



Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDO CLÍNICO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA INTRACANAL DO
LASER EM BAIXA INTENSIDADE ASSOCIADO A UM
FOTOSENSIBILIZADOR**

PATRÍCIA ROSSINI PUGLIESI ROCHA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre Profissional em *Lasers* em Odontologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

Co-orientadora:

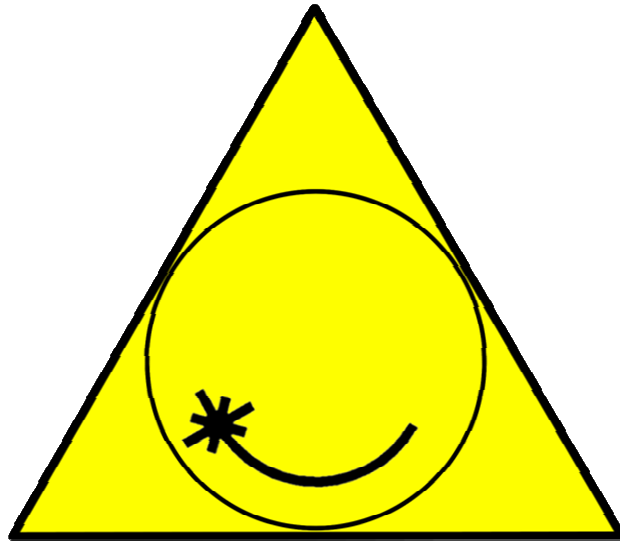
Profa. Dra. Sheila Gouw-Soares

São Paulo

2006



Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo



**MESTRADO PROFISSIONALIZANTE
LASER EM ODONTOLOGIA**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ESTUDO CLÍNICO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA INTRACANAL DO
LASER EM BAIXA INTENSIDADE ASSOCIADO A UM
FOTOSENSIBILIZADOR**

PATRÍCIA ROSSINI PUGLIESI ROCHA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre Profissional em *Lasers* em Odontologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

Co-orientadora:

Profa. Dra. Sheila Gouw-Soares

São Paulo

2006



Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo

Vida

*Quando se vê, já são seis horas!
Quando se vê, já é sexta-feira...
Quando se vê, já terminou o ano...
Quando se vê, passaram-se 50 anos!*

*Agora, é tarde demais para ser reprovado...
Se me fosse dado, um dia, outra oportunidade,
eu nem olhava o relógio.
Seguia sempre em frente e iria jogando, pelo
caminho, a casca dourada e inútil das horas...
Dessa forma eu digo:*

*Não deixe de fazer algo que gosta devido à falta
de tempo, a única falta que terá, será desse tempo
que infelizmente não voltará mais.*

Mário Quintana

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **José e Ercília**, pelo incentivo durante toda a vida, pela formação moral e principalmente pelo amor incondicional, que nortearam o meu caminho.*

*Ao meu irmão, **Luiz Fernando**, cujo nascimento trouxe uma maravilhosa mistura de sentimento de amor fraternal e maternal.*

*Ao meu marido, amigo e companheiro de todas as horas, **Dalton**, pelo constante apoio, dedicação, amor e paciência ao longo de nossas vidas.*

*Aos meus filhos, **Eduardo e Victoria**, por existirem em minha vida e por serem os responsáveis pela sensação de realização e plenitude que o meu amor por eles me traz.*

*A **DEUS**, pela minha existência e por ter me dado a oportunidade de fazer parte desta família.*

AGRADECIMENTO

À minha orientadora, **Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro**, pelos ensinamentos, paciência e respeito durante o transcorrer do nosso trabalho e principalmente pela amizade demonstrada traduzida em ânimo e estímulo constantes. Conhecê-la, ter o seu convívio e compartilhar de seus conhecimentos foi um privilégio.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Sheila Gouw-Soares**, pela co-orientação e contribuição à realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Silvana Cai**, pela riqueza de seus ensinamentos e companheirismo demonstrado durante a realização da parte experimental deste trabalho.

Aos **Professores** do Curso de Mestrado Profissionalizante em Laser em Odontologia, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao **Prof. Dr. José Eduardo Pelizon Pelino**, pela amizade demonstrada e pelo estímulo que seu alto grau de conhecimento gera em incentivo de quem deseja continuar estudando.

À **Dra. Andréa Trajano de Mello Ferreira**, amiga dos tempos de colégio, hoje parceira e companheira de consultório, quero registrar o meu agradecimento pelo permanente e fraternal apoio recebido ao longo do caminho. É uma honra tê-la como amiga!

Ao colega **Dr. Aguinaldo Garcez Segundo**, cujo auxílio foi indispensável à realização deste estudo.

Aos **Colegas** do curso, pelo agradável convívio, amizade e conhecimentos compartilhados.

Ao **Prof. Dr. Celso Kenji Nishiyama**, pela confiança e amizade sempre demonstrada, bem como pela abertura de novos horizontes na busca do conhecimento da Endodontia.

Ao **Prof. Dr. João Plácido Pinotti Collesi**, pela amizade e ajuda no período de trabalho no Departamento de Endodontia da Polícia Militar do Estado de São Paulo.

Aos meus sogros, **Marina e Auricélio**, um especial agradecimento cujo apoio e carinho permanentes serviram de alicerce de todos os momentos de minha vida.

Ao técnico **João**, do laboratório de Microbiologia, pelo auxílio técnico na fase laboratorial deste estudo.

A todas as funcionárias do consultório, **Alessandra, Himena, Eloísa e Mari**, pelo auxílio durante a fase clínica da realização deste trabalho.

Às secretárias **Elza e Andréa** (IPEN), **Cida** (LELO) e aos funcionários **Lili, Jô e Haroldo** (LELO), pela eficiência e atenção dispensados no transcorrer do curso.

**ESTUDO CLÍNICO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO LASER EM BAIXA INTENSIDADE
ASSOCIADO A UM FOTOSSENSIBILIZADOR**

PATRÍCIA ROSSINI PUGLIESI ROCHA

RESUMO

As lesões periapicais estão diretamente relacionadas à presença de microorganismos no interior do sistema de canais radiculares. Só com a eliminação do agente causal pode-se obter o processo de cura. A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*) tem se mostrada promissora na redução microbiana intracanal *in vitro*. O objetivo deste estudo foi verificar a eficiência da PDT *in vivo*. Foram selecionados 12 pacientes portadores de dentes unirradiculares com lesão periapical, que foram divididos em 3 grupos de 4 pacientes cada. O grupo 1 recebeu tratamento endodôntico convencional (técnica progressiva coroa-ápice + medicação intracanal de $\text{Ca}(\text{OH})_2$) tendo NaOCl 2,5% como solução irrigante e intervalo entre as sessões de 7 dias. O grupo 2 recebeu terapia endodôntica associada à PDT, sem o uso de medicação intracanal. O grupo 3 recebeu a mesma terapia empregada ao grupo 1 com associação da PDT. Foi utilizado um equipamento *laser* de GaAlAs de $\lambda = 670\text{nm}$, tendo como sistema de entrega de feixe, uma fibra óptica de $\varnothing = 365\mu\text{m}$. Os dentes foram irradiados em movimento helicoidal por 3 minutos correspondendo a uma energia total entregue de 1,8J. Como fotossensibilizador, foi utilizada uma pasta composta de peróxido de uréia (10%), *Tween* 80(15%), *Carbowax* (75%) e de solução de azuleno a 25%. Coletas microbiológicas foram obtidas nas duas sessões do tratamento. Os resultados mostraram que ao final da primeira sessão os três grupos apresentaram redução microbiana estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Além disso, a redução obtida com a PDT foi significativamente maior comparada ao PQC. Após 7 dias, o tratamento instituído ao grupo 1 apresentou melhores resultados que os do grupo 2. O grupo 3 foi o que apresentou maior redução microbiana, essa diferença foi estatisticamente significativa. Estes resultados sugerem que a PDT pode ser considerada um coadjuvante para redução microbiana intracanal.

**STUDY *IN VIVO* OF THE INTRACANAL MICROBIAL REDUCTION USING A LOW-POWER
LASER COMBINED WITH A PHOTSENSITIZER**

PATRICIA ROSSINI PUGLIESI ROCHA

ABSTRACT

Periapical lesions are directly related to the presence of microorganisms within the root canal system, and healing can only be achieved by their elimination. Photodynamic therapy (PDT) has been shown a promising approach on *in vitro* microbial reduction. The purpose of this study was verify the efficiency of PDT *in vivo*. Twelve patients were recruited with unirradicular teeth presenting periapical lesions, which were divided into 3 groups of 4 patients each. Group 1 received endodontic treatment (crown-down technique + Ca(OH)₂ as an intracanal medication) using NaOCl 2,5% as an irrigant solution. The interval between sessions was 7 days. Group 2 was treated by endodontic therapy associated to PDT without intracanal medication. Group 3 received the same therapy used in group 1 associated to PDT. It was used a GaAlAs laser ($\lambda = 670\text{nm}$) acoupled to an optical fiber ($\varnothing = 365\mu\text{m}$). The teeth were irradiated with helicoidal movements for 3 minutes corresponding to an total energy of 1,8J. Like a photosensitizer, it was used a paste composed by urea peroxide (10%), *Tween* 80 (15%), *Carbowax* (75%) and azulene solution 25%. Microbiological samples were obtained in the two visits. The results has shown that, at the end of the first visit, all groups had significantly microbial reduction. Besides, PDT has shown significantly reduction when compared to chemomechanical preparation. After 7 days, group 1 presented better results than group 2 and group 3 presented the highest level of microbial reduction, which was statistically significant from other groups ($p < 0.05$). These findings suggest that PDT could be considered an adjunctive to intracanal microbial reduction in Endodontics.

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	04
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	05
3.1. Infecções Endodônticas.....	05
3.2. Terapia Endodôntica.....	08
3.3. <i>Laser</i> na Endodontia.....	13
3.4. Terapia Fotodinâmica.....	14
4. METODOLOGIA.....	19
4.1. O Corante.....	19
4.2. O Equipamento <i>Laser</i>	20
4.3. Seleção do Paciente.....	20
4.4. Documentação Radiográfica.....	22
4.5. Preparo do Material Clínico.....	23
4.6. Coleta do Material.....	23
4.7. Seqüência de Procedimentos Clínicos.....	26
4.7.1. Grupo 1.....	26
4.7.2. Grupo 2.....	27
4.7.3. Grupo 3.....	28
4.8. Isolamento dos Microorganismos.....	29
4.9. Análise Estatística.....	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1. Microbiologia.....	32
5.1.1. Primeira sessão.....	32
5.1.2. Segunda sessão.....	37
5.2. Quanto ao Controle Clínico e Radiográfico.....	39

6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÕES.....	46
APÊNDICE.....	47
ANEXOS	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C. albicans *Candida albicans*.

Ca(OH)₂ hidróxido de cálcio

CO₂ dióxido de carbono (*laser de CO₂* com emissão em $\lambda=1,06\mu\text{m}$).

E energia.

E. faecalis *Enterococcus faecalis*.

Er,Cr:YSGG granada de ítrio, escândio e gálio dopada com érbio e cromo.

Er:YAG granada de ítrio e alumínio dopada com érbio (*laser* com emissão em $\lambda=2,94\ \mu\text{m}$).

GaAlAs arseneto de gálio e alumínio (*laser* de diodo com emissão em $\lambda=670\ \text{nm}$).

He-Ne hélio e neônio.

Ho:YAG granada de ítrio e alumínio dopada com hólmio.

Laser Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação).

LILT Low Intensity *Laser* Therapy (terapia com *laser* em baixa intensidade)

NaOCl hipoclorito de sódio.

Nd:YAG granada de ítrio e alumínio dopada com neodímio (*laser* com emissão em $\lambda=1064\text{nm}$).

P potência.

PDT Photodynamic Therapy (terapia fotodinâmica).

PQC preparo químico cirúrgico.

TPI	tempo de pré-irradiação.
ufc/mL	unidades formadoras de colônia por mililitro.
VMGA III	Viability Medium Goteborg Anaerobically (meio de transporte pré-reduzido para culturas de anaeóbios).
λ	comprimento de onda.
\emptyset	diâmetro.

1. INTRODUÇÃO

O conceito de que as lesões periapicais estão diretamente relacionadas à presença de microorganismos no interior do sistema de canais radiculares e esses microorganismos e seus produtos, ao atingirem a região apical, provocam reação inflamatória e posterior reabsorção óssea, já foi amplamente demonstrado.

Sabe-se também que, somente com a eliminação do agente causal presente no interior do sistema de canais radiculares, pode-se obter o processo de cura, que nada mais é do que a total regressão do processo e retorno do dente às suas características originais.

Diferentemente da cavidade oral, o sistema de canais é colonizado por um número restrito de microorganismos. Em função das condições ecológicas estabelecidas no interior da rede de canais radiculares, a presença de anaeróbios estritos e microaerofílicos torna-se predominante.

No entanto, bactérias facultativas mostram-se mais resistentes à terapia endodôntica, sendo considerados patógenos oportunistas. Dentre estes, podemos destacar o gênero *Enterococcus*, em especial a espécie *Enterococcus faecalis*, que é altamente resistente aos medicamentos utilizados na prática endodôntica. Podem-se também considerar as leveduras, principalmente do gênero *Candida*, que são habitantes naturais da cavidade oral, e quando identificados no interior dos canais, estão relacionadas aos casos de insucessos da terapia endodôntica (Tronstad *et al.* (1987); Tronstad *et al.* (1990).

A literatura também relata que microorganismos podem sobreviver, tanto na intimidade do sistema de canais como na superfície externa da raiz; mesmo valendo-se de substâncias químicas auxiliares e medicação intracanal durante a terapia endodôntica convencional, os dentes apresentam infecções resistentes, sendo necessária a reintervenção endodôntica.

Sundqvist *et al.* (1998) mostraram que, com a presença de lesão apical e dependendo do tamanho da lesão, o índice de sucesso do retratamento não passa de 74%.

O tratamento ou terapia *laser* em Odontologia tem sido amplamente difundido. As propriedades do *laser* que permitem o seu uso em endodontia incluem a capacidade em vaporizar o tecido pulpar ou os restos pulpares, alterar a permeabilidade da dentina e promover redução microbiana do canal radicular, além das propriedades antiinflamatórias e de biomodulação.

Estudos na literatura mostram que a redução microbiana pode ultrapassar 99% (Gutknecht *et al.* (1996b) e (2000)). Neste caso, utilizam-se *lasers* de alta potência (Er:YAG, Er,Cr:YSGG, Nd:YAG, Ho:YAG e diodo) que, por elevação da temperatura, provocam a morte do microorganismo através da desnaturação protéica. Os resultados são bastante animadores quanto ao uso dessa tecnologia, não como substitutiva à terapia endodôntica convencional, mas como coadjuvante (Gutknecht *et al.* (1996a), Moritz *et al.* (1997), Gouw-Soares *et al.* (2000)).

Lasers de baixa potência, entretanto, vêm sendo utilizados para redução microbiana em infecções locais sem o aumento de calor. Neste caso, os *lasers*, geralmente de emissão vermelha, são associados a fotossensibilizadores exógenos que, ao absorverem a luz, desencadeiam uma cascata de eventos fotoquímicos que levam à morte celular, principalmente por dano oxidativo.

As primeiras experiências com terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *PhotoDynamic Therapy*) datam de 100 anos atrás, relatadas por Raab e Von Tappeiner (Ackroyd *et al.* (2001)). Primeiramente eles perceberam alteração da reação dos paramécios (protozoário causador da malária), durante uma tempestade com raios, frente à acridina, o que os levou a postular que este efeito era causado pela transferência da energia da luz para a substância química. Posteriormente, o doutor Von Tappeiner e o dermatologista Josionek utilizaram uma combinação de eosina, aplicada topicamente com exposição à luz branca, para tratamento de tumores de pele. Em 1907, Von Tappeiner, usou o termo

"ação fotodinâmica" para descrever o fenômeno.

Na terapia fotodinâmica, o agente fotossensibilizador, o qual deve ser ressonante com o comprimento de onda da luz a ser utilizada, absorve a energia luminosa e é levado a um estado excitado, produzindo espécies de oxigênio altamente reativas, resultando em injúria e morte celular. Como a dose da radiação é facilmente calculada, a área a ser tratada pode ser bem delimitada e a radiação pode ser transmitida por fibras ópticas, que podem receber adaptação para atingir o alvo (Ackroyd *et al.* (2001)), esta terapia tem ganhado lugar nas áreas da saúde.

Alguns estudos têm demonstrado que diversas espécies de bactérias que habitam a cavidade oral podem ser mortas por um laser em baixa intensidade na presença de um agente fotossensibilizador (Wilson *et al.* (1992) e (1993), Bystrom e Sundqvist (1983), Komerik e MacRobert (2006)). Como já foi demonstrada *in vitro*, a terapia fotodinâmica, utilizando um *laser* com comprimento de onda de 685nm, associado ao corante azuleno, propiciou redução microbiana no interior dos canais significativamente mais alta que no grupo tratado pela técnica convencional associada ao hipoclorito de sódio 0.5% (Garcez (2002), Kairalla (2006), Williams *et al.* (2006)).

Face ao exposto, o objetivo deste trabalho é avaliar clinicamente a capacidade antimicrobiana da terapia fotodinâmica como coadjuvante à terapia endodôntica convencional.

2. OBJETIVOS

- Investigar a redução microbiana do sistema de canais radiculares utilizando a terapia fotodinâmica associada ao preparo químico-cirúrgico, através de análise microbiológica;
- Investigar a recolonização microbiana após uma semana utilizando medicação intracanal associada, ou não, à terapia fotodinâmica, através de análise microbiológica.
- Acompanhar, através de controle clínico e radiográfico, o processo de reparação das lesões.
- Verificar a utilidade da PDR na terapia endodôntica.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Infecções Endodônticas

Em 1890, surgiu um novo conceito na endodontia, o da infecção, pois foi nesse ano que Miller evidenciou a presença de bactérias no canal radicular, e sua importância na etiologia das doenças pulpares e periapicais (Leonardo e Leal (1991)).

Kakehashi *et al.* (1965) concluíram que a presença de microorganismos é fundamental para o aparecimento da lesão apical. Também, Sundqvist (1976) verificou, através de estudo microbiológico em 32 dentes humanos, ausência de microorganismos nos dentes sem lesão periapical, ao contrário do que ocorria com os dentes que apresentavam imagem radiolúcida periapical.

Moller *et al.* (1981), avaliaram a relação entre polpa necrótica não infectada e tecido periapical, observando que os canais não infectados não desenvolveram alteração periapical ao contrário do que aconteceu com os canais infectados, nos quais observou-se desenvolvimento de reações inflamatórias clínicas e radiográficas.

Diferentemente da cavidade oral, as bactérias presentes no interior do sistema de canais radiculares são em número restrito. A maioria das espécies isoladas também pode ser encontrada na microbiota periodontal (Kipioti *et al.* (1984), Kerekes e Olsen (1990)).

Nair *et al.* (1990) observaram em biópsias de lesões refratárias removidas cirurgicamente de dentes que apresentavam falha no tratamento endodôntico, a presença de bactérias e fungos. Os autores concluíram que microorganismos podem resistir após o tratamento endodôntico e serem os responsáveis pela manutenção do processo inflamatório periapical e conseqüente falha do tratamento.

Sundqvist (1992), analisou 65 indivíduos que apresentavam infecção endodôntica, e observou que, devido à baixa tensão de oxigênio nos canais necróticos e a viabilidade de nutrientes, existe um relacionamento de comensalismo e antagonismo entre as bactérias, fato que acaba selecionando e determinando a ecologia do sistema de canais radiculares.

Em estudo para determinar as características das infecções endodônticas, Haapasalo (1993) afirmou que as infecções em canais radiculares são polimicrobianas com predominância de anaeróbios e o número de espécies varia de 4 a 7.

Le Goff *et al.* (1997) avaliaram a microbiota presente em dentes unirradiculares hígidos que apresentavam lesões periapicais. O número de espécies isoladas variou de 2 a 8, com predominância de 81% para anaeróbios estritos. Nesse estudo, a ação de amoxicilina associada ao ácido clavulânico foi efetiva no combate a esses microorganismos.

A presença do gênero *Candida*, em especial a espécie *Candida albicans*, relacionada a dentes refratários ao tratamento endodôntico convencional, foi relatada no trabalho de Waltimo *et al.* (1997).

Um ano depois, Sundqvist *et al.* (1998) analisaram a microbiota encontrada em 54 dentes indicados para retratamento endodôntico que apresentavam lesão periapical persistente. A flora bacteriana encontrada era constituída predominantemente por bactérias Gram positiva, principalmente as do gênero *E. faecalis*. Os autores concluíram também que a infecção durante a obturação do canal e o tamanho da lesão são fatores negativos para o prognóstico do caso.

A associação de bacilos pigmentados de preto nas infecções endodônticas foi avaliada por Baumgartner *et al.* (1999). Os autores coletaram amostras do interior de 40 canais de dentes íntegros portadores de polpa necrótica e lesão periapical. Em 55% das avaliações houve resposta positiva ao crescimento de bacilos pigmentados de preto.

A hipótese que em infecções endodônticas a presença de microorganismos restringe-se ao sistema endodôntico e os tecidos periapicais se mantêm livres dos mesmos, foi sustentada por muito tempo. Atualmente, no entanto, estudos têm demonstrado que a invasão bacteriana no sistema endodôntico pode superar os limites do canal radicular, atingindo a intimidade dentinária bem como outras estruturas relacionadas, mantendo o processo de infecção (Tronstad *et al.* (1987).

A presença de bactérias no cimento apical em dentes com lesões apicais refratárias ao tratamento endodôntico foi avaliada por Kiryu *et al.* (1994). Os autores observaram a presença de 8 espécies bacterianas, das quais 4 eram anaeróbias estritas. Concluíram também que as bactérias invadindo o cimento apical desempenham um papel importante na cronicidade da patologia periapical.

A relação entre lesão periapical e a presença de microorganismo extraradicular foi observada por Bonifácio *et al.* (2000). Nesse estudo, todos os dentes com necrose pulpar e lesão periapical, quando examinados por microscopia eletrônica de varredura, apresentaram microorganismos e biofilme na superfície externa apical, o que não ocorreu nos dentes portadores de necrose, sem lesão apical.

Diversas pesquisas têm sido realizadas buscando identificar a microbiota presente no sistema de canais radiculares, principalmente nos casos indicados para retratamento.

Estudando vinte e cinco dentes de pacientes lituanos com canais radiculares previamente tratados e que apresentavam lesão apical, Peciulienė *et al.* (2000) identificaram *E. faecalis* em maior frequência, em 20 dos 25 dentes. Os autores salientam que as condições ecológicas presentes em canais não completamente obturados são favoráveis ao desenvolvimento desse microorganismo.

Em estudo microbiológico de 25 dentes portadores de infecção endodôntica, Ferrari (2001), detectou espécies de enterococos, enterobactérias e

leveduras nas diversas etapas da terapia endodôntica e concluiu que os *Enterococcus* foram os mais resistentes à terapia instituída.

Em estudo feito em 30 dentes portadores de tratamento endodôntico realizado há mais de 4 anos que apresentavam lesão periapical, Pinheiro *et al.* (2003) isolaram 55 espécies bacterianas, sendo 80% Gram-positivas e 58% anaeróbios facultativos. Como a espécie mais isolada foi *E. faecalis*, os autores concluíram que, nos casos de insucesso endodôntico com presença de lesão periapical, a microbiota intracanal é predominantemente Gram-positiva, representada principalmente por esta espécie.

3.2. Terapia Endodôntica

Já é sabido que é preciso eliminar a causa, para que se possa alcançar o efeito de cura do elemento dental e, portanto, retorno às suas funções. A causa da manutenção da periodontite apical é a presença de microorganismos, onde se conclui que, somente com a sua total eliminação pode-se obter sucesso no tratamento endodôntico.

Diferentes técnicas de preparo químico-cirúrgico (PQC) têm sido desenvolvidas valendo-se de diversos tipos de instrumentos endodônticos no que se refere à forma, modelo e composição. Dentre essas técnicas as que mais tem se destacado são as que utilizam o alargamento progressivo no sentido coroa-ápice, tanto manuais quanto rotatórias (Leonardo e Leal (1991), Roane (1998), Ali *et al.* (2005), Riitano (2005), Teodorovic e Martinovic (2005), Peters e Wesselink (2005), De Rossi *et al.* (2005)).

Existem várias técnicas de tratamento endodôntico que preconizam uso de diferentes substâncias químicas de ação bactericida como solução irrigante em diferentes concentrações. Muitos pesquisadores têm relacionado a ação antimicrobiana de preparo do canal a estas substâncias químicas empregadas.

Bystrom e Sundqvist (1983) avaliaram a capacidade de redução

bacteriana do NaOCl a 0,5% através de análise microbiológica de amostras colhidas durante o tratamento de dois grupos de 15 dentes unirradiculares, um instrumentado com solução salina e outro com NaOCl 0,5%, onde nenhuma medicação intracanal foi utilizada. Na primeira coleta todos os dentes apresentaram culturas positivas (80 % de anaeróbios) e para o grupo do NaOCl, 11 dentes apresentaram cultura negativa após o preparo químico-cirúrgico (PQC), mostrando uma efetiva redução da microbiota desses canais.

Sydney e Estrela (1996) analisaram a prevalência de bactérias anaeróbias em canais radiculares infectados após o preparo do canal radicular, variando a substância química empregada. Verificaram que no grupo onde empregou-se a solução salina como agente irrigante, bactérias anaeróbias estavam presentes em todos os dentes. Quando a solução de NaOCl a 1% foi empregada, a redução foi mais significativa, mas não efetiva. Concluíram os autores que após a instrumentação de dentes infectados, as bactérias que prevalecem são as anaeróbias Gram positivas.

D'Arcangelo *et al.* (1999) avaliaram o efeito antimicrobiano de algumas concentrações de NaOCl e clorexidina frente a diferentes cepas bacterianas. Os autores utilizaram culturas puras de microorganismos facultativos (aeróbios-anaeróbios), microaerofílicos e anaeróbios estritos. Cada irrigante foi mantido em contato por 10, 20 e 30 minutos nas placas de inoculação. Os resultados mostraram que todos os irrigantes apresentaram efeito bactericida em ambas as concentrações e nos diversos períodos de tempo.

Ayhan *et al.* (1999), em estudo *in vitro*, verificaram o efeito antimicrobiano de diferentes soluções irrigantes. Os autores utilizaram NaOCl 5,25% (soda clorada), NaOCl 0,5%(líquido de Dakin), digluconato de clorexidina 0,2%, álcool 21%, solução salina e uma solução de paramonoclorofenol (30%), timo (5%) e dexametazona (0,1%). Foram utilizadas culturas de *Streptococcus piogenes*, *C. Albicans*, *Strptococcus salivarius*, *Stafilococcus aureus*, *Escherichia coli* e *E.faecalis*. O NaOCl se mostrou efetivo contra todos os microorganismos testados, sendo que a concentração de 5,25% foi a mais efetiva. De acordo com os autores, diminuindo-se a concentração diminuiu-se o efeito antimicrobiano. A

solução de paramonoclorofenol, timol e dexametazona apresentou a maior zona de inibição quando comparada às outras. O álcool apresentou uma pequena zona de inibição, a mesma apresentada pelo digluconato de clorexidina e a solução salina se mostrou ineficiente.

Leonardo *et al.* (1999) testaram, *in vivo*, como solução irrigante, o gluconato de clorexidina a 2% em canais radiculares de pacientes que apresentavam polpa necrosada e lesão periapical. Foram coletadas amostras microbiológicas antes do início do tratamento, e os dentes foram fechados com curativo de óxido de zinco e eugenol por 48 horas, quando novas amostras foram coletadas. Os autores verificaram que houve redução de *Streptococcus mutans* em 100% das amostras e redução de 77% de bactérias anaeróbias, sugerindo que a solução de gluconato de clorexidina a 2% pode ser utilizada para prevenir atividade bacteriana residual.

O efeito antimicrobiano das soluções de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% e digluconato de clorexidina 2% foram testadas por Estrela *et al.* (2003). Cinco microorganismos foram testados a saber: *S. aureus*, *E. faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *C. albicans* e uma mistura de todos foi também testada. Amostras microbiológicas foram testadas de diferentes maneiras e tempos de exposição às soluções testadas. Os resultados mostraram que a magnitude do efeito antimicrobiano pode ser influenciada pelo método experimental, pelo indicador biológico e pelo tempo de exposição.

Vianna *et al.* (2004) realizam estudo para comparar a atividade antimicrobiana da solução de gluconato de clorexidina (concentrações de 0,2%, 1% e 2%) com a solução de NaOCl (concentrações de 0,5%, 1%, 2,5%, 4% e 5,25%). A ação antimicrobiana foi relacionada ao tipo, concentração e forma de apresentação dos irrigantes, bem como à susceptibilidade microbiana.

Berber *et al.* (2006) testaram a eficácia de várias concentrações de NaOCl (0,5%, 2,5% e 5,25%) e diversas técnicas de preparo químico-cirúrgico na eliminação de *E. faecalis* do interior dos canais radiculares e dos túbulos dentinários. Para todas as técnicas de preparo químico-cirúrgico utilizadas, o

NaOCl 5.25% mostrou maior eficiência na redução do *E. faecalis* seguido pelo NaOCl 2.5%. Os autores concluíram que, especialmente em concentrações mais elevadas, o NaOCl foi capaz de desinfetar os túbulos dentinários independentemente da técnica de preparo químico-cirúrgico utilizada.

De acordo com Tronstad (1991), a ação antimicrobiana na terapia endodôntica não se restringe apenas às substâncias químicas auxiliares. A ação destas substâncias varia e sua ação é rapidamente inativada quando em contato com fluidos teciduais, propiciando o desenvolvimento de microorganismos que não foram removidos durante a técnica endodôntica, que voltam a reinfetar, após um curto espaço de tempo, o sistema de canais radiculares.

Posto que uma criteriosa técnica empregada no preparo químico e cirúrgico do canal radicular diminui consideravelmente o número de microorganismos na primeira sessão, mas não os elimina totalmente, faz-se necessário o uso da medicação intracanal, que atua de maneira coadjuvante na eliminação da microbiota do sistema de canais.

Vários autores têm se dedicado ao longo dos anos ao estudo do efeito antimicrobiano de diferentes substâncias usadas como medicação intracanal, dentre elas destaca-se o hidróxido de cálcio sob diferentes formas de utilização.

Matsumia e Kitamura (1950), valendo-se de estudo histopatológico e histobacteriológico em dentes de cães, verificaram que o hidróxido de cálcio, como medicação intracanal, acelera a reparação natural das lesões periapicais, em função do desaparecimento progressivo de bactérias no interior do canal, a despeito da infecção existente no momento de sua aplicação.

Tronstad *et al.* (1980) afirmaram que em virtude do alto pH (12,5), o hidróxido de cálcio inserido no canal radicular elimina as bactérias e age nos sítios de reabsorção, favorecendo a inibição de enzimas degenerativas.

Haapasalo e Orstavik (1987) testaram a ação antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio (calasept) e paramonoclorofenol canforado frente a *E.*

faecalis e verificaram resistência às medicações da bactéria testada, principalmente o hidróxido de cálcio, mesmo após 10 dias de utilização.

Para observar a influência do PQC e da ação da medicação intracanal de hidróxido de cálcio na eliminação de bactérias do interior de canais radiculares, Yared e Dagher (1994) realizaram estudo com 60 dentes humanos. Foram obtidas amostras microbiológicas após abertura do dente, após PQC e após 7 dias, posteriormente à remoção da medicação intracanal. Os resultados mostraram uma grande redução no número médio de bactérias, estatisticamente significativa entre as amostras, e na última coleta, houve grande redução no crescimento microbiano.

A preocupação com a resistência às terapias endodônticas rotineiras por alguns microorganismos, levou Waltimo *et al.* (1999) a avaliar a susceptibilidade da espécie *C. albicans* a soluções aquosas de hidróxido de cálcio *in vitro*. Os autores observaram a resistência da *Candida* frente à medicação, o que pode explicar o isolamento de leveduras em casos de periodontite apical persistente.

Haapasalo *et al.* (2000) verificaram que o efeito do hidróxido de cálcio foi totalmente abolido na presença de dentina. O efeito de clorexidina e hipoclorito de sódio foram reduzidos, mas não totalmente eliminados na presença de dentina. O iodeto de potássio, em baixa concentração, também perdeu capacidade de ação antimicrobiana frente à dentina.

Valera *et al.* (2001) reforçaram a idéia de que o tratamento endodôntico deve ser efetuado em duas sessões e o uso de medicação intracanal é de extrema importância para eliminação de microorganismos no interior do canal radicular.

Ferrari (2001) em estudo para detecção de microorganismos nas diferentes fases da terapia endodôntica, verificou que o preparo químico cirúrgico por si só não foi suficiente para o controle de infecção presente nos canais radiculares e quando associado à medicação intracanal, foi capaz de eliminar em

100% algumas espécies de microorganismos, mas apenas reduziram em 70% outras espécies, como foi o caso dos *Enterococcus*.

Diante do exposto, fica claro que o clínico não só pode, como deve lançar mão de outras técnicas coadjuvantes à terapia endodôntica convencional, no intuito de obter controle microbiano para obtenção da cura e conseqüente restabelecimento da função do elemento dental.

3.3. Laser na Endodontia

Nos últimos anos, diversos sistemas *laser* têm sido estudados para uso em endodontia.

Dez anos depois do *laser* de rubi, surgiu o *laser* de Nd:YAG e foi no final dos anos 70 que se iniciaram as pesquisas voltadas para a área de endodontia, com Adrian (1977), avaliando os efeitos do *laser* de Nd:YAG em polpas de macacos. Porém, somente após o desenvolvimento das fibras ópticas como sistema de entrega de feixe, é que as pesquisas no campo da endodontia deslançaram.

Atualmente já existem trabalhos científicos suficientes para afirmar que os sistemas *laser* como Nd:YAG, Er:YAG, Ho:YAG, CO₂, diodo e os de baixa intensidade, podem ser considerados ferramentas importantes como coadjuvantes à terapia endodôntica (Gutknecht *et al.* (1996a), Tanji *et al.* (1999), Gouw-Soares *et al.* (2000), Camargo (2002)).

Os *lasers* em alta intensidade têm como efeito primário alterações de temperatura, cujos efeitos térmicos são capazes de eliminar microorganismos de sítios profundos da dentina. Na endodontia, é de primordial importância o controle rigoroso dessas alterações térmicas, uma vez que já foi demonstrado por Eriksson e Albrektsson (1983) que injúrias no periodonto de sustentação como, necrose óssea, anquilose e reabsorção externa da raiz, podem ocorrer se as temperaturas na superfície externa da raiz subirem mais de 10°C durante 1 minuto.

A terapia *laser* em baixa intensidade (LILT, do inglês, *Low intensity Laser Therapy*), desde que descrita por Mester *et al.* (1971), tem sido referida como excelente no campo de cicatrização de feridas. Ela tem sido considerada como uma terapia não invasiva, indolor e atérmica, que tem a propriedade de restabelecer a função baseada nos efeitos analgésicos, antiinflamatórios e de bioestimulação.

Outra forma de utilização da LILT é a terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*), onde um agente fotossensibilizador exógeno, o qual deve ser ressonante com o comprimento de onda (λ) do feixe laser utilizado, ao absorver a energia luminosa, desencadeia uma cascata de eventos fotoquímicos que levam à morte celular, principalmente por dano oxidativo, resultando na morte microbiana.

3.4. Terapia Fotodinâmica

Uma das vantagens do emprego da terapia fotodinâmica em relação ao uso dos agentes microbianos tradicionais, segundo Malik *et al.* (1990), é a obtenção de morte celular bacteriana em um período de tempo menor, não sendo necessária a manutenção do fotossensibilizador em altas concentrações na área alvo por longos períodos de tempo, o que não ocorre quando se faz uso de antissépticos e antibióticos.

Okamoto *et al.* (1992) investigaram o efeito antimicrobiano do *laser* de He-Ne associado a diversos corantes sobre microorganismos cariogênicos, e verificaram que o laser tinha efeito letal sobre os microorganismos quando corantes específicos eram utilizados.

Avaliando a sensibilidade à radiação laser em baixa intensidade das bactérias encontradas na cavidade oral, Wilson *et al.* (1992) concluíram que a maior parte delas não são capazes de absorver a luz visível sendo, portanto, necessária a utilização de um agente de absorção óptica não tóxico que se fixe à parede bacteriana atraindo para si a luz no momento da irradiação levando a fotossensibilização letal. Também em 1992, foi verificada a eficácia da PDT em

eliminar bactérias periodontopatogênicas da placa bacteriana (Dobson e Wilson (1992)), utilizando laser de He-Ne e fotossensibilizadores. Nos últimos anos, diversos estudos têm sido realizados no intuito de demonstrar a ação da PDT na redução microbiana em diversas situações na cavidade oral.

Em estudo utilizando um *laser* de He-Ne em associação com três corantes, Wilson *et al.* (1993) levantaram a hipótese da PDT ser uma terapia alternativa ao uso de antibióticos nos tratamentos de periodontites crônicas.

Wilson *et al.* (1995) relataram que na PDT, a morte celular mediada pelos radicais livres, em curtos espaços de tempo, reduz a possibilidade do aparecimento de bactérias resistentes.

Walsh (1997) em revisão de literatura sobre as aplicações do *laser* em baixa intensidade em tecidos dentários duros, salientou a vantagem do uso dessa terapia em relação à que utiliza os *lasers* em alta intensidade em razão da não ocorrência de danos térmicos aos tecidos adjacentes, uma vez que não existem fenômenos térmicos quando da utilização dessa terapia. O autor ressalta o fato de que, se for instituída a PDT, a destruição bacteriana ocorrerá com pequeno ou nenhum risco de dano à polpa ou ao ligamento periodontal devido a baixa energia envolvida.

O autor chamou a atenção para a especificidade da interação que ocorre na PDT, pois quando se realiza o procedimento somente com o *laser* ou somente com o corante, o efeito produzido é mínimo. Relatou que corantes azuis são conhecidos como potentes sensibilizadores para uma determinada faixa de bactérias quando irradiados por *lasers* que emitem no espectro do vermelho visível.

Wainwright (1998) realizou uma revisão de literatura onde alerta para o fato de ser importante o tempo de exposição prévia do tecido alvo ao corante antes da exposição à radiação luminosa (tempo de pré-irradiação) quando se utilizam os corantes azul de metileno e azul de toluidina.

Silbert *et al.* (2000) avaliaram, *in vitro*, o potencial de redução bacteriana da PDT em canais radiculares. As raízes foram divididas em dois grupos, um foi contaminado com *S. mutans* e o outro com *E. faecalis*. Com o uso de um *laser* de diodo ($\lambda = 670\text{nm}$ e $P = 3,5\text{W}$) e do corante azul de metileno, as raízes foram irradiadas por períodos de tempo que variaram de 30s a 240s. Os resultados mostraram que o corante sozinho conseguiu redução bacteriana da ordem de 20%, somente a irradiação *laser* não alterou a população bacteriana, já a associação *laser* e corante (PDT), foi capaz de eliminar 100% das bactérias do grupo contaminado com *S. mutans* e 40% das do grupo contaminado com *E. faecalis*. Os autores concluíram que a PDT é um efetivo método de redução microbiana e que os parâmetros devem ser ajustados para que se possa alcançar maior eliminação de *E. faecalis*.

Seal *et al.* (2002) compararam o efeito bactericida no interior do canal radicular da fotossensibilização letal em biofilme de *Streptococcus intermedius*, com o hipoclorito de sódio a 3%. Os autores utilizaram várias concentrações de corante e irradiações em diversas doses e concluíram que a PDT teve efeito bactericida, mas não alcançou o mesmo efeito bactericida que o hipoclorito a 3%. É importante ressaltar que o sistema de entrega do feixe não foi através de fibra óptica e, portanto, a radiação *laser* não pôde atingir todas as paredes dos canais.

De acordo com Ribeiro e Zezell (2004), as técnicas que envolvem a terapia fotodinâmica têm um grande potencial a ser explorado, por serem de baixo custo para o tratamento de doenças e infecções locais e também por provocarem o mínimo de alterações nos tecidos circunvizinhos.

Recentemente, Meisel e Kocher (2005) publicaram uma revisão da literatura sobre a terapia fotodinâmica, onde eles concluíram que, mesmo embora a PDT ainda se encontre em estágios experimentais de desenvolvimento e teste, ela pode ser um método coadjuvante à terapia antimicrobiana convencional em periodontia. Os autores ressaltam a necessidade de estudos clínicos serem realizados para confirmar a eficácia do método.

Em estudo *in vivo*, Hayek *et al.* (2005) induziu periimplantite em cães e

depois tratou um grupo de maneira convencional (retalho cirúrgico e curetagem) e outro com PDT e curetagem (sem retalho cirúrgico). Os resultados mostraram significativa redução microbiana em ambos os grupos, sugerindo que a PDT pode ser considerada uma terapia não invasiva de redução microbiana em periimplantites.

Komerik e Macrobert (2006) salientam que a PDT tem potencial para se estabelecer como uma excelente alternativa no combate às infecções da cavidade bucal, mas alertam para o fato que, além da eliminação de microorganismos patogênicos, ocorre também a eliminação da flora microbiana nativa. Isto seria um problema, já que pode ocorrer o desenvolvimento de microorganismos oportunistas. Os autores lançam a hipótese deste problema ser solucionado com o uso de anticorpos específicos para os microorganismos alvo ligados às moléculas do corante e para isso pesquisas científicas devem ser desenvolvidas.

A ação bactericida da PDT foi testada por Williams *et al.* (2006) em estudo *in vitro*, onde quatro espécies bacterianas (*Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia* e *Streptococcus intermedius*) foram utilizadas em suspensão. O fotossensibilizador utilizado foi o azul de Toluidina. Amostras microbiológicas foram coletadas antes e após as irradiações. Os resultados mostraram que, em suspensão, as reduções bacterianas foram significativamente melhores no grupo onde foi feita a PDT do que nos grupos onde foram utilizados o fotossensibilizador e a luz separadamente. Observou-se também que, a ação bactericida foi aumentada pelo aumento da dose, embora nem sempre estes resultados tenham mostrado diferença estatística, mas não pela concentração do fotossensibilizador.

Garcez *et al.* (2006), estudando a redução microbiana intracanal com a utilização de um *laser* de diodo de baixa potência ($\lambda = 685$ nm) e tendo como agente fotossensibilizador uma associação do corante azuleno a 25% a uma pasta, *in vitro*, concluíram que, com os parâmetros utilizados, a PDT se mostrou como um efetivo método na redução microbiana intracanal frente ao *E. faecalis* quando comparada ao NaOCl a 0,5%.

Em dissertação de mestrado, Kairalla (2006), comparou, através de estudo *in vitro*, o efeito da PDT e do *laser* de alta potência na redução microbiana intracanal frente a bactéria *E. faecalis* e concluiu que nos protocolos empregados, as duas técnicas foram efetivas quanto à redução microbiana, não havendo diferença estatisticamente significativa entre elas. A autora cita que tanto a PDT quanto a terapia com *laser* de alta potência podem ser consideradas como coadjuvantes à terapia endodôntica em casos de lesão periapical.

Portanto, a PDT pode ser um excelente coadjuvante na sanificação do sistema de canais radiculares e de fácil utilização na prática clínica, desde que usada com uma fonte de luz que coincida com o espectro de absorção do fotossensibilizador utilizado.

4. METODOLOGIA

4.1. O Corante

Baseado no trabalho de Garcez (2002), neste estudo clínico foi utilizado o corante azuleno. O azuleno é extraído do óleo essencial da camomila (Camazuleno) e por apresentar uma atividade antiinflamatória notável, é muito utilizado pela moderna indústria cosmética. O azuleno é formado por anéis aromáticos heterocíclicos (fórmula química 7 - etil - 1,4 dimetilazuleno), sendo que sua estrutura química lhe confere a propriedade de absorção próxima ao comprimento de onda do *laser* utilizado neste estudo ($\lambda = 670\text{nm}$).

Devido a alta concentração da solução utilizada neste estudo, solução aquosa de azuleno a 25%¹, seu uso intracanal provoca manchamento da dentina, sendo difícil sua remoção após os 5 minutos de tempo de pré-irradiação. Desse modo, foi utilizado azuleno associado à substância química Endo-PTC², uma pasta composta, segundo Paiva e Antoniazzi (1988), de: peróxido de uréia (10%), *Tween* 80 (15%) e *Carbowax* (75%). O Endo-PTC é uma associação de fármacos utilizada em endodontia como auxiliar ao preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares. A associação do azuleno a 25% ao creme de Endo-PTC é facilmente removida do canal por irrigação com solução salina (remoção mecânica) ou por hipoclorito de sódio, favorecendo a liberação de oxigênio (remoção químico-mecânica por efervescência). Conforme verificado por espectroscopia, o creme de Endo-PTC não possui banda de absorção no comprimento de onda do *laser* utilizado neste estudo (Garcez (2002)).

Foram utilizados 400 μL de solução aquosa de azuleno a 25% para cada grama de creme Endo-PTC (Figura 1).

¹ Fórmula e Ação Farmácia Magistral Ltda.

² Fórmula e Ação Farmácia Magistral Ltda.

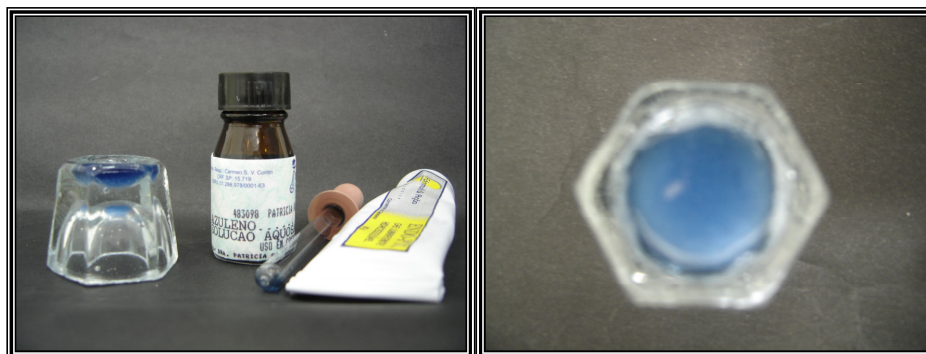


Figura 1: Componentes do corante e corante pronto para uso.

4.2. O Equipamento *Laser*

Foi utilizado um equipamento *laser* de GaAlAs^3 , com comprimento de onda de 670nm (vermelho visível), potência de 50mW e sistema de entrega de feixe por meio fibra óptica de diâmetro de 365 μm acoplada à ponta da peça de mão do equipamento.

A potência do equipamento com o uso do sistema de fibra óptica foi reduzida na saída da ponta da fibra, tendo sido aferida em 10mW por um detector *Laser Check*⁴, devidamente calibrado.

4.3. Seleção do Paciente

Foram selecionados 12 pacientes, sendo 4 em cada grupo.

Os pacientes foram triados obedecendo alguns critérios de inclusão:

- Pacientes adultos, de ambos os sexos, portadores de dentes unirradiculares com diagnóstico clínico e radiográfico de necrose pulpar em fase crônica (Figura 2);
- Idade entre 20 e 45 anos;

³ Kroman, São Paulo – Brasil.

⁴ Coherent, EUA.

- Presença de lesão periapical;
- Sem tratamento endodôntico prévio;
- Ausência de qualquer indício de fratura radicular.

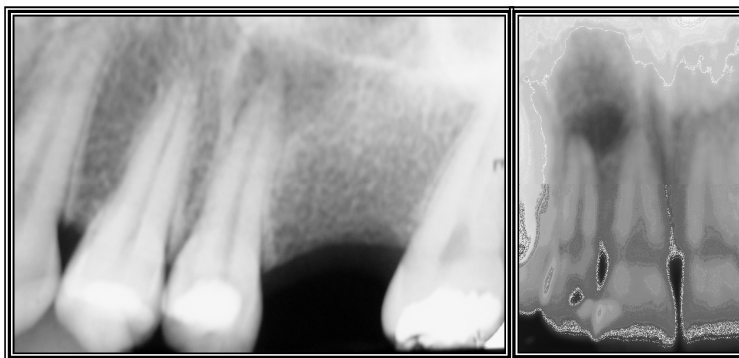


Figura 2: Radiografias representativas dos casos clínicos selecionados para o estudo.

Todos os pacientes selecionados foram informados sobre a terapia à qual seriam submetidos e assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (APÊNDICE A), para participarem da pesquisa.

Os pacientes foram divididos em três grupos: Grupo 1, que recebeu tratamento endodôntico convencional, tendo hidróxido de cálcio como medicação intracanal; Grupo 2, que recebeu tratamento convencional associado à PDT, sem o uso de medicação intracanal, e o Grupo 3, que recebeu tratamento convencional, associado à PDT e com uso de hidróxido de cálcio como medicação intracanal.

Anteriormente ao início da terapia endodôntica, os dentes foram restaurados e coroas provisórias foram confeccionadas, quando se fez necessário, para que o dente não tivesse risco de sofrer contaminação entre as sessões do tratamento.

Feito isto, foi adotado um protocolo de antissepsia após o isolamento

absoluto preconizado por Ferrari (2004), que consistiu em: a cada visita, o paciente fez bochecho com solução anti-séptica de digluconato de clorexidina a 0,12% por 1 minuto. A seguir, após profilaxia com taça de borracha e pedra pomes, o dente foi isolado com dique de borracha. O campo operatório e a superfície dental foram descontaminadas pela aplicação sucessiva de 3 soluções, formuladas em farmácia de manipulação⁵, durante 1 minuto cada: 1ª) solução de peróxido de hidrogênio 30%; 2ª) tintura de iodo 10%; 3ª) tiosulfato de sódio a 5%, utilizada para inativação do iodo. Foram colhidas amostras da superfície coronária com bolinha de algodão esterilizado para controle da esterilidade, antecedendo o acesso à cavidade pulpar. Cada um dos tubos foi identificado com etiqueta adesiva, contendo nome, número do dente, data e número da coleta (1ª coleta).

4.4. Documentação Radiográfica

Todos os dentes tratados foram radiografados antes do início e após o término do tratamento, e foram radiografados para controle depois de 1, 3 e 6 meses.

Essa documentação foi feita com auxílio de posicionadores individualizados para cada dente (Figura 3). Essa individualização foi feita valendo-se de uma silicona de condensação⁶ colocada no posicionador de forma que, quando o paciente ocluía, ficava registrada a sua mordida. Dessa forma, todas as tomadas radiográficas foram tiradas na mesma posição, com o mesmo aparelho d Rx, com películas para tomadas radiográficas intrabucais reveladas em caixa de revelação de consultório.

⁵ Fórmula e Ação Farmácia Magistral Ltda.

⁶ Optosil, Kulzer. Germany.



Figura 3: Posicionador colocado no paciente.

4.5. Preparo do Material Clínico

Os materiais e instrumentais para a intervenção endodôntica foram cuidadosamente preparados para a esterilização. Todo o instrumental passou por uma limpeza ultra-sônica por 15 minutos, lavagem com detergente neutro, enxágüe, secagem e acondicionamento em caixas adequadas para posterior esterilização em autoclave.

As peças de mão foram desinfetadas e autoclavadas. O equipo, refletor e bancadas foram desinfetados com álcool a 70%.

4.6. Coleta do Material

Na cirurgia de acesso ao canal radicular, foram utilizadas brocas esféricas⁶ de tamanho compatível com a câmara pulpar, em alta rotação com refrigeração feita com água destilada.

Uma vez acessado o canal radicular, foram colhidas amostras do interior desse canal (2ª coleta), com pinça clínica esterilizada e sem uso anterior,

⁶ Broca diamantada HL 16, K. G. Sorensen.

utilizando-se três cones de papel esterilizados⁷, deixados no interior do canal por 30s (Le Goff *et al.* (1997)). Esta coleta teve como objetivo quantificar a contaminação inicial desse canal. Quando não se verificava a existência de exudato nas pontas de papel, o canal era preenchido com solução salina, quando nova coleta era realizada. Os cones eram então imediatamente transferidos para frascos contendo 2mL de meio de transporte pré - reduzido VMGA III (*Viability Medium Goteborg Anaerobically prepared*) contendo pérolas de vidro de 5mm de diâmetro (Figura 4) para facilitar a mistura e homogeneização da amostra antes do cultivo (ANEXO A). Cada um dos tubos foi identificado com etiqueta adesiva, contendo nome, número do dente, data e número da coleta.

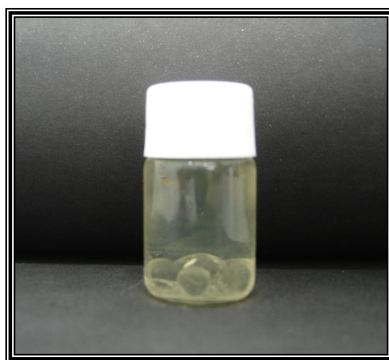


Figura 4: Frasco contendo meio de transporte VMGA III com pérolas de vidro.

Após serem transferidas para o VMGA III, as amostras foram levadas ao laboratório de Microbiologia Oral do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, onde foram então processadas e incubadas em estufa a 37°C por 7 dias.

Em seguida à segunda coleta, foi dado prosseguimento ao tratamento endodôntico com as manobras de neutralização, odontometria e preparo químico-cirúrgico (PQC) no sentido coroa-ápice. Foi utilizado como instrumento memória para realização do batente apical, o instrumento de nº35 em razão de corresponder ao diâmetro mínimo da fibra óptica utilizada. Para isto foi adotada a técnica de Oregon modificada (Leonardo e Leal (1991)), tendo sido utilizada como

⁷ Cones de papel absorvente (esterilizados pelo fabricante) Dentsplay Indústria e Comércio Ltda. Petrópolis. Rio de Janeiro.

solução irrigadora o hipoclorito de sódio a 2,5%⁸, preconizado por Siqueira *et al.* (1999), para estes tipos de casos selecionados.

Imediatamente após o PQC, o canal foi irrigado e aspirado com 2mL de solução salina, quando nova coleta (3ª coleta) foi realizada da mesma forma que a anterior. Esta 3ª coleta teve como objetivo avaliar a ação antimicrobiana do PQC.

A partir desta fase, os procedimentos foram diferenciados de acordo com cada grupo. Para os dentes do grupo 1, os canais radiculares foram então preenchidos com uma medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio⁹. Para os dentes do grupo 2, realizou-se, após lavagem com solução salina, a terapia *laser*, que consistiu na colocação da pasta de azuleno no interior do canal, por um período de 5 minutos (tempo de pré-irradiação) e irradiação com o *laser* em baixa intensidade. Os canais radiculares foram irradiados com movimentos helicoidais, durante um tempo de exposição de 3 minutos, correspondendo a uma energia total entregue de 1,8J.

Feito isto, o canal recebeu outra irrigação - aspiração com solução salina, quando então se realizou nova coleta (4ª coleta) de maneira exatamente igual às anteriores, a qual objetivava avaliar a ação antimicrobiana da PDT. No grupo 2, os canais não foram preenchidos com nenhuma medicação intracanal. O grupo 3 diferenciou-se do grupo 2 somente pela colocação no interior dos canais da medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio.

Todos os dentes receberam, entre as sessões, selamento temporário com cimento de ionômero de vidro¹⁰.

Após sete dias, os pacientes retornaram para a 2ª e última sessão, quando todos os procedimentos clínicos e de antissepsia realizados na 1ª sessão foram repetidos, tendo como diferenciação que, no reparo do canal, foram utilizados apenas os dois últimos instrumentos endodônticos empregados na fase

⁸ Fórmula e Ação Farmácia Magistral Ltda.

⁹ Calen, SSWhite Artigos Dentários Ltda. Rio de Janeiro.

¹⁰ Vidrion R.

do PQC. Como na 1ª sessão, foram realizadas três coletas para o grupo 1, e quatro para os grupos 2 e 3.

O canal foi, após secagem com cones de papel absorvente, obturado com cones de guta percha¹¹ e cimento de óxido de zinco e eugenol¹² pela técnica de condensação lateral. Após obturação, realizou-se a restauração definitiva dos dentes com resina composta¹³.

Os pacientes foram chamados após 1, 3 e 6 meses para controle clínico e radiográfico, para avaliação do processo de reparação.

4.7. Seqüência de Procedimentos Clínicos

4.7.1. Grupo 1 (Tratamento endodôntico convencional)

1ª Sessão

- ◆ Radiografia inicial;
- ◆ Bochecho, isolamento absoluto, antissepsia do elemento dental e controle da esterilidade da coroa – 1ª coleta (T11);
- ◆ Acesso à câmara pulpar e canal radicular – 2ª coleta (T21);
- ◆ Conclusão da cirurgia de acesso, neutralização, odontometria e preparo químico cirúrgico (utilizando hipoclorito de sódio a 2,5%) – 3ª coleta (T31);
- ◆ Medicação intracanal (hidróxido de cálcio) e selamento provisório temporário do dente com cimento de ionômero de vidro.

¹¹ Cones de guta percha(estandardizados pelo fabricante), Dentsplay. Petrópolis, RJ.

¹² Endo fill, Dentsplay. Petrópolis, RJ.

¹³ Charisma, Kulzer.

2ª Sessão (após 7 dias)

- ◆ Bochecho, isolamento absoluto, antissepsia do elemento dental e controle da esterilidade da coroa – 4ª coleta (T12);
- ◆ Remoção do selamento temporário – 5ª coleta (T22);
- ◆ Repreparo químico cirúrgico utilizando os dois últimos instrumentos e irrigação com solução salina – 6ª coleta (T32);
- ◆ Obturação do canal utilizando cimento à base de óxido de zinco e eugenol e cones de guta percha¹² com condensação lateral e vertical;
- ◆ Selamento definitivo do dente (restauração);
- ◆ Radiografia final com posicionador;
- ◆ Controle radiográfico após 1, 3 e 6 meses.

4.7.2. Grupo 2 (Tratamento endodôntico convencional associado à PDT)

1ª Sessão

- ◆ Repetem-se os mesmos procedimentos adotados no grupo 1 até a conclusão do preparo químico cirúrgico;
- ◆ Realização da PDT e, após lavagem com solução salina, a 4ª coleta (T41);
- ◆ Selamento temporário do dente com cimento de ionômero de vidro.

2ª Sessão (após 7 dias)

- ◆ Bochecho, isolamento absoluto, antissepsia do dente e controle da esterilidade da coroa – 5ª coleta (T12);
- ◆ Remoção do selamento temporário – 6ª coleta (T22);
- ◆ Repreparo químico-cirúrgico com os dois últimos instrumentos endodônticos e irrigação com solução salina – 7ª coleta (T32);
- ◆ Repetição da PDT – 8ª coleta (T42);
- ◆ Obturação do canal da mesma forma que no grupo 1;
- ◆ Selamento definitivo do dente e radiografia final com uso de posicionador individualizado;
- ◆ Controles radiográficos após 1, 3 e 6 meses.

4.7.3. Grupo 3 (Tratamento endodôntico convencional associado à PDT, tendo como medicação intracanal o hidróxido de cálcio)**1ª sessão**

- ◆ Repetem-se os mesmos procedimentos adotados no Grupo 2 até a remoção do corante do interior do canal com solução salina, quando então foi colocada a medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio;
- ◆ Selamento temporário do dente (total de 4 coletas).

2ª sessão (após 7 dias)

- ◆ Repetem-se os mesmos procedimentos da 2ª sessão do grupo 2 (total de 4 coletas);
- ◆ obturação do canal igualmente aos grupos 1 e 2;
- ◆ Restauração definitiva do dente e radiografia final;
- ◆ Controles radiográficos após 1, 3 e 6 meses.

4.8. Isolamento dos Microorganismos

As amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, num período máximo de 6 horas após a coleta.

Os tubos contendo as amostras em VMGA III foram colocados em estufa microbiológica¹⁴ a 37°C por 30 minutos, para que a gelatina do meio de transporte fosse liqüefeita. Depois, as amostras foram dispersas em agitador mecânico¹⁵ por 30s, para homogeneização das mesmas, e diluídas em tubos *ependorf*, em diluições de 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 em água peptonada (ANEXO B).

Volumes de 250µL das amostras sem diluição e de cada uma das diluições citadas foram semeadas, em triplicata, na superfície de placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar - Brucella (ANEXO C) acrescido de soluções de hemina (ANEXO D), menadione (ANEXO E) e sangue desfibrinado de carneiro 5%¹⁶, para crescimento de bactérias totais. A seguir, as placas foram incubadas a 37°C, em regime de anaerobiose¹⁷, por um período de 7 dias, após o qual, foram

¹⁴ Fabbe – Primar, modelo 216.

¹⁵ Fisher Vortex Genie 2, cat. nº 12-812, Fisher Científics.

¹⁶ Sangue de carneiro desfibrinado e esterilizado de Soerensen Laboratórios do Brasil Ltda.

¹⁷ AnaeroGemtm, Oxoid Ltda, Basingstoke, Hampshire, England.

contadas unidades formadoras de colônias (ufc/mL) de bactérias totais. Em alguns casos foi possível visualizar colônias de bactérias pigmentadas de preto (Figura 5).

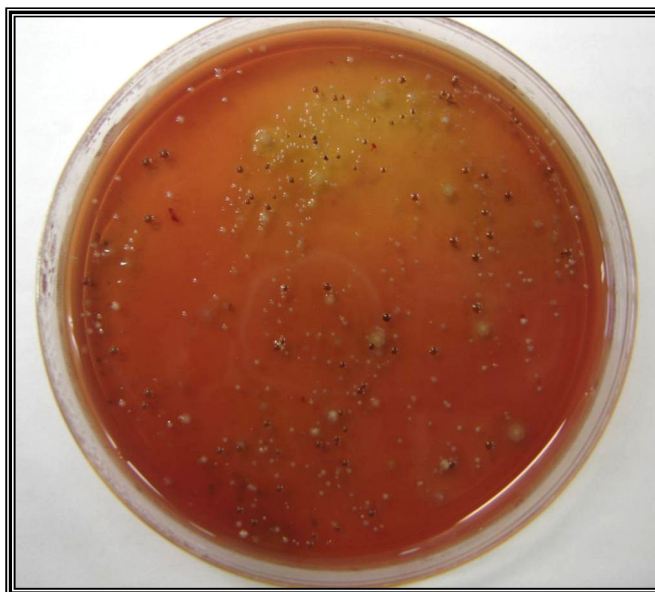


Figura 5: Crescimento microbiano em meio de Ágar - Brucella e sangue. Visualização de ufc/mL de microorganismos totais e de bactérias pigmentadas de preto.

Para as amostras T1, as placas foram semeadas sem diluição (total de três placas). Para as amostras T2, foram semeadas as diluições de 1/100, 1/1000 e 1/10000 (total de nove placas). Para as amostras de T3 e T4, as placas foram semeadas sem diluição e com diluição 1/10 (total de seis placas para cada amostra).

Após essa etapa, as placas foram analisadas em microscópio estereoscópico¹⁸ para contagem das unidades formadoras de colônias. Todos os procedimentos realizados no laboratório de microbiologia foram realizados no interior da câmara de fluxo laminar.

¹⁸ Olympus CBA, Japan.

4.9. Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados obtidos, em cada etapa do tratamento, para cada paciente foi feita uma média das três placas e, para cada média, foi obtido o desvio padrão e a incerteza.

Após este tratamento preliminar, multiplicou-se a média pelo fator de diluição, e sua incerteza foi devidamente propagada.

Para avaliar se houve ou não redução significativa no número de colônias microbianas em cada caso, foi necessário individualizá-los, pois, além do tratamento, a redução de colônias é também dependente da quantidade inicial das mesmas, grandeza esta que varia de indivíduo para indivíduo.

Dito isto, foi realizada uma razão entre o número de colônias microbianas na condição inicial (T21) e após cada etapa do tratamento (T31, T41, T22, T32 e T42).

Também foi feita uma razão entre os resultados finais do tratamento (T32 e T42) e a recolonização (T22), para avaliar se houve melhora após a segunda sessão do tratamento. Todas as razões tiveram suas incertezas devidamente propagadas.

As razões obtidas nos fornecem um fator de redução de colonização microbiana para cada tratamento em função das condições iniciais de cada indivíduo, logo, os dados não dependem mais de cada paciente. Quanto menor a razão obtida, maior é a redução microbiana.

De posse destas razões e, sabendo que estes dados não mais dependem de cada indivíduo, foi possível fazer uma análise por χ^2 e obter uma média de redução microbiana com sua respectiva incerteza.

Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Os grupos foram constituídos de 4 pacientes cada e a comparação dos grupos baseou-se na presença ou não de microorganismos (culturas positivas ou negativas), bem como na quantidade de microorganismos presentes nos momentos avaliados.

5.1. Microbiologia

As quatro primeiras coletas foram realizadas na primeira sessão de atendimento clínico, e as coletas de números 5 à 8 foram realizadas na segunda sessão. Na Tabela 1 há apresentação dos resultados observados.

Tabela 1: Quantidade de colônias microbianas encontradas.

1ª Sessão	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
T11	Nulo	Nulo	Nulo
T21	Muito alto	Muito alto	Muito alto
T31	Baixo	Baixo	Alto
T41		Nulo	Baixo
2ª Sessão	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
T12	Nulo	Nulo	Nulo
T22	Moderado	Moderado	Baixo
T32	Baixo	Nulo	Nulo
T42		Nulo	Nulo

Baixo crescimento: valores $\leq 10^1$

Moderado crescimento: valores entre 10^1 a 10^2

Alto crescimento: valores entre 10^2 a 10^3

Muito alto: valores $\geq 10^3$

5.1.1. Primeira sessão

Na primeira coleta (T11), para controle da esterilidade da superfície coronária, não foi detectado crescimento microbiano em nenhuma das amostras estudadas.

Na segunda coleta (T21), ao abrir o dente antes do PQC, para as amostras do grupo 1 foi observado crescimento microbiano em 3 dos 4 pacientes estudados. Com relação às quantidades de microorganismos encontrados, todas as amostras apresentaram crescimento muito alto (valores acima de 10^3). Para as amostras dos grupos 2 e 3 houve crescimento microbiano em todos os pacientes estudados. Quanto às quantidades de colônias, todas as amostras apresentaram crescimento muito alto (valores acima de 10^3).

Na terceira coleta (T31), após o PQC, no grupo 1 apenas dois dos quatro casos estudados apresentaram crescimento microbiano. Com relação às quantidades de colônias microbianas encontradas, observou-se diminuição do grau de crescimento microbiano, que foi considerado baixo (valores de 10^1). Para o grupo 2 também apenas dois dos quatro casos estudados apresentaram crescimento microbiano. Quanto às quantidades de colônias, observou-se diminuição do grau de crescimento, que foi considerado baixo (valores de 10^2). No grupo 3, as culturas mostraram-se positivas em três dos quatro casos estudados. Com relação às quantidades, houve diminuição do número de colônias, crescimento considerado alto (valores de 10^3).

Na quarta coleta (T41), após a PDT, que só foi efetuada para os grupos 2 e 3, no grupo 2, quatro dos casos estudados tiveram suas culturas negativas e, portanto, a quantificação foi considerada nula. No grupo 3, apenas um dos quatro casos estudados apresentou cultura positiva e com relação ao número de colônias, este foi considerado baixo (valores de 10^1).

No final da primeira sessão, em todos os grupos, houve uma redução significativa no número de colonização microbiana quando comparado com o estágio inicial dos pacientes, porém, a análise estatística não mostrou diferença significativa entre os grupos. Logo podemos concluir que dentro de um intervalo de confiança de 95%, os dados referentes aos grupos 1, 2 e 3 não são diferentes entre si, não sendo possível afirmar que um tratamento tenha sido mais eficiente que outro (Gráfico 1, Gráfico 2 e

Gráfico 3).

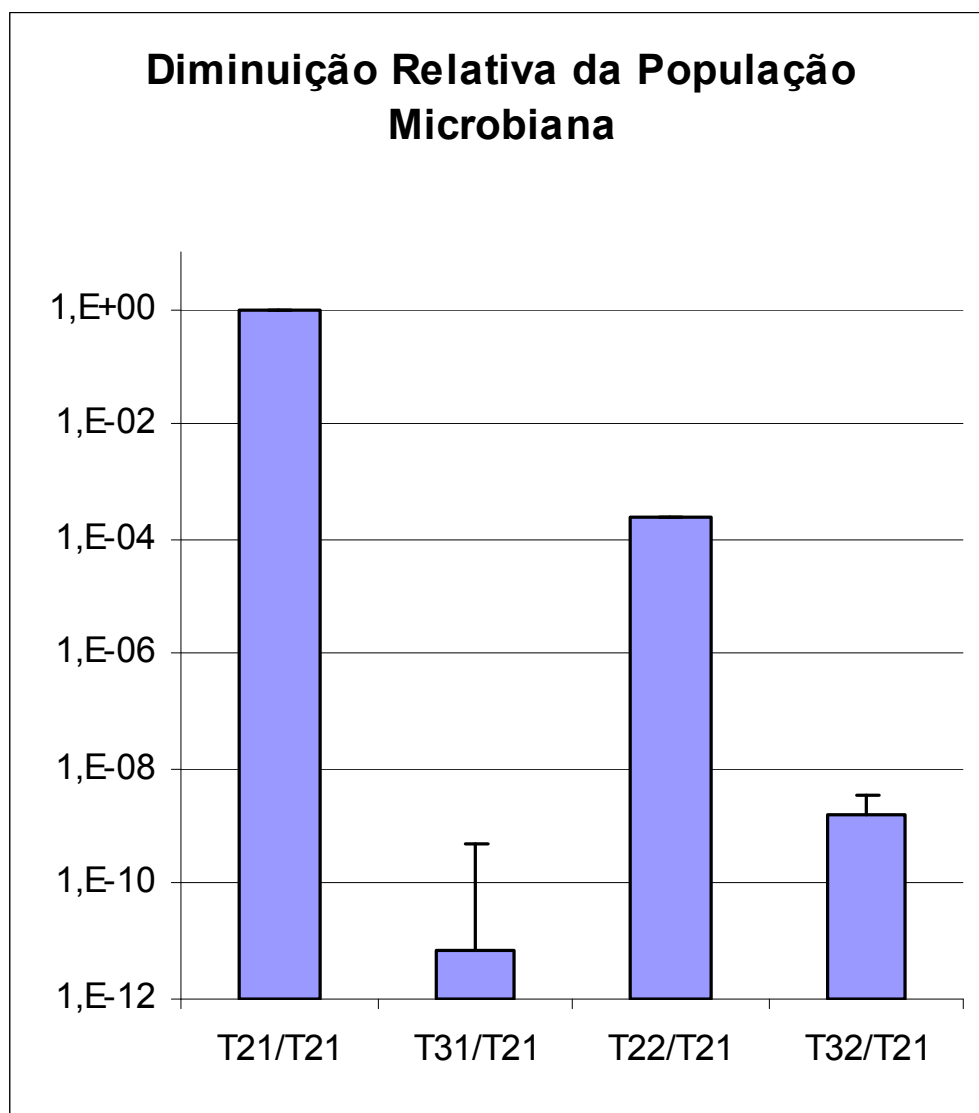


Gráfico 1: Comparação entre as fases do tratamento do **GRUPO 1**, em relação às condições iniciais de cada paciente, em escala logarítmica.

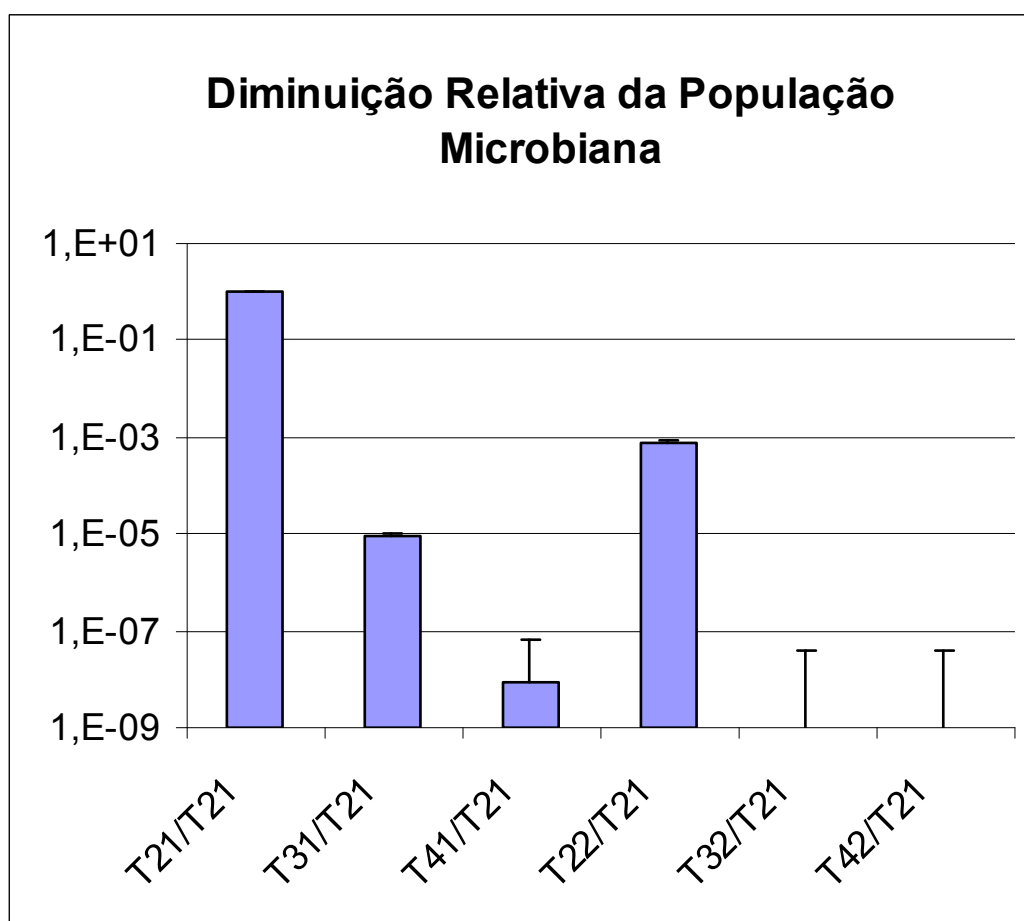


Gráfico 2: Comparação entre as fases do tratamento do **GRUPO 2**, em relação às condições iniciais de cada paciente, em escala logarítmica.

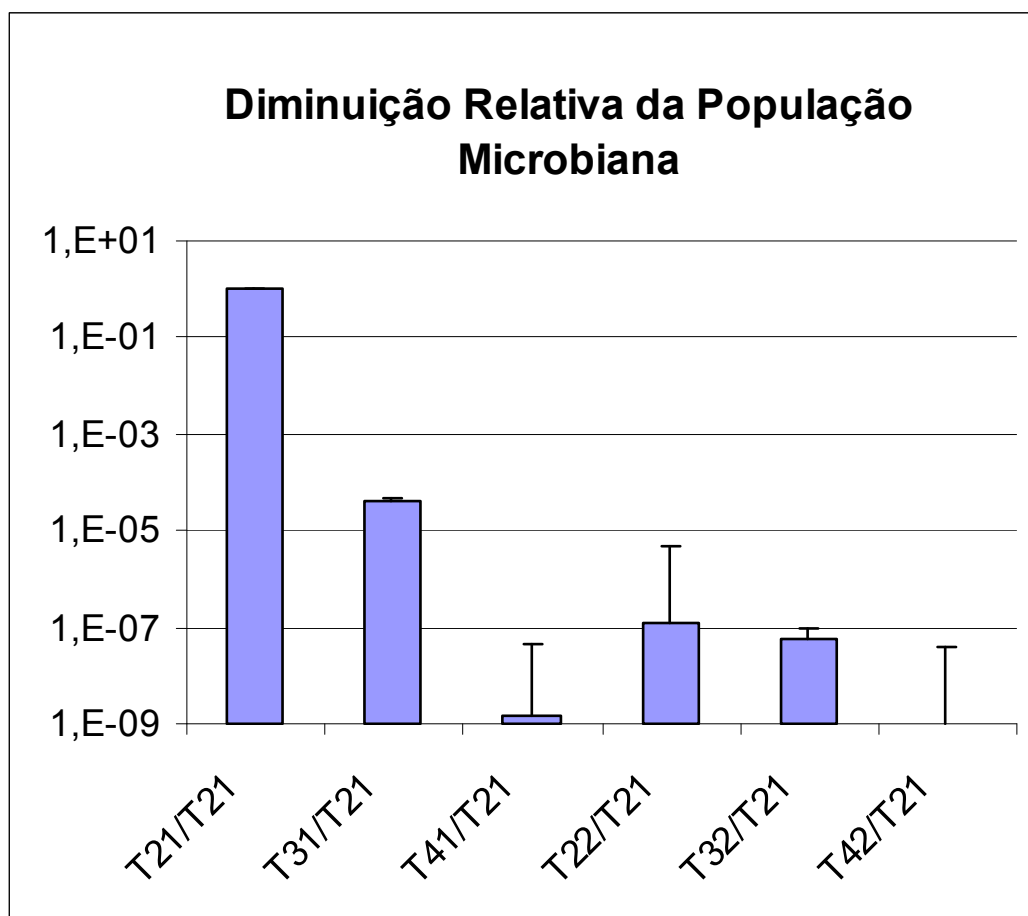


Gráfico 3: Comparação entre as fases do tratamento do **GRUPO 3**, em relação às condições iniciais de cada paciente, em escala logarítmica.

5.1.2. Segunda sessão (após 7 dias)

- ◆ **T12:** Não foi detectado crescimento microbiano em nenhuma das amostras estudadas para os 3 grupos.
- ◆ **T22:** No grupo 1, três dos quatro casos estudados apresentaram culturas positivas, e esse crescimento foi considerado moderado (valores até 10^2). No grupo 2, também três dos quatro casos estudados apresentaram crescimento microbiano, o qual foi considerado moderado (valores até 10^2). No grupo 3, apenas dois dos quatro casos estudados apresentaram culturas positivas, cujo crescimento foi considerado moderado (valores até 10^2).
- ◆ **T32:** No grupo 1, em apenas um dos quatro casos estudados houve crescimento microbiano, que foi considerado baixo. Não foi detectado crescimento microbiano para os grupo 2 e 3.
- ◆ **T42:** Tanto para os grupos 2 e 3 não foram detectados crescimento microbiano.

No estágio de recolonização, o grupo 2 apresentou pior resultado que o grupo 1, e este resultado é estatisticamente significativo, o que demonstra que o tratamento instituído ao grupo 2 foi menos eficiente que o tratamento instituído ao grupo 1.

O tratamento aplicado ao grupo 3 apresentou resultado melhor do que os grupos 1 e 2, sendo este resultado estatisticamente significativo, o que demonstra ser este tratamento o mais eficiente na redução da recolonização microbiana.

Os resultados das comparações intragrupos e intergrupos podem ser visualizados no Gráfico 1, Gráfico 2,

Gráfico 3 e Gráfico 4.

Na fase final dos tratamentos, em todos os grupos, houve redução significativa no número de microorganismos quando comparado ao estágio inicial do paciente, porém, esta redução não foi estatisticamente significativa entre os grupos.

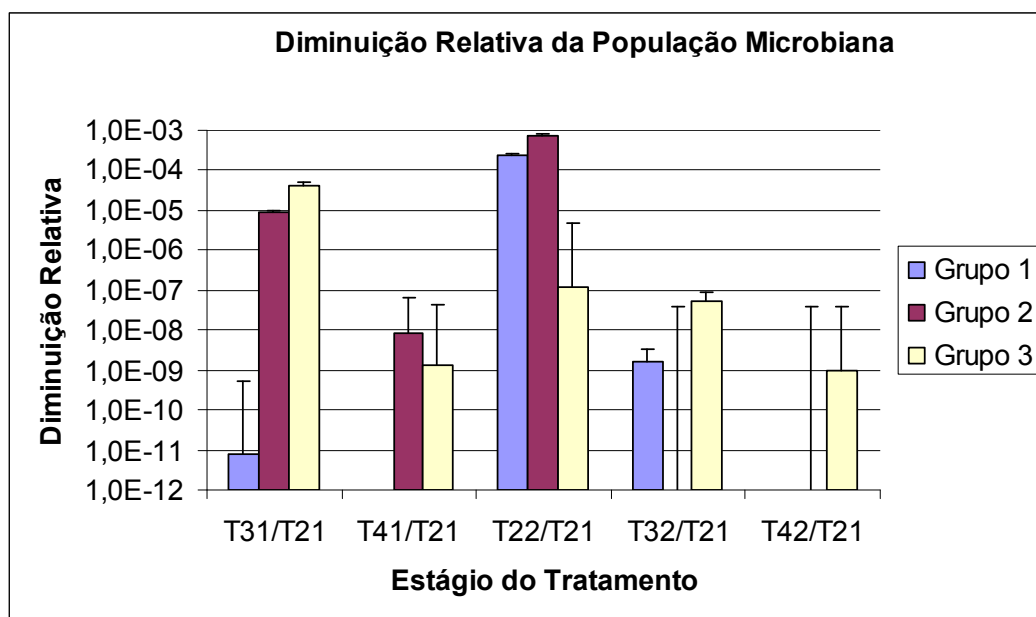


Gráfico 4: Diminuição relativa da colonização microbiana, em escala logarítmica, em função do grupo de pacientes e do estágio do tratamento.

5.2. Quanto ao Controle Clínico e Radiográfico

Os pacientes retornaram para avaliação clínica e radiográfica em períodos médios de um, três e seis meses. Testes de palpação apical, percussão, mobilidade e inspeção visual foram realizados. Os resultados mostraram ausência de sensibilidade em todos os pacientes, à exceção de um paciente (caso 1) do grupo 1, que apresentou sensibilidade e ligeiro edema na região apical após uma semana da obturação do canal. Neste caso, foi instituída a antibioticoterapia sistêmica.

Os exames radiográficos revelaram, após 6 meses, que o processo reparacional está em curso normal (Figura 6).

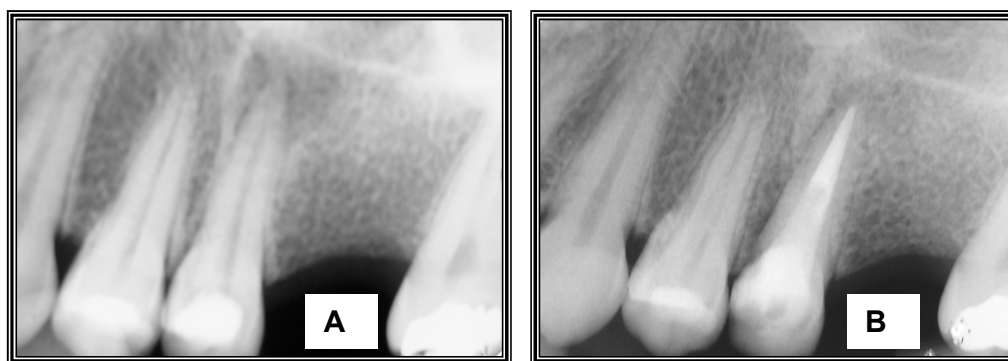


Figura 6: (A) Situação inicial. (B) Situação após 6 meses.

6. DISCUSSÃO

O canal radicular contendo polpa necrosada, sem suprimento sangüíneo, torna-se um verdadeiro *santuário* de bactérias e seus produtos. Ao contrário de outras infecções do corpo humano, devido à ausência de circulação sangüínea na polpa necrosada, os agentes infecciosos localizados no interior dos canais radiculares estão protegidos dos mecanismos de defesa do hospedeiro, bem como da ação de antibióticos administrados por via sistêmica. Por causa de sua localização anatômica, as infecções endodônticas são tratadas por meios mecânicos e químicos. Assim, o tratamento endodôntico apresenta três etapas principais de combate à infecção: o preparo químico-cirúrgico, a medicação intracanal e a obturação do sistema de canais radiculares (Siqueira *et al.* (1999)).

O verdadeiro desafio da endodontia é, sem dúvida nenhuma, a persistência da contaminação do sistema de canais radiculares após a realização da terapia endodôntica com todo rigor de técnica. Credita-se este fato, ao tipo de microbiota ali encontrada (Haapasalo (1993), Waltimo *et al.* (1997) e Le Goff *et al.* (1997)), bem como à presença de biofilme na superfície externa do ápice radicular, estabelecendo uma infecção externa refratária ao tratamento endodôntico (Tronstad *et al.* (1987) e Tronstad *et al.* (1990)).

Escolhemos para este estudo pacientes que apresentavam mortificação pulpar e lesão periapical, associação que comprova a presença de microorganismos (Takehashi *et al.* (1965), Sundqvist (1976) e Moller *et al.* (1981)).

Deve-se lembrar também que as condições anatômicas do sistema de canais radiculares dificulta o acesso dos instrumentos e das soluções antissépticas utilizadas na terapia endodôntica, o que contribui de forma decisiva para permanência de microorganismos viáveis na intimidade do sistema de canais radiculares, bem como na superfície externa da raiz, encontrando condições de proliferação e, conseqüentemente, manutenção da infecção.

Portanto, a manutenção da desinfecção obtida após o preparo químico

cirúrgico, é a razão pela qual se faz necessária a adoção de medidas antimicrobianas subseqüentes a esse preparo.

A utilização de uma medicação intracanal que apresente essas características é importante, e o hidróxido de cálcio tem se mostrado a medicação de escolha embasada por vários autores (Leonardo e Leal (1991), Chong e Pitt Ford (1992), Kontakiotis *et al.* (1995), Tanomaru Filho *et al.* (2002) e Menezes *et al.* (2004)). Porém, mesmo apresentando características adequadas, o hidróxido de cálcio, como agente antimicrobiano, apresenta algumas restrições. Alguns tipos de microorganismos importantes na manutenção da infecção endodôntica, como *E. faecalis* e *C. albicans*, mostraram-se resistentes a essa medicação (Haapasalo e Orstavik (1987), Waltimo *et al.* (1999) e Haapasalo *et al.* (2000)).

Para o preparo químico-cirúrgico, foi escolhida a técnica de neutralização progressiva no sentido coroa-ápice (*crown-down technique*) do conteúdo dos canais radiculares, que consiste basicamente na ampliação do orifício de entrada e do terço cervical dos canais radiculares, antes da instrumentação dos terços médios e apicais, cujo preparo é depois complementado pela instrumentação escalonada invertida (Leonardo e Leal (1991), Ali *et al.* (2005), De Rossi *et al.* (2005), Peters e Wesselink (2005)).

Segundo Leonardo e Leal (1991), a exploração direta dos canais radiculares, nos casos de necrose, está inteiramente descartada, pois a introdução do instrumento no canal, funcionando como um verdadeiro êmbolo, forçaria o conteúdo séptico/tóxico para a região periapical, o que provocaria a exacerbação de um processo crônico preexistente.

Em relação à substância química auxiliar, o hipoclorito de sódio foi escolhido por possuir ação antimicrobiana comprovada na literatura. A concentração escolhida foi de 2,5% por possuir capacidade bactericida eficiente já comprovada na literatura com menor grau de toxicidade aos tecidos periapicais do que em concentrações mais elevadas (Leonardo e Leal (1991), Estrela *et al.* (2003), Vianna *et al.* (2004), Carrotte (2005) e Berber *et al.* (2006)).

A irrigação com solução salina foi utilizada para que toda substância

química auxiliar fosse removida, não interferindo com os resultados das coletas.

Finalmente, quanto ao selamento temporário, foi adotado o ionômero de vidro, escolhido devido as suas características físicas de resistência e também porque o seu coeficiente de expansão térmica linear, dos materiais restauradores temporários, é o que mais se aproxima do coeficiente de expansão térmica linear do dente, de acordo com Navarro e Pascotto (1998), diminuindo assim o risco de infiltração marginal, o que poderia comprometer os resultados do estudo.

A escolha da terapia fotodinâmica se deu em razão de ela estar se demonstrando como um excelente método de redução microbiana de patógenos encontrados na cavidade oral. Diversos estudos, *in vitro*, já foram realizados utilizando esta terapia em canais radiculares, mostrando resultados animadores com relação a sua eficácia (Seal *et al.* (2002), Garcez *et al.* (2006), Kairalla (2006)), mas poucas são as informações clínicas da real capacidade de eliminação de colônias microbianas do interior do sistema de canais radiculares através da utilização deste método. Além disso, o emprego do *laser* em baixa intensidade trás como vantagens, em relação aos de alta potência, não produzir as alterações térmicas, bem como ser uma técnica de custo financeiro muito mais baixo.

Faz-se importante salientar que muitas das pesquisas encontradas na literatura foram realizadas *in vitro*, e em função da diversidade das condições encontradas clinicamente, os resultados *in vitro* não podem ser extrapolados para situações *in vivo*.

Para obtenção do material presente no interior do canal, foram utilizados cones de papel absorvente estéreis colocados no interior do canal para absorção do exudato ali contido. Quando da ausência de exudato, o canal foi preenchido com solução salina estéril e, com auxílio de um instrumento endodôntico também estéril, foi feita a homogeneização, sendo então introduzidos os cones de papel para absorção do conteúdo do mesmo (Le Goff *et al.* (1997) e Ferrari (2004)).

Foram tratados 12 pacientes que foram divididos em três grupos

aleatoriamente. A comparação dos grupos foi baseada na presença e na identificação da quantidade de microorganismos encontrados nos três momentos avaliados para o grupo 1 e nos quatro momentos para os grupos 2 e 3, tanto nas primeiras, quanto nas segundas sessões de atendimento clínico.

Para uma melhor visualização dos resultados, convencionou-se que a avaliação da quantidade de microorganismos em cada placa era obtida através de intervalos determinados por: crescimento microbiano nulo, baixo crescimento (valores até 10^1 colônias), crescimento moderado (de 10^1 a 10^2), alto crescimento (de 10^2 a 10^3) e muito alto (acima de 10^3) (Tabela 1).

O intervalo de 7 dias entre as sessões baseou-se em estudos que demonstraram ser esse espaço de tempo suficiente para que microorganismos resistentes ao processo de limpeza, que permaneceram no interior do sistema de canais radiculares, pudessem recolonizar a luz dos canais (Assed (1993), Gomes *et al.* (1996), Sundqvist *et al.* (1998) e Ferrari (2004)).

Foram observadas em todos os casos dos três grupos estudados, entre as segundas e as terceiras coletas, tanto das primeiras, quanto das segundas sessões de atendimento clínico (entre T21 e T31, entre T22 e T32), uma redução dos casos contendo amostras de culturas positivas, como também houve diminuição da quantidade de colônias presentes. Estes resultados estão de acordo com os estudos de Sjogren *et al.* (1997), Pinheiro *et al.* (1999), Ferrari (2001), Lana *et al.* (2001). Dessa forma, a fase do preparo do canal consolida-se como a etapa mais importante para a redução microbiana da terapia endodôntica.

Com relação à recolonização microbiana, observou-se que nos grupos onde foi utilizada a medicação intracanal (grupo 1 e 3), a recolonização foi maior no grupo 1 que no grupo 3, sugerindo que a terapia instituída foi mais efetiva que a terapia convencional.

Ainda com relação à quantidade de colônias, pôde-se observar que no grupo 2, apesar do uso da PDT, os valores encontrados foram maiores, sugerindo que não é aconselhável deixar o canal vazio, já que os microorganismos

localizados no interior da dentina radicular encontram condições favoráveis para multiplicação. Diversos autores recomendam o uso de medicação intracanal antimicrobiana no intuito de complementar a desinfecção alcançada pelo PQC (Ando e Hoshino (1990), Pinheiro *et al.* (1999), Lana *et al.* (2001), Chavez De Paz *et al.* (2003), Menezes *et al.* (2004), De Rossi *et al.* (2005)).

Foram realizadas instrumentações adicionais, valendo-se dos dois últimos instrumentos utilizados no PQC, nas segundas sessões previamente à fase da obturação. Essa manobra teve por objetivo permitir que os canais fossem obturados com a menor carga microbiana possível (Ferrari, 2004).

O resultado de culturas positivas obtidos após a PDT, difere do estudo de Garcez (2002). Entretanto, este estudo foi realizado *in vivo*, onde as condições são completamente diferentes, já que estão envolvidas no processo infeccioso as características imunológicas do hospedeiro, bem como a patogenicidade dos microorganismos envolvidos. Este binômio (patogenicidade X resistência do hospedeiro) é particular para cada uma das situações com que se depara na prática clínica.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que, a utilização da medicação intracanal somada à PDT mostrou maior eficácia na manutenção da sanificação alcançada na primeira sessão clínica. Portanto, nenhuma das etapas da terapia endodôntica devem ser descartadas, não se devendo abrir mão do uso da medicação intracanal quando de tratamentos realizados em duas ou mais sessões (Valera *et al.* (2001), De Rossi *et al.* (2005) e Menezes *et al.* (2004)).

É importante salientar que no caso de tratamento endodôntico em sessão única, a PDT pode ser uma excelente terapia coadjuvante no intuito de se obter uma obturação do conduto radicular com o menor número de microorganismos possíveis, já que no grupo 2 a PDT reduziu significativamente o número de microorganismos em relação ao PQC (T41/ T31).

Outra importante discussão é no que se refere ao uso de antibioticoterapia de forma indiscriminada, o que leva ao desenvolvimento de

resistência microbiana e conseqüentemente superinfecções. Acreditamos que um maior número de estudos deve ser realizado para que a PDT possa diminuir o uso da antibioticoterapia na clínica endodôntica(Chavez De Paz (2003); Pinheiro *et al* (2003).

Os resultados até agora obtidos, sugerem a PDT como uma excelente coadjuvante à terapia endodôntica e novas pesquisas devem ser realizadas no sentido de ampliar o conhecimento técnico-científico para que esta terapia possa ser utilizada na clínica endodôntica.

7. CONCLUSÕES

- Nos grupos onde foi instituída a PDT ocorreu redução microbiana significativa após o PQC.
- A PDT mostrou-se um excelente método de redução microbiana coadjuvante à terapia endodôntica convencional.
- Os controles radiográficos mostraram franco processo reparacional para todos os casos.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Este documento tem a finalidade de fornecer informações necessárias para você avaliar a possibilidade de participar da pesquisa **“Ação Antimicrobiana intracanal do *laser* em baixa intensidade associado a um fotossensibilizador”**.

O objetivo deste trabalho é verificar se o uso do *laser* em baixa intensidade associado a um fotossensibilizador é capaz de propiciar a redução microbiana intracanal.

Para participar do estudo, os voluntários devem ter idade entre 20 e 45 anos, podendo ser de ambos os sexos, ter boa saúde e, se do sexo feminino, não estar grávida ou amamentando.

Os voluntários deverão comparecer às consultas nos dias de tratamento e retornar segundo o protocolo estabelecido na pesquisa.

Nenhum tipo de medicamento ou solução deverá ser usado sem que o pesquisador seja consultado.

Durante o atendimento, serão feitas fotos da cavidade oral para acompanhamento do estudo, mas elas não serão identificadas, mantendo-se sigilo absoluto de todas as informações obtidas quando da publicação dos resultados do trabalho.

O tratamento a *laser* na redução microbiana não traz riscos ao paciente e como benefício, espera-se que o paciente tenha remissão da infecção intracanal. Para se evitar quaisquer riscos ou problemas na visão, os voluntários deverão fazer uso de óculos de proteção fornecidos pelo pesquisador e nenhuma outra pessoa sem óculos poderá permanecer na sala durante o tratamento com *laser*.

O responsável pela pesquisa responderá a qualquer dúvida do participante e informará o resultado do estudo. O voluntário poderá se recusar a continuar participando do estudo, sem que isso traga qualquer prejuízo ao tratamento que ele estará realizando.

Qualquer dúvida ou problema, o voluntário poderá entrar em contato com a Dr^a Patrícia Rossini Pugliesi Rocha, cirurgiã dentista, CRO-SP 36.066, no telefone 11 3704-7256.

Eu, _____, confirmo que recebi de maneira clara todas as informações com relação à pesquisa intitulada “**Ação antimicrobiana intracanal do *laser* em baixa intensidade associado a um fotossensibilizador**”.

Assim, após ter compreendido os meus direitos, deveres e obrigações para com a pesquisa, informo que aceito, por livre e espontânea vontade, fazer parte deste estudo.

São Paulo, _____ de _____ de 2006.

NOME: _____

RG: _____

ASSINATURA: _____

ANEXO A - MEIO VMGA III (Viability Médium Göteborg Anaerobically)**Solução A:**

Triptose (Difco, Laboratories, EUA).....	0,5 g
Thiotone (BBL, EUA).....	0,5 g
Água destilada.....	540 mL
Dissolver com agitação e aquecimento	

Solução B:

Bacto agar 4% (Difco, Laboratories, EUA).....	2g
Água destilada.....	50 mL
Dissolver em fervura	

Solução C:

Gelatina (Difco, Laboratories, EUA).....	50 g
Água destilada.....	300 mL
Dissolver com agitação e aquecimento até a homogeneização	

Solução D:

Ácido tioglicólico (Difco, Laboratories, EUA).....	0,5 mL
---	--------

Solução E:

Solução de sais de estoque (posteriormente descrita).....	100 mL
---	--------

Solução F:

L-cisteína HCL (Merck, EUA).....	0,5 g
Água destilada.....	10 mL
Dissolver com suave aquecimento	

As soluções de A – E são misturadas na ordem descrita (a temperatura não pode estar menor que 50°C). Depois a mistura é fervida livre de oxigênio sob fluxo de gás carbônico durante 3 minutos. Em seguida, troca-se este gás por nitrogênio. Quando o indicador azul-de-metileno altera sua coloração, deixando a solução mais clara, adiciona-se a solução de cisteína (F) e o pH é ajustado para 7,2. O meio é, então dispensado em frascos que contém pérolas de vidro, onde foi injetado o gás carbônico. Durante este procedimento coloca-se ainda gás nitrogênio dentro dos frascos, para se obter um ambiente livre de oxigênio. Logo após, são firmemente fechados, autoclavados a 115°C durante 20 minutos e armazenados a temperatura ambiente.

Solução de sais de estoque:

	Acetato de fenil mercúrio-cromo (Merck, EUA).....	0,005 g
1	Água destilada.....	300 mL
	Dissolver por aquecimento e incubar a 50°C durante uma noite	
	Glicerofosfato de sódio hidratado (Merck, EUA).....	100 g
2	Água destilada.....	200 mL
	Dissolver aquecendo lentamente	
3	Cloreto de cálcio hidratado.....	1,6 g
	Cloreto de potássio.....	4,2 g
	Cloreto de sódio.....	10,0 g
	Sulfato de magnésio hidratado.....	1,0 g
	Água destilada.....	300 mL

Dissolver sob agitação

4 Azul-de-metileno (Merck, EUA)..... 0,03 g

As soluções 1, 2 e 3 são misturadas de modo que não haja precipitação de sais. A seguir, completa-se com água destilada até o volume de 1000mL e adiciona-se o azul-de-metileno. A solução de sais é, então, armazenada em frascos bem fechados, à temperatura ambiente até o momento de uso.

ANEXO B – ÁGUA PEPTONADA

Água destilada..... 1000 mL

Tryptone (Difco, Laboratories, EUA)..... 2,5 g

Thiotone E-peptone (BBL, EUA)..... 2,5 g

Cloreto de sódio (Synth, Brasil)..... 5,0 g

Aquecer até dissolver por completo. Ajustar o pH para 7,2. Dispensar em tubos e autoclavar a 121°C durante 25 minutos

ANEXO C – ÁGAR BRUCELLA SANGUE, HEMINA E MENADIONE

Agar Brucella (Difco, EUA, cód. 0964-17-5)

Fórmula (g/L), pH final = 7,5 +/- 0,2 a 25°C

Bacto peptamin.....	20 g
Bacto dextrose.....	1 g
Bacto yeast extract.....	2 g
Sodium chloride.....	5 g
Sodium bissulfite.....	0,1 g
Bacto Agar.....	15 g

Em balança analítica (Denver Instruments, XL-610, Max 610g, d= 0,01g), são pesados 43,0 g de agar Brucella, 3,0 g de agar, 2,0 g de extrato de levedura, que são colocados em Erlenmeyer acrescido de 1000mL de água destilada, e deixado hidratar por 10 a 15 minutos. Com o auxílio de um bastão de vidro é dissolvido o pó completamente. O frasco é fechado e esterilizado em autoclave a 121°C, por 15 minutos. Logo após, esse é esfriado até uma temperatura aproximada de 45 a 50°C e acrescido de 1,0mL de solução de hemina (Sigma, Chemical, EUA), de 0,1mL de solução de menadione (Sigma, Chemical, EUA) e sangue de carneiro desfibrinado (30mL). Em seguida, são distribuídos em placas de Petri.

Esse meio é utilizado para semear o inóculo, a fim de estimarmos as unidades formadoras de colônias.

ANEXO D – SOLUÇÃO DE HEMINA

Hemina.....	0,05g
Solução de NaOH a 1 N.....	10 g
Água destilada	

ANEXO E – SOLUÇÃO DE MENADIONE

Menadione.....	0,2g
Etanol.....	2 g
Água destilada.....	18mL

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackroyd, R.; Kelty, C.; Brown, N. and Reed, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochem Photobiol**, v. 74(5), p.656-69, 2001.

Adrian, J.C. Pulp effects of neodymium laser. A preliminary report. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 44(2), p.301-5, 1977.

Ali, M.N.; Hossain, M.; Nakamura, Y.; Matsuoka, E.; Kinoshita, J. and Matsumoto, K. Efficacy of root canal preparation by Er,Cr:YSGG laser irradiation with crown-down technique in vitro. **Photomed Laser Surg**, v. 23(2), p.196-201, 2005.

Ando, N. and Hoshino, E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentin. **Int Endod J**, v. 23(1), p.20-7, 1990.

Assed, S. Prevalência de microrganismos em canais radiculares de dentes humanos com reação periapical crônica. Efeito do preparo biomecânico e do curativo de demora. Imunofluorescência indireta e cultura. 1993. Tese (Livre Docência em Endodontia) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Ayhan, H.; Sultan, N.; Cirak, M.; Ruhi, M.Z. and Bodur, H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. **Int Endod J**, v. 32(2), p.99-102, 1999.

Baumgartner, J.C.; Watkins, B.J.; Bae, K.S. and Xia, T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. **J Endod**, v. 25(6), p.413-5, 1999.

Berber, V.B.; Gomes, B.P.; Sena, N.T.; Vianna, M.E.; Ferraz, C.C.; Zaia, A.A. and Souza-Filho, F.J. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. **Int Endod J**, v. 39(1), p.10-7, 2006.

Bonifácio, K.C.; Leonardo, M.A.; Silva, L.A. and Ito, I.Y. MEV - Avaliação do ápice radicular de dentes humanos com e sem vitalidade pulpar. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO, p. 17, resumo N.A217, 2000, Águas de Lindóia.

Bystrom, A. and Sundqvist, G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 55(3), p.307-12, 1983.

Camargo, S.C.C. Estudo in vivo da ação antimicrobiana do preparo químico cirúrgico associado ou não a irradiação com laser de alta potência Nd:YAG. 2002. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Carrotte, P. Endodontic problems. **Br Dent J**, v. 198(3), p.127-33; quiz 174, 2005.

Chavez De Paz, L.E.; Dahlen, G.; Molander, A.; Moller, A. and Bergenholtz, G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. **Int Endod J**, v. 36(7), p.500-8, 2003.

Chong, B.S. and Pitt Ford, T.R. The role of intracanal medication in root canal treatment. **Int Endod J**, v. 25(2), p.97-106, 1992.

D'Arcangelo, C.; Varvara, G. and De Fazio, P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. **J Endod**, v. 25(5), p.351-3, 1999.

De Rossi, A.; Silva, L.A.; Leonardo, M.R.; Rocha, L.B. and Rossi, M.A. Effect of rotary or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide/1% chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 99(5), p.628-36, 2005.

Dobson, J. and Wilson, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Arch Oral Biol**, v. 37(11), p.883-7, 1992.

Eriksson, A.R. and Albrektsson, T. Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vital-microscopic study in the rabbit. **J Prosthet Dent**, v. 50(1), p.101-7, 1983.

Estrela, C.; Ribeiro, R.G.; Estrela, C.R.; Pecora, J.D. and Sousa-Neto, M.D. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. **Braz Dent J**, v. 14(1), p.58-62, 2003.

Ferrari, P. Detecção de microrganismos superinfectantes em diferentes fases da terapia endodôntica em pacientes portadores de polpa necrótica e lesão periapical com câmara pulpar fechada. 2001. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Ferrari, P. Detecção de microrganismos oportunistas em pacientes soropositivos para HIV e portadores de infecção endodôntica primária. 2004. Dissertação (Doutorado em Endodontia) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo,

Garcez, A. Laser em baixa intensidade associado a fotossensibilizador para redução microbiana intracanal comparado ao controle químico. 2002. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

Garcez, A.S.; Nüñez, S.C.; Jorge, A.O.C.; Lage-Marques, J.L. and Ribeiro, M.S. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro (in press). **Oral Surg Oral Méd Oral Path Oral Radiol and Endo**, v., 2006.

Gomes, B.P.; Lilley, J.D. and Drucker, D.B. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. **Int Endod J**, v. 29(4), p.235-41, 1996.

Gouw-Soares, S.; Gutknecht, N.; Conrads, G.; Lampert, F.; Matson, E. and Eduardo, C.P. The bactericidal effect of Ho:YAG laser irradiation within contaminated root dentinal samples. **J Clin Laser Med Surg**, v. 18(2), p.81-7, 2000.

Gutknecht, N.; Kaiser, F.; Hassan, A. and Lampert, F. Long-term clinical evaluation of endodontically treated teeth by Nd:YAG lasers. **J Clin Laser Med Surg**, v. 14(1), p.7-11, 1996a.

Gutknecht, N.; Moritz, A.; Conrads, G.; Sievert, T. and Lampert, F. Bactericidal effect of the Nd:YAG laser in in vitro root canals. **J Clin Laser Med Surg**, v. 14(2), p.77-80, 1996b.

Gutknecht, N.; van Gogswaardt, D.; Conrads, G.; Apel, C.; Schubert, C. and Lampert, F. Diode laser radiation and its bactericidal effect in root canal wall dentin. **J Clin Laser Med Surg**, v. 18(2), p.57-60, 2000.

Haapasalo, H.K.; Siren, E.K.; Waltimo, T.M.; Orstavik, D. and Haapasalo, M.P. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. **Int Endod J**, v. 33(2), p.126-31, 2000.

Haapasalo, M. Black-pigmented gram-negative anaerobes in endodontic infections. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 6(2-3), p.213-7, 1993.

Haapasalo, M. and Orstavik, D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. **J Dent Res**, v. 66(8), p.1375-9, 1987.

Hayek, R.R.; Araujo, N.S.; Gioso, M.A.; Ferreira, J.; Baptista-Sobrinho, C.A.; Yamada, A.M. and Ribeiro, M.S. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. **J Periodontol**, v. 76(8), p.1275-81, 2005.

Kairalla, E.C. Estudo da redução microbiana intracanal utilizando laser de baixa potência associado a fotossensibilizador e laser de alta potência. 2006. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

Takehashi, S.; Stanley, H.R. and Fitzgerald, R.J. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulps in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 20, p.340-9, 1965.

Kerekes, K. and Olsen, I. Similarities in the microfloras of root canals and deep periodontal pockets. **Endod Dent Traumatol**, v. 6(1), p.1-5, 1990.

Kipioti, A.; Nakou, M.; Legakis, N. and Mitsis, F. Microbiological findings of infected root canals and adjacent periodontal pockets in teeth with advanced periodontitis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 58(2), p.213-20, 1984.

Kiryu, T.; Hoshino, E. and Iwaku, M. Bacteria invading periapical cementum. **J Endod**, v. 20(4), p.169-72, 1994.

Komerik, N. and MacRobert, A.J. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, v. 25(1-2), p.487-504, 2006.

Kontakiotis, E.; Nakou, M. and Georgopoulou, M. In vitro study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. **Int Endod J**, v. 28(6), p.285-9, 1995.

Lana, M.A.; Ribeiro-Sobrinho, A.P.; Stehling, R.; Garcia, G.D.; Silva, B.K.; Hamdan, J.S.; Nicoli, J.R.; Carvalho, M.A. and Farias Lde, M. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. **Oral Microbiol Immunol**, v. 16(2), p.100-5, 2001.

Le Goff, A.; Bunetel, L.; Mouton, C. and Bonnaure-Mallet, M. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. **Oral Microbiol Immunol**, v. 12(5), p.318-22, 1997.

Leonardo, M.R. and Leal, J.M. Endodontia: Tratamento dos canais radiculares, Medicina Panamericana Editora do Brasil, 1991.

Leonardo, M.R.; Tanomaru Filho, M.; Silva, L.A.; Nelson Filho, P.; Bonifacio, K.C. and Ito, I.Y. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. **J Endod**, v. 25(3), p.167-71, 1999.

Malik, Z.; Hanania, J. and Nitzan, Y. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins--an alternative approach to antimicrobial drugs. **J Photochem Photobiol B**, v. 5(3-4), p.281-93, 1990.

Matsumia, S. and Kitamura, M. Histopathological and histobacteriological studies of the relation between the condition of sterilization of the interior of the root canal and the healing process of periapical tissues in experimentally infected root canal treatments. **Bull Tokio Dent Coll**, v. 1(1), p.1-19, 1950.

Meisel, P. and Kocher, T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. **J Photochem Photobiol B**, v. 79(2), p.159-70, 2005.

Menezes, M.M.; Valera, M.C.; Jorge, A.O.; Koga-Ito, C.Y.; Camargo, C.H. and Mancini, M.N. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. **Int Endod J**, v. 37(5), p.311-9, 2004.

Mester, E.; Spiry, T.; Szende, B. and Tota, J.G. Effect of laser rays on wound healing. **Am J Surg**, v. 122(4), p.532-5, 1971.

Moller, A.J.; Fabricius, L.; Dahlen, G.; Ohman, A.E. and Heyden, G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **Scand J Dent Res**, v. 89(6), p.475-84, 1981.

Moritz, A.; Gutknecht, N.; Goharkhay, K.; Schoop, U.; Wernisch, J. and Sperr, W. In vitro irradiation of infected root canals with a diode laser: results of microbiologic, infrared spectrometric, and stain penetration examinations. **Quintessence Int**, v. 28(3), p.205-9, 1997.

Nair, P.N.; Sjogren, U.; Krey, G.; Kahnberg, K.E. and Sundqvist, G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. **J Endod**, v. 16(12), p.580-8, 1990.

Navarro, M.F. and Pascotto, R.C. Cimentos de ionômero de vidro, Editora Artes Médicas, 1998.

Okamoto, H.; Iwase, T. and Morioka, T. Dye-mediated bactericidal effect of He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. **Lasers Surg Med**, v. 12(4), p.450-8, 1992.

Paiva, J.G. and Antoniazzi, J.H. Endodontia: Bases para a prática clinica. São Paulo, Artes Médicas, 1988.

Peciuliene, V.; Balciuniene, I.; Eriksen, H.M. and Haapasalo, M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. **J Endod**, v. 26(10), p.593-5, 2000.

Peters, L.B. and Wesselink, P.R. [Root canal preparation: shaping and cleaning of the root canal]. **Ned Tijdschr Tandheelkd**, v. 112(11), p.436-40, 2005.

Pinheiro, E.T.; Gomes, B.P.; Ferraz, C.C.; Teixeira, F.B.; Zaia, A.A. and Souza Filho, F.J. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. **Oral Microbiol Immunol**, v. 18(2), p.100-3, 2003.

Pinheiro, E.T.; Pinto, A.S.H.; Rocha, M.M.N.P.; Carvalho, C.B.M. and Gomes, B.P.F.A. Influência do preparo químico-mecânico na microbiota de dentes com periodontite apical crônica. 16ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, p. 21, 1999, Águas de São Pedro.

Ribeiro, M.S. and Zezell, D.M. Laser de baixa intensidade. A Odontologia e o Laser. N. Gutknecht and C. P. Eduardo. São Paulo, Quintessence Editora Ltda. p. 228-234, 2004.

Riitano, F. Anatomic Endodontic Technology (AET)--a crown-down root canal preparation technique: basic concepts, operative procedure and instruments. **Int Endod J**, v. 38(8), p.575-87, 2005.

Roane, J.B. Balanced force, crown-down preparation, and inject-R Fill obturation. **Compend Contin Educ Dent**, v. 19(11), p.1137-40, 1142, 1144-5, 1148-9; quiz, 1998.

Seal, G.J.; Ng, Y.L.; Spratt, D.; Bhatti, M. and Gulabivala, K. An in vitro comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. **Int Endod J**, v. 35(3), p.268-74, 2002.

Silbert, T.; Bird, P.S.; Milburn, G.J. and Walsh, L.J. Desinfection of root canals by laser dye photosensitization. **J Dent Res**, v. 79(IADR abstrats), p.569, 2000.

Siqueira, J.F., Jr.; Lima, K.C.; Magalhaes, F.A.; Lopes, H.P. and de Uzeda, M. Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. **J Endod**, v. 25(5), p.332-5, 1999.

Sjogren, U.; Figdor, D.; Persson, S. and Sundqvist, G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. **Int Endod J**, v. 30(5), p.297-306, 1997.

Sundqvist, G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. 1976. University Odontological Dissertation n.07 - University of Umea, Umea.

Sundqvist, G. Ecology of the root canal flora. **J Endod**, v. 18(9), p.427-30, 1992.

Sundqvist, G.; Figdor, D.; Persson, S. and Sjogren, U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 85(1), p.86-93, 1998.

Sydney, G.B. and ESTRELA, C. The influence of root canal preparation on anaerobic bacteria in teeth with asymptomatic apical periodontitis. **Braz Endod J**, v. 1(1), p.12-15, 1996.

Tanji, E.; Gouw-Soares, S. and Eduardo, C.P. SEM of root canals irradiated with Er:YAG and Nd:YAG lasers. **J Dent Res**, v. 78(5), p.976, 1999.

Tanomaru Filho, M.; Leonardo, M.R. and da Silva, L.A. Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. **J Endod**, v. 28(4), p.295-9, 2002.

Teodorovic, N. and Martinovic, Z. [Significance of crown-down root canal preparation technique in endodontic therapy by using the hydroxylapatite sealer]. **Vojnosanit Pregl**, v. 62(6), p.447-52, 2005.

Tronstad, L.; Andreasen, J.O.; Hasselgren, G.; Kristerson, L. and Riis, I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. **J Endod**, v. 7(1), p.17-21, 1980.

Tronstad, L.; Barnett, F. and Cervone, F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. **Endod Dent Traumatol**, v. 6(2), p.73-7, 1990.

Tronstad, L.; Barnett, F.; Riso, K. and Slots, J. Extraradicular endodontic infections. **Endod Dent Traumatol**, v. 3(2), p.86-90, 1987.

Valera, M.C.; de Moraes Rego, J. and Jorge, A.O. Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on *Candida albicans* in root canals. **J Endod**, v. 27(6), p.401-3, 2001.

Vianna, M.E.; Gomes, B.P.; Berber, V.B.; Zaia, A.A.; Ferraz, C.C. and de Souza-Filho, F.J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 97(1), p.79-84, 2004.

Wainwright, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J Antimicrob Chemother**, v. 42(1), p.13-28, 1998.

Walsh, L.J. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications. **Aust Dent J**, v. 42(5), p.302-6, 1997.

Waltimo, T.M.; Siren, E.K.; Orstavik, D. and Haapasalo, M.P. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro. **Int Endod J**, v. 32(2), p.94-8, 1999.

Waltimo, T.M.; Siren, E.K.; Torkko, H.L.; Olsen, I. and Haapasalo, M.P. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. **Int Endod J**, v. 30(2), p.96-101, 1997.

Williams, J.A.; Pearson, G.J. and John Colles, M. Antibacterial action of photoactivated disinfection {PAD} used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. **J Dent**, v. 34(6), p.363-71, 2006.

Wilson, M.; Burns, T.; Pratten, J. and Pearson, G.J. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **J Appl Bacteriol**, v. 78(5), p.569-74, 1995.

Wilson, M.; Dobson, J. and Harvey, W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. **Curr Microbiol**, v. 25(2), p.77-81, 1992.

Wilson, M.; Dobson, J. and Sarkar, S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. **Oral Microbiol Immunol**, v. 8(3), p.182-7, 1993.

Yared, G.M. and Dagher, F.E. Influence of apical enlargement on bacterial infection during treatment of apical periodontitis. **J Endod**, v. 20(11), p.535-7, 1994.