemas durante a realização do experimento.

Aos professores Sheila Gouw-Soares e Henrique Brucoli pela cooperação na Clínica durante o atendimento aos pacientes.

À Evelyn da Clínica Odontológica da FOUSP por viabilizar o atendimento aos pacientes.

À Glauci pela correção da tese para as normas da biblioteca.

Às secretárias do Departamento e Pós Graduação: Ana Maria Souza, Cátia Tiezzi e Donata Moreira.

Aos pacientes sujeitos de pesquisa desta tese.

Às agências de fomento sem as quais esta pesquisa não seria possível: FAPESP, CNPq e Capes.

Souza EB. Efeito da terapia fotodinâmica na desinfecção do sistema de canais radiculares [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão corrigida.

## RESUMO

A terapia fotodinâmica pode ser usada na eliminação de microrganismos presentes no sistema de canais radiculares. O objetivo desse estudo foi testar *in vivo* a terapia fotodinâmica como coadjuvante ao preparo do sistema de canais na desinfecção do endodonto. Foram selecionados trinta dentes unirradiculares portadores de periodontite apical com rarefação óssea. Após o acesso à entrada do canal realizou-se a 1ª coleta do conteúdo intracanal. Os espécimes foram então divididos: Grupo 1 – 15 dentes preparados com instrumentação rotatória e gel de Endo PTC e hipoclorito de sódio 0,5 %, sem MIC (2ª coleta), os mesmos foram selados e após 72 h do preparo procedeu-se a 3ª coleta do conteúdo intracanal; e, Grupo 2 – 10 dentes preparados como Grupo 1 até 2ª coleta e então realizou-se secagem e inoculação de sensibilizador azul de metileno 50 µg/mL e irradiação de laser de diodo de comprimento de onda 660 nm na potência de 100 mW por 4 minutos, enxágüe, sem medicação intracanal e selamento dos dentes para 3ª coleta após 72 h. As amostras sofreram quantificação de microrganismos para verificação da redução da microbiota total e em particular de *E. faecalis* - detecção por meio de cultura em meio seletivo. Também foram realizados ensaios de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para detecção de 8 espécies comumente encontrados em canais radiculares. Os resultados foram tabulados e tratados estatisticamente pelo método ANOVA. Houve redução da microbiota pelo preparo químico-cirúrgico, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à desinfecção em relação ao uso da PDT. As espécies mais detectadas por PCR foram: *C. rectus*, *P. micra*, *P. gingivalis* e *E. faecalis*. Conclui-se então que a PDT nos parâmetros testados não aumentou a desinfecção intracanal conseguida pelo preparo do canal.

Palavras-Chave: terapia fotodinâmica, desinfecção, Endodontia, laser, *E. faecalis*, *in vivo*.



Souza EB. Effect of photodynamic therapy in the root canal disinfection *in vivo* [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão corrigida.

## ABSTRACT

Photodynamic therapy can be used against the contamination of the root canal. The aim of this study was to evaluate *in vivo* if photodynamic therapy could enhance the disinfection in root canal therapy. Thirty single-rooted teeth with apical periodontitis were selected. Access to the canal was performed and a sample from the inner canal was collected with sterilized paper points (S1). The specimens were then divided: Group 1 (n=15) teeth were prepared with rotary instrumentation with Endo PTC gel and 0.5 % sodium hypochlorite then another sample was collected (S2). They were sealed and a third sample was collected after 72 h. Group 2 (n=10) teeth were prepared as Group 1 (S1 and S2) then PDT was carried out with methylene blue 50 µg/mL and diode laser irradiation of wavelength 660 nm, 100 mW power for 4 minutes, the teeth were sealed as Group 1 and third collection was performed after 72 h (S3). The samples were seeded in order to count total CFU and of *E. faecalis*. PCR assays were carried out in order to detect 8 endodontic pathogens. ANOVA test was performed in the results and no difference was detected between the groups with or without PDT. The microorganisms with higher incidence were: *C. rectus*, *P. micra*, *P. gingivalis* and *E. faecalis*. It was concluded that PDT in these parameters did not increase the disinfection achieved by conventional root canal preparation.

Keywords: Photodynamic therapy, disinfection, Endodontics, laser, *E. faecalis*, *in vivo*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 -	Radiografia de dente da amostra com rarefação óssea periapical.....	43
Figura 4.2 -	Manobra de desinfecção coronária.....	43
Figura 4.3 -	Coleta do conteúdo do canal radicular.....	43
Figura 4.4 -	Aparelho laser de baixa potência.....	44
Figura 4.5 -	Embalagem contendo azul de metileno.....	44
Figura 4.6 -	Lupa com placa com Ágar Brucella Sangue enriquecido com hemina e menadiona contendo u.f.c. provenientes de coleta intracanal.....	45
Figura 4.7 -	Placa com meio seletivo para <i>E. faecalis</i> .....	45
Figura 4.8 -	Termociclador para ensaio de PCR.....	46
Figura 4.9 -	Equipamento para eletroforese.....	46
Figura 4.10 -	Transiluminador.....	47
Figura 4.11 -	Imagem do gel de eletroforese das amostras para <i>P. micra</i> .....	47
Gráfico 5.1 -	Distribuição das médias em log de u.f.c./mL do Grupo 1 sem PDT.....	48
Gráfico 5.2 -	Distribuição das médias em log de u.f.c./mL do Grupo 2 com PDT.....	49
Gráfico 5.3 -	Distribuição dos dados.....	49
Gráfico 5.4 -	Distribuição das freqüências dos microrganismos nas amostras em porcentagem:.....	51
Gráfico 5.5 -	Distribuição das freqüências dos microrganismos nas amostras em porcentagem:.....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 -	Cepas-padrão das bactérias dos controles positivos das reações.....	40
Tabela 4.2 -	Concentração de reagentes da reação de PCR para iniciador espécie-específico para a enzima Taq DNA polymerase, Recombinant Invitrogen®.....	40
Tabela 4.3 -	Parâmetros da reação para a enzima Taq polymerase Recombinant Invitrogen®.....	41
Tabela 4.4 -	Concentração de reagentes da reação de PCR para iniciador espécie-específico para a enzima Taq DNA polymerase Recombinant Invitrogen®.....	41
Tabela 4.5 -	Iniciadores de PCR usados para a identificação de patógenos endodontais.....	42
Tabela 5.1 -	Médias e desvios padrão dos grupos.....	48
Tabela 5.2 -	Médias de u.f.c./mL de <i>E. faecalis</i> dos Grupos.....	51
Tabela 5.3 -	Incidência de <i>E. faecalis</i> entre o método de cultura e PCR em número de amostras positivas.....	52

## ABREVIATURAS E SIGLAS

#	número
%	porcentagem
A	Adenina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
C	Citosina
cm <sup>2</sup>	centímetro quadrado
CRT	Comprimento Real de Trabalho
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	ácido etileno diamino tetracético dissódico
<i>g</i>	aceleração da gravidade
G	guanina
h	hora
He-Ne	Hélio-Neônio
Hz	Hertz
J	Joule
K	Kerr
LED	<i>Light-Emitting Diode</i>
log	logaritmo
LPS	lipopolissacarídeo
M	Molar
mg	miligrama
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
MIC	Medicação Intra-canal
min	minuto
mM	milimolar
mW	miliWatt
NaOCl	hipoclorito de sódio
nm	nanômetro
°C	graus Celsius

pb	pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i>
q.s.p.	quantidade suficiente para
RTF	<i>Reduced Transport Fluid</i>
s	segundo
T	timina
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
u.f.c.	unidade formadora de colônia
W	Watt
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
µM	micromolar

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS.....	14
2.2 PREPARO QUÍMICO-CIRÚRGICO.....	19
2.3 TERAPIA FOTODINÂMICA.....	23
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	32
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
4.1 COLETA .....	33
4.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	36
<b>4.2.1 Análise por cultivo</b> .....	37
<b>4.2.2 Detecção por PCR de patógenos endodônticos</b> .....	37
4.2.2.1 Isolamento de DNA genômico bacteriano das amostras.....	38
4.2.2.2 Ensaio de PCR.....	39
4.2.2.3 Detecção dos produtos de PCR.....	44
<b>5 RESULTADOS</b> .....	48
5.1 ANÁLISE POR CULTIVO.....	48
5.2 ANÁLISE POR PCR.....	51
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	53
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	58
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	59
<b>ANEXOS</b> .....	69
<b>APÊNDICES</b> .....	71

## 1 INTRODUÇÃO

O sucesso da terapêutica endodôntica está alicerçado na eficaz descontaminação do sistema de canais radiculares que é conseguida, principalmente, durante o preparo do canal. Dificuldades anatômicas e execução inadequada da técnica são as principais causas para que essa contaminação persista não só no interior do canal principal, bem como na intimidade dos túbulos dentinários e canais secundários. A presença de microrganismos é reportada como a principal causa do insucesso no tratamento endodôntico, tanto por seus produtos metabólicos como por sua conseqüente formação de um foco de infecção. Além disso, a existência de microrganismos resistentes no interior do sistema de canais radiculares e o biofilme perirradicular – principalmente em casos de retratamento, onde o sucesso não foi conseguido numa primeira abordagem - impõem a execução adequada da terapêutica endodôntica com rigor no controle da infecção ainda que isso não garanta o sucesso do tratamento.

Assim, novos recursos são testados contra infecções intra e extra-canal (biofilme apical) no âmbito das substâncias irrigadoras, das medicações intracanal e da radiação laser entre outros. A terapia fotodinâmica aparece como recurso a ser pesquisado com a vantagem de não induzir resistência microbiana, o que é muito promissor atualmente, pois a existência de microrganismos resistentes pode levar a um prognóstico desfavorável

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

A existência de microrganismos em tecido pulpar foi demonstrada por Miller em 1894 quando o autor observou em tecido necrótico pulpar cocos, bacilos e espirilos. Pôde-se observar também que as bactérias são os principais microrganismos colonizadores do tecido pulpar.

A importância da presença de microrganismos na etiologia das patologias endodônticas é explicitada em estudo histopatológico de Kakehashi et al. (1965), quando polpas de ratos estéreis expostas ao meio bucal não sofreram mortificação e observou-se formação de ponte de dentina, evidenciando o poder reparador do tecido quando isento de infecção. Nos espécimes não-estéreis foram observados abscessos, extensas áreas inflamatórias e reabsorções ósseas.

Com avanços tecnológicos que possibilitaram o cultivo em anaerobiose, Sundqvist et al. (1979) caracterizaram a microbiota endodôntica de dentes com polpa necrosada e coroas intactas. Essa microbiota era composta por 90% de anaeróbios estritos, geralmente contendo de 1 a 12 espécies diferentes de microrganismos – o número de espécimes e densidade variava proporcionalmente ao tamanho da lesão perirradicular.

Möller et al. (1981) verificaram que o tecido pulpar necrótico não é suficiente para desenvolver periapicopatias, se não houver infecção no mesmo. Os autores lesionaram polpas em macacos, num grupo as cavidades pulpares foram mantidas seladas por até sete meses e em outro grupo expostas à cavidade bucal por até sete dias e depois seladas por até sete meses. Foram feitas análises histológicas, radiográficas, clínicas e testes microbiológicos. Os autores observaram presença de lesões periapicais em todos os casos onde houve contaminação (cavidades expostas). Concluíram também que nesse período experimental a via hematogênica cria um risco muito baixo de contaminação do canal radicular.

A principal causa da infecção endodôntica é a cárie dental e as vias de acesso dos microrganismos ao canal radicular são os túbulos dentinários, exposição pulpar e via periodonto. A dinâmica da infecção endodôntica é dependente da



tensão de oxigênio do meio, disponibilidade de nutrientes (carboidratos e proteínas) e interação microbiana. A tensão de oxigênio mais alta no início da infecção faz com que a porcentagem entre anaeróbios facultativos e estritos se igualem, mas a medida que esse oxigênio é consumido pelos anaeróbios facultativos ou aeróbios a tensão diminui e a concentração de anaeróbios estritos sobe. A prevalência de carboidratos ou proteínas no meio atua determinando o crescimento de anaeróbios facultativos e anaeróbios estritos, respectivamente. Além disso, o canal radicular abriga um ecossistema onde relações de sinergismo e antagonismo interferem nas espécies da infecção. Dentre os espécimes mais freqüentemente isolados de canais radiculares em infecções primárias pertencem os gêneros: *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Campylobacter*, *Selenomonas* e *Actinomyces*. Embora detectadas, não é demonstrada a relação de patogenicidade dessas espécies nas doenças do periápice. A caracterização da microbiota endodôntica tem se modificado graças aos métodos moleculares, principalmente PCR (*Polymerase Chain Reaction*) onde se pode detectar microrganismos de difícil cultivo e ou em quantidade insuficiente para detecção por cultura (Siqueira Jr, 1997, Gomes et al., 2005; Siqueira Jr et al., 2007).

Em 2001, Peciuliane et al. isolaram microrganismos em 33 de 40 dentes obturados com periodontite apical assintomática. Foram isolados leveduras em seis dentes, sendo 3 delas associadas com *Enterococcus faecalis*. Também bactérias entéricas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* presentes em 3 dentes e *E. faecalis* foi isolado em 21 das 33 culturas positivas, sendo 11 em culturas puras. Os autores testaram a utilização do iodo-iodeto de potássio (IKI) como irrigação antes da obturação em um grupo do retratamento e no outro testaram medicação de hidróxido de cálcio por 10 a 14 dias. O tratamento com IKI foi mais efetivo quanto ao potencial antimicrobiano. Os autores concluem que há alta prevalência de bactérias entéricas e leveduras em casos de periodontite apical crônica, o que foi um dos objetivos do estudo. Observaram também que entre as trocas de medicação o tipo mais comumente isolado, conseqüentemente o mais resistente às medicações, foi *E. faecalis*.

É conhecida a capacidade de *Streptococcus* em aderir ao colágeno tipo I o maior componente orgânico da dentina. Assim na presença de dissolução da dentina por cárie essa capacidade de adesão é parte importante no mecanismo de invasão

em túbulos dentinários. *In vitro* essa adesão entre fímbrias e colágeno é demonstrada também em *Porphyromonas gingivalis* e entre outras espécies bacterianas. A microbiota de canais infectados assintomáticos é composta principalmente por *Streptococci*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*. (Love, Jenkinson; 2002)

*E. faecalis* resiste e cresce em ambientes com extremas diferenças de temperatura (15-60 °C), apresenta resistência a corante azul de metileno 0,1% e ao ambiente alcalino provocado pelo hidróxido de cálcio. Essa resistência do microrganismo é relacionada à sua capacidade de adesão dentinária, o que foi testada por Hubble et al. (2003) que utilizaram variações mutantes que não sintetizavam proteína de ligação ao colágeno (*Ace*), serina protease e gelatinase (cada mutação com uma deficiência de síntese). Os espécimes foram instrumentados e irrigados com 5.25% NaOCl a cada troca de lima. Os dentes foram clivados e escovados para tirar debris e lavados e esterilizados em autoclave. As três cepas mutantes foram comparadas com a cepa mais virulenta. As amostras foram cultivadas em BHI a 37 °C aerobicamente, exceto a cepa não sintetizadora de *Ace* que foi incubada a 46 °C. As culturas foram inoculadas nas meias raízes e incubadas por 6 horas e preparadas para leitura em microscopia eletrônica de varredura e análise estatística. O tipo mais selvagem apresentou, com diferença estatística, maior quantidade de microrganismos em relação à aderência e proliferação quando comparado com outros grupos. Já os grupos mutantes não apresentaram diferenças entre si. Assim os autores concluem que a adesão do microrganismo à dentina é importante para a sua colonização e proliferação.

*E. faecalis* é um microrganismo presente mais comumente em casos de re-intervenção. Em estudo de 2004 Rôças et al. analisaram 21 casos de periodontite apical assintomática, 10 casos de periodontite apical aguda, 19 casos de abscesso dento-alveolar – todos dentes não-tratados endodonticamente e 30 casos de retratamento com lesão assintomática. Foram feitas coletas com pontas de papel estéril nos canais preenchidos por solução salina estéril. As amostras sofreram amplificação do DNA com iniciador 16S rDNA universal pela baixa quantidade de DNA presente e depois foi realizado *Nested* PCR com o iniciador espécie-específico para *E. faecalis*. A incidência desse microrganismo em infecção primária foi de 19 % dos casos, já nos casos de retratamento a incidência foi de 67 %, com diferença

estatística significativa. Os autores observaram também a maior incidência em casos assintomáticos.

Em um trabalho de revisão de literatura de 2006 sobre *E. faecalis*, Stuart et al. listaram como fatores de virulência desse microrganismo a capacidade de formação de biofilme, resistência ao principal tipo de medicação intracanal – hidróxido de cálcio – capacidade de adesão à dentina, supressão à resposta linfocitária entre outros. Os autores também reportam sua alta incidência em infecções secundárias e em casos de lesões persistentes. Em casos de lesões primárias sua ocorrência se dá mais comumente em casos assintomáticos.

Gomes et al. (2006) compararam a detecção de *E. faecalis* com coleta do conteúdo intracanal em 50 dentes com infecção primária e 50 com infecção secundária durante o retratamento de dentes com lesão periapical, tanto em método de cultura como em PCR. No método de cultura foram realizados incubação, plaqueamento e testes bioquímicos; na análise em PCR foi utilizado um iniciador espécie-específico 16S rDNA (DNA ribossômico). Em infecção primária os autores detectaram o microrganismo em 4 % dos casos pelo método de cultura e 82% por PCR. Já em dentes com insucesso, pelo método de cultura foram detectados 42% e em PCR 76 %. Os autores observaram a grande diferença de detecção pelos dois métodos, e principalmente a alta prevalência de *E. faecalis* em infecção primária.

Também comparando os métodos PCR e cultura para detecção de *Enterococcus faecalis*, Zoletti et al. (2006) coletaram amostras de 50 dentes tratados endodonticamente, 27 sem lesão periapical e 23 com lesão. PCR detectou o microrganismo, utilizando iniciador espécie-específico 16S rRNA (RNA ribossômico), em 80% dos espécimes (40 dos 50 dentes); já o método de cultura detectou *E. faecalis* em 16% (8 dos 50 dentes). Os autores observaram também que o microrganismo estava presente nos dentes sem lesão analisados por meio de PCR em 81,5% e por cultura em 18,5%, enquanto nos dentes com lesão foram encontrados em 78% e 13%, respectivamente. Os autores salientaram que apesar dos achados, mais estudos devem ser realizados, já que a correlação entre *E. faecalis* e insucesso do tratamento endodôntico é muito bem estudada.

Tomazinho e Avila-Campos (2007) também compararam em PCR e método de cultivo a detecção de *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia*, e *P. nigrescens* em infecções endodônticas crônicas de 100 pacientes. Os resultados pelo método de cultura e kit de identificação foram: 75,6 % *P. intermedia* – *P. nigrescens*, 15,2 %

*P. gingivalis* e 9,1 % *P. endodontalis*. Pelo método de PCR dos 60 casos analisados: 43,3 % eram *P. gingivalis*, 43,3 % *P. nigrescens*, 31,7 % *P. intermedia*, 23,3 % *P. endodontalis*. Os autores concluíram então que há uma grande incidência de bacilos anaeróbios pigmentados de negro em infecções crônicas endodônticas.

Em 2006, Johnson et al. testaram a capacidade de co-agregação entre *E. faecalis* e *Peptostreptococcus anaerobius*, *Prevotella oralis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus anginosus*. Os autores observaram que *E. faecalis* co-agregou com *F. nucleatum*, uma amostra co-agregou com *P. oralis*, mas nenhuma co-agregação foi observada com *Peptostreptococcus anaerobius* e *Streptococcus anginosus*. Os tempos experimentais foram de 0, 1 e 24 h, e os autores acreditam que essa interação entre *E. faecalis* e *F. nucleatum* desempenha importante papel nas periapicopatias.

Vianna et al. em 2008 analisaram pelo método de hibridização *checkerboard* e de cultura 24 dentes com periodontite periapical. Os dentes sofreram preparo químico cirúrgico com digluconato de clorexidina 2% em gel e foram divididos em três grupos segundo o tipo de medicação intracanal testada: pasta de hidróxido de cálcio, gel de clorexidina, e uma pasta contendo hidróxido de cálcio misturado com gel de clorexidina. Foram realizadas 3 coletas: 1ª no acesso ao sistema de canais, 2ª após preparo químico cirúrgico e 3ª após 7 dias de medicação intracanal. Os microrganismos com maior incidência detectados pela técnica de *checkerboard* foram: *F. nucleatum ssp polymorphium*, *Treponema socranskii ssp socranskii*, *Parvimonas micra* e *E. faecalis*. A quantidade u.f.c./mL na 1ª amostra variou entre  $4 \times 10^5$  a  $2,6 \times 10^6$  e os autores obtiveram uma redução de 99,96% na 2ª amostra, não havendo diferenças estatísticas entre a 2ª e 3ª amostra. Os autores observaram também no método de cultura foi observado maior número de casos positivos (13) que os detectados por *checkerboard* (5) na 3ª coleta. Além disso, em uma amostra foi detectada *F. nucleatum* na 3ª coleta e o mesmo não havia sido detectado nas coletas 1 e 2 da mesma amostra. Ainda pela análise por *checkerboard* *E. faecalis* foi detectado em 1 amostra na 2ª coleta não persistindo na 3ª da mesma amostra, mas foi detectado na 3ª coleta de uma amostra medicada com a associação de hidróxido de cálcio e clorexidina não tendo sido encontrado nas coletas 1 e 2 da mesma amostra.

Tanomaru et al. em 2008 demonstraram a presença de microrganismos em todo o sistema de canais radiculares, bem como região de cimento e ápice dental

em dentes de cão. Os autores observaram dentes de cão extraídos em microscopia eletrônica de varredura e análise histológica em tempos experimentais de 60 a 180 dias.

## 2.2. PREPARO QUÍMICO-CIRÚRGICO

O preparo químico-cirúrgico é etapa fundamental da terapia endodôntica e é nesta fase que se realiza a limpeza e desinfecção (sanificação) e modelagem do sistema de canais radiculares. Durante essa etapa com a remoção de restos orgânicos e inorgânicos, aumento da permeabilidade dentinária, com contato de substâncias químicas com alto poder antimicrobiano entre as paredes do canal e a intimidade de túbulos dentinários, que ocorre a maior parte da desinfecção do tratamento endodôntico. As infecções endodônticas são polimicrobianas e compostas principalmente por microrganismos anaeróbios estritos e facultativos. Devido à baixa tolerância ao oxigênio inerente a essas bactérias, as mesmas são suscetíveis ao preparo químico-cirúrgico principalmente na presença de peróxidos e hipocloritos. A reação de efervescência provocada pela reação do hipoclorito de sódio 0,5 % com o creme de Endo PTC libera alta quantidade de oxigênio proporcionando um ambiente inóspito a essa microbiota. Além disso, essa associação é efetiva no aumento da permeabilidade dentinária o que favorece a interação da medicação intracanal. (Paiva; Antoniazzi, 1988; Lage-Marques, Antoniazzi, 2002; Souza et al.,2005; Souza 2006; Souza et al., 2007)

Em 2001 Buck et al. compararam o efeito bactericida do hipoclorito de sódio a 0,5 %, clorexidina 0,12% e EDTA 0,2% em raízes colonizadas por *E. faecalis*. Após a utilização dos irrigantes, amostras de dentina eram colhidas com auxílio de brocas para a verificação de bactérias viáveis. As amostras foram inoculadas em meio de cultura TSB (caldo de soja tripticase) por 12 horas, e após contagem de u.f.c. (unidades formadoras de colônia) os resultados foram tratados estatisticamente. Os resultados demonstraram que o hipoclorito de sódio foi mais eficiente na redução microbiana com significância estatística, mas não conseguiu esterilização das amostras.

Atualmente a técnica rotatória ou mecanizada para preparo químico-cirúrgico é largamente utilizada e novos sistemas são constantemente incorporados ao mercado e testados. Schafer e Lohmann (2002) compararam qualidade do preparo e limpeza em canais curvos de raízes extraídas preparadas com sistema rotatório FlexMaster™ e limas manuais Flexofile™ (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça). O grau de curvatura das raízes estava entre 25 a 35 graus, num total de 24 raízes em cada grupo instrumentadas com irrigação de 5 mL de NaOCl 2,5% a cada troca de instrumentos. O grau de limpeza foi verificado com microscopia eletrônica de varredura e a qualidade do preparo com análise de radiografias pré e pós operatórias em programa de imagem computadorizada. Quanto a limpeza as limas manuais produziram menor quantidade de *smear layer*, já o sistema FlexMaster™ manteve mais originalmente a curvatura do canal com significância estatística.

Em 2002 Siqueira Jr. et al. compararam a redução bacteriana provocada por duas técnicas de instrumentação e diferentes combinações de agentes irrigantes. Cinquenta dentes unirradiculares foram inoculados com *E. faecalis* por 24 h em meio BHI em 37 °C e divididos: Grupo 1 – instrumentados com NaOCl 2,5% e limas Nitiflex; Grupo 2 – idem ao Grupo 1 alternado com ácido cítrico 10%; Grupo 3 – idem ao Grupo 1 mais clorexidina 2%; Grupo 4 – NaOCl 2,5% em instrumentação rotatória; e Grupo controle, instrumentado com solução salina e limas Nitiflex. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos 1, 2, 3, 4 no que concerne a redução microbiana, mas significativa em relação ao grupo controle. A redução em média dos grupos foi de 66%. Os autores salientaram que os dentes instrumentados com NaOCl associado a clorexidina (Grupo 3) tiveram escurecimento acentuado de dentina.

Comparando efeito bactericida do NaOCl (hipoclorito de sódio) 1 e 5% com a clorexidina a 0,12 e 1%, Sassone et al. (2003) concluíram que tanto as duas concentrações de NaOCl como a clorexidina 1% foram efetivas contra *E. faecalis* em presença ou ausência de albumina bovina. Os autores concluem, portanto, que a presença de matéria orgânica não influencia na característica bactericida desses dois irrigantes nas concentrações citadas. Os testes foram feitos em placa de vidro em tempos diferentes de exposição dos antimicrobianos.

Jeon et al. (2003) avaliaram a quantidade de *smear layer* produzida no terço apical por 3 sistemas rotatórios em microscopia eletrônica de varredura. Foram utilizadas 20 raízes em cada grupo instrumentados com a técnica coroa-ápice com:

Profile™ (Tulsa Dental Products, Tulsa, OK, EUA); Hero 642™(MicroMega, Besançon, França) ambos sistemas com limas de níquel-titânio e limas de aço inoxidável para sistema mecanizado Mani®(Mani, Utsunomiya-Tochigi, Japão). Os resultados foram determinados qualitativamente por *scores* de limpeza, e o sistema que produziu menor quantidade de *smear layer* foi o Hero 642.

Schafer e Schlingemann (2003) compararam a instrumentação manual com limas Flexofile e instrumentação rotatória com K<sup>3</sup> (Sybron Endo, Orange, CA, EUA) em 60 raízes curvas de molares inferiores e superiores, com grau de curvatura entre 25 a 35 graus. Depois de instrumentadas cada canal era enxaguado com 5 mL de NaOCl 2,5%. Tomadas radiográficas foram feitas para análise em programa de computador quanto à quantidade de desvio provocada pela instrumentação. Para verificação da limpeza, os espécimes foram seccionados e observados em microscopia eletrônica de varredura. Quanto à remoção de debris e limpeza das paredes do canal as limas manuais foram mais efetivas, mas quanto à manutenção da curvatura da raiz as limas rotatórias foram mais efetivas com diferença estatística.

O hipoclorito de sódio foi testado por Yamashita et al. (2003) na concentração de 2,5% quanto a sua eficácia de limpeza das paredes do canal de 36 dentes extraídos. Comparado com clorexidina 2% e solução salina apresentou melhores resultados quanto à limpeza em MEV.

Em 2003, Zamany et al. testaram a desinfecção provocada pela irrigação final com clorexidina 2% após preparo químico cirúrgico em dentes com polpa necrótica. Os dentes sofreram coletas antes do preparo, após instrumentação com hipoclorito de sódio 1% e após irrigação durante 30 s de clorexidina 2%. As amostras foram incubadas em caldo de tioglicolato e observado pelo teste de turbidez a ocorrência ou não de crescimento microbiano durante 4 semanas a 37° C. No grupo controle (sem irrigação de clorexidina) houve crescimento na 3ª coleta em 7 dos 12 dentes, enquanto que no grupo com irrigação de clorexidina apenas 1 das amostras foi positiva para crescimento microbiano. Os autores concluíram que o efeito antimicrobiano da clorexidina como irrigante final é eficaz no aumento da desinfecção do sistema de canais radiculares.

O tratamento em uma sessão utilizando hipoclorito de sódio 5,25 % e EDTA 17% foi testado por Nair et al. (2005) quanto à descontaminação conseguida em raízes mesiais de primeiros molares inferiores com periodontite apical. Dezesesseis

dentes tiveram seus canais instrumentados com limas rotatórias, obturados e suas raízes mesiais apicectomizadas para análise em microscopia eletrônica de transmissão e análises histopatológicas. Quatorze dos 16 dentes apresentavam grande quantidade de microrganismos em nichos não instrumentados e em biofilmes. Os autores concluem que o tratamento em uma sessão não é satisfatório quanto à descontaminação, o que deve ser potencializado com medicação intracanal em mais sessões nos casos de polpa necrótica.

A instrumentação rotatória proporciona um menor desgaste do operador e diminuição no tempo operatório (Hulsmann; Bluhm, 2004). Além disso, esse tipo de instrumentação obtém os mesmos níveis de limpeza e desinfecção que a técnica manual (Rossi et al., 2005).

Taşdemir et al. (2005) compararam instrumentação manual com limas tipo K e instrumentação rotatória com sistema Hero 642 em 20 canais méso-vestibulares de raízes de primeiros molares superiores com grau de curvatura entre 25 e 35 graus. Antes do preparo, foram feitas tomografias das raízes em 3 porções, cervical, média e apical. Assim os espécimes foram preparados e escaneados novamente para mensuração da quantidade de desvio provocada pela instrumentação. O sistema rotatório manteve o preparo mais centralizado que a instrumentação manual. Pode-se concluir que a técnica de instrumentação rotatória é segura, eficiente quanto à sanificação e proporciona menor risco de deformidades do canal radicular.

Avaliando a presença de microrganismos após preparo químico-cirúrgico, Ferrari et al. (2005) recuperaram em pacientes soropositivos para HIV, cepas de *E. faecalis* em dentes com infecção primária após 7 dias de medicação intracanal. Foram utilizados 25 dentes com polpas necróticas, lesões perirradiculares e câmara fechada.

Diversos autores já constataram a presença de *E. faecalis* após a instrumentação endodôntica. Vivacqua-Gomes et al. (2005) em estudo *in vitro* comparou tratamento em sessão única e múltiplas sessões. Quarenta e cinco raízes contaminadas foram instrumentadas com técnica rotatória (Greater Taper – Tulsa Dentsply, Tulsa, OK, USA) e clorexidina, medicadas com hidróxido de cálcio, obturadas e desgastadas para semeadura e contagem de ufc após 60 dias da obturação. Os autores não observaram diferenças entre sessões única ou múltiplas quanto à presença de microrganismos viáveis.



Comparando diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0,5, 2,5 e 5,25%) em diversas técnicas rotatórias e manuais em 180 dentes extraídos contaminados durante 21 dias por *E. faecalis*, Berber et al. (2006) constataram que independente da técnica nas concentrações mais altas o NaOCl foi mais efetivo na desinfecção em profundidade. Quanto ao grau de limpeza não houve diferença entre as concentrações testadas.

Em 2008, Souza et al. observaram uma redução da contaminação *in vitro* por *E faecalis* em média de 98,39% após preparo químico-cirúrgico com a associação de creme Endo-PTC e hipoclorito de sódio 0,5%. Os autores coletaram microrganismos da luz do canal principal, bem como da profundidade de túbulos dentinários para contagem de u.f.c..

### 2.3 TERAPIA FOTODINÂMICA

Em 1941 aparece na literatura médica pela primeira vez o termo Terapia Fotodinâmica sendo definida como: *Sensitizador (corante) no tecido alvo e presença de oxigênio + luz = destruição celular por oxigênio singleto*. A terapia fotodinâmica é uma reação entre fotossensibilizadores e luz gerando um efeito citotóxico, normalmente por reações oxidativas. A PDT, muito utilizada na desinfecção de produtos sanguíneos, é eficaz na inativação de vírus, bactérias resistentes e leveduras. Nessa terapia um agente químico (corante) é utilizado e ativado por luz (sensitização) causando morte celular principalmente por apoptose em células eucariotas. (Fan et al., 1996; Wainwright, 1998; Machado, 2000; Ackroyd et al., 2001; Lee et al., 2004; Konopla; Goslinski, 2007).

Assim a terapia fotodinâmica é um processo fotoquímico onde a excitação eletrônica do sensibilizador provoca dois mecanismos: tipo I – transferência de elétrons - e tipo II – transferência de energia. No mecanismo tipo I há a formação de produtos oxidados e ocorre em cerca de 5% da reação. Nos outros 95%, ocorrem o mecanismo tipo II, mais desejável e responsável pela apoptose, morte celular que diferentemente da necrose não provoca injúria aos tecidos adjacentes. Na apoptose a célula tem uma morte programada com encolhimento da mesma e formação de vesículas (corpos apoptóticos) que são fagocitados por macrófagos posteriormente.

Como não há lise celular, não há extravasamento do conteúdo citoplasmático evitando assim lesão tecidual. Isso torna a PDT uma terapia eficaz e segura. (Kristiansen; Amaral, 1997; Kübler et al., 1998; Gad et al., 2004).

Para a melhor compreensão da PDT é necessário definir as propriedades e interações dos 3 elementos envolvidos nesse processo fotoquímico: corante, luz e oxigênio.

### *Corantes*

Corantes são substâncias com grande capacidade de absorção de luz no espectro visível. Devido a essa característica os corantes podem induzir processos fotoquímicos. Isso fica bem exemplificado com a clorofila no processo da fotossíntese das plantas. Outros exemplos de corantes são: verde de malaquita, acridina, eosina, azul de metileno, entre outros. Na PDT os corantes são denominados fotossensibilizadores e devem ser compostos não-tóxicos. São divididos nos seguintes grupos: azino-catiônicos, fenotiazínicos, cianinas, macrocíclicos, ftalocianinas, psoralens, porfirinas, perilenequinonóides e combinações de corantes. Em Odontologia os sensibilizadores mais utilizados são os fenotiazínicos representados pelo azul de metileno, azul de toluidina, tolueno, azuleno. Os fenotiazínicos têm ação antimicrobiana comprovada por vários estudos. (Haas et al., 1997; Shibli et al., 2003; Sigusch et al., 2005; Zanin et al., 2005; Zanin et al., 2006; Bello-Silva et al., 2007; Bouillaguet et al., 2008; Souza et al., 2009)

### *Luz*

Definida como uma radiação eletromagnética, a luz apresenta características de ondas e partículas e é composta de fótons que de maneira simplificada constituem “pacotes de energia”. Os fótons são responsáveis por efeitos fotoquímicos de transferência de energia como os que ocorrem na fotossíntese e também na PDT. A luz possui quatro propriedades que a caracterizam e diferenciam os vários tipos da mesma, sendo brevemente explicitadas a seguir:

- Distribuição espacial – volume: a luz ocupa espaço e apresenta-se na forma de um feixe divergente. No caso da luz laser essa característica é alterada por colimadores que produzem um feixe paralelo e com condensação dessa radiação.
- Espectro – é a característica que dá a cor da luz. O espectro é dado pelo comprimento de onda que pode ser visível ou não-visível (ultravioleta e infravermelho).

- Distribuição temporal – é dada pela frequência das ondas de luz, expressa em Hz (Hertz).
- Potência – intensidade da luz, podendo ser de alta ou baixa potência, expressa em W (Watt).<sup>11</sup>

Todas essas características serão novamente abordadas no tópico Lasers. A luz pode interagir com os tecidos pelos fenômenos de: reflexão, refração, transmissão, absorção e espalhamento. A preponderância da ocorrência de tais fenômenos é diretamente relacionada ao cromóforo tecidual, isto é a cor dos tecidos. Desses fenômenos o mais desejável na terapia fotodinâmica é o de absorção, onde quanto maior a quantidade de energia absorvida maior a ocorrência de fenômenos fotoquímicos. Assim quanto maior a afinidade entre a luz e o corante presente no tecido, maior a quantidade de energia absorvida pelo mesmo. (Dortbüdak et al., 2001; Bonsor et al., 2006; Garcez et al., 2007; Bello-Silva et al., 2007).

### Lasers

Os primórdios sobre a radiação laser são estudados desde 1917 onde são descritos os mecanismos de interação da radiação de fótons – absorção, emissão espontânea e emissão estimulada. Na radiação laser têm-se fótons com características idênticas, gerando uma luz com propriedades como mesma fase, mesma direção e polarização. O resultado é uma luz pura, coerente (a propagação dos fótons se dá em mesma fase), que tem a capacidade de conter grande quantidade de energia em um ponto diminuto. A luz laser apresenta também monocromaticidade e direcionalidade (propagação em uma única direção). A luz laser é definida como uma radiação eletromagnética e, como tal com comprimentos de onda, frequências e amplitudes determinados. Com o controle total dos seus parâmetros, a luz laser se tornou escolha mais comum na PDT para maximizar a ação da luz com o sensibilizador. Na terapia fotodinâmica, a radiação laser utilizada é a de baixa intensidade em baixa potência, com protocolos próximos a 100 mW. Esses tipos de lasers são encontrados em equipamentos portáteis de baixo custo, favorecendo o emprego em consultório. (Souza et al., 2003; Pearson; Schuckert, 2003; Kairalla et al., 2006; Souza et al., 2006; Souza et al., 2007; de Souza et al., 2008).

### *Oxigênio*

O oxigênio molecular no estado fundamental presente nos tecidos quando recebe energia no processo fotoquímico (mecanismo tipo II, descrito anteriormente) torna-se oxigênio singleto que é altamente citotóxico. O oxigênio singleto apresenta papel importante no fenômeno de apoptose de células nucleadas, onde as mesmas têm uma morte programada. Em células procariotas, as reações da PDT ocorrem em sítios ricos em oxigênio como parede celular, lisossomos, DNA, etc. (Komerik et al., 2003; Giroldo et al., 2009; Souza; Lage-Marques, 2010)

A terapia fotodinâmica, também conhecida como fotossensitização, foi testada em peri-implantites provocadas em cachorros por Shibli et al. em 2003. Nesse experimento, os autores testaram laser de diodo com comprimento de onda 685 nm associado ao corante azul de toluidina 100 µg/mL, após realização de retalho mucoperiosteal nos cães. A coleta microbiológica foi feita antes e após a irradiação, com pontas de papel. Os autores observaram redução de microrganismos nas amostras e até completa eliminação dos mesmos em alguns espécimes. PDT utilizando laser de diodo também obteve resultados de desinfecção contra *E. faecalis* em canal radicular, configurando interessante ferramenta para obtenção de melhores resultados na terapia endodôntica, sobretudo nos casos de re-intervenção

Komerik et al. (2003) avaliaram a ação da PDT com azul de toluidina em diversas concentrações e variadas doses de energia em molares de ratos infectados periodontalmente por *P. gingivalis*. Os melhores resultados quanto ao poder de desinfecção da PDT nesse estudo foram encontrados na dose de 48 J (irradiação total de 8 min) e concentração de 1 mg/mL. Para a avaliação os autores utilizaram contagem de u.f.c. e a média de redução conseguida neste grupo foi 2 log. Em estudo similar Qin et al. (2008) também testaram em ratos com periodontite, mas desta vez polimicrobiana, azul de toluidina na concentração de 1mg/mL e dose de energia de 12 J/cm<sup>2</sup> em PDT. Os autores compararam com procedimentos de raspagem e polimento radicular e em ambos os grupos os resultados não diferiram estatisticamente. Os autores concluíram que PDT pode servir como um adjunto ao tratamento periodontal.

Além do efeito antimicrobiano do fotossensitizador azul de toluidina sob o laser He-Ne, o mesmo promove a redução de até 50 % da atividade proteolítica induzida pela endotoxina LPS de *P. gingivalis*. A concentração utilizada foi de 12,5

$\mu\text{g/mL}$  e energia de 21 J. A presença dessa endotoxina pode perpetuar a patogenicidade da infecção endodôntica. Quando utilizado em canais contaminados por *Streptococcus intermedius in vitro* na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  e energia de 21 J, o azul de toluidina promoveu uma redução de 5 log. (Wilson, 2004).

O potencial antimicrobiano dos fotossensibilizadores fenotiazínicos como o azul de metileno é demonstrado mesmo contra cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente e *E. faecalis* vancomicina resistente. Sua capacidade bactericida é maior quando comparada com porfirinas aniônicas e ftalocianinas, outros sensibilizadores utilizados em PDT (Wainwright, 2005).

Meisel e Kocher (2005) em uma revisão da literatura sobre o uso da PDT em Periodontia observaram que apesar de inúmeros estudos comprovarem seu efeito antimicrobiano, a utilização da mesma não é comumente encontrada na prática clínica. Os autores concluíram também que a terapia fotodinâmica pode ser um interessante recurso em casos de resistência microbiana a antibioticoterapia. Dentre os sensibilizadores estudados o azul de metileno apresentou poder bactericida principalmente na formulação dimetil- azul de metileno. Os autores não encontraram também uniformidade nos parâmetros utilizados.

Soukos et al. (2006) testaram azul de metileno dissolvido em BHI estéril na concentração de 25 mg/mL em culturas de *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. micra* e *E. faecalis*. Também testaram a mesma concentração em raízes contaminadas experimentalmente por *E. faecalis*. Os parâmetros da PDT foram 100 mW/cm<sup>2</sup> a uma fluência de 30 J/cm<sup>2</sup>, 5 min de pré-irradiação e 5 min de irradiação. Os autores calcularam que do total de energia dispensada de 140 J foram dispersados 70 J e que a fluência total chegou a 222 J/cm<sup>2</sup>. A PDT foi efetiva contra os microrganismos estudados em sua fase plantônica com alta taxa de eficiência, nos canais infectados por *E. faecalis* a taxa de redução bacteriana foi de 97 %. Os autores concluíram que a PDT pode ser utilizada como um coadjuvante à terapia endodôntica.

Em 2006 Silva Garcez et al. utilizaram laser vermelho cujo comprimento de onda era 685 nm em terapia fotodinâmica (PDT) para descontaminação de canais infectados por *E. faecalis in vitro*. Nessa terapia um agente químico (corante) é utilizado e ativado por luz (sensitização) causando morte celular principalmente por apoptose. Os autores utilizaram 30 dentes extraídos unirradiculares divididos em grupo controle, grupo com preparo químico e grupo com radiação laser. No grupo

químico os canais foram irrigados por hipoclorito de sódio 0,5 % e deixados inundados pela solução por 30 minutos. No grupo laser os canais foram preenchidos por uma pasta (sensibilizador) e deixados por 5 minutos previamente à irradiação do laser por 3 minutos com energia de 1,8 J através de fibra óptica. Depois da coleta do conteúdo intracanal, o mesmo foi semeado para contagem de u.f.c.. No grupo químico a média de redução bacteriana foi de 93,25 %, já no grupo laser a média de redução foi de 99,2%. Os autores concluíram que a fotossensibilização foi mais eficiente que a utilização do hipoclorito de sódio sozinho, com diferença estatística na redução da população do microrganismo.

Para testar a citotoxicidade do azul de metileno em diversos veículos na PDT, George e Kishen (2007a) utilizaram cultura de fibroblastos e cultura de fibroblastos com células de *E. faecalis*. O azul de metileno era diluído em água, em 70 % de glicerol, 70 % de polietilenoglicol 200 e glicerol:etanol:água (MIX) na concentração de 10  $\mu\text{mol/L}$  e a PDT era conduzida nos seguintes parâmetros: comprimento de onda 664 nm, potência de 30 mW e tempo de irradiação de 1, 5, 10 e 20 minutos, total de energia de 36 J. Em todos os grupos a PDT foi menos citotóxica que o hipoclorito de sódio, quando testada em fibroblastos com *E. faecalis* as soluções MIX e com polietilenoglicol foram as menos citotóxicas e no tempo de 20 minutos o efeito bactericida foi de 97 %. Assim os autores concluem ser a PDT segura para os tecidos e com efetividade bactericida alta.

George e Kishen (2007b) analisaram o azul de metileno quanto às suas características físicas, químicas e biológicas na desinfecção do canal radicular. Os autores testaram diferentes concentrações variando de 1, 5, 15, 20, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$  em diferentes solventes: água, água + glicerol, polietilenoglicol 200 em água e glicerol:etanol:água (MIX). Os testes foram: produção de oxigênio singleto, quantidade de corante absorvido pelas bactérias (*E. faecalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), penetração em túbulos dentinários e poder bactericida em biofilme. Os parâmetros da PDT foram: laser de comprimento de onda de 664 nm, tempo de pré-irradiação de 10 e 30 min, tempo de irradiação de 10 e 20 min, total de energia de 18 e 36 J, para biofilme em mini poços e em raízes dentais respectivamente. Os autores encontraram melhores resultados com a solução MIX, na concentração de 100  $\mu\text{M}$  e maior ação contra *E. faecalis* que *A. actinomycetemcomitans*.

Garcez et al. em 2008 demonstraram que a utilização da terapia fotodinâmica como coadjuvante ao tratamento endodôntico promoveu um aumento na desinfecção obtida em 20 pacientes. Foram obtidas coletas antes e após preparo químico-cirúrgico, além de depois da execução do protocolo de terapia fotodinâmica. Os autores realizaram nova PDT em sessão subsequente uma semana após preparo e PDT e medicação de hidróxido de cálcio. Nessa última coleta a redução bacteriana foi maior, mas evidencia a persistência de microrganismos pós preparo e PDT mesmo com medicação intracanal.

Giusti et al. (2008) avaliaram Photogem e azul de toluidina como fotossensibilizadores quanto ao seu poder antimicrobiano variando concentração energia de luz LED. Os autores utilizaram cepas de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* em cárie dental. O maior efeito tóxico foi obtido com o azul de toluidina a 0,1 mg/mL e 48 J/cm<sup>2</sup>.

George e Kishen (2008) testaram o azul de metileno como sensibilizador dissolvido em água e numa mistura de glicerol:etanol:água (MIX) em uma suspensão de *E. faecalis*. Os autores observaram que o sensibilizador dissolvido em MIX foi mais efetivo na redução da concentração do microrganismo que os mesmos acreditam seja devido a uma maior interação entre o azul de metileno e a célula.

Souza et al. (2010) testaram azul de metileno e azul de toluidina na concentração de 15 µg/mL *in vitro* após preparo do canal radicular com NaOCl 2,5 % ou NaCl 0,85% em dentes extraídos contaminados por *E. faecalis*. Os parâmetros da PDT utilizados foram: 40 mW de potência, com fibra óptica e durante 4 minutos de irradiação de laser de 660 nm de comprimento de onda. Os autores utilizaram um período de 2 minutos de pré-irradiação. Os autores utilizaram o método de contagem de u.f.c./mL realizando coleta inicial, imediatamente pós preparo e imediatamente pós PDT. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, concluindo-se, então, que a PDT não promoveu aumento da desinfecção intracanal conseguida pelo preparo químico-cirúrgico.

Garcez et al. (2010) testaram PDT em 30 dentes para retratamento em infecções endodônticas antibiótico-resistentes. Foram realizadas coleta inicial com pontas de papel estéril, coleta pós-preparo químico-cirúrgico e coleta imediatamente pós-PDT. Os parâmetros utilizados foram 40 mW de potência durante 4 minutos energia total de 9.6 J e sensibilizador uma mistura de polietilenimina e clorina. Os resultados comprovaram diminuição no número de u.f.c. após PDT das seguintes

espécies: *Enterococcus sp*, *Prevotella sp*, *Actinomyces sp*, *Peptostreptococcus sp*, *Streptococcus sp*, *Fusobacterium sp*, *Porphyromonas sp*, *Enterobacter sp* e *Propionibacterium sp*. Os autores concluíram que a PDT pode ser um coadjuvante à terapia endodôntica.

Em modelo *ex vivo*, onde foram utilizados dentes extraídos, Bergmans et al. (2008) inocularam cepas de *Streptococcus anginosus*, *E. faecalis* e *F. nucleatum* em dentes incubados por 2 dias para a observação do efeito bactericida por contagem de u.f.c. e em dentes incubados por culturas mistas destes microrganismos para a formação de biofilme e sua observação em MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura). Os autores utilizaram azul de toluidina na concentração de 12,7 mg/mL e potência de 100 mW por 2,5 min e período de pré irradiação de 60 s. houve redução de u.f.c. para todos os microrganismos e em MEV os autores observaram que em biofilmes pouco espessos houve grande redução da microbiota, já em biofilmes mais densos e de mais de uma camada somente superfície externa foi observada ação da PDT. Os autores concluíram então que para a efetiva ação da PDT é necessária a desestabilização do biofilme conseguida pelo hipoclorito de sódio durante o preparo do canal.

Fimble et al. (2008) também estudando em *ex vivo*, contaminaram 120 raízes extraídas com *Actinomyces israelii*, *F. nucleatum ssp nucleatum*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* para formação de biofilme que foi constatado por MEV de alguns espécimes. Os autores imergiram os espécimes em azul de metileno na concentração de 25 µg/mL por 10 min e após isso realizaram PDT com 100mW/cm<sup>2</sup> e período de irradiação de 2,5 min, intervalo de 2,5 min e nova irradiação de 2,5 min, total de energia de fluência de 30 J/cm<sup>2</sup>. A redução bacteriana conseguida foi de cerca de 80% por análise de u.f.c. Os autores concluíram que a PDT tem ação coadjuvante na desinfecção do canal radicular.

Ng et al. (2011) avaliaram em *ex vivo* a utilização de terapia fotodinâmica com azul de metileno quanto ao seu potencial antimicrobiano. Foram utilizados 52 dentes extraídos portadores de polpa necrótica e lesão periapical discernível em radiografia. Foram realizadas 2 coletas do conteúdo intracanal: 1ª coleta no acesso ao sistema de canais, 2ª coleta imediatamente após preparo químico cirúrgico (grupo sem PDT) e 2ª coleta imediatamente após terapia fotodinâmica (grupo preparo + PDT). Os dentes sofreram preparo químico cirúrgico com hipoclorito de sódio 6 % e metade deles foram submetidos ao protocolo de PDT com azul de



metileno na concentração de 50 µg/mL sob laser de diodo na potência e comprimento de onda de 665 nm com fluência de energia a 30 J/cm<sup>2</sup>. Pré-irradiação de 5 min e irradiação em duas etapas de 2,5 min com intervalo de 2,5 min entre elas. Os autores utilizaram método de contagem de u.f.c. e hibridização de DNA-DNA *checkerboard* para detecção de 39 espécimes bacterianos das células cultivadas. O tratamento conjugado com a terapia fotodinâmica se mostrou mais eficiente quanto à desinfecção dos canais radiculares.

Assim faz-se necessária a análise do efeito da terapia fotodinâmica in vivo para a verificação do seu potencial antimicrobiano em canais endodônticos infectados.

### 3 PROPOSIÇÃO

Face ao exposto fica claro a necessidade de verificar se a utilização da terapia fotodinâmica (PDT) promove o incremento da desinfecção do sistema radicular *in vivo* após o preparo químico cirúrgico dos canais radiculares através da:

1. análise por quantificação de bactérias coletadas do interior do canal;
2. detecção por PCR de 8 microrganismos comumente associados à infecção endodôntica: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*; e,
3. comparar a detecção de *E. faecalis* pelos métodos de cultura e PCR.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi realizado em pacientes na Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Foram selecionados 30 pacientes com trinta dentes unirradiculares portadores de periodontite apical primária, sintomática ou assintomática, rizogênese completa, podendo a cavidade endodôntica apresentar-se clinicamente exposta ou não ao meio bucal, com ou sem presença de fístula e rarefação óssea periapical discernível em radiografia, (Figura 4.1). Os pacientes e seus responsáveis foram informados e assinaram termo de consentimento aprovado pelo Comitê de Ética da FOU SP, (Anexos A e B) para a realização da pesquisa, com preenchimento de ficha de anamnese, (Apêndice A).

Para a obtenção dos objetivos deste estudo foram realizados dois procedimentos distintos:

1. determinação do número de bactérias presentes no canal através de contagem total de células viáveis e cultivo em meio seletivo para *Enterococcus faecalis*;
2. detecção dos microrganismos alvos em ensaios de PCR.

### 4.1 COLETA

Os seguintes procedimentos foram realizados em todos os pacientes:

- bochecho com solução anti-séptica de digluconato de clorexidina a 0,12% durante 1 minuto a cada visita;
- anestesia local;
- profilaxia da coroa dental com pedra pomes e taça de borracha;
- isolamento do dente com dique de borracha;

- anti-sepsia do campo operatório, (Figura 4.2) realizada segundo o protocolo proposto por Ng et al. (2003): aplicação na coroa dental e lençol de borracha de: 1) solução de peróxido de hidrogênio 30% até não haver mais efervescência 2) hipoclorito de sódio 2,5% por 1 minuto, 3) tiosulfato de sódio 5%, para inativação do hipoclorito de sódio (todas as soluções foram preparadas em farmácia de manipulação (Fórmula & Ação – Laboratório Farmacêutico Ltda, São Paulo, SP, Brasil);
- após o acesso à entrada do canal radicular com brocas esféricas estéreis em alta rotação nova anti-sepsia do campo operatório foi realizada como supra citado, sendo complementada pela coleta de material com *swab* estéril antes do acesso ao canal radicular. Esse material foi transferido para o meio de cultura TSB e pelo teste de turbidez era constatado se havia ou não contaminação na coroa dental. Em caso afirmativo a amostra seria descartada. Esse procedimento se fez necessário para o controle do método de coleta das amostras e 5 dentes foram descartados, totalizando então 25 dentes;
- uma lima tipo K de fino calibre foi introduzida no interior do canal radicular onde promoveu uma limagem das paredes do mesmo a fim de se remover a maior parte do biofilme intracanal e o mesmo ser absorvido pelas pontas de papel. Além disso, em canais aparentemente secos foi injetada pequena quantidade de solução fisiológica estéril para promover a mistura do conteúdo infectado do canal e poder ser absorvido pelas pontas de papel, (Figura 4.3). Uma amostra do conteúdo do canal foi colhida para análise microbiológica com 3 pontas de papel estéreis (Precise - Miltex, Inc. York, PA, EUA) deixadas intracanal por 1 minuto. Posteriormente os cones de papel foram imersos em meio de transporte 1 mL RTF (Apêndice B). Essa 1ª coleta foi considerada Grupo Controle (**1ª coleta**).

Feito isso os dentes sofreram preparo químico cirúrgico:

- a) preparo do terço cervical com brocas Gates-Glidden #2 e #3 e brocas de Largo #2 (Dentsply- Maillefer, Ballaigues, Suíça);

- b) odontometria com o CRT determinado a 0,5 mm do vértice radiográfico;
  - c) penetração desinfetante com hipoclorito de sódio 0,5 % e limas de fino calibre;
  - d) preparo químico cirúrgico com instrumentos rotatórios (Protaper® - DENTSPLY-Maillefer, Ballaigues, Suíça) com hipoclorito de sódio 1 % em associação com gel Endo PTC (todas as substâncias químicas auxiliares foram preparadas por farmácia de manipulação Fórmula & Ação – Laboratório Farmacêutico Ltda, São Paulo, SP, Brasil);
  - e) ao término do preparo químico cirúrgico alcançado quando um instrumento de calibre 0.20 maior que o instrumento inicial ficasse livre dentro do canal radicular, foi realizada irrigação com hipoclorito de sódio 0,5% para remoção do conteúdo intracanal;
  - f) após esse procedimento fez-se a neutralização do hipoclorito de sódio por tiosulfato de sódio 5%, seguido então por irrigação e aspiração com solução fisiológica estéril.
- Nova coleta (2ª) foi obtida do conteúdo intracanal com 3 pontas de papel por 1 minuto e depois transportadas em 1 mL de RTF como descrito anteriormente na 1ª coleta.

Os 25 dentes foram divididos em 2 grupos experimentais:

Grupo 1 (n=15) – selamento duplo provisório realizado nos dentes (bolinha de algodão estéril na entrada do canal coberta por uma camada de cimento de restauração provisório (Citodur® - Dorident, Viena, Áustria) e preenchimento da cavidade pulpar com cimento de ionômero de vidro (Vitro Fil® - DFL Indústria e Comércio S.A. Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Após 72 h foi realizada anestesia, isolamento absoluto e remoção da restauração provisória respeitando o protocolo de descontaminação do campo operatório já mencionado, e realizada a **3ª coleta** com pontas de papéis absorventes como nas anteriores posteriormente. O objetivo dessa coleta foi detectar os microrganismos remanescentes em túbulos dentinários que alcançaram a luz do canal principal durante esse período.

Grupo 2 (n=10) – Imediatamente após a **2ª coleta** foram realizados os procedimentos da terapia fotodinâmica. Os dentes tiveram seus canais preenchidos por 0,5 mL de fotossensibilizador azul de metileno 50 µg/mL (Chimiolux- Aptivalux, MG, Brasil) – Figura 4.4 - deixados por 2 minutos (pré-irradiação). A irradiação foi realizada com laser de diodo (Thera Lase® - DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, SP, Brasil), – Figura 4.5 - comprimento de onda de 660 nm e potência de 100 mW durante 4 minutos de irradiação. Após a irradiação os canais foram irrigados e aspirados com 10 mL de solução fisiológica estéril para eliminação do fotossensibilizador. Os dentes foram então selados (como descrito no Grupo 1) para posterior execução da **3ª coleta** em 72 h.

Após as 3<sup>as</sup> coletas todos os dentes tiveram seu tratamento endodôntico terminado segundo preceitos da técnica FOUSP e foram obturados com guta percha (DENTSPLY Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil) e cimento resinoso (AH Plus® - DENTSPLY- Maillefer, DENTSPLY International Inc. Johnson City, TN, EUA).

## 4.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

A análise microbiológica foi efetuada no Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. As amostras do material coletado em 1 mL de RTF em tubos de polietileno sofreram homogeneização por 60 s em equipamento Fisher Vortex® (Genie 2™- Fisher Scientific, Bohemia, NY, EUA) para processamento e análise pelo método de cultivo para contagem de células viáveis.

O restante do conteúdo de RTF de cada amostra foi congelado a -80 °C para posterior extração e purificação de DNA bacteriano para reação de PCR e detecção de microrganismos pré-determinados.

#### 4.2.1 Análise por cultivo

- Alíquotas de 100 µL do conteúdo sofreram diluições seriadas até  $10^{-4}$  em 900 µL de água peptonada contida em tubos de polietileno de 1,5 mL.
- Cultivo de 100 µL de cada diluição em placas de Petri contendo Agar Brucella – BD Difco (BD,NJ,EUA) com sangue de carneiro enriquecido com hemina e menadione (Apêndice C) e incubação em câmara de anaerobiose por 7 dias para contagem das u.f.c./mL. de bactérias anaeróbios estritos, visualizadas em lupa (Figura 4.6).
- Cultivo de 25 µL em triplicata de cada diluição em placas de Petri contendo Agar mEnterococcus - BD Difco (BD, NJ, EUA) incubação em estufa em 37° C por 7 dias para contagem das u.f.c./mL de *Enterococcus faecalis* (Figura 4.7).
- Após 7 dias foi realizada a contagem de u.f.c./mL de cada diluição.

Os resultados foram tabulados e analisados estatisticamente para determinação da existência de diferenças entre os grupos quanto ao grau de desinfecção obtido.

#### 4.2.2 Detecção por PCR de patógenos endodônticos

Para a realização dos ensaios de PCR foi feita a extração e purificação do DNA bacteriano.

#### 4.2.2.1 Isolamento de DNA genômico bacteriano das amostras

A extração de DNA das amostras em meio RTF foi feita com o Kit de Extração Wizard<sup>R</sup> Genomic DNA Purification Kit – Promega Corporation (Madison, Wisconsin, EUA) com as modificações abaixo citadas:

1. o conteúdo da mostra foi centrifugado a 13000 *g* por 2 min. O sobrenadante foi removido por aspiração e as células re-suspendidas em 480  $\mu$ L de EDTA 50 mM. Optou-se pela não remoção dos cones de papel da amostra já que os mesmos continham grande quantidade de microrganismos o que se seguiu até a fase da aspiração do sobrenadante contendo a massa de DNA para inoculação em isopropanol;
2. adição de 120  $\mu$ L de lisozima 10 mg/mL em água ultra pura estéril *nuclease free*;
3. incubação por 30 min a 37<sup>o</sup> C em trocador de calor (Digi-Block<sup>R</sup> Jr - Barnstead International, Dubuque, Iowa, EUA);
4. agitação em Vortex por 30 s;
5. centrifugação a 13000 *g* por 2 min;
6. remoção do sobrenadante e adição de 600  $\mu$ L de *Nuclei Lysis Solution*;
7. incubação a 80 °C por 5 min para lisar as células, e a seguir, resfriamento na temperatura ambiente;
8. adição de 3  $\mu$ L de *RNase Solution* às células lisadas. Inversão do tubo de 2 a 5 vezes;
9. incubação a 37 °C por 30 min. Resfriamento à temperatura ambiente;
10. adição de 200  $\mu$ L de *Protein Precipitation Solution* às células tratadas com RNase. Vortex vigorosamente em alta velocidade por 20 s;
11. incubação em gelo por 5 min;
12. centrifugação a 13000 *g* por 3 min;



13. transferência do sobrenadante contendo o *pellet* de DNA para um tubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol à temperatura ambiente;
  14. inversão do tubo até a visualização da massa de DNA;
  15. centrifugação a 13000 *g* por 2 min;
  16. remoção cuidadosa do sobrenadante. Adição de 600 µL de etanol 70% à temperatura ambiente para lavagem do *pellet* de DNA;
  17. centrifugação a 13000 *g* por 2 min. Aspiração do etanol;
  18. secagem do tubo por 10 a 15 min;
  19. adição de 100 µL de *DNA Rehydration Solution* e incubação a 65 °C por 1 h ou *overnight* à temperatura ambiente;
  20. Armazenamento em freezer a -20 °C.
- Cinco amostras do Grupo 1 foram perdidas resultando em 10 amostras de DNA para cada grupo.

#### 4.2.2.2 Ensaio de PCR

Os microrganismos selecionados para identificação por PCR foram: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*. Amostras de DNA extraídas de cepas padrão foram utilizadas como controle positivo das reações de PCR (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Cepas-padrão das bactérias dos controles positivos das reações

<i>Espécies bacterianas</i>	<i>Cepas padrão</i>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	ATCC 29522
<i>Campylobacter rectus</i>	ATCC 33238
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATCC 25586
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Parvimonas micra</i>	ATCC 33270
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277
<i>Prevotella intermedia</i>	ATCC 25611
<i>Prevotella nigrescens</i>	ATCC 33563

Após a extração e purificação do DNA a concentração do mesmo foi determinada em espectrofotômetro (Nanodrop- Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). Devida a baixa concentração encontrada nas amostras o DNA extraído sofreu amplificação em reação de PCR com iniciador universal. O protocolo da reação está explicitado na Tabela 4.2.

Os produtos desses ensaios de PCR foram então submetidos à reações de *Nested* PCR com os iniciadores espécie-específico de cada espécie bacteriana segundo protocolo proposto por Rôças et al. (2004) em análise de amostras clínicas provenientes de canais portadores de polpa mortificada e lesão periapical discernível em radiografias.

Tabela 4.2. - Concentração de reagentes da reação de PCR para iniciador espécie-específico para a enzima Taq DNA polymerase, Recombinant Invitrogen® (Life Technologies, Brasil)

<b>Concentração</b>	<b>Reagente</b>
*	Molde de DNA
<b>1X</b>	Tampão
<b>1,5 mM</b>	50M MgCl <sub>2</sub>
<b>0,2 mM</b>	dNTPs
<b>0,4 µM</b>	<i>Iniciador forward</i>
<b>0,4 µM</b>	<i>Iniciador reverse</i>
<b>1 unidade</b>	<i>Taq polymerase</i>
<b>q.s.p. 50 µL</b>	Água ultra pura <i>nuclease free</i>

\* quantidade de molde de DNA de 5 µL

Os parâmetros das reações tanto para o ensaio de PCR quanto para o *Nested* PCR iniciadores espécie-específico estão discriminados na Tabela 4.3:

Tabela 4.3 - Parâmetros da reação para a enzima Taq polymerase Recombinant Invitrogen®:

Ciclos		Temperatura	Tempo
1 ciclo		94 °C	3 min
35 ciclos	Denaturação	94 °C	45 a 60 s
	Anelamento	Tempo e temperatura dados pelo <i>iniciador</i>	
	Extensão	72 °C	1,5 a 2 min
1 ciclo	Extensão final	72 °C	10 min

As reações ocorrem em termociclador (C1000 Thermal Cycler – BIORAD, CA, EUA) – Figura 4.8 - e os produtos das reações de PCR de iniciador universal foram então congelados a – 20 °C para posteriormente serem utilizados como molde de DNA para os ensaios de *Nested* PCR iniciador espécie-específico. Os reagentes e quantidades utilizados nessa segunda reação estão explicitados em tabela a seguir:

Tabela 4.4 - Concentração de reagentes da reação de PCR para iniciador espécie-específico para a enzima Taq DNA polymerase, Recombinant®

Concentração	Reagente
#	Molde de DNA (produto de PCR do iniciador universal)
1X	Tampão
1,5 mM	50M MgCl <sub>2</sub>
0,2 mM	dNTPs
0,4 µM	Iniciador <i>foward</i>
0,4 µM	Iniciador <i>reverse</i>
1 unidade	<i>Taq polymerase</i>
q.s.p. 25 µL	Água ultra pura <i>nuclease free</i>

# quantidade de molde de 1 µL

#### 4.2.2.3 Detecção dos produtos de PCR

Os *amplicons* dos ensaios de PCR, tanto de iniciador universal quanto de iniciador espécie-específico, foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% conduzido a 100 V em tampão Tris-EDTA, (Figura 4.9). O gel foi sensibilizado com GelRed™ (Uniscience, Brasil) e visualizado sob luz ultravioleta de 302 – 312 nm em transiluminador DNR-Bio Imaging Systems® (Minibus Pro, Israel) – Figura 4.10 - e analisado em software específico do mesmo. Foi utilizada uma escala padrão High Ranger plus 100bp DNA Ladder Norgen™ (Biotek Corporation, Canadá) para leitura dos resultados, (Figura 4.11).

Tabela 4.5 - Iniciadores de PCR usados para a identificação de patógenos endodontais

<i>Espécies bacterianas</i>	<i>Sequências dos pares de iniciadores (5' – 3')</i>	<i>Temperatura de anelamento</i>	<i>Tamanho do produto (pb)</i>
<b>Iniciadores universais (controle positivo)</b> Sato et al. (1997)	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG TACGGGTACCTTGTACGACTT	60 °C	1500
<b><i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i></b> Goncharoff et al. (1993)	CTAGGTATTGCGAAACAATTTG CCTGAAATTAAGCTGGTAATC	55 °C	262
<b><i>Campylobacter rectus</i></b> Ashimoto et al. (1996)	TTTCGGAGCGTAACTCCTTTTC TTTCTGCAAGCAGACACTATT	60 °C	598
<b><i>Enterococcus faecalis</i></b> Rôças, Siqueira e Santos (2004)	GTTTATGCCGCATGGCATAAGAG CCGTCAGGGGACGTTTCAG	60 °C	310
<b><i>Fusobacterium nucleatum</i></b> Kim et al. (2005)	CCTGCAGGAACAATAAGAC TGAAAGGCAAGGTGAAG	57 °C	328
<b><i>Parvimonas micra</i></b> Riggio, Lennon e Smith (2001)	TGGAACGTGATTTTTGTGGA TCCAGAGTTCCCACCTCT	55 °C	1074
<b><i>Porphyromonas gingivalis</i></b> Amano et al. (1999)	TGTAGATGACTGATGGTGAAAACC ACGTCATCCCCACCTTCCTC	60 °C	197
<b><i>Prevotella intermedia</i></b> Guillot e Mouton (1997)	CAGCACCCACAACGATATGA TTCCATCTTCTCTGCCTGTC	65 °C	754
<b><i>Prevotella nigrescens</i></b> Guillot e Mouton (1997)	TTATGTTACCCGTTATGGAAG ATGGCGAAATAGGAATGAAAGTTA	65 °C	1100

Os resultados foram analisados para a observação da incidência desses microrganismos nas amostras coletadas.

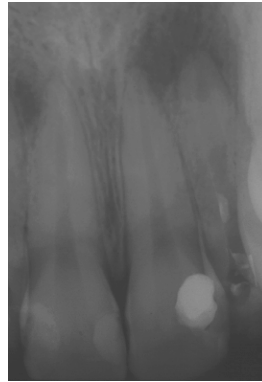


Figura 4.1 - Radiografia de dente da amostra com rarefação óssea periapical

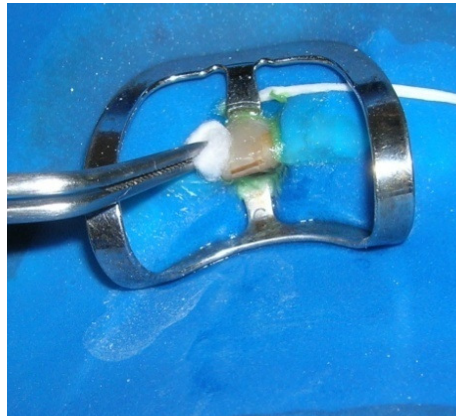


Figura 4.2 - Manobra de desinfecção coronária

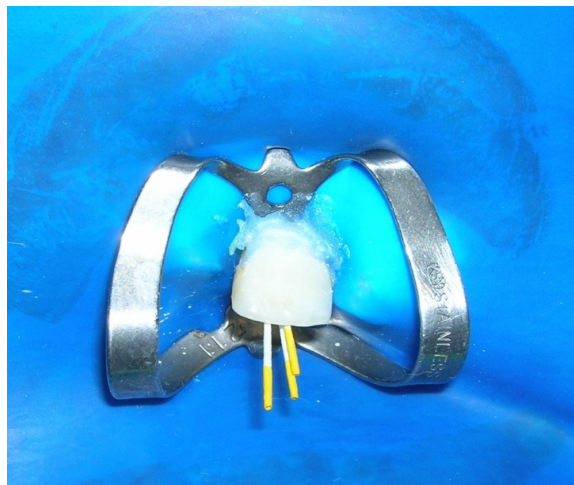


Figura 4.3 - Coleta do conteúdo do canal radicular



Figura 4.4 - Aparelho de laser de baixa potência



Figura 4.5 - Embalagem contendo azul de metileno



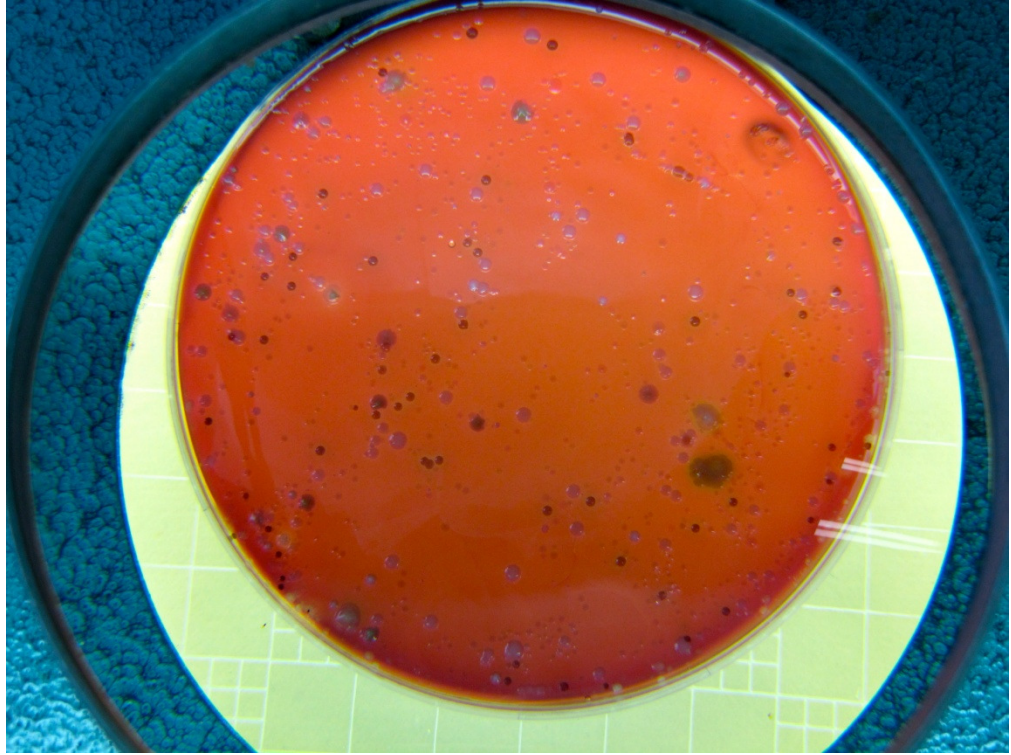


Figura 4.6 - Lupa com placa com Ágar Brucella Sangue enriquecido com hemina e menadione contendo microrganismos provenientes de coleta intracanal

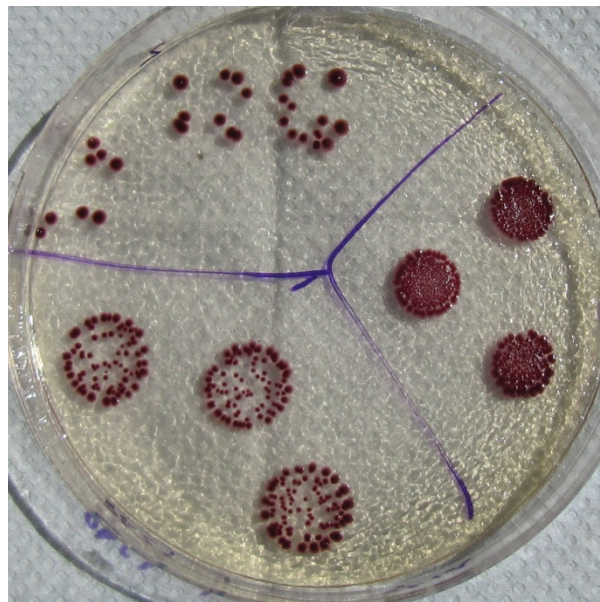


Figura 4.7 - Placa com meio seletivo para *E. faecalis*



Figura 4.8 - Termociclador para ensaio de PCR



(a)



(b)

Figura 4.9 - Equipamento para eletroforese (a) e (b)





Figura 4.10 - Transiluminador

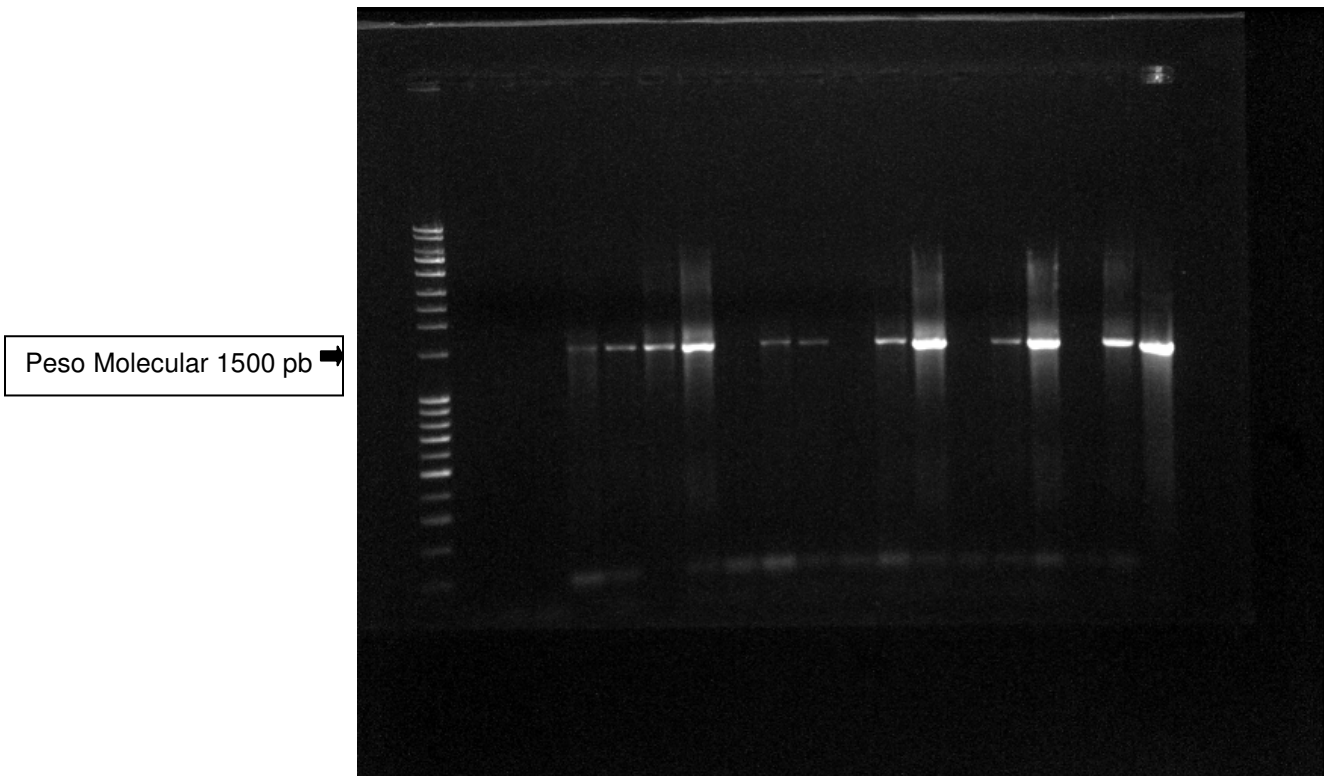


Figura 4.11 - Imagem ilustrativa do gel de eletroforese das amostras iniciador universal

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE POR CULTIVO

Os resultados da contagem de u.f.c./mL totais em Agar Brucella Sangue foram tabulados e a análise está presente na Tabela 5.1 e Gráficos 5.1 e 5.2.

Tabela 5.1 - Médias e desvios padrão dos grupos

Grupo	Coleta	Média	Máximo	Mínimo	Desvio padrão
Grupo 1	1ª coleta	$2 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	49	$4,5 \times 10^5$
Sem	2ª coleta	$1,4 \times 10^3$	$2,1 \times 10^4$	0	$5,4 \times 10^3$
PDT	3ª coleta	$6,2 \times 10^4$	$3,6 \times 10^5$	0	$1,2 \times 10^5$
Grupo 2	1ª coleta	$1 \times 10^5$	$5,9 \times 10^5$	6	$1,8 \times 10^5$
Com	2ª coleta	$2,6 \times 10^3$	$2,4 \times 10^4$	0	$7,5 \times 10^3$
PDT	3ª coleta	$2,2 \times 10^4$	$1,9 \times 10^5$	1	$5,9 \times 10^4$

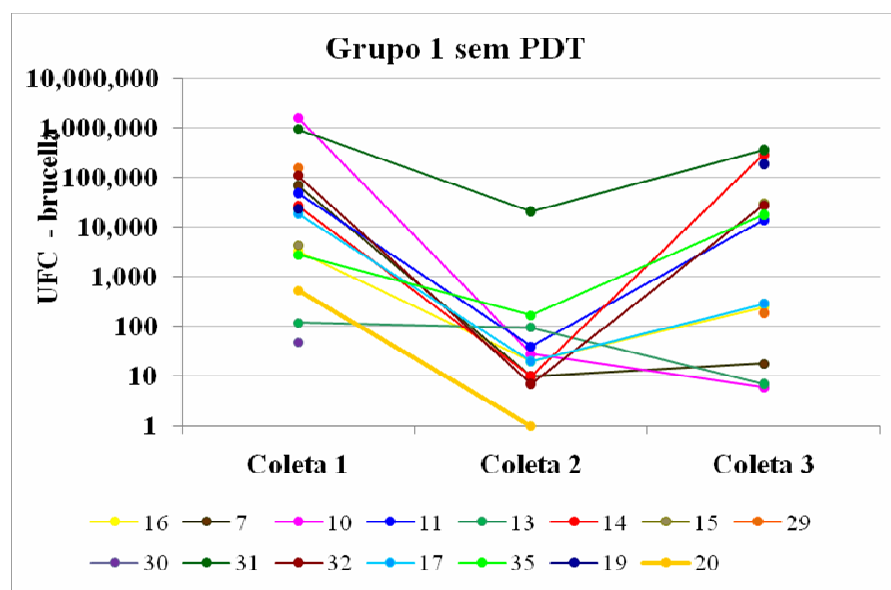


Gráfico 5.1 - Distribuição das médias em log de u.f.c./mL do Grupo 1 sem PDT

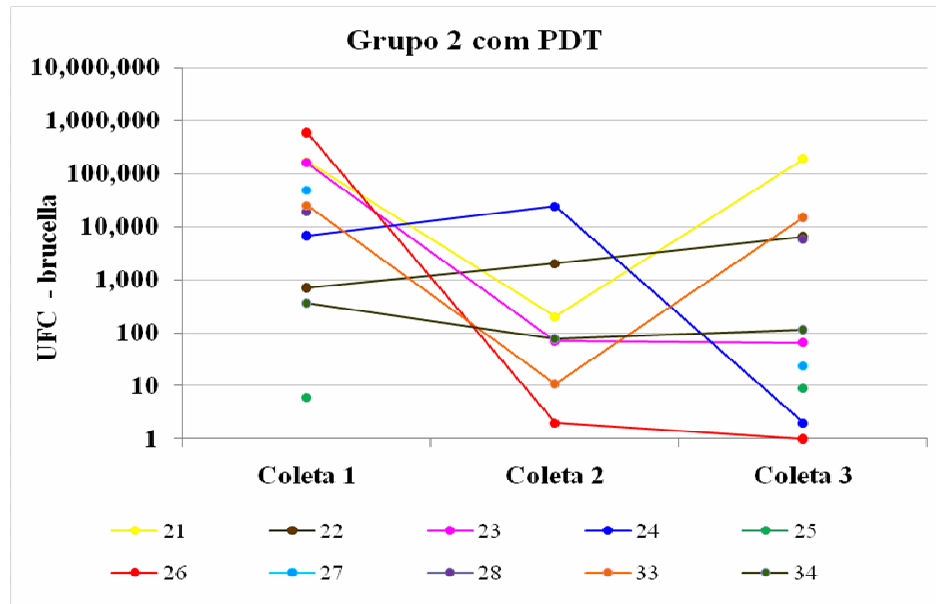
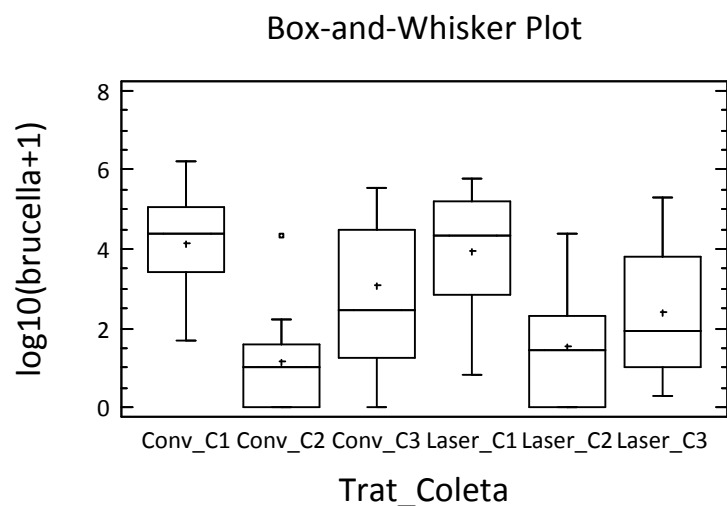


Gráfico 5.2 - Distribuição das médias em log de u.f.c./mL do Grupo 2 com PDT

A análise estatística pelo método ANOVA do log dos resultados por testes de Cochran, Bartlett, Hartley e Levene (Gráfico 5.3) demonstraram diferenças entre as coletas dos dois grupos (contagem de colônias totais) com significância  $p < 0,05$ , assim pode-se concluir que ambos os tratamentos foram capazes de reduzir a microbiota intracanal.



Conv = Grupo 1; Laser = Grupo 2; C1, C2 e C3 = coletas

Gráfico 5.3 - Distribuição dos dados

Quando comparados os Grupos experimentais (contagem de colônias totais) não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre eles  $p = 0,693$  (Gráfico 5.3).

Foram detectados pelo meio de cultivo mEnterococcus uma quantidade baixa de *E.faecalis* em ambos os grupos, não possibilitando análise estatística dos resultados explicitados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Médias de u.f.c/mL. de *E. faecalis* dos Grupos

	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3
<b>GRUPO 1</b>	0	0	0
<b>SEM</b>	0	0	0
<b>PDT</b>	0	0	0
	0	0	0
	<b>400</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>40</b>	<b>0</b>	<b>320</b>
	<b>3200</b>	<b>0</b>	<b>24000</b>
	<b>200</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	0	0	0
	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>240</b>
	<b>200</b>	<b>1</b>	<b>5200</b>
	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
<b>Freqüência</b>	<b>33,33 %</b>	<b>6,67 %</b>	<b>26,67 %</b>
<b>GRUPO 2</b>	0	0	0
<b>PDT</b>	0	0	0
	0	0	0
	<b>36000</b>	<b>40</b>	<b>0</b>
	0	0	0
	0	0	0
	<b>38</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<b>40</b>	<b>0</b>	<b>12</b>
	0	0	0
	0	0	0
<b>Freqüência</b>	<b>30 %</b>	<b>10 %</b>	<b>10 %</b>

## 5.2 ANÁLISE POR PCR

Todos os microrganismos alvos foram detectados nas amostras testadas e suas freqüências em porcentagem estão explicitadas nos Gráficos 5.4 e 5.5.

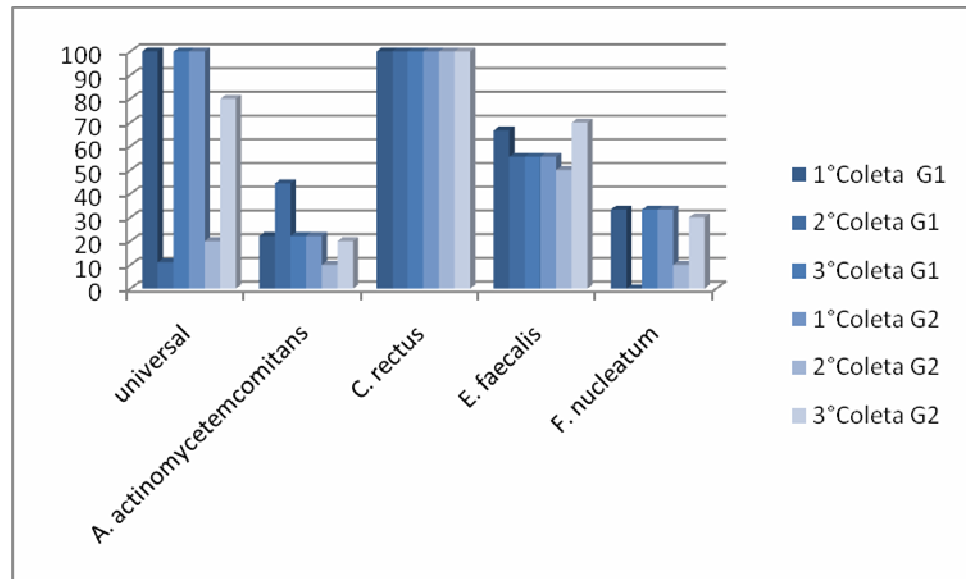


Gráfico 5.4 - Distribuição das freqüências dos microrganismos nas amostras em porcentagem de detecção por PCR.

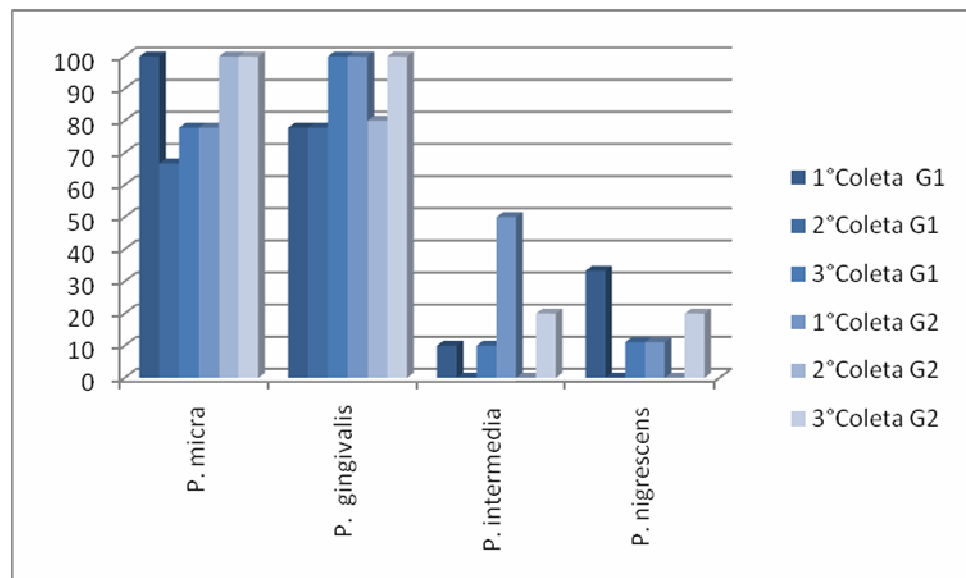


Gráfico 5.5 - Distribuição das freqüências dos microrganismos nas amostras em porcentagem de detecção por PCR.

Devida a alta variabilidade da distribuição dos dados e sua não homogeneidade não foi possível uma análise estatística dos mesmos.

Na comparação dos resultados de detecção de *E. faecalis* nas amostras que foram submetidas tanto ao método de cultura quanto ao ensaio de PCR houve diferença entre os resultados encontrados, (Tabela 5.3). A análise estatística pelo teste *t* demonstrou diferenças significativas entre os métodos,  $p=0,0048$ .

Tabela 5.3 - Incidência de *E. faecalis* entre o método de cultura e PCR em número de amostras positivas

Grupo	Cultivo	PCR	Cultivo	PCR	Cultivo	PCR
	1ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	3ª coleta
Grupo 1	3	5	1	5	3	4
Grupo 2	2	6	0	5	1	7

## 6 DISCUSSÃO

A constante busca em se alcançar a melhor desinfecção de canais radiculares está presente nos parâmetros dos procedimentos endodônticos, visto que a presença de microrganismos se constitui em fator significativo para a manutenção ou aparecimento da lesão periapical. Tal assertiva é consensual desde os primórdios da Endodontia e alcançá-la, a desinfecção, é objetivo de pesquisa constante.

O método de cultura de microrganismos viáveis para posterior contagem de u.f.c. é amplamente utilizado para verificação de desinfecção do sistema de canais radiculares (Peciulienė et al., 2001; Rôças et al., 2004; Ferrari et al., 2005; Gomes et al. 2006; Zoletti et al., 2006; Garcez et al., 2008; Vianna et al., 2008; Garcez et al. 2010). Para isso, é necessária a coleta com cones de papel absorvente e posterior transporte do material coletado em meios de transporte adequado à manutenção da viabilidade celular. Neste estudo optou-se pelo meio de transporte RTF por suas características de manutenção da tensão de oxigênio necessária à conservação dos microrganismos coletados em estado vital. Além disso, a consistência fluida foi crucial na sua escolha, em detrimento do meio VMGA III, pois a mesma é fundamental para a extração e purificação do DNA bacteriano para posteriores ensaios de PCR pelo kit utilizado. Com o propósito de coletar material representativo do canal radicular, foi utilizada uma lima de fino calibre para melhor misturar o conteúdo intracanal nas coletas, tanto em canais secos bem como nas 2<sup>a</sup>. e 3<sup>a</sup>. coletas o canal foi preenchido por solução fisiológica estéril como em estudos de Rôças et al. (2004), Zoletti et al. (2006) e Siqueira Jr et al. (2007). Mesmo com esses cuidados a 1<sup>a</sup> coleta teve resultados não uniformes e em poucos casos foi detectada uma quantidade muito pequena de microrganismos. Isso se deveu, basicamente, a duas características intrínsecas dos espécimes: 1) heterogeneidade das amostras – dentre os espécimes havia casos de abscesso dento-alveolar agudo, abscesso dento-alveolar crônico, lesões periapicais sintomáticas ou não, casos de trauma dental, cavidade pulpar exposta ou não, etc. – causando alta variabilidade na quantidade de células presentes no interior do canal; e, 2) anatomia radicular – alguns canais apresentavam diâmetros reduzidos e curvaturas que dificultavam a inserção do cone de papel absorvente até o terço apical e influenciavam diretamente

na quantidade de material coletado mesmo com a inoculação da solução fisiológica estéril.

Neste estudo optou-se por fazer 3 coletas: inicial (**1ª coleta**); imediatamente pós preparo químico-cirúrgico (**2ª coleta**) e pós 72 h (**3ª coleta**). Cabe ressaltar que este intervalo da 2ª. para a 3ª. coleta foi sem a utilização de MIC, ao contrário dos estudos de Vianna et al. (2008), Garcez et al. (2008) e Garcez et al. (2010) que utilizam usualmente hidróxido de cálcio e eventualmente clorexidina entre sessões. Isso se fez necessário para evitar qualquer interferência do potencial antimicrobiano da medicação intracanal na última coleta, já que a mesma visava verificar se a PDT potencializava a desinfecção conseguida pela fase de preparo do canal. Devido a isso, o tempo entre sessões foi diminuído para 72 h e pelos seguintes motivos: não deixar o paciente com tempo demasiado sem medicação intracanal e sujeito a algum aparecimento de sinais e sintomas; e, para que nesse período houvesse tempo hábil aos microrganismos remanescentes no interior dos túbulos dentinários para que se multiplicassem e alcançassem a luz do canal principal. Ainda, essa manobra visou também verificar se havia alguma diferença entre os tipos de microrganismos resistentes à terapia fotodinâmica.

Pela análise estatística realizada fica claro que o preparo do canal é determinante para a redução da microbiota intracanal, o que também afirmado em outros estudos (Paiva; Antoniazzi, 1988; Buck et al., 2001; Lage-Marques, Antoniazzi, 2002; Siqueira Jr et al., 2002; Sassone et al., 2003; Zamany et al., 2003; Nair et al., 2005; Berber et al., 2006; Souza et al.; 2008). É nessa etapa que ocorrem a limpeza e a desinfecção do canal radicular denominadas como sanificação. A ação dos instrumentos em conjunto com substâncias químicas auxiliares com ação antimicrobiana como o gel de Endo PTC e o hipoclorito de sódio são responsáveis pela maior parte da redução, causando morte celular, desorganização de biofilme e aumentando a permeabilidade dentinária (Paiva; Antoniazzi, 1988; Lage-Marques, Antoniazzi, 2002; Souza et al., 2005; Souza et al., 2007). Mesmo assim, a total eliminação da microbiota endodôntica não é conseguida por motivos anatômicos (canais laterais, deltas apicais, túbulos dentinários) e a presença de microrganismos resistentes ao preparo do canal.

Torna-se necessária a utilização de recursos como medicação intra-canal, radiação laser e a terapia fotodinâmica na busca de eficiente desinfecção do sistema de canais radiculares (Nair et al., 2005; Garcez et al., 2008; Bergmans et al., 2008;



Souza et al., 2008; Souza; Lage-Marques, 2010; Ng et al., 2011)

A terapia fotodinâmica apresenta ação antimicrobiana com a vantagem da não indução de resistência bacteriana. Com o advento cada vez mais comum de microrganismos antibiótico-resistentes esse tipo de terapia apresenta vantagem com potencialidade para mais estudos. Além disso, a PDT inativa a endotoxina LPS, presente em bactérias Gram-negativas, responsável por perpetuação de lesões periapicais (Kristiansen; Amaral, 1997; Wilson, 2004; Sigusch et al., 2005; Zanin et al., 2005; Bello-Silva et al., 2007). Outra característica interessante da terapia fotodinâmica é a capacidade de penetração do sensibilizador em túbulos dentinários infectados que seriam atingidos pela sua ação bactericida.

Dentre os sensibilizadores mais utilizados em Endodontia estão os fenotiazínicos como azul de metileno e azul de toluidina, com grande eficácia antimicrobiana quando conjugados com a PDT, comprovada por vários estudos *in vitro* (Wainwright, 2005; Soukos et al., 2006; George; Kishen, 2007a,b; George; Kishen, 2008; Bergmans et al., 2008; Fimple et al., 2008; Ng et al., 2011). Neste experimento optou-se pelo azul de metileno diluído em água de osmose reversa estéril na concentração de 50 µg/mL, vendido em embalagens previamente esterilizadas.

Os parâmetros utilizados para a irradiação do laser de diodo foram os já testados em experimento *in vitro* Souza et al. (2009).

Neste estudo a PDT, nos parâmetros utilizados e no método de cultura em Agar Brucella para contagem de u.f.c. totais, não promoveu um incremento significativa da redução da população bacteriana em relação ao preparo químico-cirúrgico. Esse achado está de acordo com estudo de Souza et al. 2010 onde a PDT não apresentou efeito coadjuvante ao preparo do canal de raízes extraídas contaminadas com *E. faecalis*. Há na literatura uma grande variabilidade nos parâmetros utilizados na PDT (tempo de exposição, fluência de energia, potência do laser, concentração do corante, etc.). Em Endodontia diversos autores utilizaram diferentes combinações entre esses parâmetros com resultados positivos, a maioria deles *in vitro*, sendo que, apenas dois deles realizados *in vivo* constataram o efeito de aumento da desinfecção coadjuvado pela PDT (Garcez et al., 2008; Garcez et al., 2010). Fica claro, portanto, a necessidade de maior número de estudos *in vivo*. Além disso, as coletas microbiológicas foram feitas imediatamente após o preparo do canal e subsequente PDT.

Pela própria metodologia de coleta intracanal, duas coletas praticamente imediatas podem reduzir o número de microrganismos recuperados na última delas pela própria diminuição do conteúdo intracanal. Vale ressaltar também que nessa dinâmica de coletas não há tempo hábil para que microrganismos presentes em túbulos dentinários possam alcançar o canal principal da mesma forma que ocorre em um tempo maior como de 72 h.

Para maximizar a quantidade de material genético extraído das amostras os cones de papel absorvente foram mantidos nas etapas da extração e purificação do DNA bacteriano até a fase de aspiração separando o sobrenadante do DNA extraído. Durante a adequação do método de extração e purificação de DNA ao kit houve perda de 5 amostras do Grupo 1. As concentrações de DNA obtidas das amostras foram pequenas, o que é confirmado por estudos de Rôças et al. (2004), Gomes et al. (2006) e Zoletti et al. (2006), e explicadas pela pequena quantidade de material orgânico coletado do interior do canal radicular da maioria dos espécimes. Essa pequena quantidade de DNA é ainda menor quando dividida pelos diferentes microrganismos presentes, sendo necessária a amplificação desse material genético previamente à detecção por iniciadores espécie-específico. Como em estudos de Leys et al. (1994), Rôças et al. (2004) e Zoletti et al. (2006) houve uma amplificação do DNA pelo iniciador universal em reação de PCR. Após isso, este produto de PCR serviu como molde para a reação *Nested* PCR, agora com DNA suficiente para ser detectado por iniciador espécie-específico. O iniciador universal utilizado corresponde à posição 8-27 relativa à região 16S rDNA da *Escherichia coli* na porção *forward* e correspondente à posição 1493-1513 na porção *reverse* da mesma região. Este par de iniciadores promovem a amplificação de praticamente toda a extensão da região 16S rDNA, contemplando assim todas as regiões comuns aos iniciadores espécie-específicos utilizados (Rôças et al., 2004).

Quanto à correlação entre os microrganismos remanescentes e sua susceptibilidade à PDT os resultados obtidos pela análise de PCR não foram conclusivos devido à grande variabilidade dos dados. Quando comparadas as frequências de detecção do *E. faecalis* neste estudo pelo método de cultura e pelo método de PCR, as mesmas foram maiores pelo ensaio de PCR o que está de acordo com outros estudos. (Rôças et al., 2004; Gomes et al., 2006; Zoletti et al., 2006; Tomazinho; Avila-Campos, 2007).

O ensaio de PCR possui maior sensibilidade de detecção que o método de

cultura e neste estudo essa diferença teve significância estatística. A detecção de *E. faecalis* em infecção primária pelo método de cultivo foi de 25% e, quando analisada pelo método de PCR a incidência foi de 55% das mesmas amostras.

*E. faecalis* é reportado como microrganismo resistente à medicação intracanal de hidróxido de cálcio e de alta incidência nos casos de insucessos em Endodontia (Peciulienė et al., 2001; Hubble et al., 2003; Rôças et al., 2004, Gomes et al., 2006; Zoletti et al., 2006; Stuart et al., 2006). Neste experimento procurou-se determinar *in vivo* sua suscetibilidade à PDT realizada pelo método de cultura o que é confirmado por estudos *in vitro* (Silva Garcez et al., 2006; Soukos et al., 2006; George; Kishen, 2007a,b; Garcez et al., 2008; George, Kishen, 2008; Ng et al., 2011). Os resultados encontrados no Grupo 2 (com PDT) foram de redução de u.f.c./mL de todas as amostras e zero u.f.c./mL de 2 dos 3 casos, já no Grupo 1 (sem PDT) houve redução a zero u.f.c./mL em 2 dos 6 casos e, ainda, aumento de u.f.c./mL nos outros 4 casos da 3ª coleta. Devido à alta variabilidade dos dados não foi possível analisar estatisticamente estes resultados que demonstram uma tendência positiva do efeito bactericida da PDT contra *E. faecalis*, que está de acordo com os estudos previamente citados. A PDT apresenta maior efeito antimicrobiano contra microrganismos Gram-positivo, caso do *E. faecalis* devido as características inerentes da membrana celular desse tipo de bactéria (Wainwright, 1998; Wainwright, 2005; George; Kishen, 2007a,b; George; Kishen, 2008).

Inúmeros estudos *in vitro* demonstram o potencial antimicrobiano da PDT, principalmente em relação ao *E. faecalis* nos mais diversos parâmetros. Porém, mais estudos são necessários para se verificar o potencial antimicrobiano da PDT na terapia endodôntica *in vivo* e um maior número de casos com *E. faecalis* para verificar de forma confiável a sua suscetibilidade à PDT.

## 7 CONCLUSÕES

A partir da análise dos resultados pode-se concluir:

- A terapia fotodinâmica nos parâmetros testados não aumentou significativamente a desinfecção do sistema de canais.
- Os microrganismos detectados por PCR mais freqüentes foram: *C. rectus*, *P. micra*, *P. gingivalis* e *E. faecalis* em ordem decrescente.
- A detecção de *E. faecalis* pelo método de PCR foi mais alta quando comparada pela detecção pelo método de cultura.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2001 Nov; 74(5): 656–69.
- Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, Morisaki I, Hamada S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with fimA genotypes in periodontitis patients. *J Clin Microbiol.* 1999 May;37(5):1426-30.
- Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesion. *Oral Microbiol Immunol.* 1996 Aug;11(4):266-73.
- Bello-Silva MS, Ribeiro MS, Eduardo CP, Garcez AS, Gouw-Soares S, Lage-Marques JL. Efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica em canais radiculares. Estudo clínico. *Braz Oral Res.* 2007 Set;21(Supl 1); 99.
- Berber VB, Gomes BPF, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J.* 2006 Jan;39(1):10-7.
- Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, Meerbeek BV, Quirynen M, Lambrechts P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens *ex vivo*. *Int Endod J.* 2008 Mar;41:227-39.
- Bonsor SJ, Nichol R, Reid TMS, Pearson GJ. Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (An *in vivo* study). *Br Dent J.* 2006 Mar;2006(6):337-41.
- Bouillaguet S, Owen B, Wataha JC, Campo MA, Lange N, Schrenzel J. Intracellular reactive oxygen species in monocytes generated by photosensitive chromophores activated with blue light. *Dent Mater.* 2008 Aug;24:1070-6.
- Buck RA, Eleazer PD, Staat RH, Scheetz JP. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. *J Endod.* 2001 Mar;27(3):206-8.

<sup>1</sup> De acordo com Estilo Vancouver.

Dörtbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokomy G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2001 Apr;12(2):104-8.

Fan KF, Hopper C, Speight PM, Buonaccorsi G, MacRobert AJ, Bown SG. Photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid for premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Cancer.* 1996 Oct; 78:1374-83

Ferrari PHP, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. *Inter Endod J.* 2005 Jun;38(6):372–80.

Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, Tanner ACR, Kent R, Doukas AG, Stashenko PP, Soukos NS. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod.* 2008 Jun;34(6):728-34.

Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin MR. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jun;48(6):2173-8.

Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Nunez SC, Jorge AOC, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med.* 2007 Jan;39:59-66.

Garcez AS, Nunez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod.* 2008 Feb; 34(2):138-42.

Garcez AS, Nunez SC, Hamblin MR, Suzuki H, Ribeiro MS. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. *J Endod.* 2010 Sep;36(9):1463-6.

George S, Kishen A. Advanced noninvasive light-activated disinfection: assessment of cytotoxicity on fibroblast versus antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2007a May;33(5):599-602.

George S, Kishen A. Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. *J Biomed Opt.* 2007b May-Jun;12(3):034029.

- George S, Kishen A. Influence of photosensitizer solvent on the mechanisms of photoactivated killing of *Enterococcus faecalis*. *Photochem Photobiol*. 2008 May-Jun, 84: 734–40.
- Giroldo LM, Felipe MP, Oliveira MA, Munin E, Alves LP, Costa MS. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2009 Jan;24(1):109-12.
- Giusti JSM, Santos-Pinto L, Pizzolito AC, Helmersen K, Carvalho-Filho E, Kurachi C et al. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomed Laser Surg*. 2008 Aug;26(4):281-7.
- Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol*. 2005 Aug; 20: 211–5.
- Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Aug;102(2):247-53.
- Goncharoff p, Figurski DH, Stevens RH, Fine DH. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: polymerase chain reaction amplification of lktA-specific sequences. *Oral Microbiol Immunol*. 1993 Apr;8(2):105-10.
- Guillot E, Mouton C. PCR DNA probe assays for identification and detection of *Prevotella intermedia sensu stricto* and *Prevotella nigrescens*. *J Clin Microbiol*. 1997 Jul;35(7):1876-82.
- Haas R, Dörtbudak O, Mensdorff-Pouilly N, Mailath G. Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser. *Clin Oral Implants Res*. 1997 Aug;8(4):249-54.
- Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol*. 2003 Apr;18(2):121-6.
- Hulsmann M, Bluhm V. Efficacy, cleaning ability and safety of different rotary NiTi instruments in root canal retreatment. *Int Endod.J*. 2004 Jul;37(7),468–76.

Jeon IS, Spangberg LS, Yoon TC, Kazemi RB, Kum KY. Smear layer production by 3 rotary reamers with different cutting blade designs in straight root canals: a scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Nov;96(5):601-7

Johnson EM, Flannagan SE, Sedgley CM. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. *J Endod.* 2006 Oct;32(10):946-50

Kairalla EC, Ribeiro MS, Rodrigues MFA, Lage-Marques JL. Estudo da redução microbiana intracanal utilizando lasers de alta e baixa potência (PDT). *Braz Oral Res.* 2006 Set;20 (Supl 1):159.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald JR. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965 Sep;20(1):340-9.

Kim HS, Song SK, Yoo SY, Jin DC, Shin HS, Lim CK, Kim MS, Kim JS, Choe SJ, Kook JK. Development of strain-specific PCR primers based on a DNA probe Fu12 for the identification of *Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum* ATCC 25586T. *J Microbiol.* 2005 Aug;43(4):331-6. Erratum in: *J Microbiol.* 2005;43(5):473.

Komerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Mar;47(3):932-40.

Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in Dentistry. *J Dent Res.* 2007 Aug; 86(8):694-707.

Kristiansen JE, Amaral L. The potential management of resistant infections with non-antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 1997 Sep;40:319-27.



Kübler A, Haase T, Rheinwald M, Barth T, Muhling J. Treatment of oral leukoplakia by topical application of 5-aminolevulinic acid. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1998 Dec; 27:466-9.

Lage-Marques JL, Antoniazzi JH. Versão eletrônica da técnica endodôntica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. *Ajna Interactive [CD-ROM].* 2002.

Lee MT, Bird PS, Walsh LJ. Photo-activated disinfection of the root canal: a new role for lasers in endodontics. *Aust Endod J.* 2004 Dec;30(3):93-8.

Leys EJ, Griffen AL, Strong SJ, Fuerst PA. Detection and Strain Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by Nested PCR. *J Clin Microbiol.* 1994 May;32(5):1288-94.

Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002 Mar;13(2):171-83.

Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quim Nova.* 2000 Mar-Abr;23(2):237-43.

Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B.* 2005 May;79:159-70.

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

Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res.* 1981 Dec;19(6):475-84.

Nair PNR, 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 Feb;99(2):231-52.

Ng R, Singh F, Papamanou DA, Song X, Patel C, Holewa C, et al. Endodontic photodynamic therapy ex vivo. *J Endod.* 2011 Feb;37:217-22.

Ng YL, Spratt D, Sriskantharajah S, Gulabivala K. Evaluation of protocols for field decontamination before bacterial sampling of root canals for contemporary microbiology techniques. *J Endod.* 2003 May;29(5):317-20.

Paiva JG, Antoniazzi JH. *Endodontia: bases para a prática clínica* 2a. ed. São Paulo: Artes Médicas; 1988.

Pearson GJ, Schuckert KH. The role of lasers in dentistry: present and future. *Dent Update.* 2003 Mar;30:70-6.

Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J.* 2001 Sep;34(6):429-34.

Qin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YQ, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J Periodontol Res.* 2008 Apr;43(2):162-7.

Riggio MP, Lennon A, Smith A. Detection of *Peptostreptococcus micros* DNA in clinical samples by PCR. *J Med Microbiol.* 2001 Mar;50:249-54.

Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004 May;30(5):315-20.

Rossi A, Silva LAB, Leonardo MR, Rocha LB, Rossi MA. Effect of rotatory 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 May;99(5):628-36.

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

Sassone LM, Fidel R, Fidel S, Vieira M, Hirata Jr R. The influence of organic load on the antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine *in vitro*. *Int Endod J.* 2003 Dec;36(12):848-52.

Sato T, Sato M, Matsuyama J, Hoshino E. PCR restriction fragment length polymorphism analysis of genes coding for 16S rRNA in *Veionella ssp.* *Int J Syst Bacteriol.* 1997 Oct;47:1268-70

Schafer E, Lohmann D. Efficiency of rotary nickel-titanium FlexMaster instruments compared with stainless steel hand K-Flexofile--Part 2. Cleaning effectiveness and instrumentation results in severely curved root canals of extracted teeth. *Int Endod J*. 2002 Jun;35(6):514-21.

Schafer E, Schlingemann R. Efficiency of rotary nickel-titanium K3 instruments compared with stainless steel hand K-Flexofile. Part 2. Cleaning effectiveness and shaping ability in severely curved root canals of extracted teeth. *Int Endod J*. 2003 Mar;36(3):208-17.

Shibli JA, Martins MC, Theodoro LH, Lotufo RF, Garcia VG, Marcantonio EJ. Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. *J Oral Sci*. 2003 Mar;45(1):17-23.

Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol*. 2005 Jul;76:1100-5.

Silva Garcez A, Nunez SC, Lage-Marques JL, Jorge AO, Ribeiro MS. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Oct;102(4):93-8.

Siqueira Jr. JF. Tratamento das infecções endodônticas. Rio de Janeiro: MEDSI;1997. Capítulo 3, p. 31-51.

Siqueira Jr. JF, Rôças IN, Santos SRLD, Lima KC, Magalhães FAC, Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod*. 2002 Mar;28(3):181-4.

Siqueira Jr JF, Rôças IN, Paiva SSM, Magalhães KM, Guimarães Pinto T. Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Aug;22:266-71.

Soukos NS, Chen OS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod*. 2006 Oct;32(10):979-84.

Souza EB, Amorim CVG, Lage-Marques JL. Avaliação de permeabilidade dentinária relacionada à dinâmica de substituição das substâncias químicas auxiliares do preparo dos canais radiculares. *RPG Rev Pos Grad*. 2005 Abr-Jun;12(2):195-8.

Souza EB, Amorim CVG, Lage-Marques JL. Avaliação da permeabilidade dentinária provocada por laser diodo em superfície externa de raiz [resumo. *Pesqui Odontol Bras*. 2003 Set;17 Supl:82.

Souza EB. Avaliação da desinfecção da dentina radicular em profundidade provocada pela irradiação do laser de diodo de alta potência [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

Souza EB, Amorim CVG, Lage-Marques JL. Effect of diode laser irradiation on the apical sealing of MTA retrofillings. *Braz Oral Res*. 2006 Jul-Set;20(3):231-4.

Souza EB, Simionato MRL, Cai S, Lage-Marques JL. Avaliação da desinfecção da dentina radicular em profundidade provocada pela irradiação do laser de diodo de alta potência. *RPG Rev Pos Grad*. 2007 Jan-Mar;14:75-80.

Souza EB, Cai S, Simionato MRL, Lage-Marques JL. High-power diode laser in the disinfection in depth of the root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Jul; 106(1):e68-72.

Souza EB, Simionato MRL, Ferrari PHP, Lage-Marques JL, Gavini G. Photodynamic therapy with methylene blue in root canals infected by *Enterococcus faecalis*: 14th Biennial Congress of the European Society of Endodontology; Sep 24-26 2009, Edinburgh, UK.

Souza EB, Lage-Marques JL. Terapia fotodinâmica no controle da infecção endodôntica. *In: A infecção endodôntica e sua resolução*. São Paulo: Santos, 2010. Capítulo 15, p. 289-97.

Souza LC, Brito PRR, Oliveira JCM, Alves FRF, Moreira E JL, Sampaio-Filho HR et al. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2010 Feb ;36(2):292-6.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod*. 2006 Feb;32(2):93-8.

Sundqvist GK, Eckerbom MI, Larsson AP, Sjogren UT. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infect Immun*. 1979 Aug;25(2):685-93

Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru-Filho M, Silva LA, Ito IY. Microbial distribution in the root canal system after periapical lesion induction using different methods. *Braz Dent J*. 2008 Feb;19(2):124-9.

Taşdemir T, Aydemir H, Inan U, Ünal O. Canal preparation with Hero 642 rotary Ni-Ti instruments compared with stainless steel hand K-file assessed using computed tomography. *Int Endod J*. 2005 Jun;38(6):402-8.

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

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

Vivacqua-Gomes N, Gurgel-Filho ED, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single- or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth *ex vivo*. *Int Endod J*. 2005 Oct;38(10):697-704.

Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother*. 1998 Jul;42:13-28

Wainwright M. The development of phenothiazinium photosensitisers. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2005 Nov;2:263-72.

Wilson M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci*. 2004 May;3:412-8.

Yamashita JC, Tanomaru-Filho M, Leonardo MR, Rossi MA, Silva LAB. Scanning electron microscopic study of the cleaning ability of chlorhexidine as root-canal irrigant. *Inter Endod J*. 2003 Jun;36(6):391-4.

Zamany A, Safavi K, Spangberg LSW. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Nov;96(5):578-81.

Zanin IC, Gonçalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Aug; 56:324-30.

Zanin IC, Lobo MM, Rodrigues LK, Pimenta LA, Hofling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci.* 2006 Feb; 114:64-9.

Zoletti GO, Siqueira Jr. JF, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. *J Endod.* 2006 Aug;32(8):722-6.

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa




Universidade de São Paulo  
Faculdade de Odontologia  
Comitê de Ética em Pesquisa

**PARECER DE APROVAÇÃO**  
**FR - 214726**  
**Protocolo 166/08**

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**Efeito da terapia fotodinâmica na desinfecção do sistema de canais radiculares**", de responsabilidade da Pesquisadora Eliana Barbosa de Souza, sob orientação do Professor Doutor João Humberto Antoniazzi.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 17 de fevereiro de 2009.

  
Prof. Dr. João Gualberto de Carqueira Luz  
Coordenador do CEP-FOUSP

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre Esclarecido

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título do estudo: EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA DESINFECÇÃO DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES**

**Pesquisador(es) responsável(is):** Eliana Barbosa de Souza/ Prof. Dr. João Humberto Antoniazzi

**Instituição/Departamento:** Faculdade de Odontologia da Universidade São Paulo – Departamento de Dentística

**Telefone para contato:** xxxxxx

**Local da coleta de dados:** Clínica Odontológica da FOU SP

O objetivo dessa pesquisa é verificar se a utilização de laser com substância química pode diminuir a infecção do canal do dente. Para isso os dentes que precisam de tratamento de canal e possuem infecção serão tratados. Após isso uma luz laser com uma substância química serão colocados dentro do canal para ajudar a matar as bactérias. Os dentes serão fechados e serão avaliados após 3 dias para se verificar se o uso do laser matou mais bactérias. Para testar a eficiência do laser as bactérias de dentro do canal serão analisadas antes do tratamento, durante os procedimentos e após os 3 dias. Feitos os testes os dentes terão seus canais terminados pelo pesquisador. O tratamento será feito com anestesia para conforto do paciente, mas no prazo de 3 dias (prazo de retorno do paciente) o dente pode ficar sensível ou com dor moderada e suportável por causa do tratamento de canal. Se houver dor forte durante qualquer período do tratamento, o dentista se compromete a atender o paciente em urgência para aliviar a dor do paciente. O paciente terá o benefício direto do tratamento de canal realizado com diminuição da infecção do dente, garantindo melhor saúde bucal.

As informações obtidas na pesquisa são sigilosas e apenas para esse estudo, e a identidade do paciente não será divulgada. O paciente tem o direito de saber informações durante o andamento da pesquisa que serão dadas pelo dentista. O paciente pode desistir em qualquer momento de participar da pesquisa sem prejuízos no tratamento que vinha recebendo. O paciente não terá qualquer despesa de tratamento de canal realizada, nem ajuda financeira para a realização da pesquisa. O dentista responsável, Eliana Barbosa de Souza poderá ser encontrada no telefone xxxxxx, ou na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo).

Após ler estas informações e de ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelo pesquisador concordo em participar de forma voluntária neste estudo.

Nome: \_\_\_\_\_

endereço: \_\_\_\_\_

tel. \_\_\_\_\_

RG \_\_\_\_\_ tel. \_\_\_\_\_

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente



## APÊNDICE A - Ficha e Anamnese

**Nome:** \_\_\_\_\_  
**Data de Nascimento:** \_\_\_\_\_ **Nacionalidade** \_\_\_\_\_ **UF** \_\_\_\_\_  
**Telefones: (res)** \_\_\_\_\_ **(trab)** \_\_\_\_\_ **(cel)** \_\_\_\_\_  
**Endereço:** \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ **Prontuário** \_\_\_\_\_  
**Profissão:** \_\_\_\_\_

**Responda às questões abaixo, marcando a resposta com um X:**

Está em tratamento médico? Qual? _____	( ) Sim	( ) Não	( ) Não sei
Já fez tratamento psiquiátrico?			
Está tomando alguma medicação no momento? Qual? _____	( ) Sim	( ) Não	( ) Não sei
Tem ou teve alguma doença infecciosa como hepatite, sífilis, AIDS. (Se sim, qual?) _____ _____	( ) Sim	( ) Não	( ) Não sei
Você é hemofílico?	( ) Sim	( ) Não	( ) Não sei
Já sofreu algum infarto? Quando? _____	( ) Sim	( ) Não	( ) Não sei
Sofre de alguma doença no coração? Qual? _____ _____	( ) Sim	( ) Não	( ) Não sei
Já teve tuberculose?	( ) Sim	( ) Não	( ) Não sei
Você é diabético?	( ) Sim	( ) Não	( ) Não sei
Já sofreu alguma intervenção cirúrgica? Qual? _____	( ) Sim	( ) Não	( ) Não sei
Tem algum tipo de alergia? Qual? _____ _____	( ) Sim	( ) Não	( ) Não sei
Você está grávida?	( ) Sim	( ) Não	( ) Não sei

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

DECLARO serem verdadeiras as respostas dadas, bem como compreender e concordar com as informações e proposta de tratamento determinada.

---

Assinatura do paciente ou responsável

## APÊNDICE B - RTF –Composição

Solução 1

0,6 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,6 %	dissolvido em 100 mL de água destilada
-------	---------------------------------	-------	--

Solução 2

2g	NaCl	1,2%	} dissolvidos em 100 mL de água destilada
2g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,2 %	
0,6 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6 %	
0,25 g	MgSO <sub>4</sub>	0,25%	
3,722 g	EDTA	0,1 M	dissolvidos em 100 mL de água destilada
8 g	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	8 %	dissolvidos em 100 mL de água destilada
1 g	di-tioeitol	1 %	dissolvidos em 100 mL de água destilada

## Meio RTF

75 mL	solução 1
75 mL	solução 2
10 mL	EDTA
5 mL	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
814 mL	água destilada

## APÊNDICE C - Agar Brucella Sangue Enriquecido com Hemina e Menadiona-Composição

Agar Brucella	45 g
Extrato de levedura	5 g
Água destilada	944 mL
Hemina	1 mL
Menadiona	200 µL
Sangue desfibrinado	50 mL