

Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Odontologia de Araraquara

FERNANDA GERALDES PAPPEN

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO  
CANAL RADICULAR E DA REPARAÇÃO DA  
REGIÃO APICAL E PERIAPICAL APÓS  
TRATAMENTO ENDODÔNTICO DE DENTES DE  
CÃES COM VITALIDADE PULPAR E SEM  
VITALIDADE PULPAR COM OU SEM REAÇÃO  
PERIAPICAL CRÔNICA



Araraquara  
2004

**FERNANDA GERALDES PAPPEN**

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO CANAL  
RADICULAR E DA REPARAÇÃO APICAL E PERIAPICAL  
APÓS TRATAMENTO ENDODÔNTICO DE DENTES DE  
CÃES COM VITALIDADE PULPAR E SEM VITALIDADE  
PULPAR COM OU SEM REAÇÃO PERIAPICAL CRÔNICA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

ARARAQUARA  
2004

Pappen, Fernanda Geraldês

Avaliação microbiológica do canal radicular e da reparação apical e periapical após tratamento endodôntico de dentes de cães com vitalidade pulpar e sem vitalidade pulpar com ou sem reação periapical crônica / Fernanda Geraldês Pappen. -- Araraquara: [s.n.], 2004.

200 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia.

Orientador : Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

1. Periodontite periapical 2. Endodontia – Métodos  
3. Cavidade da polpa dentária - Microbiologia I. Título.

## *Dados Curriculares*

### **Fernanda Geraldês Pappen**

<i>NASCIMENTO</i>	20 DE JUNHO DE 1978 – Pelotas/RS
<i>FILIAÇÃO</i>	Ary Fernando Pappen Maria Lúcia Geraldês Pappen
<i>1997/2000</i>	Curso de Graduação Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas – UFPel
<i>2001</i>	Curso de Especialização em Endodontia Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas – UFPel
<i>2000-2001</i>	Professora Substituta das Disciplinas de Patologia I e II da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas - UFPel
<i>2002/2004</i>	Curso de Pós-graduação em Endodontia, nível de Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
<i>2004</i>	Professora Substituta da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas – UFPel

*Dedicatória*

---

## *Dedicatória*

*Aos meus queridos pais, Maria Lúcia e Ary*

*Os exemplos de honestidade, de força, de trabalho, de princípios e de amor à família me seguirão por toda a vida. Agradeço a vocês todo o carinho, todo o incentivo, e o apoio INCONDICIONAL em todos os meus sonhos e em todas as minhas decisões.*

*Mesmo de longe, sinto toda a dedicação de vocês.*

*Estivemos juntos o tempo todo!*

*Amo muito vocês!*

*Aos amados Felipe, Gustavo e Laura*

*Por toda a torcida, e todo o amor de vocês. Agradeço a Deus por vocês serem meus queridos e amorosos irmãos. Senti muito estar ausente em tantos momentos que deveríamos ter compartilhado.*

*Agradecimentos Especiais*

---

## *Agradecimentos Especiais*

*Ao Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho*

Por sua constante presença como orientador, mestre e amigo, sempre um exemplo de disciplina, serenidade, determinação e dedicação à endodontia e à pesquisa. Agradeço pela oportunidade de trabalharmos juntos, por todos os ensinamentos transmitidos, e pela enorme contribuição na minha formação. Tê-lo como mestre e orientador me fez sonhar ainda mais com a docência e a pesquisa.

*Ao Prof. Dr. Mario Roberto Leonardo.*

Ser sua aluna é um privilégio sonhado por muitos. Ao conhecê-lo, seu profissionalismo, sua competência, seu amor pela Endodontia, sua dedicação ao ensino e seus princípios, me fizeram admirá-lo ainda mais. Espero levar adiante suas idéias e seu exemplo, sempre.

*Ao Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo*

Sua enorme amizade, companheirismo, e sua inteligência foram essenciais para que este fosse um curso especial, do qual sentirei saudade. Agradeço por todas as oportunidades, pela confiança, e pelos conhecimentos transmitidos com tanto entusiasmo.

*Ao Prof. Dr. Roberto Miranda Esberard*

Sua atenção, educação, respeito, postura firme e sensata são qualidades que o tornam um grande mestre. Obrigada por ter participado da minha formação.

*Ao Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho*

Exemplo de alegria, de amizade e de simplicidade. Admiro muito sua capacidade de trabalho, seu amor pela Endodontia e principalmente pela vida.

*Ao Prof. Dr. Fábio Luiz Berbert*

Pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade demonstrada em diversos momentos do curso de mestrado.

*À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isabel Yoko Ito*

Sua dedicação à ciência e à prática docente, a beleza de seus ensinamentos, paciência e disponibilidade foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À *Profª. Drª. Lea Assed Bezerra da Silva*, por todos os conhecimentos transmitidos, pelas sugestões e por sua importante contribuição para a pesquisa endodôntica.

À *Profª. Drª. Ana Paula Vieira Colombo*, pela atenção, disponibilidade e valiosa contribuição com este trabalho.

À *Juliane Tanomaru*, pelo auxílio durante todo o curso de mestrado, e principalmente por sua dedicação à parte histológica deste trabalho. Sua dedicação e seu amor à pesquisa a fazem uma vencedora. Muito obrigada por tudo.

À minha avó *Celeste Geraldés*, por todas as orações e pelo amor sempre a mim dispensado. Tu moras no meu coração, minha querida!

À minha grande e fiel amiga *Junia Carolina Linhares Ferrari*, por todos os cuidados, pela ajuda em todas as situações, por nossa enorme amizade e alegre convívio. Foste, durante este período, minha família em Araraquara.

Aos queridos colegas do curso de mestrado, *Cristiane, Denise, Erick, Henrique, Jose Carlos, Renata, Roberta, Ronaldo e Sônia*. Esta foi a minha mais amiga, mais companheira, mais especial que eu poderia ter. Vocês, com suas características pessoais e tão marcantes, contribuíram para que estes dois anos fossem inesquecíveis. Compartilhamos experiências, incentivamos os sonhos de cada um, participamos juntos de momentos importantes das nossas vidas. Espero que Deus consiga nos reunir muitas outras vezes.

Aos amigos *Cristina Oliveira, Caroline de Deus, Darlon Martins, Rinaldo Telles, Patrícia Calderon, Patrícia Aleixo, Alessandra Rastelli e Denise Leonardi*. Vocês são os responsáveis pelos melhores dias que vivi em Araraquara. Obrigada por todas as palavras de apoio, de carinho, pela companhia nos finais de semana, pela acolhida, e pela amizade demonstrada em todos os momentos em que convivemos. Estejam certos de que sentirei muita saudade!

Às amigas *Cristina Takeuchi e Patrícia Motta*. Os momentos divididos permitiram o nascimento de uma amizade que espero que me acompanhe pra sempre.

A todos os Professores e Amigos da *Universidade Federal de Pelotas*, que participaram da minha formação profissional sempre me incentivando a buscar meus objetivos.

*Agradecimientos*

---

## *Agradecimentos*

À direção da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho – UNESP, nas pessoas do Diretor **Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached** e do Vice-diretor **Prof. Dr. Roberto Miranda Esberard**.

À Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, pela contribuição na realização do processamento histológico.

Ao **Sr. Edson Luiz Mori**, por todo o seu empenho e dedicação ao seu trabalho, essencial para realização desta pesquisa.

Aos funcionários da Disciplina de Endodontia desta faculdade, **Sra. Célia, Sra. Creusa, Sr. Pedro, Sr. Mário e Sra. Luíza** pela amizade e atenção com que sempre me atenderam.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, turma de doutorado em Endodontia, **Eliane, João Vicente, Marcos e Paulo**, pela amizade e convívio durante a realização do curso.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, **Mara, Vera, Rosângela e Sílvia**, por sua dedicação e atenção com seu trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Endodontia, por todos os conhecimentos transmitidos.

Aos colegas do programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara, pelo convívio durante a realização deste curso.

## Sumário

<b>Resumo</b> .....	14
<b>Abstract</b> .....	16
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	23
2.1 Microbiologia Endodôntica .....	24
2.2 Reparação Apical e Periapical .....	63
2.3 Cimento Resinoso AH Plus.....	74
<b>3. PROPOSIÇÃO</b> .....	82
<b>4. MATERIAL E MÉTODO</b> .....	84
4.1 Processo de Indução das Reações Periapicais Crônicas – Grupo III	86
4.2 Processo de Contaminação dos Canais Radiculares – Grupo II .....	87
4.3 Colheita do Material para Estudo Microbiológico.....	88
4.4 Análise da Microbiota dos Canais Radiculares por Meio de Cultura..	92
4.5 Análise da Microbiota dos Canais Radiculares por Meio de Hibridação DNA – DNA <i>Checkerboard</i> .....	96
4.6 Preparo Biomecânico dos Canais Radiculares.....	101
4.7 Obturação dos Canais Radiculares.....	102
4.8 Avaliação Radiográfica.....	103
4.9 Avaliação Histopatológica.....	105
<b>5. RESULTADO</b> .....	114
5.1 Análise da Microbiota dos Canais Radiculares por Meio de Cultura..	115
5.2 Análise da Microbiota dos Canais Radiculares por Meio de Hibridação DNA – DNA <i>Checkerboard</i> .....	118
5.3 Avaliação Radiográfica.....	122
5.4 Avaliação Histopatológica.....	126
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	148
6.1 Discussão da Metodologia.....	149
6.2 Discussão dos Resultados.....	158
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	171
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	173
<b>APÊNDICE</b> .....	193
<b>ANEXO</b> .....	199

*Resumo*

---

## Resumo

O objetivo deste estudo foi a avaliação da microbiota dos canais radiculares de dentes de cães sem vitalidade pulpar, com e sem reação periapical crônica por meio dos métodos de cultura microbiológica e hibridação DNA-DNA *checkerboard*, além da análise da reparação dos tecidos apicais e periapicais após o tratamento endodôntico de dentes sem vitalidade pulpar sem ou com lesão periapical e dentes com vitalidade pulpar. Foram utilizados 60 pré-molares de 3 cães. No grupo I foram realizados os casos de biopulpectomia; no grupo II, após a abertura coronária, os canais radiculares permaneceram expostos por 30 dias, visando a contaminação dos mesmos (necropulpectomia I); e no grupo III, os canais radiculares permaneceram expostos ao meio bucal por 7 dias, sendo a seguir, selados por 60 dias, quando as lesões periapicais foram evidenciadas radiograficamente (necropulpectomia II). Anteriormente ao preparo biomecânico foi realizada a colheita de material dos canais radiculares para análise microbiológica dos dentes sem vitalidade pulpar. O tratamento endodôntico foi realizado em todos os grupos, em uma única sessão, e após 180 dias os cães foram mortos e as peças preparadas para análise histopatológica. Os resultados da análise microbiológica por meio da técnica de cultura demonstraram o predomínio de anaeróbios estritos e aeróbios em relação aos microrganismos facultativos. A técnica de *checkerboard* demonstrou o predomínio de anaeróbios estritos nas duas situações avaliadas. Nos dois métodos de análise microbiológica foi possível observar maior número de células bacterianas no Grupo II, onde os canais radiculares permaneceram expostos ao meio bucal por 30 dias. Os resultados histopatológicos demonstraram presença de infiltrado inflamatório severo, reabsorção apical e óssea nos grupos II e III, com aspectos semelhantes para estes dois grupos ( $p > 0,05$ ). No entanto, os casos de biopulpectomia (grupo I) apresentaram ausência de infiltrado inflamatório e de reabsorção apical e óssea, com presença de selamento parcial ou total da abertura apical, sendo que os resultados apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos II e III ( $p < 0,05$ ).

**Palavras-chave:** Periodontite periapical; Endodontia – métodos; Cavidade da polpa dentária – microbiologia

*Abstract*

---

## *Abstract*

The aim of this study was to evaluate the microbiota of root canals from dog's teeth, with no pulp vitality, with or without radiographic chronic periapical lesion, using a culture microbiologic method and checkerboard DNA-DNA hybridization technique. The repair of apical and periapical tissues was evaluated after the endodontic treatment of root canals, with no pulp vitality, with or without chronic periapical lesion and with vital pulp. It were used dog's premolars from 3 animals, divided into three groups: group I, treatment of teeth with vital pulps; group II, after coronal opening the root canals were exposed to oral environment during 30 days (teeth with no pulp vitality without chronic periapical lesion); and in group III, the root canals were exposed to oral environment during 7 days, and after this, sealed during 60 days, until the radiographic observation of the presence of periapical lesion. Before the biomechanical preparation, the microbiologic samples were obtained from groups II and III. Endodontic therapy was conducted in three groups, in one-visit treatment, and after 180 days, the dogs were killed and the obtained histological sections were stained with hematoxylin-eosin for optical microscopic analysis of the apical and periapical repairing. The results of microbiologic evaluation using culture technique, showed the predominance of obligate anaerobic and aerobic bacteria in both groups, when compared to facultative species. The method checkerboard demonstrated the predominant occurrence of obligate anaerobes in the both clinical situations that were evaluated. For the two microbiological methods used it was possible to observe a greater number of cells in group II, where the root canals were kept exposed to oral environment during 30 days. The histological results showed inflammatory cell infiltrate, apical and bone resorption, in groups II and III, with similar aspects for both ( $p>0.05$ ). However, in the cases of group I, where the vital teeth were treated, there was no inflammatory infiltrate, no resorption, and it was possible to view partial or total biological seal of apical orifice. The healing difference was statistically significant between group I and the other groups ( $p<0.05$ ).

**Key words:** Periapical periodontitis; Endodontic – methods; Dental pulp cavity -  
Microbiology

## *1. Introdução*

---

## 1. Introdução

O tratamento endodôntico tem como objetivo fundamental a obtenção de condições favoráveis à reparação dos tecidos apicais e periapicais. As diferentes situações da polpa dental e sistema de canais radiculares proporcionam condições distintas para a reparação tecidual pós-tratamento endodôntico. Desta forma, a terapia endodôntica deve ser instituída de acordo com a patologia pulpar e periapical, por meio do correto diagnóstico e determinação da conduta terapêutica a ser utilizada.

Levando-se em consideração que os canais radiculares, nos casos de biopulpectomia, ou tratamento endodôntico de dentes com vitalidade pulpar, não apresentam infecção, a terapia endodôntica deve ser baseada na manutenção da cadeia asséptica e emprego de substâncias e materiais biocompatíveis que não promovam agressão aos tecidos do coto pulpar, de forma a facilitar a reparação apical e periapical (HORSTED-BINDSLEV; LOVSCHALL<sup>72</sup>, 2002; LEONARDO et al.<sup>95,91</sup> 1997, 1998; LEONARDO; LEAL<sup>92</sup>, 1998).

No entanto, nos casos de dentes sem vitalidade pulpar, o sucesso do tratamento endodôntico depende da eliminação da infecção dos canais radiculares, sendo este objetivo mais complexo nos casos de necrose pulpar com presença de lesão periapical visível radiograficamente, caracterizado por um processo infeccioso de longa duração, no qual os microrganismos e seus subprodutos já alcançaram o sistema de canais radiculares além de tecidos apicais e periapicais (ANDO; HOSHINO<sup>6</sup>, 1990; ARMITAGE et al.<sup>8</sup>, 1983; LEONARDO et al.<sup>90</sup> 1994; SHOVELTON<sup>145</sup>, 1964).

As elevadas porcentagens de insucesso após a necropulpectomia II, ou tratamento endodôntico de dentes com lesão periapical (LEONARDO; LEAL<sup>92</sup>,

1998) têm sido relacionadas ao predomínio de bactérias anaeróbias, particularmente as gram-negativas (FABRICIUS et al.<sup>48</sup>, 1982; SUNDQVIST<sup>180,181</sup>, 1976, 1989) e à grande concentração de endotoxinas bacterianas (HORIBA et al.<sup>71</sup>, 1990; PITTS et al.<sup>131</sup>, 1982; SCHEIN; SCHILDER<sup>141</sup>, 1975; SCHONFELD et al.<sup>142</sup>, 1982) no sistema de canais radiculares.

A determinação da microbiota presente nos canais radiculares de dentes sem vitalidade pulpar contribui para o estabelecimento das condutas terapêuticas a serem instituídas, uma vez que a necrose pulpar e as alterações periapicais estão diretamente relacionadas aos microrganismos presentes.

A partir do estudo de Kakehashi et al.<sup>75</sup> (1965) que comprovaram o papel dos microrganismos na etiopatogenia das patologias pulpares e periapicais, uma série de estudos microbiológicos foram realizados. Até o início da década de 70, as investigações apontavam a microbiota endodôntica como predominantemente facultativa. Com o surgimento das técnicas de isolamento e cultura em anaerobiose, os estudos começaram a demonstrar maior prevalência de bactérias anaeróbias estritas nas infecções endodônticas (FABRICIUS et al.<sup>48</sup>, 1982; SUNDQVIST<sup>179,180,181</sup> 1976, 1989, 1992; TRONSTAD et al.<sup>191</sup>, 1987).

Inicialmente, a infecção endodôntica é composta predominantemente por anaeróbios facultativos, ocorrendo alterações dos níveis de oxigênio, cadeia alimentar e interações microbianas, que irão determinar com o passar do tempo, o maior predomínio de anaeróbios estritos (FABRICIUS et al.<sup>48</sup>, 1982).

Outros fatores determinantes na modificação da microbiota endodôntica vêm sendo relatados, como no estudo de Bassler<sup>14</sup> (1999), que descreve um mecanismo observado em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, denominado comunicação intergênica, ou “quorum-sensing”. Neste processo, a expressão de determinados genes determinaria a sobrevivência de alguns microrganismos, em função das modificações no meio.

Através de técnicas de cultura, algumas bactérias vêm sendo apontadas como responsáveis pela etiopatogenia das alterações periapicais, entre elas espécies dos gêneros *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*,

*Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces* e *Propionibacterium* (BAUMGARTNER; FALKLER<sup>15</sup>, 1991; LE GOFF et al.<sup>88</sup>, 1997).

O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular tem permitido à Endodontia a identificação de espécies bacterianas que até então não eram relatadas como parte da microbiota responsável pela patogênese pulpar e periapical (BAUMGARTNER et al.<sup>18</sup>, 2000; SIQUEIRA Jr. et al.<sup>149,153,156,161,162</sup>, 2002, 2003; XIA et al.<sup>202,203</sup> 2000, 2003). Estes métodos são capazes de identificar microrganismos em amostras clínicas sem a necessidade de cultura ou de testes bioquímicos, sendo mais rápidos que os métodos tradicionais de cultura.

Socransky et al.<sup>171</sup> (1994) introduziu um método identificação microbiana através da hibridação de múltiplas amostras de biofilme subgengival contra um número específico de sondas de DNA, técnica denominada checkerboard DNA-DNA hybridization. Este método permite a determinação simultânea de várias espécies bacterianas, em um grande número de amostras clínicas, o que certamente tem contribuído para a melhor compreensão da microbiologia das infecções orais, entre elas a infecção endodôntica.

Apesar dos casos de necropulpectomia I, ou necrose pulpar sem lesão periapical visível radiograficamente, representarem um processo infeccioso de curta duração, é difícil determinar o momento exato em que ocorre o shift microbiano e quando a infecção deixa de limitar-se à luz do canal radicular principal, e passa a ocupar todo o sistema de canais radiculares.

Porém, nos casos de dentes com reação periapical crônica, a disseminação do processo infeccioso para o sistema de canais radiculares tem sido demonstrada em diversos estudos (HOLLAND et al.<sup>66</sup> 2003; LEONARDO et al.<sup>90,99</sup> 1994, 2002; NELSON-FILHO et al.<sup>119</sup>, 2002; RIBEIRO; CONSOLARO<sup>134</sup>, 2000; TANOMARU et al.<sup>184</sup>, 2003; TANOMARU-FILHO et al.<sup>187</sup>, 2002), o que impede a sua eliminação apenas pelo preparo biomecânico. Assim, a utilização de um curativo de demora entre sessões torna-se necessária, como complemento à atuação do preparo biomecânico e solução irrigadora, possibilitando a eliminação de microrganismos e seus subprodutos presentes no sistema radiculares, e criando condições para o processo de reparação dos tecidos apicais e periapicais.

Uma vez que não existem, na literatura, estudos histopatológicos a respeito do tratamento endodôntico de dentes sem vitalidade pulpar que não apresentem lesão periapical crônica torna-se oportuna a avaliação do comportamento tecidual desses casos.

Além disso, é importante o conhecimento da microbiota envolvida nesta condição, comparativamente à microbiota presente nos casos de necrose pulpar com lesão periapical crônica.

Para o estabelecimento de um protocolo de tratamento dos casos de necropulpectomia I, o estudo da correlação das condições microbiológicas e da reparação apical e periapical pós-tratamento endodôntico de dentes com vitalidade pulpar e de dentes com necrose pulpar com e sem lesão periapical crônica visível radiograficamente torna-se relevante.

## *2. Revisão da literatura*

---

## *2. Revisão da literatura*

### **2.1 Microbiologia Endodôntica**

Miller<sup>109</sup>(1894) sugeriu pela primeira vez a correlação entre a ocorrência de patologias pulpares e a presença de bactérias. O autor citou ainda a importância desses conhecimentos também na compreensão e tratamento das patologias dos tecidos periapicais.

Brown e Rudolph<sup>24</sup> (1957) avaliaram a microbiota de 70 canais radiculares de dentes que não apresentavam exposição pulpar, lesões cáries profundas, defeitos anatômicos, restaurações extensas, doença periodontal ou história de trauma. Foram realizadas culturas em aerobiose e anaerobiose, além da avaliação direta dos espécimes em microscopia de fase/contraste e campo escuro. Através da observação direta, foi possível a detecção de microrganismos em 90% dos casos. Os autores observaram que os microrganismos anaeróbios estritos, não cultiváveis, puderam ser observados através da microscopia, demonstrando a importância de técnicas alternativas para a evidência das bactérias. Através da metodologia de cultura, foram encontrados 51,3% de anaeróbios facultativos, 23,9% de anaeróbios estritos e 23,9% de aeróbios nos canais radiculares infectados.

Grossman<sup>60</sup> (1959) investigou a presença de bactérias nos tecidos periapicais de 150 casos de dentes sem vitalidade pulpar. O material para cultura foi colhido durante os procedimentos de cirurgia parendodôntica, e todos os casos apresentavam-se com polpas necrosadas e presença de rarefação óssea periapical. O autor questionou a importância das bactérias no desenvolvimento

das lesões periapicais, uma vez que 85,3% das amostras resultaram em culturas negativas.

Em 1959, Socransky et al.<sup>170</sup> utilizaram a câmara de anaerobiose e aprimoraram a técnica de transporte e cultura, protegidas do oxigênio, tornando possível o isolamento de bactérias anaeróbias estritas e de difícil crescimento pelas técnicas tradicionais de cultura.

Winkler e van Amerongen<sup>200</sup> (1959) investigaram a microbiota presente em 4186 culturas de canais radiculares de dentes com e sem vitalidade pulpar. Observaram culturas negativas em 72% dos casos, e culturas positivas em 27% das amostras. A espécie *Streptococcus* spp. foi predominante, seguida de *Micrococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. Os demais microrganismos foram considerados patógenos oportunistas.

Shovelton et al.<sup>145</sup> (1964), realizaram um estudo para determinar o padrão de distribuição bacteriana nas paredes dentinárias de dentes sem vitalidade pulpar. Foram utilizados para isso, 97 dentes, recém extraídos e descalcificados. Foram realizados cortes transversais na porção mais coronária e na porção apical, e cortes longitudinais próximos ao canal radicular. Por meio de uma coloração de Gram modificada, onde bactérias Gram-positivas e Gram-negativas podiam ser diferenciadas, os autores avaliaram o grau de invasão dos túbulos dentinários, e a profundidade dos túbulos alcançada pelas bactérias. Apesar do número variável de túbulos onde havia colonização bacteriana, microrganismos foram observados em 79 câmaras pulpares dos 97 dentes avaliados. Foi observada uma diferença na distribuição bacteriana dependendo da história clínica de cada caso: em dentes com abscesso periapical agudo, a invasão dentinária foi menor que nos casos de onde o processo era crônico.

Em estudo clássico, Kakehashi et al.<sup>75</sup> (1965) compararam as alterações resultantes de exposições pulpares não tratadas em ratos "germ-free" e em ratos convencionais. Após intervalos operatórios, variando de 1 a 42 dias, os animais foram mortos e os tecidos pulpares examinados. Foi observado após um intervalo de 8 dias, tecido pulpar vital somente na região apical dos canais

radiculares dos ratos com microbiota convencional. No geral, ocorreu necrose do tecido pulpar na presença de bactérias, resultando no desenvolvimento de lesões periapicais crônicas. Nos animais “germ-free” no entanto, não foi observada necrose pulpar, granuloma apical ou abscessos. Além disso, independente do tamanho da exposição pulpar, houve formação de tecido mineralizado sobre a polpa exposta, a partir dos 14 dias, com pontes de tecido mineralizado completas entre o 21<sup>o</sup> e o 28<sup>o</sup> dia.

Melvill e Birch<sup>103</sup> (1967) investigaram a microbiota dos canais radiculares e do tecido periapical de dentes sem vitalidade pulpar. Foram realizadas colheitas do conteúdo dos canais radiculares e do tecido periapical de 104 incisivos, sendo 27 deles já tratados endodonticamente e com indicação para cirurgia parendodôntica. As espécies isoladas do canal radicular foram em sua maioria estreptococos, e com menor frequência estafilococos. As amostras colhidas da região periapical resultaram em 64,7% de culturas negativas. Os autores concluíram que para um estudo microbiológico da região periapical, seria essencial tanto cultura aeróbia quanto anaeróbia, e que, mesmo com a presença de bactérias no interior do canal radicular, a região periapical pode permanecer estéril. No entanto, a microbiota periapical não é independente da presente no interior dos canais radiculares, geralmente elas são idênticas.

Andreasen e Rud<sup>7</sup> (1972) determinaram, por meio de técnica histo-bacteriológica, a localização de bactérias em 66 biópsias contendo ápices e tecidos periapicais obtidos através de cirurgia parendodônticas. A maioria das bactérias pôde ser observada nos túbulos dentinários em regiões próximas ao canal radicular. Não foi encontrada relação entre a quantidade e localização das bactérias e o grau de inflamação periapical. No entanto, as bactérias foram encontradas mais freqüentemente nos casos com inflamação periapical severa, em relação aos casos com inflamação periapical moderada, leve ou ausente. Em apenas dois casos em que os ápices radiculares estavam circundados por cistos infectados já há um longo tempo, a região do cimento apresentou-se necrótica e invadida por bactérias. Nos tecidos periapicais, foi possível observar a presença bacteriana em apenas três casos.

Berg e Nord<sup>20</sup> (1973) utilizaram *in vivo* uma técnica especial de colheita para anaeróbios em dentes infectados de humanos, utilizando uma mistura gasosa de 3% de hidrogênio em nitrogênio, aplicada sobre o campo operatório (coroa e canal radicular), obtendo assim uma maior quantidade de bactérias anaeróbias que as técnicas convencionais.

Kantz e Henry<sup>76</sup> (1974) colheram amostras de 24 dentes necrosados de humanos com câmaras pulpares fechadas de 20 pacientes. Para manter o ambiente de anaerobiose durante a colheita das amostras do interior dos canais radiculares, foi desenvolvida uma nova metodologia, assim como para o transporte e a identificação. Foram isolados 104 microrganismos anaeróbios, de um total de 377 microrganismos. Os mais comumente observados foram *Actinomyces israelii*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Campylobacter sputorum*, *Eubacterium alactolyticum*, *Fusobacterium fusiformis*, *Fusobacterium varium*, *Peptococcus morbillorum*, *Propionibacterium acnes* e *Veillonella parvula*. Não foram encontrados bacilos anaeróbios formadores de esporos ou treponemas.

Wittgow e Sabiston<sup>201</sup> (1975) colheram amostras de tecido necrótico de dentes que haviam sofrido traumatismos e que apresentavam câmaras pulpares íntegras. Foram utilizadas técnicas que minimizavam a possibilidade de contaminação com a microbiota bucal. As amostras foram cultivadas em anaerobiose, e os microrganismos posteriormente identificados. Dos 42 dentes utilizados na amostra, 32 apresentaram culturas positivas. Bastonetes anaeróbios gram-negativos foram observados em 67% das amostras, 75% dos dentes com polpa necrosada e 84% das culturas positivas. Entre as demais espécies identificadas podemos citar os cocos anaeróbios gram-negativos e gram-positivos, *Lactobacillus* spp., *Actinomyces* spp. e *Streptococcus* spp.

Keudell et al.<sup>80</sup> (1976), analisaram o conteúdo microbiológico de 42 canais radiculares de dentes humanos que apresentavam necrose pulpar. As amostras foram colhidas sob fluxo de dióxido de carbono (97%) e hidrogênio (3%), livre de oxigênio, direcionada ao redor da abertura coronária. Foi possível observar crescimento de microrganismos anaeróbios estritos em 64% da amostra.

Um estudo clássico de Sundqvist<sup>180</sup> (1976) avaliou 32 dentes unirradiculares sem vitalidade pulpar e câmaras pulpares não expostas, de 27 pacientes. Os dentes não apresentavam lesões de cárie, restaurações ou alterações anatômicas, e a perda da vitalidade pulpar era decorrente de trauma. Os elementos dentários que apresentassem bolsas periodontais não foram incluídos no estudo. Foram isoladas bactérias de 18 dos 19 dentes que apresentavam lesão periapical visível radiograficamente. Destes, a maior parte continha mais de uma espécie bacteriana. Em alguns dentes, puderam ser isoladas até 8 cepas e, no total, 88 foram isoladas. Os resultados demonstraram o papel fundamental dos microrganismos na etiologia e desenvolvimento das lesões periapicais. Houve grande predomínio de anaeróbios sobre aeróbios na amostra avaliada. Apenas 5, das 88 cepas encontradas cresceram em aerobiose, o que comprovou a eficácia dos meios de transporte e de cultivo utilizados neste estudo. Foram isolados *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Campylobacter*. A espécie *Bacteroides melaninogenicus* estava presente em todos os canais de dentes que apresentavam sintomatologia dolorosa, e presença de exsudato, enquanto não foi encontrada em nenhum dos casos livre de sintomas. Também foram isolados nos casos com características de inflamação aguda, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter sputorum* e espécies denominadas *Peptococcus* grupo I e *Eubacterium* grupo I.

Zavistoski et al.<sup>206</sup> (1980) descreveram uma técnica para avaliar quantitativamente por meio de cultura, a microbiota endodôntica. Através dela, as amostras foram colhidas com o auxílio de cones de papel, colocadas em solução salina, e cultivadas quantitativamente, utilizando-se diluições seriadas semeadas em múltiplos meios de cultura. O peso das amostras foi determinado a fim de se determinar a concentração média de células bacterianas por grama de amostra. O método foi aplicado no estudo da microbiota de 10 dentes sem vitalidade pulpar, e foi observada uma média de  $10^{7,7}$  células bacterianas por grama de conteúdo dos canais radiculares. Uma microbiota mista, com presença de aeróbios e anaeróbios, foi observada em 9 amostras, sendo encontradas, em média 5 espécies diferentes de microrganismo por amostra. Bactérias anaeróbias

constituíram 63% de todas as espécies isoladas, e 64% das espécies isoladas encontravam-se em concentrações maiores que  $10^5$  UFC/g. De acordo com a análise quantitativa, não houve diferença significativa entre a concentração total de aeróbios e de anaeróbios. No que se refere às espécies isoladas, os anaeróbios constituíram quase dois terços do total de espécies. Através destes resultados, os autores reiteram o conceito de que as bactérias desempenham um papel significativo no desenvolvimento de patologias pulpares e periapicais.

Sundqvist e Reuterving<sup>182</sup> (1980) isolaram pela primeira vez *Actinomyces israelii* a partir de amostras de lesões periapicais, através de uma nova técnica microbiológica. Antes deste estudo, a espécie só havia sido isolada do interior de canais radiculares. Nestes casos, o diagnóstico era feito baseado na observação do corte histológico da lesão periapical, que apresentava microrganismos Gram-positivos e agregados de microrganismos.

Em 1980, Dáhlen e Bergenholtz<sup>40</sup> estudaram a presença da endotoxina nos canais radiculares de 13 dentes com polpas necróticas. A presença da endotoxina está relacionada com a contagem de bactérias viáveis nas amostras dos canais radiculares, com os diferentes microrganismos anaeróbios gram-negativos presentes e com a variação na quantidade de exsudato purulento. Nove dos 13 dentes examinados estavam infectados, enquanto em 4 espécimes não foi observado crescimento bacteriano. Em sete dos oito canais radiculares infectados, houve predomínio de bactérias anaeróbias gram-negativas. A análise radiográfica mostrou que a área periapical dos dentes com canais infectados apresentavam focos de reabsorção óssea, enquanto nos dentes com canais estéreis não foi possível observar sinais de inflamação periapical. Nos canais radiculares contendo microrganismos gram-negativos o teste de Limulus foi, em todos os casos, positivo, demonstrando a atividade da endotoxina presente na parede celular destes microrganismos, enquanto nos canais sem crescimento bacteriano, ou onde havia crescimento apenas de gram-positivos, o teste foi negativo. Os resultados demonstraram que a atividade da endotoxina está relacionada com a presença e com o número de microrganismos gram-negativos no interior dos canais radiculares.

Byström e Sundqvist<sup>29</sup> (1981) avaliaram a presença bacteriana em 15 dentes unirradiculares portadores de polpas necróticas e lesões periapicais, durante todo o tratamento endodôntico. Foi observada a eficácia da instrumentação manual utilizando como solução irrigadora apenas o soro fisiológico. Após 4 sessões de preparo biomecânico, 47% da amostra ainda apresentava crescimento bacteriano positivo. Microrganismos anaeróbios estritos representavam 88% dos microrganismos detectados no interior dos canais radiculares, e as espécies mais comumente isoladas foram *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella oralis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium alactolyticum* e *Prevotella intermedia*.

Dahlén et al.<sup>41</sup> (1981) avaliaram histológica e histoquimicamente a influencia do lipopolissacarídeo extraído de *Fusobacterium nucleatum* nos tecidos periapicais de macacos. Amostras de 50-100 µg de LPS foram introduzidas em 27 canais radiculares estéreis de quatro macacos. Dezesete dentes foram desvitalizados e inundados com solução salina, fazendo parte do grupo controle. Os períodos experimentais foram de 3 ou 7 meses. Os dentes e o tecido periapical foram examinados radiograficamente e posteriormente os animais foram mortos. Reações enzimáticas histoquímicas foram observadas por diaforese, fosfatase ácida e atividades de amino-peptidase em sessões seriadas. Radiograficamente, 6 espécimes do grupo experimental apresentavam destruição periapical evidente, e em 21 as reações periapicais estavam ausentes ou não foram diagnosticadas. No grupo controle, os 17 elementos dentais não apresentaram evidências de alterações periapicais. As reações inflamatórias ocorreram nos tecidos periapicais de todos os espécimes do grupo experimental com reabsorção de tecido dentário e ósseo. Mesmo quando a resposta inflamatória observada era leve, as células do tecido ósseo periapical apresentavam atividade enzimática aumentada, sugestiva de reabsorção ativa. Os elementos do grupo controle apresentaram nenhuma ou pouca alteração nas atividades enzimáticas.

Moller et al.<sup>111</sup> (1981) avaliaram os tecidos periapicais após a exposição ao ambiente oral do tecido pulpar de dentes de macacos e selamento no período de seis meses. Todas as polpas expostas se tornaram infectadas com

microrganismos como *Streptococcus* alfa-hemolíticos, *Enterococcus*, coliformes, e anaeróbios como os bacteróides, eubactéria, propionibactéria, e *Peptostreptococcus*. Noventa por cento dos dentes desenvolveram lesões periapicais visíveis radiograficamente.

Dwyer e Torabinejad<sup>46</sup> (1981) utilizaram gatos como modelo de estudo para avaliar a reação do tecido periapical à endotoxina extraída de *Escherichia coli*, e da endotoxina detoxificada pelo uso de hidróxido de cálcio. Estas duas soluções foram diluídas em solução salina, obtendo-se assim, três diferentes concentrações: 100µg/mL, 10µg/mL e 1µg/mL. Após a abertura coronária e remoção da polpa, os canais radiculares foram inundados com 0,1 mL de endotoxina ou solução salina, e selados com cimento provisório. Após 2, 4 ou 6 semanas, os animais foram mortos. Foram feitas análises radiográfica e histológica, observando-se o tipo de infiltrado inflamatório, o grau de inflamação, e a presença de atividade de osteoblastos e osteoclastos. Radiograficamente, áreas radiolúcidas relativamente grandes foram observadas após 2 semanas, fato que pode ser confirmado nos casos examinados após 4 e 6 semanas. No grupo controle, onde foi utilizada solução salina, foram observadas pequenas, ou nenhuma área de radiolucidez óssea, o mesmo ocorrendo com a endotoxina que passou pelo processo de detoxificação. Histologicamente, as áreas de inflamação foram geralmente mais intensas, com maior número de células inflamatórias por unidade de área, nos casos onde foi injetada endotoxina que naqueles onde se utilizou endotoxina detoxificada ou solução salina. Os resultados indicaram que a endotoxina bacteriana provocou um maior efeito patogênico nos tecidos periapicais que a endotoxina detoxificada ou a solução salina, utilizada no grupo controle.

Fabricius et al.<sup>48</sup> (1982) analisaram o conteúdo microbiano de 24 canais radiculares infectados de dentes de macacos depois de variados períodos de selamento. Os dentes foram desvitalizados e os canais expostos ao meio bucal por 1 semana, sendo posteriormente selados. Os autores relataram que após a cobertura das polpas expostas, o percentual de anaeróbios em relação aos aeróbios aumentou com o decorrer do tempo. A espécie *Bacteroides melaninogenicus*, hoje em dia denominada *Prevotella melaninogenica* foi

encontrada em alta prevalência na região apical. Espécies dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella* têm se mostrado capaz de induzir a formação de abscessos em uma variedade de modelos de estudo experimental, tanto em culturas puras quanto em associação com outros microrganismos facultativos.

Nair<sup>117</sup> (1987) em estudo empregando microscopia eletrônica de varredura em 31 lesões periapicais de dentes de humanos (30 granulomas e 1 cisto periapical) observou que todas as superfícies radiculares estavam infectadas por cocos, bacilos, microrganismos filamentosos e espiroquetas. Na maioria dos casos, a microbiota estava restrita ao sistema de canais radiculares. No entanto, bactérias extraradiculares foram observadas em quatro granulomas e um cisto radicular.

Tronstad et al.<sup>191</sup> (1987) estudaram a presença de bactérias em 8 dentes com lesões periapicais assintomáticas refratárias ao tratamento endodôntico convencional. Durante a realização de cirurgia parendodôntica foram colhidas amostras de tecido das lesões periapicais e cortes superficiais das porções apicais das raízes. Foi realizada a metodologia de cultura em anaerobiose e o crescimento bacteriano foi evidenciado em todas as lesões analisadas. Duas delas apresentaram somente bactérias anaeróbias e 5 estavam intensamente colonizadas por anaeróbios. Foram detectadas espécies de *Bacteroides* produtores de pigmento negro assim como bacilos anaeróbios gram-positivos e cocos. Espécies de estreptococos facultativos foram raramente isoladas.

Nair et al.<sup>118</sup> (1990) analisaram através da microscopia óptica e eletrônica, nove lesões periapicais assintomáticas, removidas como blocos de biópsia durante o tratamento cirúrgico dos dentes afetados. Estes casos receberam tratamento endodôntico não-cirúrgico, e quando examinados de 4 a 10 anos depois de realizada a endodontia, apresentavam lesões periapicais visíveis radiograficamente. Seis das nove biópsias revelaram a presença de microrganismos na região apical do canal radicular. Quatro continham uma ou mais espécies de bactérias e duas apresentavam leveduras. Dos três casos onde nenhum microrganismo pôde ser observado, um apresentou características

histopatológicas de um granuloma de células gigantes central. Estes achados sugerem os microrganismos apresentam um papel significativo nas falhas endodônticas.

Baumgartner e Falkler<sup>15</sup> (1991) investigaram a presença bacteriana nos 5 mm apicais de canais radiculares infectados. Os dentes utilizados na amostra possuíam exposições pulpares devido à presença de lesão de cárie. Depois de extraídos, os dentes foram levados a uma câmara de anaerobiose e foi realizada cultura da porção apical das raízes. Além disso, foi realizada cultura em aerobiose. Foi possível a identificação de um total de 50 cepas bacterianas, dos 10 canais radiculares que fizeram parte da amostra. As espécies encontradas com maior frequência foram *Actinomyces*, *Lactobacillus*, bacteróides produtores de pigmento negro, *Peptostreptococcus*, bacteróides não-pigmentados, *Veillonella*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus mutans*. Do total de microrganismos isolados, 68% eram anaeróbios estritos. O estudo demonstrou a presença predominante de anaeróbios nos 5 mm apicais dos canais radiculares de dentes com exposições pulpares decorrentes de cárie e lesões periapicais.

Hashioka et al.<sup>64</sup> (1992) avaliaram a relação entre os sintomas clínicos e a presença de bactérias anaeróbias em canais radiculares infectados. Foram avaliados microbiologicamente 28 dentes de 25 pacientes com periodontite apical. Para fazer parte da amostra, os dentes afetados não poderiam ter sofrido tratamento endodôntico prévio, contaminação prévia do canal radicular por saliva, bolsa periodontal maior que 2 mm, e o paciente não poderia apresentar qualquer desordem sistêmica, ou ter passado por antibioticoterapia nos 6 meses que antecederam as colheitas. Os pacientes examinados foram divididos em grupos, baseados na combinação de sinais e sintomas. Grupo 1, com dor espontânea e à percussão, juntamente com aumento de volume, presença de exsudato ou odor; grupo 2, dor à percussão, mas não espontânea, além de aumento de volume, presença de exsudato ou odor; grupo 3, onde os pacientes não apresentavam dor espontânea ou à percussão. Apesar disso, havia aumento de volume, odor, exudação ou fístula. Foi realizada incubação das amostras, em meio anaeróbio, por 7 dias, e em condições de aerobiose por 3 dias. Todas as colônias isoladas e

incubadas em aerobiose ou anaerobiose foram isoladas e foi verificado se se tratavam de anaeróbios, ou facultativos. Os microrganismos anaeróbios foram corados pelo método de Gram, e foram determinados os tipos de morfologia celular. Os resultados demonstraram a presença freqüente de *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Porphyromonas* e *Bacteroides* no grupo 1; *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* e *Bacteroides* nos casos com dor à percussão, odor, exsudato, e aumento de volume. *P. gingivalis* e *P. endodontalis* foram freqüentemente encontrados nos casos com dor à percussão, odor, e presença de exsudato, indicando uma correlação positiva entre *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Porphyromonas* e *Bacteroides* isolados de canais radiculares infectados e dor à percussão, assim como entre *Porphyromonas* e *Bacteroides* e a presença de odor no interior dos canais radiculares.

Fouad et al.<sup>51</sup> (1992), avaliaram histopatológica e radiograficamente as lesões periapicais crônicas induzidas em dentes de furão. Em 8 caninos, foi realizada a pulpectomia, deixando as cavidades abertas por 7 dias e a seguir selando-as por 12 semanas. As lesões foram avaliadas radiograficamente a cada 2 semanas. Após a morte dos animais, as lesões foram avaliadas através da coloração com hematoxilina-eosina e pela coloração Brown & Brenn. De acordo com os resultados, as rarefações ósseas periapicais eram visíveis em todos os dentes após 4 semanas. Histologicamente, as lesões induzidas consistiam principalmente de um infiltrado inflamatório mononuclear predominantemente de macrófagos e linfócitos. Através da coloração Brown & Brenn, bactérias foram detectadas em todo o sistema de canais radiculares, e somente uma das amostras apresentou bactérias no interior da lesão periapical.

Wayman et al.<sup>197</sup> (1992) avaliaram 58 lesões periapicais através da histopatologia e de cultura microbiológica. Metade das lesões (29) tinha comunicação com a cavidade bucal. Uma porção da biópsia foi submetida ao exame histopatológico, e outra à cultura. As culturas bacterianas foram positivas em 51 dos 58 casos, e bactérias foram visualizadas em 8 dos 58 casos. Foram isoladas 50 espécies bacterianas diferentes, sendo a maior parte de anaeróbios estritos. Bacteróides foram encontrados em 17 culturas, sempre na presença de

outras espécies. As espécies mais comumente encontradas foram *Staphylococcus epidermidis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Propionibacterium acnes*, *Peptostreptococcus micros* e *Bacteroides gracilis*.

Sundqvist<sup>179</sup> (1992) investigou a existência de relações comensais ou antagonistas entre microrganismos nos canais radiculares de dentes com necrose pulpar e periodontite apical. Foram colhidas amostras de 65 canais radiculares de dentes de humanos, e estas analisadas microbiologicamente. As espécies mais freqüentes foram *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium alactolyticum*, *Eubacterium lentum* e *Wolinella recta*. Foram detectadas associações positivas entre *F. nucleatum* e *P. micros*, *Porphyromonas endodontalis*, *Selenomonas sputigena* e *W. recta*. Também houve associação positiva entre *P. intermedia* e *P. micros*, *P. anaerobius* e eubactérias. Em geral, *Streptococcus* spp., *Propionibacterium propionica*, *Capnocytophaga ochracea* e *Veillonella parvula* mostraram associações nulas ou negativas com outras bactérias. Os resultados reafirmaram o conceito de que há um ambiente especial e seletivo dentro do canal, criado, em parte, pelos relacionamentos de cooperação e de antagonismo entre as bactérias ali presentes.

Wasfy et al.<sup>195</sup> (1992) estudaram a microbiota de dentes com história de trauma em 85 pacientes. Não havia, em nenhum caso, presença de lesão de cárie ou doença periodontal. A média de espécies bacterianas encontradas por amostra foi de 3,1. A flora observada era predominantemente anaeróbia, sendo 73% das bactérias cultiváveis. Os microrganismos mais freqüentemente isolados foram *Eubacterium* (68%), *Streptococcus morbillorum* (47%), e bacteróides não pigmentados.

Tani-ishii et al.<sup>183</sup> (1994) realizaram um estudo procurando determinar a microbiota endodôntica em diferentes períodos de tempo, tendo como modelo experimental, ratos. Relataram que durante a fase de desenvolvimento das lesões periapicais, o número de células bacterianas foi igual no 7º e no 15º dia de exposição dos canais radiculares ao meio bucal, e na

segunda semana ocorreu um aumento significativo da proporção de anaeróbios estritos sobre aeróbios e anaeróbios facultativos.

Kiryu et al.<sup>81</sup> (1994) colheram amostras de cimento e de lesões periapicais de 10 ápices radiculares removidos durante uma apicectomia, com o intuito de verificar se microrganismos invadem o cimento periapical de dentes humanos, a partir de lesões periapicais adjacentes. As lesões periapicais não apresentavam comunicação com a cavidade oral no momento da cirurgia, mas em 5 casos já havia formação de fístula. Em todos os casos, já havia sido realizado o tratamento endodôntico, e no momento da cirurgia, ainda havia a presença de imagem radiolúcida na região periapical dos dentes em questão. Durante a apicectomia, a porção apical de cada raiz e dos tecidos da região periapical foram removidos com o cuidado de não contaminar as amostras com microrganismos da cavidade bucal. As amostras foram imediatamente transportadas em um recipiente selado, contendo gás anaeróbio até o laboratório onde foram transferidas para uma câmara contendo o mesmo gás. Após a diluição, cada solução da amostra foi semeada em caldo BHI e em placas com ágar, e incubados em anaerobiose e também em ambiente com gás carbônico 30% a 37°C. Microrganismos foram colhidos de duas das 10 amostras de cimento. Destes, foram identificados entre os anaeróbios estritos, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* e *Fusobacterium*; e um anaeróbio facultativo, *Campylobacter*. Bactérias também foram colhidas dos tecidos das lesões periapicais. Um total de 83 gêneros foi isolado dos tecidos periapicais, sendo a maior parte anaeróbios estritos (86%). Foram identificados os gêneros *Prevotella*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus* e *Streptococcus*. Os restantes, 13%, eram anaeróbios facultativos, incluindo espécies de *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e um coco Gram-positivo que não pôde ser identificado.

Gomes et al.<sup>54</sup> (1994) estudaram a associação de bactérias específicas com alguns sinais endodônticos e sintomas clínicos. Para isso, foi feito o exame microbiológico de 30 canais radiculares de pacientes que buscavam tratamento endodôntico; destes, 14 relacionados com sintomatologia dolorosa, 20 com sensibilidade à percussão, 23 com presença de exsudato, 7 relacionados a

edema, 5 com exsudato purulento e 4 com fístula. No total, foram encontradas 57 espécies bacterianas diferentes, e apenas 3 canais radiculares não estavam contaminados. Os anaeróbios estritos totalizaram 60% das espécies isoladas, sendo 23% facultativos. A correlação entre o aspecto clínico e o microbiológico foi observada particularmente com relação à sintomatologia dolorosa, onde os microrganismos anaeróbios foram isolados em 93% dos canais. Nos casos que não estavam relacionados com dor, a presença de microrganismos anaeróbios foi de apenas 53%. Espécies de *Prevotella* spp. foram isoladas em 64,2% dos casos com sintomatologia dolorosa e 12,5% dos casos sem este sintoma. De forma similar, *Peptostreptococcus* foram isolados de 71,4% dos canais radiculares de pacientes com dor, e 31,3% dos casos sem relato de dor. Os autores afirmam que existe uma associação significativa entre dor e a presença de *Prevotella* e *Peptostreptococcus* spp. no interior dos canais radiculares.

Socransky et al.<sup>171</sup> (1994) introduziram um novo método para identificação bacteriana que utiliza a hibridação de várias amostras de DNA simultaneamente, cruzando-as com um grande número de sondas de DNA na superfície de uma membrana de nylon. A técnica é denominada sondas genômicas de DNA e *checkerboard*, consiste na aplicação de DNA desnaturado de até 30 amostras, dispostas em canaletas horizontais. A membrana é girada 90° no mesmo aparelho, e em 30 canaletas verticais são introduzidas sondas de DNA marcadas. Onde houver hibridação do DNA, nas interseções amostra/sonda, evidencia a presença de determinada espécie. A técnica permite a determinação simultânea da presença de múltiplas amostras, através da realização de um único exame.

Assed et al.<sup>9</sup> (1996) avaliaram a presença de *Actinomyces viscosus*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* em materiais colhidos do interior de canais radiculares de dentes com polpa necrótica e com presença de lesão periapical visível radiograficamente. Para isso, após a colheita do material com cones de papel absorvente esterilizados, o material foi analisado através de imunofluorescência indireta. A reação foi positiva em 24 das 25 amostras, sendo que 14 foram positivas para *Actinomyces viscosus*, 12 para *Prevotella intermedia*, 10 para *Fusobacterium nucleatum* e 4 para *Porphyromonas*

*gingivalis*. A técnica de imunofluorescência indireta apresentou maior eficácia na detecção de bactérias anaeróbias de difícil crescimento, se comparada às técnicas de cultura.

Gomes et al.<sup>55</sup> (1996) procuraram avaliar se uma determinada combinação de bactérias específicas está associada com sinais e sintomas endodônticos. O método utilizado pelos autores foi semelhante ao estudo de 1994. Foi realizado o estudo microbiológico de 70 canais radiculares, onde o material colhido por meio de pontas de papel absorventes foi inoculado em quatro diferentes meios sólidos. O mesmo cone de papel também foi utilizado para inocular um meio semi-líquido, não seletivo para anaeróbios (Brewer's thioglycollate médium), empregado para otimizar a detecção de anaeróbios. Foram identificadas 65 espécies bacterianas diferentes, sendo que os microrganismos anaeróbios estritos totalizaram 64% das espécies isoladas, incluindo *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella oralis*, *Eubacterium aerofaciens*, *Eubacterium lentum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella buccae* e *Prevotella intermedia*. 23,1% dos microrganismos se tratavam de *Streptococcus*, sendo o grupo *milleri* o mais predominante. A dor estava associada com 37 dentes, e de todos os canais radiculares associados à sintomatologia dolorosa, foram colhidas colônias de microrganismos. Os anaeróbios foram isolados de 70,3% dos casos onde havia dor, e de apenas 29,7% dos canais não relacionados a este sintoma, confirmando a associação dos anaeróbios com a sintomatologia dolorosa. A presença de edema nos tecidos gengivais adjacentes aos dentes utilizados no estudo foi observada em 23 dos 70 casos, e esteve particularmente associada com a presença de *Eubacterium* spp., *Peptostreptococcus micros* e *Prevotella* spp. A combinação de *Peptostreptococcus micros* e *Prevotella* spp. foi encontrada em 9 dos 23 pacientes com aumento de volume gengival e apenas 8 dos 47 sem este sinal. 57 dos canais estudados continham exsudato, seja ele limpo, hemorrágico ou purulento. Estes canais estavam associados de forma significativa com a presença de *Prevotella* spp., *Eubacterium* spp., ou *Propionibacterium* spp. com predomínio dos microrganismos facultativos. A presença de exsudato parece

estar associada às seguintes combinações: *Prevotella* spp./ *Eubacterium* spp. e *Peptostreptococcus* spp./*Eubacterium* spp.

Ainda em 1996, Gomes et al.<sup>56</sup>, examinaram canais radiculares a fim de determinar a relação entre sintomas e sinais clínicos com determinadas espécies bacterianas. Para isso, utilizaram 70 canais radiculares, de onde colheram o material para cultura microbiológica. Do total de canais incluídos no estudo, 37 estavam associados com dor espontânea, 49 com dor à percussão, 23 com sinais de aumento de volume, 6 com drenagem de exsudato purulento. Espécies anaeróbias foram isoladas de 70,3% dos casos onde havia sintomatologia dolorosa, e de 29,7% dos casos onde não houve relato de dor. Foram encontradas associações significativas entre dor e a presença de *Prevotella* spp. ou peptostreptococci; dor à percussão e *Prevotella* spp. ou anaeróbios em geral; aumento de volume e *Eubacterium* spp. ou *Prevotella* spp. ou *Peptostreptococcus micros*; exsudato purulento e *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella loescheii*, *Streptococcus constellatus* ou *Bacteroides* spp. De acordo com estes resultados, foi demonstrada a relação existente entre os diferentes sinais e sintomas clínicos e determinadas espécies bacterianas.

Bae et al.<sup>10</sup> (1997) procuraram detectar *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* em infecções endodônticas utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida e lauril sulfato de sódio (SDS – PAGE) para a detecção das proteínas celulares destas bactérias, possibilitando assim, a diferenciação das duas espécies. Foram isoladas 56 cepas de bacilos produtores de pigmento negro provenientes de infecção endodôntica, previamente identificadas como *P. intermedia*. Através das diferenças de pesos moleculares, registrados em diferentes bandas no processo de gel-eletroforese, é possível distinguir as duas espécies. Das 56 cepas, 41 (73,2%) foram identificadas como *P. nigrescens* e 15 (28,8%) como *P. intermedia*.

A técnica de PCR para amplificação direcionada ao gene 16S rDNA foi utilizada por Conrads et al.<sup>37</sup> (1997) para detecção e diferenciação de bactérias em amostras colhidas de canais radiculares com polpas necróticas. Foram encontradas espécies do gênero *Actinomyces*, *Fusobacterium nucleatum*,

*Streptococcus milleri*, e presumidamente descrita pela primeira vez a espécie *Bacteroides forsythus*.

Vigil et al.<sup>193</sup> (1997) realizaram diagnóstico histológico e cultura microbiológica de 28 amostras colhidas do periápice radicular de casos resistentes ao tratamento endodôntico, e com indicação de cirurgia parendodôntica. Foram isoladas e identificadas bactérias destas lesões, além de testada sua susceptibilidade aos antibióticos mais comumente utilizados. Vinte e duas, das 28 lesões (79%), continham microrganismos. Dos 22 casos que exibiam culturas positivas, 15 eram polimicrobianos e 7 resultaram em culturas puras. Um total de 53 espécies diferentes foram isoladas, sendo 29 anaeróbios estritos, 19 anaeróbios facultativos e 5 aeróbios. Em apenas um caso foi possível observar microrganismos por meio da microscopia óptica. Os microrganismos mais comumente isolados foram *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus intermedius*, *Wollinella recta*, *Fusobacterium* e *Clostridium*. Os testes de sensibilidade aos antibióticos não demonstraram resistência das espécies avaliadas. Estes resultados corroboram com estudos anteriores a respeito da população microbiana das lesões periapicais refratárias ao tratamento endodôntico convencional.

Barthel et al.<sup>13</sup> (1997) se propuseram a avaliar a habilidade do hidróxido de cálcio em neutralizar a atividade biológica das endotoxinas, visto que este componente da parede das bactérias anaeróbias gram-negativas está relacionado com a patogênese das lesões periapicais resultantes dos canais radiculares infectados. O hidróxido de cálcio tem se mostrado um efetivo medicamento sobre estas infecções, reduzindo a população microbiana no interior do canal. Tem sido proposto que o efeito terapêutico do hidróxido de cálcio pode também resultar na desativação direta do LPS. Neste estudo, foi investigado o potencial tóxico do LPS da *Escherichia coli* e da sua associação ao hidróxido de cálcio. Foram utilizadas quatro diferentes concentrações de LPS de *Escherichia Coli* variando de 1-100 ng/mL de água destilada, incubadas em duplicata com 25 mg de hidróxido de cálcio ou somente com água destilada. As amostras do grupo controle eram de hidróxido de cálcio sem LPS, somente com água destilada. Monócitos foram colhidos do sangue periférico por centrifugação através de um

gradiente e laminação a uma determinada densidade. Os monócitos aderentes foram incubados por quatro dias a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> em meio M199. As diferentes soluções de LPS foram colocadas no poço no 5º dia, e depois de 4 horas o material foi colhido e quantitativamente analisado quanto à presença de TNF- $\infty$  usando um kit comercial ELISA. Os resultados demonstraram a habilidade do hidróxido de cálcio em eliminar a estimulação do LPS da *E. coli* na produção de TNF- $\infty$  pelos monócitos no sangue periférico.

A sensibilidade a antibióticos da microbiota de canais com polpas necrosadas foi avaliada por Le Goff et al.<sup>88</sup> (1997). Foram utilizados na amostra, 26 dentes unirradiculares com polpas necrosadas cujas coroas e raízes apresentavam-se intactas. No total, 84 cepas foram isoladas. O número de espécies por dente variou de 2 a 8, com predomínio de anaeróbios estritos. As espécies mais comumente encontradas foram *Bacteroides gracilis*, *Propionibacterium acnes*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella buccae* e *Eubacterium lentum*. Foi avaliada a sensibilidade de 38 cepas à amoxicilina, à amoxicilina associada ao clavulanato, e à tetraciclina. Para todas as cepas examinadas, as concentrações inibitórias mínimas encontradas foram baixas, e bem menores que a concentração plasmática efetiva para estes antibióticos.

Em 1997, Waltimo et al.<sup>194</sup> isolaram fungos do interior de 19 canais radiculares de dentes que apresentavam lesões periapicais resistentes ao tratamento endodôntico. Em 16 amostras foi isolada a espécie *Candida albicans*. As outras espécies isoladas, em frequência significativamente mais baixa, foram *Candida inconspicua*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii* e *Geotrichum candidum*. Em grande parte da amostra, bactérias Gram-positivas facultativas estavam associadas aos fungos, e em 5 casos, havia também a presença de anaeróbios estritos.

Uma vez provado que as lesões periapicais não são estéreis e que podem estar contaminadas por microrganismos oportunistas devido à comunicação com o meio bucal ou por um grupo restrito de anaeróbios facultativos, Abou-Rass e Bogen<sup>1</sup> (1998) se propuseram a investigar quais os microrganismos associados com lesões periapicais fechadas, associadas com

terapia endodôntica sem sucesso, e com calcificação pulpar. Os 13 pacientes examinados foram selecionados de 70 indivíduos que necessitavam cirurgia parendodôntica, 5 deles apresentavam sintomatologia, e 8 não. Todos os casos apresentavam evidências de radiolucências periapicais. Dois dentes anteriores estavam completamente calcificados ao exame radiográfico, e os outros 11 possuíam tratamento endodôntico com aspecto aceitável radiograficamente, com lesões refratárias associadas com uma das raízes. Um método bem controlado de cultura foi utilizado em todos os casos, e as amostras foram colhidas de três sítios distintos de cada cirurgia. As amostras retiradas da janela cirúrgica e que não faziam parte do corpo da lesão, serviram de controle. Em todos os 13 casos examinados, as amostras retiradas do ápice abrigavam microrganismos sendo 63,6% anaeróbios estritos, 36,4% facultativos. Quanto à prevalência de espécies isoladas, 31,8% eram *Actinomyces* spp., 22,7% *Propionibacterium* spp., 18,2% *Streptococcus* spp., 13,6% *Staphylococcus* spp., 4,6% *Porphyromonas gingivalis*, 4,6% *Peptostreptococcus micros* e 4,6% gram-negativos entéricos. Os resultados desta investigação indicam que mesmo as lesões periapicais fechadas, associadas a canais calcificados, ou a insucessos no tratamento endodôntico abrigam microrganismos. A inabilidade em erradicar todos os microrganismos do canal radicular durante o tratamento do sistema de canais radiculares, pode permitir a colonização bacteriana adicional do ápice radicular e dos tecidos periapicais, conseqüentemente evitando a reparação da região.

Molander et al.<sup>110</sup> (1998) avaliaram a microbiota de dentes com tratamento endodôntico, sendo 100 deles associados à lesão periapical, e 20 sem evidência de lesão periapical. Todos os casos haviam sido tratados endodonticamente há mais de 4 anos, caracterizando casos de insucesso. No entanto não apresentavam sintomas clínicos indicativos de periodontite apical aguda e o término apical da obturação estava situado nos 5 mm apicais radiculares. Na maior parte dos casos associados à lesão periapical, uma ou duas espécies bacterianas foram encontradas, sendo sua maioria constituída por anaeróbios facultativos, representando 69% do total de espécies. O crescimento bacteriano foi classificado como esparso ou muito esparso em 43% dos casos, e intenso ou muito intenso em 42%. Bactérias do gênero *Enterococcus* tiveram a

maior freqüência, apresentando crescimento intenso ou muito intenso em 78% das amostras. Nos dentes que não apresentavam evidência de lesão periapical, em 11 casos não houve crescimento bacteriano. Nas 9 amostras restantes, houve crescimento de 13 espécies bacterianas.

A presença de bactérias pigmentadas de negro em canais radiculares de dentes recém-extraídos que apresentavam necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente foi investigada por Dougherty et al.<sup>44</sup> (1998), que utilizaram métodos convencionais de cultura. Os dentes com radiolucências periapicais foram extraídos e imediatamente transferidos em *Reduced Transport Fluid* (RTF) para uma câmara de anaerobiose. Das 18 raízes, 12 (67%) apresentaram crescimento de bactérias pigmentadas de negro. Em 7 raízes, pôde ser detectada a presença de *Prevotella nigrescens* tanto na porção apical quanto cervical da raiz. Das 12 raízes infectadas por bactérias pigmentadas de negro, 6 apresentaram 2 espécies diferentes, sendo que em todos os casos uma delas se tratava de *P. nigrescens*. A espécie *P. melaninogenica* foi isolada de 5 segmentos coronários e 3 apicais. *Porphyromonas gingivalis* foi isolada em combinação com *P. nigrescens* de dois casos. Segundo os autores, a espécie mais comumente encontrada foi *P. nigrescens*.

Bogen e Slots<sup>22</sup> (1999), realizaram um estudo para determinar a freqüência de *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* em 20 lesões periapicais fechadas associadas com patologias endodônticas refratárias, sintomáticas e assintomáticas. Anteriormente à cirurgia parendodôntica, foram colhidas amostras de outros três sítios orais para a análise microbiológica: áreas subgengivais que exibiam inflamação gengival e profundidade de sondagem aumentada. As amostras da região periapical foram colhidas por meio de pontas de papel absorvente, durante os procedimentos cirúrgicos parendodônticos utilizando-se um método onde o risco de contaminação por microrganismos não-endodônticos fosse mínimo. As amostras de placa subgengival foram colhidas com pontas de papel absorvente de três bolsas periodontais e de uma bolsa presente no elemento dental que também apresentava a lesão periapical fechada. A saliva foi colhida da superfície do palato mole. A identificação bacteriana foi realizada utilizando-se o método de

detecção de espécies através da reação em cadeia de polimerase (PCR) baseada no gene 16S rRNA, com alto grau de sensibilidade na identificação de espécies bacterianas de difícil detecção pelas técnicas microbiológicas convencionais. Os autores não observaram *P. endodontalis* em nenhuma das lesões periapicais, mesmo 40% dos pacientes apresentando tais microrganismos nas amostras subgingivais. *P. gingivalis* estava presente em uma lesão periapical, associado com sintomatologia dolorosa moderada. *P. nigrescens*, *P. endodontalis* e *P. intermedia* não foram detectados em nenhuma das lesões periapicais avaliadas. Tais resultados demonstram a pouca freqüência de bastonetes anaeróbios produtores de pigmentos negros nas lesões periapicais fechadas.

Gonçalves e Mouton<sup>57</sup> (1999) avaliaram a prevalência de *Bacteroides forsythus* em canais radiculares com polpas necróticas e presença de lesão periapical visível radiograficamente. Foram examinados 11 canais radiculares, através de 4 técnicas. Através do método de PCR evidenciaram a espécie em um maior número de canais, 6/11. Pela técnica de *slot-blot*, 3/11; 5/11 pelo ELISA e 4/11 pela imunofluorescência.

Baumgartner et al.<sup>17</sup> (1999) avaliaram a presença de bactérias pigmentadas de negro em infecções endodônticas associadas com sinais e sintomas clínicos. As amostras microbiológicas foram colhidas de 40 canais radiculares com polpas necróticas e lesões periapicais visíveis radiograficamente. Para identificação das bactérias pigmentadas de negro, foram realizados procedimentos laboratoriais de cultura e de PCR com iniciadores específicos para o gene 16 rRNA. Vinte e duas (55%) amostras foram positivas para as bactérias pesquisadas. Destas, 11 de 22 (50%) foram identificadas como *P. nigrescens*, 8 de 22 (36%) como *P. intermedia*, 2 de 22 (9%) como *Porphyromonas gingivalis*, e 1 de 22 (5%) como *Prevotella melaninogenica*. Dezesesseis dos 22 canais radiculares que foram positivos para o crescimento de bactérias pigmentadas de negro estavam associados com casos de drenagem de exsudato purulento. Não foi possível demonstrar uma correlação significativa entre a presença de bactérias pigmentadas de negro e a ocorrência de sinais e sintomas clínicos.

Gonçalves et al.<sup>58</sup> (1999) colheram amostras de canais radiculares infectados e de biofilme microbiano subgingival de 10 pacientes sem lesões de cárie ou restaurações profundas. As amostras foram submetidas à cultura em anaerobiose para detecção de anaeróbios produtores de pigmento negro. Colônias de *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella nigrescens*, isoladas de 4 pacientes, foram identificadas pela amplificação PCR espécie-específica. A técnica AP-PCR ou RAPD com *primer* arbitrário foi realizada para examinar a diversidade genética dos microrganismos isolados, e não possibilitou a diferenciação de *P. gingivalis* e *P. nigrescens*. De acordo com os resultados observados pelos autores, os tecidos periodontais, e os canais radiculares podem ser colonizados pelos mesmos tipos clonais de anaeróbios produtores de pigmento negro.

Baumgartner et al.<sup>18</sup> (2000) investigaram a presença de *Candida albicans* em 24 amostras de canais radiculares infectados e de fluidos aspirados do interior de lesões periapicais. Através da técnica de PCR, a espécie *C. albicans* foi detectada em 5 das 24 amostras provenientes de canais radiculares (21%). Nas amostras aspiradas das lesões periapicais, a *C. albicans* não foi detectada.

Bonifácio<sup>23</sup> (2000), observou através da microscopia eletrônica de varredura a ocorrência do biofilme apical em todas as raízes de dentes de humanos portadores de lesões periapicais radiograficamente visíveis observadas em seu estudo. Este biofilme apical bacteriano estava em todos os casos, associado a áreas de reabsorção cementária, comuns na presença de lesão periapical crônica. Já os dentes portadores de polpas vitais, ou com polpas necróticas, porém sem lesão periapical visível radiograficamente apresentavam normalidade estrutural e ausência de biofilme bacteriano na região apical.

Siqueira Jr. et al.<sup>163</sup> (2000) examinaram o conteúdo de 28 canais radiculares utilizando 42 sondas de DNA e sondas genômicas de DNA e *checkerboard*. Para confirmar a presença de DNA bacteriano nas amostras, foi realizado um teste PCR com iniciadores específicos para o 16 sRNA comuns a maioria das espécies bacterianas. Pelo método de *checkerboard*, 22 das 42

sondas utilizadas foram reativas com pelo menos uma das amostras. O número de espécies bacterianas em cada amostra foi em média de 4,7 espécies, variando de 1 a 17. Das 28 amostras, 17 foram positivas para pelo menos uma das sondas de DNA. As espécies mais prevalentes foram *Bacteroides forsythus* (39,3%), *Haemophilus aphrophilus* (25%), *Corynebacterium matruchotii* (21,4%), *Porphyromonas gingivalis* (17,9%) e *Treponema denticola* (17,9%). Os métodos baseados na biologia molecular podem fornecer conhecimento adicional a respeito da microbiota endodôntica uma vez que permitem a detecção de bactérias que não são facilmente identificadas através das técnicas convencionais de cultura.

Gatti et al.<sup>53</sup> (2000) identificaram por meio de DNA-DNA *hibridization* as espécies bacterianas presentes em lesões periapicais assintomáticas. Além disso, foram comparadas duas formas cirúrgicas distintas observando a inclusão de bactérias no interior da lesão durante o procedimento cirúrgico. Os pacientes selecionados para o estudo apresentavam periodontite apical assintomática e tinham sido indicados para cirurgia parendodôntica. As incisões foram feitas de forma intrasulcular mucoperiosteal ou submarginal. Em todas as amostras foi detectado DNA bacteriano. Sete sondas de DNA para *Bacteroides fragilis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter concisus*, *Capnocytophaga ochracea*, *Campylobacter sputorum* ss *sputorum*, *Selonomus noxia*, e *Porphyromonas endodontalis*) foram negativas em todas as lesões. Sete sondas para *Campylobacter gracilis*, *Eikenella corrodens*, *Streptococcus gordonii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter curvis*, *Campylobacter gingivalis* e *Campylobacter showae* foram positivas para as amostras obtidas após incisão intrasulcular, mas não foram reativas quando utilizada a incisão submarginal. Duas sondas foram positivas quando as amostras foram obtidas após incisão submarginal, mas não quando foi utilizada a técnica intrasulcular (*Actinomyces odontolyticus* e *Prevotella nigrescens*). Apenas as espécies *Bacteroides forsythus* e *Actinomyces naeslundii* estavam presentes em um grande número, independente da técnica de incisão utilizada.

Sunde et al.<sup>178</sup> (2000) realizaram um estudo a fim de identificar as bactérias presentes em lesões periapicais de dentes que não apresentavam

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

Oliveira et al.<sup>122</sup> (2000) verificaram a ocorrência de *Porphyromonas endodontalis* em infecções endodônticas, sintomáticas ou assintomáticas, através da técnica PCR. Em 17 dos 43 casos avaliados (39,5%) a espécie foi detectada. Dos 6 casos diagnosticados como abscesso periapical agudo, 4 apresentaram *P. endodontalis* (66,7%) enquanto nos demais casos, a espécie foi detectada em 13 dentes (35,1%). A presença de *P. endodontalis* estava associada à lesão periapical assintomática em 6 casos (25%) e em 10 dentes com sensibilidade à percussão (52,6%). A espécie foi detectada em um caso assintomático e sem evidência de lesão periapical. Pôde-se observar uma maior prevalência de *P. endodontalis* nos casos sintomáticos.

Ribeiro e Consolaro<sup>134</sup> (2000), através do método de coloração Brown & Brenn, procuraram evidenciar bactérias nas estruturas mineralizadas de dentes com necrose pulpar e granuloma periapical. Os autores relataram maior concentração de bactérias nos canais principais e acessórios, seguidos dos túbulos dentinários, cimento e granulomas. Os autores destacaram a presença de biofilme na região apical de todos os elementos dentários.

Peters et al.<sup>126</sup> (2001) realizaram um estudo para determinar a presença bacteriana nos túbulos dentinários de dentes com lesão periapical. Dentes com evidência radiográfica de lesão periapical e sem doença periodontal foram extraídos. As amostras foram obtidas de duas localizações distintas:

Amsterdã e Glasgow. Logo após as extrações, os dentes foram mantidos em RTF para que fossem transportados até o laboratório de microbiologia. A dentina radicular de 20 dentes foi examinada por meio de cultura microbiológica em três localizações entre a polpa e o cimento (A, B e C). Além disso, foram examinados histologicamente áreas de dentina de 8 dentes. Usando a técnica de cultura, bactérias foram encontradas em 77% das amostras de dentina das amostras de Amsterdã e 87,5% das de Glasgow. Na camada mais profunda de dentina (camada C), foram detectadas bactérias em 62% das amostras de dentina. Um total de 50000 UFC/mg de dentina, ou mais, foi encontrada em aproximadamente 25% das amostras da camada C. Nas camadas mais próximas à polpa, um maior número de bactérias anaeróbias e de bacilos Gram-positivos foram encontrados, assim como uma maior diversidade de espécies bacterianas. Os cortes histológicos demonstraram penetração bacteriana nos túbulos dentinários em 5 dos 8 dentes examinados. Nos outros 3 dentes, onde não houve evidência histopatológica de penetração de bactérias nos túbulos dentinários, o número de UFC/mg observado pelo método de cultura foi <10000. Estes resultados comprovaram a ocorrência de células bacterianas nas camadas mais profundas de dentina, na maior parte dos dentes acometidos por necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente.

Jung et al.<sup>74</sup> (2001) procuraram identificar espécies de espiroquetas originárias de infecções endodônticas e determinar sua associação com *Bacteroides forsythus* e *Porphyromonas gingivalis* em dentes portadores de lesão periapical visível radiograficamente. Para isso, foram colhidas amostras do conteúdo dos canais radiculares de 79 dentes, e realizada análise através do método PCR para amplificação do gene 16 rRNA. Foi realizada também hibridação com 8 sondas de oligonucleotídeos espécie-específicas. A espécie mais freqüentemente detectada foi *P. gingivalis* seguido de *Treponema maltophilum*, *Bacteroides forsythus* e *Treponema socranskii*. Foram observadas associações entre *T. maltophilum*, *B. forsythus* e *P. gingivalis*.

Siqueira Jr. et al.<sup>159</sup> (2001) investigaram a presença de bacilos anaeróbios produtores de pigmento negro em infecções endodônticas através do método PCR 16S rDNA. Foram colhidas amostras de 54 dentes infectados de

humanos, sendo que 10 deles foram diagnosticados como abscesso dento-alveolar agudo. Bactérias anaeróbias pigmentadas de negro foram detectadas em 59,3% das amostras e mais de uma espécie foi observada em 12 casos. Da totalidade de amostras, 42,6% apresentaram *P. endodontalis*; 27,8% *P. gingivalis*; 7,4% *P. nigrescens*; e 5,6% *P. intermedia*. Analisando separadamente os casos de abscesso dento-alveolar agudo, as espécies bacterianas foram encontradas nas seguintes proporções: *P. endodontalis* 70%, *P. gingivalis* 40% e *P. intermedia* 10%. Nestes casos, não houve evidenciação de *P. nigrescens*.

Rôças et al.<sup>137</sup> (2001) procuraram determinar a associação entre os microrganismos *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, conhecidos patógenos periodontais na microbiota endodôntica. Através de biologia molecular foram estudados 50 canais radiculares de dentes sem vitalidade pulpar e com lesão periapical. O DNA das amostras foi extraído e examinado por PCR. Em 33 casos, foi encontrado pelo menos um dos microrganismos investigados. *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Bacteróides forsythus* foram detectados em 44%, 30% e 20% dos casos respectivamente. Os três microrganismos foram identificados em conjunto em 4 casos.

Siqueira Jr. et al.<sup>157</sup> (2001) procuraram detectar a presença de *Treponema denticola* em 54 canais radiculares com necrose pulpar por meio do método de PCR. Os resultados demonstraram a presença de *T. denticola* em 10 dos 29 casos assintomáticos (34,5%), 8 dos 15 canais com dor à percussão (53,3%), e 5 dos 10 casos de abscesso periapical agudo (50%). Em geral, *T. denticola* estava presente em 23 dos 54 casos (42,6%).

Peciuliane et al.<sup>125</sup> (2001) determinaram a ocorrência e o papel dos fungos, dos bacilos entéricos gram-negativos e das espécies de *Enterococcus* em dentes tratados endodonticamente, e que apresentavam lesão periapical visível radiograficamente. As amostras para processamento microbiológico foram colhidas antes e depois do preparo biomecânico que se seguiu à desobturação dos canais. Inicialmente, microrganismos foram isolados de 33 dos 40 canais utilizados no estudo. Fungos foram observados em 6 amostras, e em 3 delas

estavam associados a *E. faecalis*. Bacilos entéricos (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*) estavam presentes em 3 amostras e *Enterococcus faecalis* em 21 das 33 amostras positivas para o crescimento de microrganismos. Após o preparo biomecânico, 10 canais permaneceram com culturas positivas, a maioria para os casos onde não foi utilizado o hidróxido de cálcio como curativo de demora.

Siqueira Jr. e Lopes<sup>151</sup> (2001), examinaram a presença de bactérias na superfície radicular apical de dentes associados a lesões periapicais crônicas. Vinte e sete dentes extraídos, com lesões ligadas aos tecidos radiculares no momento da extração foram selecionados para este estudo. As lesões foram removidas e a porção apical da raiz foi seccionada para exame em microscopia eletrônica de varredura. As células bacterianas foram observadas na maioria das vezes próximas ao forame apical, mas restritas ao canal radicular. Foram observados cocos e bacilos. Em um espécime havia um denso agregado bacteriano composto principalmente por bacilos, circundando o forame apical externamente.

Hashimura et al.<sup>63</sup> (2001) procuraram por meio do método de PCR três espécies de difícil crescimento pelas técnicas de cultura: *Slackia exigua*, *Mogibacterium timidum* e *Eubacterium saphenum*. Iniciadores espécie-específicos foram preparados de acordo com a seqüência 16S rDNA. Um total de 36 amostras clínicas foi obtido, sendo 7 casos de pulpíte, 17 de canais durante a primeira sessão do tratamento endodôntico, e 12 de retratamentos endodônticos. Dos 7 casos de pulpíte, apenas 2 casos foram positivos para *S. exigua* e *M. timidum*. Dos 17 casos onde estava sendo realizado o tratamento endodôntico, 7 foram positivos para *S. exigua*, 12 para *M. timidum* e 4 casos para *E. saphenum*. Dos 12 casos de retratamento, 3 eram positivos para *S. exigua* e *M. timidum*, e dois casos para *E. saphenum*.

Lana et al.<sup>87</sup> (2001) avaliaram a microbiota de 31 canais radiculares de pacientes com polpas necrosadas. Em 22 casos, a coroa dentária estava fechada, e em 9 já havia comunicação da câmara pulpar com a cavidade bucal. Foram realizadas 3 colheitas em cada canal radicular: a primeira logo após a

abertura coronária, com o auxílio de um cone de papel absorvente introduzido nos canais; a segunda, após a instrumentação com limas manuais, irrigação com hipoclorito de sódio, e colocação de um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio por 7 dias; e a terceira colheita foi realizada através de um cone de papel absorvente no final da segunda sessão, que permaneceu no interior dos canais por mais 7 dias, quando foi então, realizada a obturação. Anaeróbios estritos e facultativos, aeróbios e fungos foram detectados em 24, 14, 5 e 2 amostras clínicas iniciais respectivamente. Os gêneros mais freqüentes foram *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* e *Peptostreptococcus* entre as bactérias, e *Candida* e *Saccharomyces* para os fungos. Foi encontrada também, uma relação significativa entre *Clostridium* e *Prevotella* e entre *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium*. Na segunda colheita, mesmo após a instrumentação e o uso de um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio, microrganismos facultativos foram isolados em 2 canais radiculares, e fungos em 3. Na terceira colheita, foram isolados microrganismos de 7 canais radiculares, na sua maioria anaeróbios facultativos. Segundo o autor, estes resultados demonstram o caráter polimicrobiano das infecções endodônticas, e a dificuldade de eliminação dos microrganismos mesmo após o tratamento endodôntico.

Fouad et al.<sup>50</sup> (2002) utilizaram genes 16S rRNA a partir de genes provenientes do gênero *Enterococcus* para identificar patógenos bacterianos em canais radiculares com polpas necrosadas. Investigaram também as associações entre estes microrganismos com sintomas e com história de diabetes mellitus. Para esta análise foi colhido o conteúdo de 24 canais radiculares de dentes com polpas necrosadas, e utilizada a técnica PCR com iniciadores universais. Foi possível identificar DNA bacteriano em 22 espécimes. A sintomatologia dolorosa estava relacionada à presença de *Streptococcus* spp. Os autores observaram ainda uma relação não significativa entre a presença de sintomatologia e a ocorrência de *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*, assim como para a presença de *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis* associadas à história de diabetes mellitus. Em uma amostra, foi detectado um

microrganismo relacionado ao gênero *Olsenella*, jamais descrito em infecções endodônticas.

Também em 2002, Poliseli Neto<sup>132</sup> comparou radiográfica e microbiologicamente diferentes métodos de indução experimental de lesões periapicais em dentes de cães, apresentando como variáveis o selamento da abertura coronária e o arrombamento do ápice radicular. Foram utilizados 58 canais radiculares, divididos em 4 grupos. Nos dois primeiros, os canais foram expostos ao meio bucal por 7 dias e após este período selados como cimento de óxido de zinco e eugenol por 53 dias. Nos outros 2 grupos, os canais permaneceram abertos por 180 dias. Nos grupos I e III não foi realizado o arrombamento do ápice radicular, sendo o mesmo realizado nos grupos II e IV. Ao final dos períodos de indução das lesões, foi realizada a colheita do material do canal, para cultura microbiológica. O número de células bacterianas foi maior nos grupos onde os canais permaneceram expostos por todo o período experimental ( $p < 0,05$ ). Para as duas técnicas no entanto, a proporção de microrganismos, com maior número de anaeróbios em relação aos aeróbios foi mantida. A avaliação radiográfica demonstrou que as áreas radiolúcidas foram semelhantes, independente do grupo experimental ( $p > 0,05$ ).

Sunde et al.<sup>177</sup> (2002) investigaram a microbiota periapical de 36 casos de lesão periapical refratária ao tratamento endodôntico. Foram incluídos no estudo, os casos que não responderam positivamente ao tratamento endodôntico após o uso de uma pasta de hidróxido de cálcio durante 6 meses, com trocas periódicas do curativo de demora. Durante o procedimento de apicectomia, foram colhidas as amostras da região periapical, por meio de cones de papel absorvente esterilizados, e curetagem dos tecidos da região afetada. O material foi transferido para tubos contendo meio de transporte, e foi realizada cultura e análise em microscopia eletrônica. Por meio de cultura microbiológica, 35, das 36 amostras apresentaram crescimento positivo, sendo 33 polimicrobianas. Foram identificadas 67 espécies bacterianas diferentes, sendo 51% espécies anaeróbias estritas. O número de espécies isoladas para cada lesão variou de 1 a 11, com uma média de 4,1 espécies por lesão. Foram observadas por meio de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, 9

lesões, onde foram observados macroscopicamente grânulos. Nessas lesões, foram observados bacilos e filamentosos, além de material amorfo entre as células bacterianas.

Siqueira Jr. et al.<sup>162</sup> (2002) avaliaram a prevalência das espécies de *Actinomyces*, *Streptococcus*, e *Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas primárias utilizando o *checkerboard DNA-DNA hybridization*. As amostras foram colhidas de 53 canais radiculares infectados, entre os quais 27 casos foram diagnosticados como abscesso periapical agudo. O DNA foi extraído e avaliada a presença de 13 diferentes espécies bacterianas usando sondas genômicas de DNA. Todas as amostras continham células bacterianas, como foi demonstrado pela técnica de PCR, realizada previamente à hibridação. O ensaio de sondas genômicas de DNA e *checkerboard* permitiu a detecção de *Streptococcus* em 22,6% das amostras, espécies de *Actinomyces* em 9,4%, e de *Enterococcus faecalis* em 7,5%. As espécies mais prevalentes foram do grupo dos *Streptococcus anginosus*. Com relação às lesões assintomáticas, as espécies mais prevalentes foram *S. intermedius*, *E. faecalis*, em 11,5% dos casos cada, e *S. anginosus* em 7,7%. Nos casos onde havia a presença de supuração, a espécie mais prevalente foi *S. constellatus*, presente em 25,9% das amostras. As outras espécies mais prevalentes nos casos de abscesso foram *A. gerencseriae* (14,8%), *S. gordonii* (11,1%), *S. intermedius* (11,1%), *A. israelii* (7,4%), *S. anginosus* (7,4%). A única espécie cuja presença pôde ser relacionada à ocorrência de abscesso periapical agudo foi a *S. constellatus*.

Moraes et al.<sup>114</sup> (2002) compararam a eficácia da técnica de cultura bacteriana, do PCR dirigido ao gene 16S rDNA e das sondas genômicas de DNA e *checkerboard* para detecção de *Fusobacterium nucleatum* em 36 dentes com canais radiculares infectados e presença de lesão periapical. Somando os resultados dos 3 métodos, a espécie *F. nucleatum* estava presente em 4 dos 13 dos canais radiculares examinados (31%). A técnica de PCR detectou a espécie *F. nucleatum* em 15,4% dos canais radiculares, a técnica de cultura também em 15,4%, e as sondas genômicas de DNA e *checkerboard* em 10% da amostra. Não foi possível observar diferença significativa na efetividade das técnicas avaliadas.

Oliveira et al.<sup>121</sup> (2002), avaliaram a incidência de *Porphyromonas endodontalis* em dez casos de abscessos perirradiculares agudos. Para a detecção dos microrganismos, foi utilizada a técnica de PCR, direcionada para o rDNA, fração 16S. A *P. endodontalis* foi detectada em 7 dos 10 casos avaliados (70%).

A presença de biofilme bacteriano na superfície externa de ápices radiculares foi estudada por Leonardo et al.<sup>93</sup> (2002). Foram utilizadas raízes de dentes recém extraídos, com vitalidade pulpar, e sem vitalidade pulpar, com ou sem lesão periapical visível radiograficamente. Os 3mm apicais das raízes foram examinados em microscopia eletrônica de varredura, e observada a presença de microrganismos, de reabsorção cementária e de biofilme. Não foi possível observar microrganismos ou áreas de reabsorção cementária nos espécimes que apresentavam vitalidade pulpar ou necrose pulpar sem lesão visível radiograficamente. No entanto, os microrganismos estavam presentes em todos os ápices onde havia presença de lesão periapical visível radiograficamente. Nestes casos, foram observados cocos, bacilos, e filamentos, além de biofilme e reabsorção do cimento.

Peters et al.<sup>127</sup> (2002) avaliaram as bactérias encontradas em infecções endodônticas de dentes portadores de lesões periapicais crônicas sem sintomatologia ou sinais clínicos. Amostras do conteúdo de 58 canais radiculares foram cultivadas em anaerobiose, e os microrganismos contados e classificados. Todas as amostras apresentaram crescimento bacteriano, com uma média de  $8 \times 10^4$  ufcs/mL<sup>-1</sup> por amostra. Microrganismos anaeróbios estritos representaram 87% de toda a amostra. A espécie bacteriana mais prevalente foi *Prevotella intermedia*, presente em 33% dos canais radiculares analisados, *Peptostreptococcus micros*, em 29% dos canais, e *Actinomyces odontolyticus*, em 19%. Foi possível observar uma relação entre *P. intermedia* e *P. micros*, e entre *P. intermedia* e *P. oralis*, *A. odontolyticus* e *P. micros*, *Bifidobacterium* spp. e *Veillonella* spp. De acordo com os resultados observados, os autores concluíram que os patógenos responsáveis por patologias endodônticas não infectam os canais radiculares de forma randômica, mas são encontrados em combinações específicas.

Nelson-Filho et al.<sup>119</sup> (2002) realizaram uma avaliação radiográfica do efeito nos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães da endotoxina bacteriana, associada ou não ao hidróxido de cálcio. Após a remoção do tecido pulpar, as raízes foram divididas em grupos e foram preenchidas com endotoxina bacteriana de *Escherichia coli* (grupo 1), endotoxina acrescida de pasta de hidróxido de cálcio (grupo 2), solução salina (grupo 3), no último grupo os canais foram expostos ao meio bucal para contaminação por 5 dias, e tiveram em seguida suas coroas seladas, induzindo desta forma a formação de lesões periapicais. Após 30 dias, foram realizadas tomadas radiográficas e as imagens comparadas com as obtidas anteriormente ao início do experimento. As 20 raízes do grupo 1, onde foi utilizado o LPS apresentaram lesões periapicais visíveis radiograficamente com perda da integridade da lâmina dura e áreas bem delimitadas de reabsorção óssea periapical. No grupo 2, onde o LPS foi acrescido de hidróxido de cálcio, 17 raízes apresentavam lâmina dura intacta e não havia áreas de reabsorção óssea periapical. Nas outras 3 raízes do grupo 2, foi observado apenas um aumento do espaço do ligamento periodontal. No grupo 3, apenas 1 das raízes apresentou espessamento do espaço do ligamento periodontal, sendo que nos outros casos, o aspecto apical e periapical eram normais. No grupo 4, houve formação de lesão periapical visível radiograficamente em todas as raízes. Tais resultados demonstram a capacidade da endotoxina bacteriana em induzir a reabsorção óssea periapical, e a propriedade do hidróxido de cálcio, quando associado à endotoxina, de inibir esta indução.

Siqueira Jr. et al.<sup>158</sup> (2002) investigaram o padrão de colonização microbiana em canais radiculares relacionados com lesões periapicais crônicas, por meio do microscópio eletrônico de varredura. Quinze dentes extraídos com extensas lesões de cárie, que apresentavam lesões radiolúcidas relacionadas com seus ápices, foram selecionados para o estudo. Após a fixação em glutaraldeído 2,5% em solução tampão de cacodilato, as lesões periapicais foram removidas e os dentes seccionados longitudinalmente em 2 metades. Os espécimes foram então desidratados, receberam uma cobertura de liga áurea, e foram examinados por meio de um microscópio eletrônico de varredura. Todos os

canais radiculares examinados estavam infectados, e as células bacterianas puderam ser observadas em praticamente todas as áreas do sistema de canais radiculares. O padrão de colonização bacteriana não foi uniforme entre os espécimes e mesmo em um mesmo espécime. A maior parte das paredes dos canais radiculares de todas as raízes estava colonizada por uma microbiota composta por cocos e/ou bacilos, freqüentemente formando colônias mistas. Espiroquetas foram ocasionalmente observadas isoladamente, ou em pequenos cachos, sempre localizadas entre as outras formas bacterianas. Foi possível observar com freqüência penetração bacteriana nos túbulos dentinários. Bactérias puderam ser observadas alcançando até 300 µm da profundidade dos túbulos em alguns espécimes. Células fúngicas estavam presentes em um dos espécimes, juntamente com as colônias bacterianas. A propagação bacteriana por todo o sistema de canais radiculares dos dentes associados a lesões periapicais sugerem que medidas terapêuticas apropriadas são necessárias para eliminar completamente a infecção do sistema de canais.

Souza<sup>173</sup> (2003) avaliou a prevalência de 51 espécies bacterianas em canais radiculares de dentes com necrose pulpar e lesão periapical crônica através da técnica de biologia molecular *checkerboard DNA-DNA hybridization*, além de observar a capacidade do hidróxido de cálcio em eliminar estes microrganismos. Previamente ao tratamento endodôntico, foram realizadas as colheitas do material do interior dos 12 canais radiculares incluídos na amostra, e novamente, no momento da obturação dos canais, após 14 dias de medicação intracanal. Os resultados demonstraram a presença de microrganismos em todas as amostras, com uma maior prevalência de *Fusobacterium nucleatum* ss. *vincentii* (100%), *Capnocytophaga sputigena* (90%), *Streptococcus constelatus* (80%), *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella melaninogenica* (75%), com uma redução significativa na prevalência e nos níveis de detecção nas amostras pós-terapia endodôntica.

Pinheiro et al.<sup>128</sup> (2003) identificaram a microbiota dos canais radiculares em canais radiculares de dentes com tratamento endodôntico e lesões periapicais persistentes, e determinaram a associação das diferentes espécies com as características clínicas dos casos examinados. Foram selecionados para

o estudo, 60 dentes tratados endodonticamente e que demonstravam evidência radiográfica de lesão periapical. A maioria dos dentes (90%) havia recebido o tratamento endodôntico há mais de 4 anos. A remoção do material obturador foi realizada utilizando-se brocas Gates-glidden e limas endodônticas, sem o uso de solventes químicos, e irrigação apenas com solução salina. O material para análise microbiológica foi colhido por meio de cones de papel absorvente esterilizados, levados em todo o comprimento do canal radicular. O material foi colhido sob fluxo de gás nitrogênio e os cones foram transferidos imediatamente para um meio de transporte, o VMGA III, e levados a uma câmara de anaerobiose. A partir daí, foi realizado o isolamento e a identificação das espécies bacterianas. Foram detectados microrganismos em 51 dentes. Das espécies isoladas, 57,4% eram anaeróbios facultativos, e 83,3% microrganismos Gram-positivos. *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana encontrada com maior frequência. Anaeróbios estritos representaram 42,6% das espécies e o gênero mais frequentemente isolado foi o *Peptostreptococcus*, que pôde ser associado com sintomas clínicos. Associação significativa também pôde ser observada entre: dor ou história de dor e infecções polimicrobianas ou anaeróbios; reação à percussão e as espécies *Prevotella intermedia/P. nigrescens*; canais radiculares comunicando-se com o meio bucal e a presença de *Streptococcus* spp. ou *Cândida* spp. De acordo com os resultados deste estudo, a microbiota dos canais radiculares com lesões periapicais refratárias ao tratamento endodôntico é limitada a um número pequeno de espécies predominantemente Gram-positivas. Anaeróbios facultativos, especialmente *E. faecalis*, foi a espécie isolada com maior frequência, no entanto, infecções polimicrobianas e anaeróbios estritos foram comumente encontrados em canais radiculares de dentes que apresentavam sintomatologia.

A prevalência de *Treponema socranskii* em infecções endodônticas foi investigada por Siqueira Jr. e Rôças<sup>149</sup> (2003) por meio do *nested* PCR. As amostras foram colhidas de 60 canais radiculares com necrose pulpar e diferentes patologias periapicais. O DNA extraído das amostras foi inicialmente amplificado por meio de iniciadores universais 16S rDNA. Uma segunda amplificação, desta vez com os produtos do PCR, foi realizada para detectar um fragmento específico

do *T. socranskii* 16S rDNA. *T. socranskii* foi detectado em 11 dos 28 casos assintomáticos (39,3%), 5 dos 12 canais associados com periodontite apical aguda (41,7%), e 5 dos 20 casos diagnosticados como abscesso periapical agudo (25%). Não foi possível observar relação entre a presença de *T. socranskii* e a ocorrência de sintomatologia. Em geral, esta espiroqueta foi detectada em 21 das 60 amostras (35%).

Rôças et al.<sup>135</sup> (2003) investigaram a presença de espécies de *Treponema* em infecções endodônticas primárias usando o *nested PCR*. As amostras foram obtidas do interior de 32 canais radiculares. Vinte e dois casos apresentavam lesões periapicais crônicas assintomáticas, e 10 casos assintomáticos foram diagnosticados como periodontite apical aguda. O DNA extraído das amostras foi inicialmente amplificado usando iniciadores universais 16S rDNA. Uma segunda amplificação usou os produtos PCR para detectar um fragmento específico do 16S rDNA de cada uma das espécies de *Treponema* investigadas (*T. denticola*, *T. socranskii*, *T. vincentii* e *T. pectinovorum*). Em todas as amostras, havia a presença de bactérias. *T. denticola* foi detectada em 77,3% dos casos assintomáticos, *T. socranskii* em 40,9%, *T. vincentii* em 18,2% e *T. pectinovorum* em 13,6%. Nos casos diagnosticados como periodontite apical aguda, *T. denticola* foi detectado em 80% dos canais radiculares, enquanto *T. socranskii* e *T. vincentii* foram detectados em 40% e em 10% dos casos, respectivamente. *T. pectinovorum* não foi observado nos casos sintomáticos. No geral, o *nested PCR* demonstrou a presença de *T. denticola* em 78,1% dos casos, *T. socranskii* em 40,6%, *T. vincentii* em 15,6% e *T. pectinovorum* em 9,4%. Pelo menos uma das quatro espécies de *Treponema* foi encontrada em 84,4% dos casos examinados. As espécies de *T. denticola* foram observadas em um grande número de casos examinados e a prevalência de *T. socranskii* também foi relativamente alta. As espécies *T. vincentii* e *T. pectinovorum* também foram encontradas, porém em um menor número de casos. Baseado nestes dados, pela reconhecida patogenicidade destes microrganismos e pelo seu envolvimento nas patologias dos tecidos bucais, estes devem ser reconhecidos como supostos patógenos endodônticos.

Chávez de Paz et al.<sup>32</sup> (2003) realizaram um estudo a fim de determinar se há um padrão para a persistência de colonização bacteriana após o preparo biomecânico de canais radiculares de dentes com reações periapicais. Foram colhidas amostras de 200 canais radiculares, onde especialistas e clínicos gerais já haviam realizado a primeira sessão do tratamento endodôntico. Todos os dentes incluídos no estudo apresentavam evidências clínicas e/ou radiográficas. Um total de 248 espécies foi isolado, e houve crescimento bacteriano em 107 amostras, com predomínio de microrganismos Gram-positivos (85%). *Lactobacillus* spp. (12%), *Streptococcus* (18%) e *Enterococcus* spp. (12%) foram as espécies mais comumente isoladas. Estes resultados sugerem que as espécies encontradas comumente sobrevivem mesmo após o preparo biomecânico.

Siqueira Jr. et al.<sup>156</sup> (2003) realizaram um estudo a fim de detectar, por meio do método de PCR a espécie *Peptostreptococcus micros* em infecções endodônticas primárias. As amostras foram colhidas de 50 casos de lesões periapicais crônicas assintomáticas, periodontite apical aguda e abscesso periapical agudo. O DNA extraído das amostras foi amplificado utilizando o ensaio PCR, reproduzindo um fragmento do *P. micros* 16S rDNA. *P. micros* foi detectado em 6 dos 22 canais radiculares associados com lesões periapicais assintomáticas (27,3%), em 2 dos 8 canais com periodontite apical aguda (25%), e em 6 dos 20 casos de abscesso periapical agudo (30%). Considerando o total da amostra, *P. micros* foi encontrado em 14 casos (28%). Não houve, portanto, correlação entre a presença de *P. micros* e a ocorrência de sintomatologia. Os achados sugerem que o *P. micros* pode estar envolvido na patogênese de diferentes formas de lesões periapicais.

Siqueira Jr. e Rôças<sup>154</sup> (2003) investigaram a ocorrência de *Campylobacter gracillis* e *Campylobacter rectus* em infecções endodônticas primárias utilizando o método de PCR. As amostras foram colhidas de 57 canais radiculares com polpas necróticas e evidência de reação periapical. Foram incluídos na amostra, 28 casos de lesão periapical crônica, 12 casos de periodontite apical aguda e 17 casos de abscesso periapical agudo. O DNA foi extraído das amostras e inicialmente amplificado usando um primer universal 16S

rDNA. Uma segunda amplificação foi realizada, desta vez utilizando os produtos do PCR para detectar especificamente o *C. gracilis* ou *C. rectus* nas amostras. Estas duas espécies foram detectadas em 21,4 (6 de 28) e 30% (6 de 20) dos canais radiculares associados a lesões periapicais assintomáticas. *Campylobacter gracilis* foi encontrado em 16,7% (2 de 12) dos casos diagnosticados como periodontite apical aguda, enquanto *Campylobacter rectus* foi encontrado em 33,3% (2 de seis casos). Nos abscessos periapicais agudos, *C. gracilis* e *C. rectus* foram detectados em 23,5 (4 de 17) e 11,8% (2 de 17) dos casos, respectivamente. Nenhuma associação das espécies com a sintomatologia clínica foi observada ( $p > 0,01$ ). Considerando toda a amostra, *C. gracilis* foi observada em 21,1% e *C. rectus* em 23,3% das amostras colhidas dos canais radiculares. Estes achados confirmam a participação das espécies *C. gracilis* e *C. rectus* nas infecções endodônticas primárias.

Siqueira Jr. e Roças<sup>161</sup> (2003), utilizaram o método de PCR para investigar a ocorrência da espécie *Pseudoramibacter alactolyticus* em canais radiculares não tratados endodonticamente, infectados, associados com lesões periapicais assintomáticas ou pericementite apical e em amostras de pus colhidas de abscessos periapicais agudos. O DNA foi extraído das amostras e inicialmente amplificado utilizando iniciadores universais. Uma segunda amplificação foi realizada usando os produtos do PCR, a fim de detectar um fragmento específico de *P. alactolyticus* 16S rDNA. Foi possível detectar a espécie *P. alactolyticus* em 76% das amostras dos canais radiculares dos canais associados com lesões periapicais crônicas, em 60% das amostras dos canais associados com pericementite apical aguda, e em 32% das amostras de pus aspiradas dos abscessos periapicais agudos. Não foi determinada associação significativa da espécie com os sintomas clínicos. No geral, *P. alactolyticus* foi observada em 56% das amostras.

Siqueira Jr. e Rôças<sup>153</sup> (2003) estudaram a prevalência de *Bacteroides forsythus* em infecções endodônticas primárias usando o "Nested PCR". As amostras foram colhidas de 50 canais radiculares com diferentes formas de reação periapical. O DNA extraído das amostras foi inicialmente amplificado usando um primer universal. Em seguida, foi realizada uma segunda

amplificação, usando os produtos do PCR para identificar um fragmento específico do 16S rDNA do *Bacteroides forsythus*. Foi possível detectar *B. forsythus* em 13 dos 22 casos assintomáticos (59,1%), 4 dos 10 canais associados com periodontite apical aguda (40%), e 9 dos 18 casos diagnosticados como abscesso periapical agudo (50%). Não foi possível observar relação entre a presença de *B. forsythus* e a ocorrência de sintomatologia. Esta espécie foi detectada em 26 das 50 amostras colhidas dos canais radiculares (52%). Os resultados deste estudo confirmaram a associação do *B. forsythus* com infecções de origem endodôntica, e sugerem que a espécie pode estar envolvida na patogênese das diferentes formas de lesões periapicais.

Siqueira Jr. e Sen<sup>166</sup> (2004), estudaram o papel dos fungos nas infecções endodônticas, uma vez que estes microrganismos podem estar envolvidos na etiologia das doenças periapicais. Os fungos possuem a capacidade de se adaptar a uma variedade de condições ambientais, de se aderir a diferentes superfícies, de produzir enzimas hidrolíticas, formar biofilme e modular reações imunes do hospedeiro, que podem ter um papel significativo na patogenia das doenças periapicais. Os fungos têm sido observados também em infecções endodônticas primárias, mas têm sido isolados com maior frequência em casos já tratados endodonticamente, onde não houve sucesso após o tratamento. A espécie *Candida albicans* é de longe a mais comumente isolada dos canais radiculares infectados, possuindo alta afinidade com a dentina, onde normalmente se aloja. *C. albicans* também é resistente a alguns medicamentos utilizados como curativo de demora, o que explicaria sua freqüente associação com casos de falha no tratamento endodôntico. Algumas substâncias como o digluconato de clorexidina, ou as associações hidróxido de cálcio/paramonoclorofenol canforado e hidróxido de cálcio/clorexidina e o EDTA têm potencial para serem utilizadas como medicação intracanal efetiva nos casos de infecções endodônticas por fungos.

Roças et al.<sup>136</sup> (2004) estudaram a associação da espécie *Enterococcus faecalis* com diferentes formas de doenças periapicais. Esta espécie é ocasionalmente isolada de casos de infecção endodôntica primária, mas freqüentemente detecta em falhas de tratamento endodôntico. As amostras

foram colhidas de canais radiculares não tratados endodonticamente, associados com lesões periapicais crônicas assintomáticas, pericementite apical aguda ou abscesso periapical agudo; e de canais radiculares já tratados endodonticamente, associados a lesões periapicais crônicas assintomáticas. Foi realizada a extração do DNA das amostras, e para a identificação da espécie *E. faecalis*, foi utilizado a técnica de *nested* PCR. Foi possível a detecção de *E. faecalis* em 7 dos 21 canais radiculares associados com lesões assintomáticas, em 1 dos 10 canais associados com pericementite apical aguda, e em um dos 19 casos de abscesso periapical agudo. A análise estatística demonstrou que a espécie *E. faecalis* está significativamente mais associada com casos assintomáticos do que com as infecções com características agudas. *E. faecalis* foi detectada em 20 dos 30 casos de infecção endodôntica persistente pós-tratamento endodôntico. Quando comparadas as frequências desta espécie nos 30 casos de infecção persistente e nos 50 casos de infecção endodôntica primária, a análise estatística demonstrou uma forte associação do *E. faecalis* com as infecções persistentes.

Estudo de Moller et al.<sup>112</sup> (2004), demonstrou o papel de microrganismos na formação de lesões periapicais crônicas. Após a inoculação de canais radiculares de dentes de macacos com as espécies *Streptococcus milleri*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Prevotella oralis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Enterococcus faecalis*. Todas as cepas foram novamente isolados dos canais radiculares após o período de 8 e 12 meses, quando foi constatada também a ocorrência de reabsorção óssea visível radiograficamente. Foi possível observar a formação de lesão periapical crônica em mais de 96% dos canais radiculares. O tratamento endodôntico desses casos foi realizado sem o uso de um curativo de demora, e após o tratamento, foi observado que o preparo biomecânico reduziu, mas não eliminou a infecção dos canais radiculares. Além disso, de acordo com os resultados, os microrganismos anaeróbios facultativos foram mais resistentes que as bactérias anaeróbias à ação do preparo biomecânico.

Siqueira Jr. e Roças<sup>155</sup> (2004) investigaram a ocorrência de diversas espécies microbianas nos casos de infecções endodônticas persistentes pós-tratamento endodôntico por meio da técnica de PCR. As amostras foram colhidas

de 22 canais radiculares já tratados endodonticamente associados a lesões periapicais, com indicação de retratamento. Foi realizada a extração do DNA das amostras, e analisada a presença de 19 espécies microbianas. Todas as amostras foram positivas para pelo menos uma das espécies investigadas. *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais prevalente, detectada em 77% dos casos. Depois dela, as mais prevalentes foram as espécies de anaeróbios *Pseudoramirbacter alactolyticus* (52%), *Propionibacterium propionicum* (52%), *Dialister pneumosintes* (48%) e *Filifactor alocis* (48%). *Candida albicans* foi encontrada em 9% das amostras. O número médio de espécies foi 3, variando de 1 a 5, nos canais radiculares onde o limite da obturação ficou entre 0 e 2 mm do ápice radiográfico. Naqueles casos onde o limite apical da obturação foi maior que 2 mm, a média de espécies foi 5, variando de 2 a 11 espécies por canal radicular. Esta diferença foi estatisticamente significativa.

## 2.2 Reparação Apical e Periapical

Holland et al.<sup>70</sup> (1989) estudaram a influência do curativo de demora no processo de reparação em casos de dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical visível radiograficamente, após o emprego de um “plug” de raspas de dentina previamente à obturação dos canais radiculares. Após a indução de lesões periapicais em dentes de cães, os canais foram preparados e obturados com cones de guta-percha e cimento de óxido de zinco e eugenol, após a confecção de um “plug” apical de dentina, em sessão única, ou após o emprego de curativo de demora com paramonoclorofenol canforado. Foi realizada a preservação durante 180 dias, quando então, a análise histopatológica mostrou melhores resultados após a utilização do paramonoclorofenol canforado.

Em 1992, Holland et al.<sup>69</sup> investigaram a influência da solução irrigadora e do uso do curativo de demora no processo de reparação de dentes de cães portadores de lesões periapicais. Foram induzidas experimentalmente, lesões periapicais em 90 raízes de incisivos e pré-molares de cães, através da

remoção do tecido pulpar e exposição da cavidade pulpar ao meio bucal, até o surgimento das lesões. No grupo I, os canais radiculares permaneceram expostos ao meio bucal durante todo o período experimental. No grupo II, os canais radiculares foram preparados utilizando a solução salina como solução irrigadora, e ao final do preparo, foram selados sem curativo de demora, sendo posteriormente obturados com cimento à base de óxido de zinco e eugenol. No grupo III a solução irrigadora utilizada foi hipoclorito de sódio a 0,5%, e o paramonoclorofenol canforado foi utilizado como curativo de demora. No grupo IV foi realizada a obturação dos canais radiculares na mesma sessão do preparo biomecânico, onde a solução irrigadora utilizada foi solução salina. No grupo V os procedimentos foram os mesmos empregados no grupo IV, porém tendo o hipoclorito de sódio 0,5% como solução irrigadora. Seis meses após a obturação dos canais radiculares, a análise histopatológica demonstrou no grupo I presença de lesão periapical crônica, com infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário, assim como reabsorção cementária e óssea. O grupo II apresentou aspecto semelhante ao grupo I, porém com menor índice de reabsorção óssea e cementária. No grupo III houve redução do tamanho das lesões periapicais, com presença de infiltrado inflamatório moderado a severo em áreas próximas ao forame apical com formação de cimento reparador, e ocorrência, muitas vezes, de selamento biológico. Os resultados observados nos grupos IV e V foram similares, com espaço do ligamento periodontal aumentado e demais aspectos semelhantes ao grupo I. Tais achados ratificaram a importância do emprego de um curativo de demora nos casos de canais com necrose pulpar e lesão periapical crônica.

Almeida<sup>4</sup> (1993) correlacionou o aspecto microbiológico da infecção do sistema de canais radiculares e as condições de reparação dos tecidos após a obturação dos canais radiculares de dentes com necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente. As lesões foram induzidas experimentalmente em pré-molares de cães, e os canais radiculares receberam tratamento endodôntico de acordo com o grupo experimental do qual faziam parte. No grupo I, 20 canais receberam neutralização imediata e foram instrumentados, tendo como solução irrigadora auxiliar no preparo, o hipoclorito de sódio 0,5%, sendo a obturação realizada na mesma sessão, com cimento Sealapex e cones de guta-percha. No

grupo II, 20 canais foram instrumentados utilizando o hipoclorito de sódio 5,25% como solução irrigadora, sendo aplicada a pasta Calen/PMCC como curativo de demora, por 5 dias, quando então foi efetuada a obturação dos canais radiculares. Após 270 dias, os animais foram mortos, as peças foram removidas, fixadas, desmineralizadas, e coradas pela técnica de Brown & Brenn, procedendo-se a análise histomicrobiológica dos 2 mm apicais e da região próxima ao ápice. Os resultados demonstraram a presença de bactérias no grupo I, em todos os cortes examinados, especialmente cocos gram-positivos, os quais puderam ser identificados no interior dos canais radiculares, túbulos dentinários, cementoplastos e junto às zonas de reabsorção cementária localizadas no ápice radicular. Somente em um dos casos foram observados bacilos gram-negativos na luz e parede do canal radicular. Neste grupo, foi possível observar reação inflamatória moderada a severa na região periapical, ápices irregulares com áreas de reabsorção de cimento e dentina. Em 68,8% das raízes do grupo II havia discreta presença de bactérias, sendo que estas estavam localizadas em alguns túbulos dentinários de poucos cortes histológicos, e ausentes nos cementoplastos, na superfície cementária e nas ramificações apicais do sistema de canais radiculares. A extensão da invasão bacteriana foi classificada como intensa em 100% das raízes do grupo I e como suave em 87,5% e moderada em 12,5% das raízes do grupo II. O tecido conjuntivo periapical, em todas as amostras do grupo I apresentou características de avançado processo de reparação.

Leonardo et al.<sup>90</sup> (1994) avaliaram a reparação apical e periapical de dentes de cães com reação periapical crônica induzida experimentalmente. Foram utilizados 40 canais radiculares de pré-molares de cães. Após a pulpectomia e indução das lesões periapicais, o tratamento endodôntico foi realizado seguindo duas diferentes técnicas operatórias. Na primeira, o hipoclorito de sódio 4-6% e o peróxido de hidrogênio a 10 vol. foram usados como soluções irrigadoras, e após o preparo biomecânico, foi empregado um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio, enquanto na segunda a solução irrigadora utilizada foi o hipoclorito de sódio 0,5%, e a obturação dos canais foi realizada na mesma sessão, sem o emprego de qualquer substância como curativo de demora. Em

ambas as técnicas, a obturação foi realizada utilizando-se cones de guta-percha e cimento Sealapex. Após um período de 270 dias, os animais foram mortos e os cortes foram corados pela técnica de Brown & Brenn. Após a análise radiográfica, pôde-se perceber uma diminuição ou mesmo o desaparecimento das áreas radiolúcidas periapicais nos canais tratados através da primeira técnica. A análise histomicrobiológica evidenciou uma maior extensão da invasão bacteriana para o interior dos túbulos dentinários no grupo tratado pela segunda técnica. Também a quantidade de microrganismos detectados no interior do sistema de canais radiculares foi intensa na técnica II, e moderada ou ausente na técnica I.

Leonardo et al.<sup>95</sup> (1997) observaram o comportamento histológico da região apical e periapical de pré-molares de cães, todos com vitalidade pulpar, após o tratamento endodôntico e obturação em sessão única com os cimentos Sealapex, CRCS, Sealer 26 e Apexit. Cento e oitenta dias após a obturação, os animais foram mortos e foi realizado o processamento histológico das peças. A análise histopatológica demonstrou que o Sealapex foi o cimento que permitiu as melhores condições de reparação, através da deposição de tecido mineralizado na região apical, sendo o único cimento que promoveu completo selamento (37,5% dos casos). Com uso do Sealapex, não foi observado nenhum infiltrado inflamatório e nenhuma área de reabsorção dos tecidos mineralizados. No grupo onde foi utilizado o CRCS foi observado selamento parcial e infiltrado inflamatório moderado. Quando foram utilizados os cimentos Apexit e Sealer 26, a ausência de selamento foi bastante freqüente, e áreas de reabsorção dos tecidos mineralizados apicais puderam ser observadas na maioria dos casos.

Tanomaru-Filho et al.<sup>188</sup> (1998) estudaram o efeito de diferentes cimentos endodônticos na reparação apical e periapical de dentes de cães com necrose pulpar e lesão periapical evidente radiograficamente. Foram induzidas lesões periapicais em dentes de cães, e quando estas foram comprovadas através de tomadas radiográficas, os canais radiculares foram tratados endodonticamente, utilizando limas do tipo K e hipoclorito de sódio a 5,25% como solução irrigadora. Após o preparo biomecânico, todos os canais receberam curativo de demora à base de hidróxido de cálcio durante 7 dias. Os canais foram então obturados através da técnica de condensação lateral ativa, utilizando os

seguintes cimentos: Sealapex, um cimento à base de hidróxido de cálcio; e Fill Canal, à base de óxido de zinco e eugenol. Após 270 dias, a análise histopatológica comprovou que os canais radiculares obturados com Sealapex apresentaram melhores condições na reparação apical e periapical.

Soares<sup>169</sup> (1999) avaliou as condições microbiológicas dos canais radiculares durante várias fases do tratamento endodôntico, assim como os aspectos histopatológicos e histomicrobiológicos dos tecidos apicais e periapicais em função do preparo biomecânico e de dois curativos de demora à base de hidróxido de cálcio. Foram analisadas 64 raízes de dentes pré-molares de cães, portadores de necrose pulpar e lesão periapical crônica. Após o preparo biomecânico, onde foi utilizada solução de hipoclorito de sódio a 5,25%, os canais receberam curativo à base de hidróxido de cálcio: pasta Calen/PMCC e pasta Calasept, pelos períodos de 15 e 30 dias. A avaliação microbiológica foi realizada quatro dias após o preparo biomecânico, e após a remoção do curativo de demora. De acordo com os resultados, o preparo biomecânico reduziu significativamente a infecção presente no interior dos canais radiculares, no entanto, não houve diferença significativa entre a ação antimicrobiana dos curativos de demora utilizados. Foi feita também a análise histopatológica através da coloração hematoxilina/eosina, onde foi observado um melhor quadro de reparação periapical após 30 dias de curativo de demora com Calen/PMCC.

Holland et al.<sup>67</sup> (1999) realizaram um estudo avaliando a reparação periapical em canais radiculares com polpas necrosadas e lesão periapical induzidas experimentalmente em cães. Em um dos grupos, os canais foram preparados e obturados na mesma sessão, e no restante dos grupos, foram utilizados como curativos de demora o hidróxido de cálcio, furacin ou PMCC. Todos os canais radiculares foram obturados com guta-percha e cimento Sealapex. Após um período de 6 meses, os cães foram mortos e os espécimes levados à análise histopatológica. Os resultados demonstraram reparação em 60% das lesões onde foi utilizado o curativo de demora de hidróxido de cálcio e soro fisiológico; 40% naqueles em que se utilizou PMC + Furacin; 20% com hidróxido de cálcio + PMCC, 20% com PMCC e 20% naqueles canais tratados em sessão única.

Katebzadeh et al.<sup>79</sup> (1999) avaliaram histologicamente a reparação apical de canais radiculares tratados endodonticamente em uma única sessão ou com a utilização de um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio. Foram utilizados 72 dentes de cães, nos quais foi realizada a pulpectomia, seguida da contaminação com placa dental e selamento das coroas. Após um período de 6 semanas, as lesões foram confirmadas radiograficamente. No grupo I, o tratamento endodôntico foi realizado em uma única sessão, e a irrigação feita com soro fisiológico; no grupo II, os canais foram irrigados com soro fisiológico e receberam curativo de demora à base de hidróxido de cálcio por um período de 7 dias; no grupo III, controle positivo, os canais foram preparados mas não foram obturados, no grupo IV, controle negativo, os dentes não foram infectados e foram imediatamente obturados de forma asséptica. A morte dos animais foi feita após 6 meses, e o exame histológico demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. O maior infiltrado inflamatório foi observado no grupo III, e o menor no grupo IV. O grupo II, que recebeu curativo de demora por 7 dias, apresentou menor infiltrado inflamatório que o grupo I, onde os canais foram tratados em uma única sessão ( $p < 0,05$ ). Os autores demonstraram a necessidade do uso de um curativo de demora para desinfecção dos canais radiculares nos casos de necrose pulpar com presença de lesão periapical.

Katebzadeh et al.<sup>78</sup> (2000) realizou um estudo um estudo radiográfico onde avaliou a reparação periapical após o tratamento endodôntico realizado em uma sessão ou com a utilização de um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio. Foram utilizados 72 canais radiculares de dentes de cães, onde foram induzidas lesões periapicais visíveis radiograficamente. Como controle negativo, foi realizado o tratamento endodôntico de 12 canais radiculares ainda com vitalidade pulpar. Os canais foram divididos em 4 grupos: Grupo 1 – tratamento realizado em uma única sessão, tendo como auxiliar no preparo, solução salina; grupo 2 – tratamento realizado da mesma forma que no grupo 1, porém com a utilização de uma pasta de hidróxido de cálcio como curativo de demora, durante 7 dias; grupo 3, controle positivo, onde a polpa foi removida, e a coroa selada, porém sem a obturação dos canais radiculares; e grupo 4, controle negativo, tratamento endodôntico realizado nos canais radiculares ainda com

vitalidade pulpar. Após um período de 6 meses, foram realizadas tomadas radiográficas padronizadas, e as imagens foram analisadas por três examinadores que classificaram as radiografias pós-operatórias como indicadoras de falha no tratamento, melhora ou reparação. O percentual de casos onde foi possível observar a reparação completa foi similar para os grupos 1 e 2 (35,3% e 36,8% respectivamente). No entanto, no grupo onde foi utilizado o hidróxido de cálcio como curativo de demora foi menor o número de falhas no tratamento (15,8%) do que naquele onde o tratamento foi realizado em uma única sessão.

Weiger et al.<sup>198</sup> (2000) avaliaram a influência do hidróxido de cálcio como curativo de demora na reparação das lesões periapicais associadas a dentes sem vitalidade pulpar. Setenta e três pacientes com necessidade de tratamento endodôntico em dentes com necrose pulpar e lesão periapical foram examinados. Destes, 67 receberam o tratamento. Em 31 dentes, foi realizado o preparo biomecânico seguido da aplicação de um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio por no mínimo 7 dias, e a obturação foi realizada em uma segunda consulta. Trinta e seis dentes foram tratados em uma única sessão. Os critérios para que um caso fosse considerado sucesso, foram baseados na ausência de sinais e sintomas clínicos, e radiograficamente ausência de rarefação óssea ou aumento do espaço do ligamento periodontal. Os intervalos de tempo utilizados para análise dos casos foram de 6 meses, 1, 2, 3, 4 e 5 anos. A probabilidade de um completo reparação apical e periapical ocorreu à medida que o tempo de preservação aumentava. Em ambos os grupos, o número de sucessos após 5 anos de preservação ultrapassou os 90%, sem ter havido diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Grecca et al.<sup>59</sup> (2001) realizaram um estudo onde determinaram radiograficamente a reparação após o tratamento endodôntico de dentes de cães com lesão periapical induzida experimentalmente. Após a indução das lesões, os canais radiculares foram tratados endodonticamente utilizando hipoclorito de sódio 5,25% como solução irrigadora. Após a instrumentação, todos os canais foram preenchidos com um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio (Calen PMCC ou Calasept) durante 30 dias. Após este período, os canais foram obturados com guta-percha e um cimento à base de hidróxido de cálcio

(Sealapex) ou de resina epóxica (AH Plus). Foram realizadas tomadas radiográficas 90, 180, 270 e 360 dias após a obturação dos canais radiculares. As imagens radiográficas foram digitalizadas e para a mensuração das lesões periapicais foi utilizado o programa Mocha. Os resultados demonstraram uma maior redução no tamanho das lesões dos grupos onde foi utilizado o Calen PMCC como curativo de demora, estando ele associado a qualquer um dos dois cimentos. A menor redução das lesões ocorreu no grupo onde foram utilizados o Calasept e o cimento AH Plus.

Leonardo et al.<sup>99</sup> (2002) avaliaram a reparação apical e periapical de dentes de cães com lesão periapical crônica após o uso de medicação à base de hidróxido de cálcio por diferentes períodos de tempo. Foi realizado o preparo biomecânico de 61 raízes de pré-molares de cães, através de uma técnica manual coroa-ápice, tendo como solução irrigadora o hipoclorito de sódio a 5,25%. Um dos grupos não recebeu curativo de demora, e os demais tiveram seus canais radiculares preenchidos com o curativo durante 7, 15 e 30 dias. Para exame histopatológico das peças, foram realizadas as colorações com hematoxilina/eosina e tricrômico de Mallory. Os melhores resultados histopatológicos foram observados após 15 e 30 dias, e os piores no grupo que não recebeu curativo, seguido pelo grupo onde o hidróxido de cálcio foi mantido por apenas 7 dias.

Tanomaru-Filho et al.<sup>187</sup> (2002) realizaram um estudo onde avaliaram a reparação apical e periapical em dentes de cães com lesão periapical visível radiograficamente após o tratamento endodôntico. Para isso, foi feito o tratamento endodôntico de 72 dentes de cães, utilizando como solução irrigadora o hipoclorito de sódio a 5,25% ou a solução de clorexidina a 2%. Os canais foram obturados com cimento Sealapex, na mesma sessão, ou receberam um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio durante 15 dias antes de serem obturados com Sealapex. Após 210 dias, os animais foram mortos e os cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina para observação da reparação apical e periapical. Nos grupos onde foi usado o hidróxido de cálcio como curativo de demora, a reparação foi significativamente melhor ( $p < 0,05$ ) que naqueles onde

o tratamento foi realizado em sessão única. Quando comparadas as soluções irrigadoras, a clorexidina apresentou melhores resultados.

César<sup>31</sup>, em 2003, avaliou histopatologicamente a reparação apical e periapical pós-tratamento de canais radiculares de dentes de cães com reação periapical crônica experimentalmente induzida. Após a neutralização imediata do conteúdo séptico/tóxico e o preparo biomecânico, utilizando como solução irrigadora o hipoclorito de sódio a 5,25%, os canais radiculares foram obturados na mesma sessão com cimento AH Plus através da técnica da condensação lateral ativa, e/ou após a utilização de 2 diferentes curativos de demora à base de hidróxido de cálcio, por um período de 15 dias: pasta Calen/PMCC e pasta Calasept. Após 180 dias da obturação, os animais foram mortos e realizou-se o processamento histológico. Os resultados mostraram haver diferença estatística significativa entre os grupos que receberam o curativo de demora, onde os melhores resultados foram conseguidos com a pasta Calen/PMCC; e, no grupo que foi obturado na mesma sessão, a resposta inflamatória foi considerada severa.

Holland et al.<sup>66</sup> (2003) compararam o tratamento endodôntico de dentes de cães que apresentavam necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente, quando realizado em uma única sessão ou em duas, onde foi utilizada uma pasta de pó de hidróxido de cálcio e propilenoglicol. Para a indução das lesões, os canais radiculares foram mantidos expostos ao meio bucal por um período de 180 dias. Após o preparo biomecânico com limas manuais e irrigação com hipoclorito de sódio a 2,5%, os canais foram obturados de acordo com os grupos experimentais aos quais pertenciam: grupo 1, onde os canais foram tratados em sessão única e obturados com cimento Sealapex; grupo 2, onde os canais receberam um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio após o preparo biomecânico por um período de 7 dias quando foi realizada a obturação com cimento Sealapex; e grupo 3, onde o curativo de demora de hidróxido de cálcio permaneceu no interior dos canais radiculares por 14 dias antes da obturação, também com cimento Sealapex. O processamento histológico foi realizado 180 dias após a obturação dos canais radiculares. Os espécimes do grupo 1, onde a endodontia foi realizada em sessão única, apresentaram ao exame

histopatológico neoformação de cimento em todos os espécimes, reparando áreas de reabsorção na maioria dos casos, e produzindo o selamento biológico do canal principal em 10 dos 16 casos, e o selamento completo, de todos os canais acessórios em apenas 4 casos. A coloração Brown & Brenn demonstrou a presença bacteriana em 13 espécimes. No grupo 2, em todas as raízes foi possível observar a presença de cimento neoformado, reparando áreas de reabsorção na maioria dos casos. O selamento do canal principal ocorreu em todos os espécimes, e o selamento completo de todos os canais acessórios em 16 deles. A técnica de Brown & Brenn demonstrou a presença de microrganismos em 10 casos, em alguns canais apicais acessórios e em lacunas localizadas no cimento apical. No grupo 3, onde o curativo de demora foi mantido por 14 dias no interior dos canais, houve o fechamento do canal principal em 14 espécimes, e o selamento completo de todo o sistema de canais em 8 casos. Em nove casos havia ausência de infiltrado inflamatório na região apical. A coloração de Brown & Brenn demonstrou microrganismos Gram-positivos em apenas 4 casos, e somente em lacunas apicais de cimento.

Leonardo et al.<sup>90</sup> (2003) avaliaram a reparação apical e periapical após o tratamento de dentes de cães com necrose pulpar e lesão periapical crônica onde foram utilizados diferentes cimentos endodônticos. Após a indução das lesões, foi realizado o preparo biomecânico de 44 canais radiculares de 3 cães, tendo como solução irrigadora auxiliar o hipoclorito de sódio a 5,25%. Foi utilizado em todos os casos, um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio – Calen/PMCC, durante 15 dias. Após este período, os canais foram obturados utilizando a técnica de condensação lateral com cones de guta-percha associados aos cimentos Sealapex, AH Plus e Sealer Plus. Após 180 dias, os animais foram mortos por meio de sobredose anestésica e os cortes histológicos foram corados com hematoxilina/eosina para análise em microscópio óptico da reparação apical e periapical. Os grupos onde foram utilizados os cimentos Sealapex e AH Plus apresentaram reparação histológica significativamente melhor ( $p < 0,05$ ) que o grupo onde foi utilizado o cimento Sealer Plus, que apresentou resultados pouco satisfatórios.

Tanomaru et al.<sup>184</sup>, em 2003, avaliou o efeito do preparo biomecânico utilizando diferentes soluções irrigadoras e um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio em canais radiculares de dentes de cães contendo endotoxina (LPS bacteriano). Foram utilizadas 137 raízes com vitalidade pulpar de 7 cães, cujos canais radiculares, após pulpectomia, foram preenchidos com solução de LPS de *Escherichia coli* na concentração de 10mg/mL, por 10 dias. Nos grupos I a V foi realizado o preparo biomecânico tendo como soluções irrigadoras o hipoclorito de sódio a 1; 2,5 e 5% (grupos I a III); solução de digluconato de clorexidina a 2% (grupo IV); soro fisiológico (grupo V). No grupo VI, a solução de LPS foi mantida no canal radicular durante todo o período experimental e no grupo VII os canais foram preenchidos com pasta Calen (utilizando soro fisiológico como solução irrigadora). Depois de 60 dias, realizaram a análise histopatológica, demonstrando que nos grupos I a VI, que não receberam curativo de demora, apresentaram maior intensidade de infiltrado inflamatório, espessura do ligamento periodontal e reabsorção cementária e óssea ( $p < 0,05$ ) do que o grupo VII, que recebeu curativo de demora à base de hidróxido de cálcio. Concluíram que o preparo biomecânico coadjuvado por diferentes soluções irrigadoras não foi capaz de inativar a endotoxina. No entanto, o curativo de demora à base de hidróxido de cálcio mostrou-se eficaz na inativação, *in vivo*, dos efeitos tóxicos da endotoxina.

Yamashita<sup>204</sup>, em 2004, avaliou a microbiota presente no sistema de canais radiculares antes e após o preparo biomecânico; além das condições histopatológicas da reparação apical e periapical após preparo biomecânico dos canais radiculares de dentes com reação periapical crônica. Foram utilizados 78 canais radiculares de dentes de cães, os quais, após indução de lesão periapical, foram submetidos ao preparo biomecânico utilizando as seguintes soluções irrigadoras: solução de digluconato de clorexidina a 2%, hipoclorito de sódio a 2,5% ou soro fisiológico. Um grupo controle não recebeu preparo biomecânico. Foi realizada cultura microbiológica antes e após 30 dias do preparo biomecânico. Após este período os animais foram mortos para processamento e análise histopatológica. O estudo microbiológico demonstrou que houve redução dos microrganismos nos grupos que utilizaram soluções antimicrobianas ( $p < 0,05$ ),

com melhor resultado para a solução de clorexidina. No estudo histopatológico foi observado, de um modo geral, infiltrado inflamatório severo e em grande extensão, severo espessamento do ligamento periodontal e grandes áreas de reabsorção óssea e periapical em todos os grupos ( $p > 0,05$ ).

### 2.3 Cimento Resinoso AH Plus

Almeida<sup>3</sup> (1997) comparou a ação dos cimentos AH Plus e Fill Canal na resposta dos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães depois de realizada a biopulpectomia. Foram utilizadas 34 raízes de pré-molares de cães. A solução irrigadora utilizada em todos os casos foi o hipoclorito de sódio 0,5%, e a obturação foi realizada em 20 casos com cimento à base de resina epóxica (AH Plus), e 14 casos com cimento à base de óxido de zinco e eugenol (Fill Canal). Noventa dias após as obturações, os cães foram mortos, e as amostras avaliadas histopatologicamente. No grupo onde as obturações foram feitas com o cimento AH Plus não foi observada a presença de células inflamatórias ou áreas de necrose, em nenhuma das raízes. Puderam ser observadas extensas massas de tecido mineralizado próximas ao material obturador, sendo formado selamento biológico completo no ápice de duas raízes. Tais resultados demonstram a biocompatibilidade do cimento AH Plus, que permitiu a reparação apical e periapical, o que não pôde ser observado com o cimento Fill Canal. Neste mesmo trabalho, os autores avaliaram também *in vitro* a infiltração marginal apical de 99 incisivos centrais superiores humanos extraídos e obturados com AH Plus, Ketac-Endo e Fill Canal. A técnica de obturação utilizada foi a técnica clássica com condensação lateral ativa. Foi utilizado o corante azul de metileno 2%, e os espécimes foram levados a uma câmara a vácuo, onde foram mantidos por 24 horas. Os resultados mostraram níveis de infiltração significativamente inferiores para o cimento AH Plus, em relação aos demais cimentos estudados.

Koulaouzidou et al.<sup>85</sup> (1998) estudaram a citotoxicidade dos cimentos à base de resina epóxica AH 26, AH Plus e TopSeal através da cultura

de fibroblastos da pele e da polpa de ratos. A avaliação foi feita após 24 e 48 horas de exposição das células aos materiais. A exposição direta das células ao AH 26, durante 24 horas, resultou em 15% de células viáveis, e durante 48 horas, em apenas 2%. Os cimentos AH Plus e TopSeal permitiram uma viabilidade celular de 68% e 42% após 24 e 48 horas, respectivamente. Tais resultados demonstraram a maior biocompatibilidade dos cimentos AH Plus e TopSeal, quando comparados ao AH 26.

Leonardo et al.<sup>96</sup> (1999) avaliaram histologicamente a resposta dos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães frente à biopulpectomia e obturação com dois cimentos endodônticos: AH Plus e Fill Canal. Foram utilizados 20 canais para obturação com AH Plus, e 14 canais obturados com Fill Canal. Os dois cimentos foram testados em um mesmo animal. O comprimento de trabalho foi determinado a 2 mm aquém do ápice radiográfico, e o batente apical estabelecido com uma lima nº 50. Antecedendo a obturação, os canais receberam uma irrigação final com solução de EDTA durante 3 minutos, com o objetivo de remover a smear layer. As obturações foram realizadas com guta-percha e um dos cimentos a serem avaliados, utilizando-se a técnica de condensação lateral. Após 90 dias, os animais foram mortos, e as raízes submetidas a processos histológicos de rotina, sendo coradas com hematoxilina-eosina e tricrômico de Mallory. Nas raízes obturadas com AH Plus, pôde-se observar, próximo ao ápice, numerosos fibroblastos e fibras colágenas, não havendo presença de células inflamatórias e áreas de necrose em nenhum espécime. A formação de tecido mineralizado ao nível do forame apical também estava presente na maioria das raízes onde foi utilizado o AH Plus. Nas raízes obturadas com cimento Fill Canal, ocorreu uma resposta inflamatória de intensidade moderada a intensa na região periapical, principalmente nas regiões em contato com o material obturador.

Em 1999 Kaplan et al.<sup>77</sup> avaliaram o efeito antimicrobiano de seis cimentos endodônticos: Apexit, Endion, AH26, AH Plus, Procosol e Ketac-Endo. Os microrganismos utilizados foram *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Actinomyces israelii*. Placas de Petri foram preenchidas com ágar, onde poços foram preparados e preenchidos com o cimento a ser avaliado. As placas foram incubadas por dois dias a 37°C. Passado este período,

as placas receberam 4,5 mL de meio de cultura e foram divididas em três grupos. As amostras do grupo 1 foram incubadas por 2 dias a 37°C, enquanto as amostras dos grupos 2 e 3 foram incubadas a 4°C por 20 e 40 dias respectivamente. Neste momento, 0,1 mL de meio de cultura foi levado às placas com o intuito de permitir a contagem das unidades formadoras de colônia. Os cimentos Apexit, Endion e AH Plus produziram uma leve inibição das colônias de *Streptococcus mutans* depois de 20 dias, e de *Actinomyces israelii* em todos os intervalos de tempo. Estes cimentos não apresentaram redução das colônias de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*. O Ketac Endo produziu efeito antimicrobiano apenas sobre *Actinomyces israelii* após 2 e 40 dias de incubação. Os cimentos AH26 e Procosol mostraram ação antimicrobiana aos 40 dias sobre *Candida albicans*, depois de 20 e 40 dias sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*, e uma inibição efetiva de *Actinomyces israelii* em todos os intervalos de tempo. Os cimentos contendo eugenol ou formaldeído se mostraram mais eficazes na inibição microbiana em todos os períodos de tempo estudados.

Em 1999, Leonardo et al.<sup>98</sup> avaliaram a liberação de formaldeído por quatro cimentos endodônticos. Foram estudados os cimentos AH 26, Endomethasóne, AH Plus e Topseal. A presença de formaldeído foi avaliada através de um espectrofotômetro, após o emprego dos materiais. Os resultados demonstraram a liberação de formaldeído pelos cimentos AH 26 e Endomethasóne após sua presa. Os cimentos AH Plus e Topseal, com composição química similar, liberaram formaldeído em concentrações mínimas.

Leonardo et al.<sup>97</sup> (2000) avaliaram a ação antimicrobiana dos cimentos AH Plus, Sealapex, Ketac Endo e Fill Canal, assim como das pastas Calen, Calasept, e de uma pasta à base de óxido de zinco água destilada. Tais materiais foram testados *in vitro* sobre culturas de *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*. Os cimentos e pastas foram colocados em poços de 4 mm de diâmetro, preparadas em ágar. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 2 horas para difusão dos materiais, e em seguida incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, foram

medidos os halos de inibição. Quando aplicada a metodologia de poço, todos os materiais inibiram todas as culturas de microrganismos avaliadas. Utilizando-se o método de difusão em ágar, no entanto através da aplicação dos materiais com pontas de papel absorvente, o *Enterococcus faecalis* não foi inibido pelo óxido de zinco; assim como a *Pseudomonas aeruginosa* não foi inibida pelos cimentos AH Plus, Fill Canal, ou pela pasta de óxido de zinco.

A atividade antimicrobiana e o escoamento de alguns cimentos endodônticos foram avaliados por Siqueira Jr. et al.<sup>150</sup> (2000). Os cimentos Kerr Pulp Canal Sealer EWT, cimento de Grossman, ThermaSeal, Sealer 26, AH Plus e Sealer Plus foram avaliados quanto à sua ação anti-bacteriana através do método de difusão em ágar, e no quanto ao escoamento através da colocação do material entre duas placas de vidro, e registro dos diâmetros dos discos de cimento formados após a aplicação de peso. Todos os cimentos avaliados demonstraram alguma atividade antimicrobiana, no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os halos formados pelos diferentes materiais. Quanto ao escoamento, os cimentos AH Plus e Kerr Pulp Canal Sealer EWT apresentaram valores superiores aos demais cimentos testados.

Willershausen et al.<sup>199</sup> (2000) avaliaram a citotoxicidade de cimentos endodônticos sobre três diferentes linhagens de células humanas. Os cimentos estudados foram o Sealapex, Endion, Super-EBA, Ketac-Endo e AH Plus. O crescimento, a morfologia e a viabilidade celular, o conteúdo protéico das células, e a liberação de prostaglandinas E2 foram usados como parâmetros para determinar a citotoxicidade dos materiais. O conteúdo protéico de três linhagens de células – fibroblastos nasais, fibroblastos gengivais e células tumorais epiteliais – foi reduzido significativamente por todos os materiais testados. A liberação de prostaglandina E2 não foi significativa na presença dos cimentos Sealapex, Endion e Super-EBA, enquanto altos níveis de prostaglandina puderam ser observados quando utilizados o Ketac-Endo e o AH Plus.

A reparação apical e periapical de dentes de cães com necrose pulpar e reação periapical crônica tratados endodonticamente e obturados com os cimentos Sealapex, AH Plus ou Sealer Plus foi avaliada por Salgado<sup>139</sup> em 2001.

O tratamento endodôntico foi realizado empregando-se hipoclorito de sódio 5,25% como solução irrigadora, e pasta Calen/PMCC como curativo de demora durante 15 dias. A obturação foi realizada com a técnica de condensação lateral da gutapercha, utilizando-se os diferentes cimentos a serem avaliados. Após 180 dias, os animais foram mortos e as peças submetidas ao processamento histológico. Os resultados demonstraram melhor reparação apical e periapical naqueles dentes obturados com os cimentos AH Plus e Sealapex, quando comparados ao grupo onde o Sealer Plus foi utilizado.

A atividade antimicrobiana dos cimentos AH26, AH Plus, N2 e Sealapex sobre patógenos endodônticos foi comparada por Lai et al.<sup>86</sup> (2001). Os microrganismos utilizados foram quatro espécies de facultativos (*S. mutans*, *S. sanguis*, *E. coli* e *S. aureus*) e quatro espécies de anaeróbios estritos (*P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *F. nucleatum* e *P. intermedia*). Os cimentos, recém manipulados, foram levados aos poços confeccionados em placas contendo ágar e inoculadas com os microrganismos acima. Depois de passado o período de incubação de 2 dias para as espécies facultativas e 7 dias para as anaeróbias estritas, os halos de inibição foram observados e medidos. Todos os cimentos apresentaram comportamentos distintos dependendo da espécie bacteriana utilizada. O maior efeito anti-bacteriano foi apresentado pelo cimento N2 que contém formaldeído e eugenol, o que também confere a este material um pronunciado efeito tóxico.

Hernández<sup>65</sup> (2002) avaliou histologicamente a reparação apical e periapical pós-tratamento de canais radiculares de dentes de cães, com lesão periapical crônica induzida, utilizando curativo de demora à base de hidróxido de cálcio em diferentes períodos de tempo e obturação com cimento endodôntico à base de resina epóxica, AH Plus. O tratamento endodôntico foi realizado em uma única sessão (Grupo I) ou em duas sessões (Grupo II), onde foi utilizado um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio (Calen/PMCC) por diferentes períodos: 15 ou 30 dias, previamente à obturação dos canais radiculares, ou por 180 dias sem a realização da obturação. Os resultados demonstraram que o curativo de demora foi fundamental para a reparação dos tecidos periapicais, não tendo o cimento utilizado influência neste processo de reparação.

Berbert et al.<sup>19</sup> (2002) avaliaram histopatologicamente a resposta dos tecidos periapicais de dentes de cães com necrose pulpar e lesão periapical crônica ao tratamento endodôntico, quando utilizados dois diferentes curativos de demora, e os cimentos Sealapex e AH Plus. Foram utilizados 78 canais radiculares, devidamente preparados e preenchidos com uma pasta à base de hidróxido de cálcio (Calen/PMCC ou Calasept), mantida no interior dos canais por um período de 30 dias. Após este período, os canais foram obturados com um dos cimentos a serem avaliados (Sealapex ou AH Plus). Os animais foram mortos após 360 dias, e os dentes analisados ao microscópio óptico para observação da reparação apical e periapical. Os piores resultados foram observados no grupo onde foram utilizados Calasept/AH Plus. O cimento Sealapex, mais que o AH Plus, interferiu positivamente na reparação periapical.

A citotoxicidade de diferentes cimentos endodônticos foi avaliada por meio de um novo modelo de estudo proposto por Schwarze et al.<sup>144</sup> (2002), onde raízes de dentes humanos extraídos foram obturadas através da técnica do cone único. Foram utilizados os cimentos N2, Apexit, RoekoSeal, AH Plus, Ketac Endo e Endomethasone. Um grupo adicional foi obturado com cimento N2 e condensação lateral ativa. Canais obturados apenas com cones de guta-percha, sem cimento, constituíram o grupo controle. Todos os espécimes, após a obturação, foram mantidos em água destilada por um período total de 1 ano. Os extratos foram avaliados quanto a citotoxicidade utilizando-se culturas de fibroblastos 3T3 e de células primárias do ligamento periodontal humano. Efeitos citotóxicos significativos só puderam ser observados em extratos de N2. Também o Endomethasone induziu alterações citotóxicas nos eluatos avaliados passadas 10 semanas depois de realizada as obturações. Os demais cimentos avaliados não demonstraram alteração significativa do metabolismo celular.

Schwarze et al.<sup>143</sup> (2002) avaliaram a biocompatibilidade de cinco cimentos obturadores nas primeiras 24 horas após sua manipulação. Os cimentos N2, Endomethasone, Apexit, AH Plus foram colocados em contato com culturas de células 0, 1, 5 e 24 horas após seu preparo. Os eluatos foram testados quanto a citotoxicidade com células 3T3 e fibroblastos do ligamento periodontal usando ensaios XTT. Todas as amostras de N2 inibiram completamente o metabolismo

celular. Efeitos similares puderam ser observados nos primeiros eluatos de Endomethasone, mas as amostras que entraram em contato com as células após 24 horas provocaram uma reação significativamente menor. Todas as amostras do Ketac-Endo provocaram uma citotoxicidade severa. O cimento AH Plus, provocou uma significativa inibição do metabolismo mitocondrial em alguns dos eluatos avaliados. Nenhum dos eluatos do Apexit revelaram potencial citotóxico.

Mickel et al.<sup>104</sup> (2003) avaliaram a atividade antimicrobiana de quatro diferentes cimentos endodônticos sobre *E. faecalis*. Foram inoculadas 17 placas de ágar sangue com *E. faecalis* utilizando a técnica de Lawn. Os cimentos Sealapex, Roth 811, Kerr EWT e AH Plus foram levados em discos às placas, e um disco contendo ampicilina serviu como controle. As placas foram incubadas a 37°C. A mensuração dos halos de inibição foi realizada após 24 e 48 horas. O cimento Roth 811 apresentou o maior halo de inibição (1,1 mm), seguido do Sealapex (0,8 mm) e Kerr EWT (0,5 mm), enquanto o AH Plus não demonstrou atividade antimicrobiana alguma. Não houve diferença nas zonas de inibição entre os diferentes períodos de 24 e 48 horas.

Cobankara et al.<sup>35</sup>, em 2004, avaliaram a atividade antibacteriana de 5 diferentes cimentos endodônticos: Roeko Seal, Ketac-Endo, AH Plus, Sealapex, Sultan; colocando os mesmos em contato com *E. faecalis* (ágar teste), 1 hora a 37°C. Após o período de incubação a 37°C por 24 horas e 7 dias em temperatura ambiente, as zonas de inibição de crescimento bacteriano nas placas de ágar foram observadas e mensuradas. Os cimentos Ketac-Endo, Sultan e AH Plus apresentaram maiores halos de inibição que os cimentos Sealapex e Roeko Seal.

Duarte et al.<sup>45</sup>, em 2004, avaliaram *in vitro*, o pH e a liberação de iônica de Ca(OH)<sub>2</sub> contida no cimento AH Plus. Utilizaram o cimento AH Plus na forma pura e modificada, contendo 5 e 10% de adição de hidróxido de cálcio durante a manipulação do cimento. O material foi armazenado em tubos de 1 X 1,5cm, imersos em água deionizada antes da sua presa. Foram utilizados 10 tubos contendo óxido de zinco e eugenol como grupo controle. Quatro milímetros de água foram removidos após 24 e 48 horas; assim como após 7, 14 e 30 dias; sendo medido o pH e a liberação de íons cálcio através de um pHmetro e

espectrofotometria. Concluiu-se que a adição de 5 e 10% de hidróxido de cálcio na manipulação do cimento AH Plus favoreceram a obtenção de um pH mais alcalino, assim como maior liberação de íons cálcio.

Saleh et al.<sup>138</sup>, em 2004, avaliaram a efetividade de 4 diferentes cimentos endodônticos, assim como do hidróxido de cálcio, contra bactérias em túbulos dentinários (*in vitro*). Utilizaram 56 raízes humanas, biomecanicamente preparadas até número 90 (ISO-Largo Peeso). Após tratamento das raízes com EDTA a 17% + NaOCl por 4 minutos para cada raiz, as amostras foram então infectadas com *E. faecalis* por 3 semanas. As raízes foram então divididas em 8 grupos e obturadas com guta-percha e AH Plus; cimento Grossman; Ketac-Endo; Roeko Seal; Apexit; Roeko Seal + primer (experimental); ou obturadas somente com hidróxido de cálcio. As raízes foram armazenadas a temperatura ambiente por 7 dias, sendo que, posteriormente foi determinado o número de unidade formadora de colônia (UFC) para cada amostra. Concluiu-se que os cimentos AH Plus e cimento de Grossman foram os mais eficazes contra o *E. faecalis* em túbulos de dentina.

### *3. Proposição*

---

### *3. Proposição*

O presente estudo teve como objetivos:

1. Avaliar a microbiota dos canais radiculares de dentes de cães sem vitalidade pulpar, com e sem reação periapical crônica visível radiograficamente.
2. Avaliar, por meio de exame histopatológico, a reparação dos tecidos apicais e periapicais após o tratamento endodôntico de dentes sem vitalidade pulpar sem ou com lesão periapical radiográfica e de dentes com vitalidade pulpar.

## *4. Material e Métodos*

---

## 4. Material e Métodos

Este projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara, tendo sido aprovado em sessão de 05/09/2002, de acordo com o Ofício CEPA – FO nº 37/2002 (Anexo A).

Foram utilizados três cães, de ambos os sexos, sem raça definida, com 12 a 15 meses de idade e pesando entre 10 e 15 Kg. Anteriormente às intervenções endodônticas, os animais foram mantidos por um período de 30 a 45 dias, sob cuidados relacionados à dieta e vacinas. Nesta fase e durante todo o experimento, os mesmos foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Campus UNESP.

Os dentes selecionados para o estudo foram os segundos, terceiros e quartos pré-molares inferiores e segundos e terceiros pré-molares superiores, totalizando 30 dentes, ou 60 raízes, divididas em 3 grupos experimentais.

Para cada intervenção, os animais foram pré-anestesiados com injeção intramuscular de 2 mL de Rompum\* aproximadamente 30 minutos antes dos procedimentos operatórios. Em seguida, foram anestesiados por via endovenosa, com solução de Nembutal Sódico†, na dosagem de 15mg/Kg de peso do animal. Durante o procedimento, o animal foi mantido com solução isotônica de cloreto de sódio‡.

Após a anestesia, empregando-se um posicionador para padronização das tomadas radiográficas (CORDEIRO et al.<sup>38</sup> 1995), foram efetuadas radiografias periapicais dos dentes selecionados. Estas radiografias

---

\* Cloridrato de dihidroxiiazina – Bayer do Brasil S/A, Produtos Veterinários, São Paulo – SP

† Thionembutal – Abott Laboratórios do Brasil Ltda., Rio de Janeiro – RJ

‡ Darrow Lab. S/A São Paulo – SP

padronizadas foram utilizadas para permitir as comparações com as tomadas realizadas nos períodos experimentais.

De acordo com a proposição do estudo, os tratamentos endodônticos foram realizados em diferentes condições patológicas e microbiológicas da polpa dental. Assim, dividindo-se em quadrantes, os grupos experimentais foram realizados de acordo com o quadro 1.

Os grupos experimentais foram distribuídos nos 4 quadrantes de um mesmo animal, em sistema de rodízio, sendo utilizados 3 animais. Em cada animal, um dos grupos foi realizado em dois quadrantes (Quadros 1 e 2).

**Quadro 1** – Grupos experimentais em função da condição pulpar e presença ou ausência de lesão periapical.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	TRATAMENTO	NÚMERO DE CANAIS
I	Biopulpectomia	20
II	Necropulpectomia I	20
III	Necropulpectomia II	20

**Quadro 2** – Distribuição dos grupos experimentais em diferentes quadrantes dos três animais.

ANIMAL 1 20 canais		ANIMAL 2 20 canais		ANIMAL 3 20 canais	
I	II	II	I	III	III
III	I	II	III	I	II

#### 4.1 Processo de Indução das Reações Periapicais Crônicas – Grupo III – Necropulpectomia II

Para o grupo experimental envolvendo dentes sem vitalidade pulpar com lesão periapical visível radiograficamente, de acordo com os quadrantes planejados, foram realizadas aberturas coronárias com brocas esféricas carbide números 2 ou 4<sup>\*</sup>, em turbina de alta velocidade refrigerada a ar e água, de modo a serem obtidas duas aberturas, uma mesial e outra distal. A ponte de esmalte foi mantida com o objetivo de prevenir fraturas coronárias. As aberturas oclusais foram complementadas com ponta diamantada tronco-cônica de extremidade inativa também em alta rotação.

Removida a polpa coronária, foi realizada a irrigação da câmara pulpar com soro fisiológico empregando a seringa Luer de 10 mL e agulha endodôntica 30 X 5. Com base nas radiografias para diagnóstico, foi efetuada a exploração dos canais radiculares com limas tipo K<sup>†</sup> nº 25, até o nível do "platô apical", situado aproximadamente 1,5 a 2 mm da abertura apical, sendo este, utilizado como referência para a remoção da polpa radicular, realizada com auxílio de limas tipo Hedströen<sup>†</sup>, de número 25 ou 30. A seguir, foram utilizadas limas tipo K<sup>†</sup> de número 25, posicionadas no nível do platô apical e realizada a tomada radiográfica periapical, pela técnica da bissetriz, com o objetivo de realização da odontometria e obtenção do Comprimento Real do Dente (CRD). O Comprimento Real de Trabalho (CRT) foi estabelecido aproximadamente 2 mm aquém do CRD.

A partir deste momento, os canais radiculares foram mantidos expostos ao meio bucal durante sete dias, com o objetivo de permitir a contaminação dos mesmos. Decorrido este período, também sob anestesia geral, foi realizada irrigação/aspiração da câmara pulpar com soro fisiológico. Após secagem, foi colocada uma mecha de algodão na câmara pulpar sendo a seguir a

---

\* K.G. Sorensen – São Paulo-SP

† Maillefer, Ballaigues, Suíça

abertura coronária selada com cimento à base de óxido de zinco e eugenol de presa rápida Pulposan\* .

Decorridos 30 dias do selamento provisório, controles radiográficos foram realizados até a observação das imagens radiolúcidas sugestivas de reação periapical crônica, as quais ocorreram aos 60 dias.

#### **4.2 Processo de Contaminação dos Canais Radiculares – Grupo II – Necropulpectomia I**

Trinta dias após o selamento das aberturas coronárias do Grupo III, em outro quadrante, de acordo com planejamento prévio, foram realizadas as aberturas coronárias e os canais radiculares foram expostos ao meio bucal durante 30 dias, possibilitando a infecção dos mesmos, sem a formação de lesões periapicais, comprovada por meio de tomadas radiográficas.

Assim, os quadrantes estavam divididos, apresentando dentes com vitalidade pulpar e dentes sem vitalidade pulpar com lesão periapical visível radiograficamente (Necropulpectomia II) e infectados, porém, sem lesão periapical (Necropulpectomia I).

#### **4.3 Colheita do Material para Estudo Microbiológico**

Foram colhidas amostras do conteúdo dos canais radiculares com o objetivo de identificar e quantificar os microrganismos presentes nos canais radiculares com necrose pulpar com ou sem lesão periapical crônica (Grupos II e III), utilizando para isto, as técnicas de cultura e de hibridação com sondas genômicas de DNA e o *checkerboard*.

Nos casos de Necropulpectomia II, a colheita para exame microbiológico de 14 canais radiculares, aleatoriamente selecionados, foi realizada após o período de indução das lesões periapicais, antes do preparo

---

\* Andrade e Filhos Ltda., Juiz de Fora, MG

biomecânico. Sob anestesia geral, os dentes de um dos quadrantes foram submetidos ao isolamento absoluto, anti-sepsia do campo operatório com solução de peróxido de hidrogênio a 3%\* e solução de clorexidina a 2%\*, e remoção do selamento provisório por meio de uma sonda endodôntica modificada Maillefer nº 5†.

Nos casos de Necropulpectomia I, a colheita para exame microbiológico dos 14 canais foi aleatória, em diferentes quadrantes dos 3 cães utilizados no estudo e foi realizada após o período de 30 dias, no qual os canais radiculares foram expostos ao meio bucal, antes de realizado o preparo biomecânico. Também sob anestesia geral e isolamento absoluto, foi realizada a anti-sepsia do campo operatório com soluções de peróxido de hidrogênio a 3%‡ e clorexidina a 2%†. Em seguida, foi realizada a colheita do material dos 14 canais radiculares.

A amostra microbiológica para a técnica de cultura, foi obtida após a inundação dos canais radiculares com soro fisiológico esterilizado, e agitação com uma lima endodôntica, com o objetivo de dessorção do material necrótico da parede dos canais. A seguir, foram introduzidas 3 pontas de papel absorvente nº 30§, esterilizadas, uma por vez, providas de aletas metálicas, na extensão do CRT. Após um minuto, as pontas de papel foram removidas e transferidas para um tubo de ensaio contendo 1,5mL de fluido de transporte reduzido (RTF) (Figura 1A).

Para a colheita de material do canal radicular, visando a avaliação pela técnica de *Checkerboard*, os canais radiculares foram inundados com soro fisiológico esterilizado, e prosseguiu-se com a agitação do conteúdo dos canais radiculares com o auxílio de uma lima endodôntica, promovendo a suspensão do material. O conteúdo de cada canal radicular foi colhido com 2 pontas de papel absorvente esterilizadas nº 30\*, introduzidas alternadamente às pontas de papel para colheita de material para cultura, e mantidas uma de cada vez em posição por aproximadamente 1 minuto, sendo então transferidas para um tubo Eppendorf

---

\* Instituto de Química de Araraquara – UNESP

† Maillefer, Ballaigues, Suíça

‡ Instituto de Química de Araraquara, UNESP

§ Tanari Industrial Ltda., Manaus, AM

contendo 1 mL de dimetil-sulfóxido a 5% em caldo tripticase (TSB-DMSO)<sup>†</sup>. As amostras foram imediatamente congeladas a -70°C para posterior processamento (Figura 1B).

---

\* Tanari Industrial Ltda., Manaus, AM

† Difco, Detroit, MI, USA

#### 4.4 Análise da Microbiota dos Canais Radiculares por Meio de Cultura

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados segundo as técnicas já utilizadas por Polisel-Neto<sup>132</sup> (2002).

Os tubos de ensaio contendo as amostras microbiológicas em meio RTF receberam de 4 a 6 pérolas de vidro e uma aleta metálica esterilizadas, e foram agitados de forma descontínua durante 2 minutos em um aparelho Mixtrom-Toptronix, regulado em velocidade máxima.

A seguir, foram realizadas diluições decimais seriadas até  $10^{-4}$ , em 4,5 mL de Tampão Fosfato Sorensen (PBS), em zona asséptica, em fluxo laminar. Um volume de 50µL das amostras puras e de cada diluição foi depositado em placas com auxílio de uma pipeta centesimal esterilizada, contendo ágar-sangue (As), ágar MacConkey (Mc), ágar gema de ovo hipertônico (Ni), ágar SB20, ágar Mitis salivaris e ágar sangue suplementado com hemina e menadiona – vitamina K (Ask).

Foi utilizado o produto desidratado Brain Heart Infusion\* no preparo deste meio, sendo 37 g adicionados a 1 L de água destilada contendo 1,5% de agar. Após o resfriamento foi adicionado 5% de sangue desfibrinado de coelho, 0,5 mg/mL de menadiona<sup>†</sup>. Distribuiu-se 5 mL do meio de cultura em placas de Petri (10X60).

Utilizou-se o Mitis salivarius Agar\* hidratado em água destilada. Foram distribuídos 5 mL do meio de cultura em placas de Petri (10x60).

Com a mesma base do As, utilizou-se o produto desidratado Brain Heart Infusion<sup>‡</sup>. Após hidratação e resfriamento se adicionou 5% de sangue desfibrinado de coelho, 5 mg/mL de hemina e 0,1 mg/mL de menadiona<sup>§</sup>. Distribuiu-se 5 mL do meio de cultura em placas de Petri (10X60).

As placas de As e Mc foram incubadas em aerobiose, as de Ms e SB20 em microaerofilia, e as de Ask em anaerobiose.

---

\* Difco, Detroit, MI, USA

† Merck & Co., Inc. USA

‡ Difco, Detroit, MI, USA

§ Merck & Co., Inc. USA

O meio ágar Mitis salivaris foi utilizado para verificar o crescimento de microrganismos Gram-positivos, os estreptococos orais, e o ágar gema de ovo hipertônico para verificar o crescimento de *Staphylococcus*. Todas as amostras foram também semeadas em meio SB20, específico para estreptococos do grupo mutans. O meio As foi utilizado para a contagem de aeróbios e o meio Ask para a contagem de anaeróbios.

Ao tubo com a amostra remanescente não diluída foi acrescentado aproximadamente 4,0 mL de meio Tio's, e observado até 20 dias após a colheita, a fim de determinar a presença de microrganismos em quantidades menores ou iguais a 30 ufc por raiz, quantidade não detectada em virtude da limitação da técnica.

As condições de anaerobiose foram obtidas por meio do sistema Gas-pack, em jarras\* contendo as placas seladas e incubadas a 37°C por 10 dias.

As condições de microaerofilia foram obtidas por meio do sistema de chama de vela, em jarra hermeticamente vedada, e o período de incubação foi de 48 horas a 37°C.

As placas incubadas em aerobiose foram colocadas diretamente na estufa a 37°C.

Na Figura 2, podem ser observados de forma esquemática os procedimentos utilizados para cultura das amostras.

---

\* Permutation

As colônias foram contadas após o período de incubação, com o auxílio de um microscópio estereoscópio\* e, os valores anotados para posterior cálculo do número de ufc por canal radicular.

#### 4.5 Análise da Microbiota dos Canais Radiculares através de Sondas de DNA Genômico e *Checkerboard*

As sondas de DNA utilizadas foram: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (ATCC 29523), *Actinomyces gerencseriae* (ATCC 23860), *Actinomyces meyeri* (ATCC 35568), *Actinomyces naeslundii* *genospecies 1* (ATCC 12104), *Actinomyces odontolyticus* (ATCC 17929), *Tannerella forsythensis* (nomenclatura utilizada por Klein & Gonçalves<sup>82</sup>, 2003 para a espécie *Bacteroides forsythus* (ATCC 43037), *Campylobacter rectus* (ATCC 33238), *Capnocytophaga ochracea* (ATCC 33596), *Eikenella corrodens* (ATCC 23834), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Prevotella melaninogenica* (ATCC 25845), *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Propionibacterium acnes I* (ATCC 11827), *Streptococcus anginosus* (ATCC 33397), *Streptococcus constellatus* (ATCC 27823), *Streptococcus intermedius* (ATCC 27335), *Streptococcus gordonii* (ATCC 10558), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus oralis* (ATCC 33037), *Treponema denticola*<sup>†</sup>.

A técnica de hibridação DNA-DNA *checkerboard* foi empregada com uma modificação, como descrita por Socransky et al.<sup>171</sup> (1994). A cada tubo contendo uma amostra foi adicionado 100 µL de hidróxido de sódio a 0,5M e as suspensões fervidas em banho-maria por 10 minutos. Após a fervura, as suspensões foram neutralizadas com a adição de 800 µL de acetato de amônia a 5 M, o que permitiu a lise e a suspensão do DNA na solução.

---

\* Nikon, USA.

† Cepa B1, Forsyth Dental Center, Boston, MA.

Uma placa metálica contendo 30 canaletas, denominada Minislot 30<sup>\*</sup> foi colocada sobre uma membrana de nylon (15 X 15 cm) com carga positiva<sup>†</sup> e o conjunto aparafusado sobre uma base de acrílico. Cada suspensão contendo DNA livre foi depositada nas fendas do “Minislot 30” e o DNA concentrado na membrana de nylon. A membrana foi removida do aparato e o DNA fixado na membrana através da exposição ao calor (120°C), durante 20 minutos (Figura 3).

Após fixação do DNA na membrana, essa foi pré-hibridada a 42°C por 1 hora numa solução contendo 50% de formamida, 5 X SSC, 1% de caseína, 25 mM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/mL de RNA de levedura. Em seguida, a membrana foi colocada sob a placa acrílica do “Miniblotter 45”<sup>\*</sup> com as linhas contendo o DNA fixado perpendiculares às canaletas do “Miniblotter 45” (Figura 4).

Cada canaleta do “Miniblotter 45” foi preenchida com 130 µL de uma determinada sonda, contida numa solução de hibridação (45% formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/mL de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano, 1% de caseína e 20 ng/mL de sonda de DNA). O aparato contendo a membrana foi, então, colocado em uma embalagem de plástico para evitar a desidratação. A hibridação das amostras fixadas na membrana com as sondas foi efetuada a 42°C, por um período mínimo de 16 horas.

Após hibridação com as sondas, a membrana foi removida do “Miniblotter 45” e lavada por 5 minutos à temperatura ambiente, seguido de duas lavagens de 20 minutos cada a 68°C, com solução contendo 20mM de tampão fosfato, 1mM EDTA e 1% de SDS, a fim de remover sondas que não hibridaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por 1 hora em solução contendo ácido maléico 0,1 M, Cloreto de sódio 3 M, hidróxido de sódio 0,2 M, Tween 20 0,3%, caseína 0,5%, pH 8,0, e 30 minutos na solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina<sup>\*</sup>. As membranas foram, então, lavadas com uma solução de ácido maléico 0,1 M, Cloreto de sódio 3 M, Hidróxido de sódio 0,2 M, Tween 20 a 0,3%, pH 8,0, 4 vezes por 10 minutos e uma vez por 5 minutos em Tris HCl 50mM e Cloreto de sódio 50mM, pH 9.5. Em

---

\* Immunetics, Cambridge, MA, USA

† Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra

seguida, as membranas foram incubadas numa solução contendo o substrato para a enzima, CDP-Star<sup>®†</sup>, por 45 minutos.

Finalmente, as membranas foram colocadas em um cassete de autoradiografia, sob um filme radiográfico<sup>‡</sup> por aproximadamente 40 minutos, e revelados em seguida para a detecção dos sinais de quimioluminescência. Ao final, se obtém um filme radiográfico com os sinais detectados pelas sondas de DNA. As linhas horizontais representam as amostras, e as verticais as sondas de DNA, formando um “tabuleiro de xadrez”.

A leitura dos resultados é semiquantitativa, feita através da comparação dos sinais das amostras, com as amostras controle, feitas a partir do DNA de todas as bactérias que estão sendo pesquisadas, e colocadas nas duas últimas canaletas do “Minislot 30”, que equivalem a 100.000 e 1.000.000 células. Desta forma, se obtém um número de células bacterianas aproximado de cada amostra.

---

\* Boehringer Mannheim

† Amersham Pharmacia Biotech

‡ Kodak X-OMAT, Rochester, NY, USA

#### 4.6 Preparo Biomecânico dos Canais Radiculares

Em uma mesma sessão, após a indução da lesão periapical no Grupo III e 30 dias de contaminação do canal radicular no Grupo II, foi realizado o preparo biomecânico dos 4 quadrantes do animal. Realizado o isolamento dos dentes de um quadrante com dique de borracha, e anti-sepsia do campo operatório com peróxido de hidrogênio a 3%\* e clorexidina a 2%\*, foi realizada a abertura coronária dos dentes onde deveria se proceder a biopulpectomia (Grupo I), irrigação/aspiração/inundação na entrada dos canais radiculares com a solução de hipoclorito de sódio a 1%† nos casos de necropulpectomia I (Grupo II), e remoção do selamento coronário e da mecha de algodão da câmara pulpar nos casos de necropulpectomia II (Grupo III). A solução de hipoclorito de sódio\* foi utilizada como solução irrigadora nas concentrações de 1%, nos Grupos I e II, ou 2,5% (Grupo III). A irrigação foi realizada com auxílio de seringa Luer de 10 mL e agulha hipodérmica 30 X 5, sendo utilizados inicialmente 5 mL de solução irrigadora e posteriormente 2 mL a cada troca de instrumento.

Nos casos de biopulpectomia (Grupo I), após odontometria, foi realizado o arrombamento do delta apical utilizando seqüencialmente limas tipo K nº 20, 25, 30† no Comprimento Real de Trabalho (C.R.T.) determinando o Instrumento Apical Foraminal (I.A.F.), para padronização do diâmetro de abertura apical dos canais radiculares.

A neutralização imediata do conteúdo séptico-tóxico dos canais radiculares nos casos de necropulpectomia I e II (Grupos II e III) foi realizada por meio da técnica clássica sendo utilizadas limas tipo K†, no sentido coroa-ápice associadas à solução irrigadora descrita para cada grupo experimental.

Após a neutralização, foi realizado o arrombamento do delta apical nestes grupos, empregando-se limas tipo K† nº 20, 25 e 30, conforme descrito anteriormente, padronizando a abertura do forame apical.

---

\* Instituto de Química de Araraquara – UNESP

† Maillefer, Ballaigues, Suíça

Para o preparo biomecânico foram empregadas limas tipo K<sup>†</sup> no Comprimento Real de Trabalho, a partir do Instrumento Apical Inicial (I.A.I.) até o instrumento de nº 60 para os segundos pré-molares inferiores e nº 70 para os demais dentes. Após o preparo biomecânico, uma lima tipo K\* nº 30 (I.A.F.) foi novamente utilizada no Comprimento Real do Dente, para remoção de possíveis raspas de dentina levadas à região do forame apical durante a instrumentação.

Durante todo o preparo biomecânico, foi realizada irrigação/aspiração/inundação dos canais radiculares, utilizando solução de hipoclorito de sódio<sup>†</sup> a 1% nos casos de necropulpectomia I e biopulpectomia, e a 2,5% nos casos de necropulpectomia II. A cada troca de instrumentos, os canais foram irrigados com 2mL de solução.

Após a instrumentação, foi realizada secagem dos canais radiculares com pontas de papel absorvente esterilizadas<sup>‡</sup>, e posterior inundação com solução de ácido etilenodiamino-tetracético<sup>§</sup>, mantida sob agitação durante 3 minutos com auxílio de uma lima tipo K\* nº 40. Em seguida, nova irrigação/aspiração com 2 mL de soro fisiológico foi realizada, sendo a secagem dos canais radiculares efetuada, novamente, por meio de pontas de papel absorvente esterilizadas<sup>‡</sup>.

#### 4.7 Obturação dos Canais Radiculares

A obturação dos canais radiculares foi realizada logo após o preparo biomecânico. A técnica de obturação e o material obturador empregado foram os mesmos nos 3 grupos experimentais.

Uma vez estando os canais radiculares secos, foi efetuada a seleção dos cones de guta-percha principais<sup>‡</sup>, de diâmetro correspondente ao último instrumento empregado na confecção do batente apical, ou seja, nº 60 para os

---

\* Maillefer, Ballaigues, Suíça

† Instituto de Química de Araraquara – UNESP

‡ Tanari Industrial Ltda., Manaus, AM

§ Odahcam, Herpo Produtos Dentários Ltda., São Paulo, SP

segundos pré-molares inferiores, e nº 70 para os demais dentes, seguida de confirmação radiográfica.

A obturação dos canais radiculares foi realizada com cones de guta-percha e cimento AH Plus\*, à base de resina plástica. Este cimento, composto por duas pastas, foi manipulado com partes iguais das duas pastas (1:1).

Para a obturação dos canais radiculares, o cone de guta-percha principal† foi envolto pelo cimento obturador em toda a sua extensão, inclusive na sua extremidade e levado ao canal radicular até o batente apical no Comprimento Real de Trabalho. Após a colocação do cone principal, a condensação lateral ativa foi realizada com o auxílio de espaçador digital tamanho C‡ *Finger Spreader*, com 21 mm de comprimento, sendo colocados cones de guta-percha auxiliares\* tamanho XF e FF, até a completa obturação do canal radicular, confirmada radiograficamente.

Realizadas as obturações dos canais radiculares, o excesso de guta-percha e de material obturador foi removido até o nível cervical com condensadores verticais aquecidos, sendo as aberturas coronárias restauradas com amálgama de prata Velvalloy§, condensado sobre uma base de cimento de fosfato de zinco§.

#### 4.8 Avaliação Radiográfica

Com a finalidade de confirmar a análise da região periapical nos grupos II e III, foram avaliadas as radiografias iniciais, logo após a obturação dos canais radiculares e após 180 dias de preservação. Desta forma, foi possível constatar a situação da região periapical nos períodos iniciais e o padrão radiográfico após o tratamento endodôntico.

---

\* Dentsply De Trey GmbH - Konstanz, Alemanha

† Tanari Industrial Ltda., Manaus, AM

‡ Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça

§ S.S.White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, RJ

As radiografias foram obtidas por meio de um aparelho de Raios X Odontológico modelo Heliodont\*, trabalhando com 60 KVp, 10 mA e 0,4 segundo de exposição. Para cada tomada radiográfica foi utilizada uma película periapical Ultraspeed†.

O processamento das radiografias foi realizado em uma Processadora Automática para radiografias periapicais Dent – X 9000. Após a obtenção das radiografias, as imagens foram digitalizadas em um scanner Sprint Scan 35‡ da Polaroid. As imagens foram salvas em arquivos no formato *.tiff*, produzindo compactação e preservando seus detalhes originais. As imagens foram salvas com dimensões de 30 x 40 mm, e resolução espacial de 600 dpi.

As imagens foram avaliadas no programa Adobe Photoshop 7.0, diretamente em um monitor NOC, com resolução de 1024 X 768 pixels e qualidade de cor True Color (32 bits), por três examinadores, sendo dois endodontistas e um radiologista. Para a análise, foram atribuídos escores, de acordo com o aspecto da região periapical (Quadro 3)

**Quadro 3** – Escores atribuídos à região periapical durante a avaliação radiográfica.

Escore	Aspecto observado
1	Aspecto normal
2	Espessamento do espaço do ligamento periodontal
3	Rompimento da lâmina dura e/ou presença de reabsorção não nítida do trabeculado ósseo periapical
4	Reabsorção óssea periapical bem definida

Além disso, foi observada a progressão, manutenção ou diminuição dos escores atribuídos após o período de controle de 180 dias, quando comparados àqueles atribuídos logo após a obturação.

\* Siemens, USA

† Eastman Kodak Company – Rochester – NY – USA

‡ Polaroid

#### 4.9 Avaliação Histopatológica

Do total de 60 raízes, 5 foram desprezadas durante o processamento histológico. Sendo assim, no grupo I foram avaliadas 16 raízes; no grupo II, 20 raízes; e no grupo III, 19 raízes.

Durante o período experimental de 180 dias após a obturação dos canais radiculares, os animais foram mantidos no Biotério do Câmpus da UNESP – Araraquara, sendo então, mortos por sobredose anestésica. As maxilas e mandíbulas foram removidas e as peças fixadas em solução de cacodilato de sódio em associação com sacarose e glutaraldeído (Soares<sup>169</sup>, 1999).

##### Composição da solução fixadora

Solução aquosa de glutaraldeído a 25%	50 mL
Sacarose	5 g
Solução tamponada de cacodilato de sódio (pH 7,4)	1 L
Solução de hidróxido de sódio 0,1 N	qsp

Depois de fixadas, as peças foram lavadas, radiografadas e recortadas em pequenos blocos, contendo cada raiz e tecidos adjacentes. Para a desmineralização, as peças foram imersas em solução à base de EDTA e, submetidas à exposição em forno de microondas\* ajustado na potência 2 e com tempo de exposição de 4 minutos. Após cada exposição, a temperatura da solução era verificada, de modo a mantê-la entre 30 e 36°C. A cada seis exposições, as peças eram agitadas em solução tampão de cacodilato de sódio (fixadora) e imersas em nova solução desmineralizadora, repetindo-se as exposições até a completa desmineralização, o que ocorreu entre 15 e 20 dias.

---

\* Continental AW 42 – B.S., São Paulo, SP

**Composição da solução desmineralizadora:**

Sal EDTA dihidratado USP	95,05 mg
Solução aquosa de glutaraldeído 25%	20 mL
Sacarose	34,25 g
Solução tamponada de cacodilato de sódio (pH 7,4)	280 mL
Água destilada	200 mL
Solução de hidróxido de sódio 0,1 N	q. s. p.
pH final da solução 7,4	

Constatada radiograficamente a desmineralização das peças, as mesmas foram lavadas em água corrente por 24 horas, desidratadas em álcool de concentrações crescentes, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os blocos contendo a raiz disposta longitudinalmente foram reduzidos para facilitar a microtomia, quando então foram obtidos cortes seriados com espessura de 6 micrômetros. Para a análise histopatológica, os cortes foram corados pela Hematoxilina e Eosina (HE) e tricrômico de Mallory.

**Intensidade do Infiltrado Inflamatório**

A avaliação da intensidade da reação inflamatória periapical foi realizada por meio da contagem de células inflamatórias na região periapical. Cortes histológicos corados pela Hematoxilina e Eosina (HE) foram selecionados, e analisados em fotomicroscópio binocular<sup>\*</sup>, com auxílio de uma lente ocular<sup>†</sup>, contendo uma área teste de 10x10mm, sendo utilizado o aumento de 1000X, possibilitando no campo delimitado, a contagem das células inflamatórias presentes. Para cada raiz, foram selecionados e analisados 3 cortes histológicos representativos, sendo realizada a contagem das células em 5 campos diferentes de cada corte, distribuídos de acordo com a Figura 5. A partir dos 5 valores

---

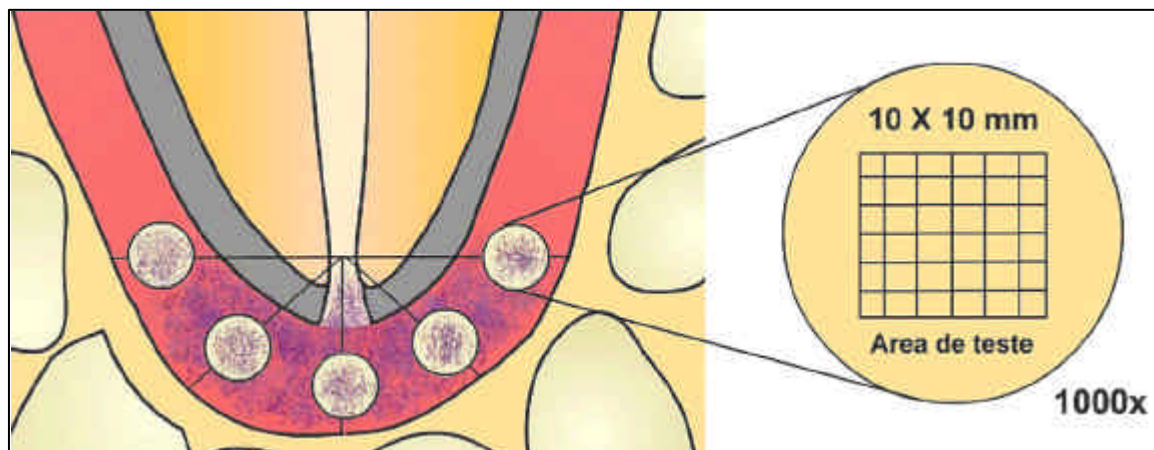
<sup>\*</sup> Olympus BX50, Japan

<sup>†</sup> Carl Zeiss, Germany

obtidos para cada corte histológico e considerando os resultados obtidos para as três secções avaliadas para cada raiz foi obtida uma média final para o espécime.

Para avaliação da intensidade do infiltrado inflamatório periapical por meio de escores, possibilitando posterior análise global conjunta dos parâmetros histopatológicos, foi realizada conversão das medidas de contagem de células. Desta forma, a partir dos valores globais obtidos nos 3 grupos experimentais, foi realizada análise estatística, possibilitando a obtenção dos valores da mediana, assim como dos quartis (25% e 75%). Estes valores foram utilizados para elaboração dos intervalos de número de células inflamatórias relativos aos seguintes escores:

1. 0 a 23,2 células inflamatórias.
2. 23,3 a 91,20 células inflamatórias.
3. 91,3 a 127,5 células inflamatórias.
4. Acima de 127,6 células inflamatórias.



**Figura 5** - Representação esquemática dos campos de contagem das células inflamatórias (1000x).

## Espessura do Espaço Periodontal Apical

A análise da espessura do espaço periodontal apical foi realizada por meio da obtenção da sua medida em milímetros (distância entre ápice radicular e osso alveolar). Estas mensurações foram realizadas em 4 regiões estabelecidas de acordo com a Figura 6. Para isto, foram realizadas fotomicroscopias utilizando microscópio binocular\*, em aumento de 40X empregando filme fotográfico†.

Três cortes histológicos corados por Hematoxilina e Eosina (HE) representativos de cada raiz foram fotografados e suas imagens digitalizadas, para possibilitar avaliação no programa Image Tool‡. Para conversão das medidas, as quais são apresentadas no programa em pixels, uma escala milimetrada foi fotografada em aumento de 40x, possibilitando a obtenção da proporção de 1 mm para 550 pixels. Foram obtidos 4 valores de medida para cada corte histológico, sendo realizada análise de 3 cortes de cada raiz, possibilitando a determinação de uma média final para cada espécime.

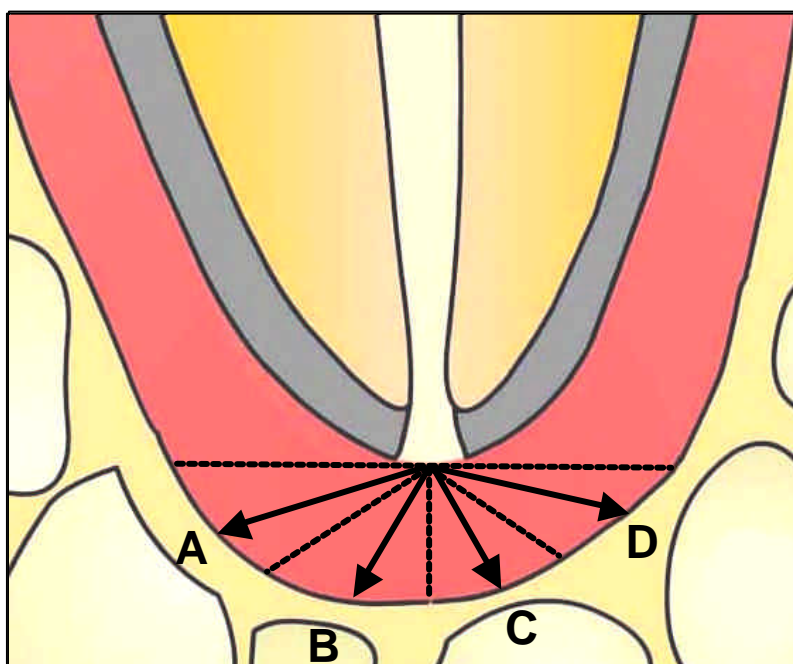
Para avaliação espessura do Espaço Periodontal Apical por meio de escores, possibilitando posterior análise global conjunta dos parâmetros histopatológicos, foi realizada conversão das medidas obtidas. Desta forma, a partir dos valores globais dos 3 grupos experimentais, foi realizada análise estatística, possibilitando a obtenção dos valores da mediana, assim como dos quartis (25% e 75%). Estes valores foram utilizados para elaboração dos intervalos de espessura (em mm) relativos aos seguintes escores:

---

\* Olympus BX50, Japan

† Reala Supéria ASA 100, Fuji, Japan

‡ UTHSCSA Image Tool for Windows version 3.0, San Antonio, TX, USA



1. 0 a 0,34mm
2. 0,35 a 0,88mm
3. 0,89 a 1,16mm
4. acima de 1,17mm

**Figura 6** – Representação esquemática das áreas onde foram realizadas as mensurações da espessura do ligamento periodontal.

Para avaliação histopatológica dos espécimes quanto à reabsorção óssea, extensão do infiltrado inflamatório, reabsorção apical e selamento da abertura apical, foram determinados escores de 1 a 4, da melhor para a pior situação quanto à reparação dos tecidos. Os parâmetros de avaliação foram os seguintes:

### **Reabsorção óssea**

- 1 – Ausente
- 2 – Áreas reparadas
- 3 – Pequenas áreas ativas
- 4 – Grandes áreas ativas

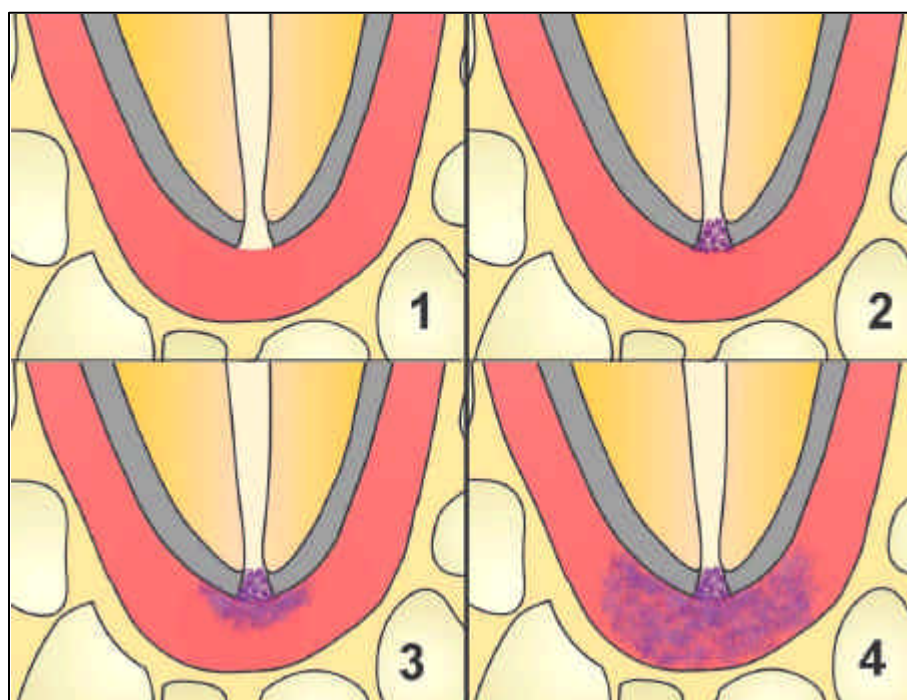
**Extensão do Infiltrado Inflamatório Periapical (Figura 7)**

1 – Ausente

2 – Restrito ao forame apical

3 – Localizado até a metade do espaço periodontal apical

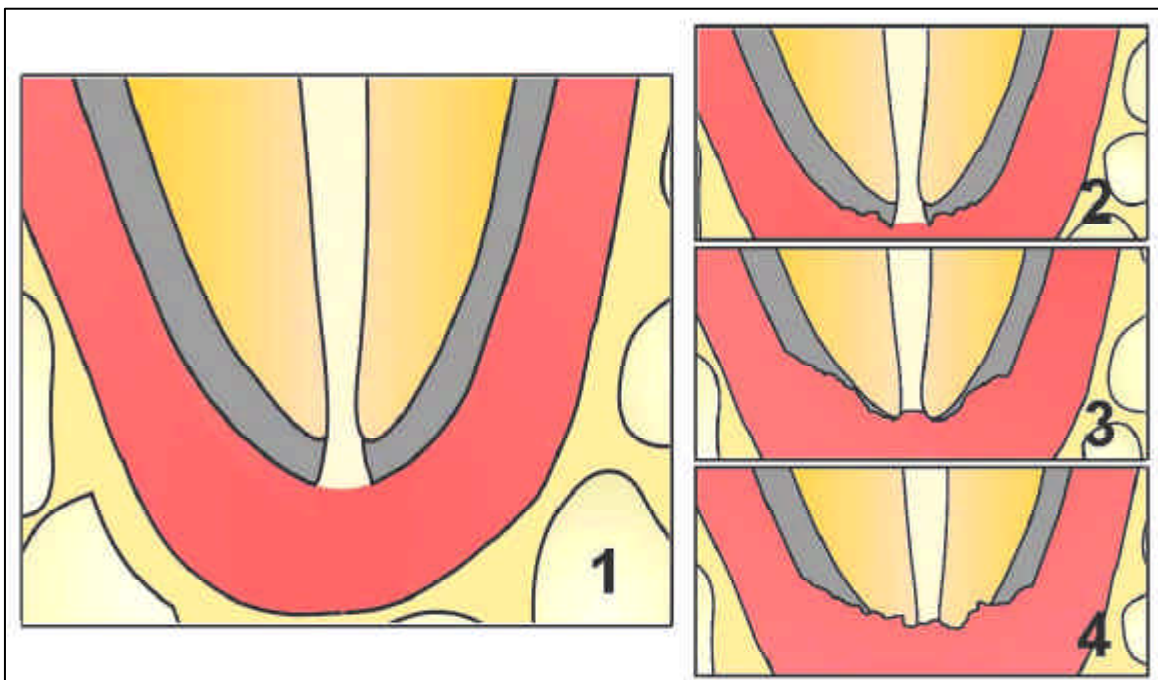
4 – Localizado além da metade do espaço periodontal apical



**Figura 7** – Representação esquemática dos escores atribuídos à extensão do infiltrado inflamatório na região periapical.

**Extensão da Reabsorção Apical (Figura 8)**

- 1 – Ausente
- 2 – Presente e localizada até a metade da espessura do cimento
- 3 – Presente e localizada além da metade da espessura do cimento
- 4 – Presente invadindo a dentina



**Figura 8** – Representação esquemática dos escores atribuídos à reabsorção apical.

**Selamento da abertura Apical**

- 1 – Total
- 2 – Além da metade da abertura apical
- 3 – Até a metade da abertura apical
- 4 – Ausente

Além destes parâmetros, foi observado o nível apical da obturação, atribuindo-se escores de 1 a 3, com o objetivo de avaliar sua influência na ocorrência de fenômenos inflamatórios e de reabsorção dos tecidos mineralizados.

- 1 – De 0,5 a 2 mm aquém do ápice
- 2 – Do limite apical até 0,5 mm aquém
- 3 – Extravasamento para a região periapical

Os dados obtidos foram anotados em fichas representadas em modelo a seguir:

**Quadro 4** - Modelo de ficha utilizada para anotação dos resultados histopatológicos.

<b>Aspectos Histológicos</b>	<b>Condições Observadas</b>	<b>Cão Raiz</b>	<b>Cão Raiz</b>	<b>Cão Raiz</b>	<b>Cão Raiz</b>
Intensidade do Infiltrado Inflamatório	1-De 0 a 23,2 células inflamatórias				
	2-De 23,3 a 91,2 células inflamatórias				
	3-De 91,3 a 127,5 células inflamatórias				
	4-Acima de 127,6 células inflamatórias				
Espaço Periodontal Apical (EPA)	1-De 0 a 0,34mm				
	2-De 0,35 a 0,88mm				
	3-De 0,89 a 1,16mm				
	4-Acima de 1,17mm				
Reabsorção Óssea	1-Ausente				
	2-Áreas reparadas				
	3-Pequenas áreas ativas				
	4- Grandes áreas ativas				
Localização do Infiltrado Inflamatório	1-Ausente				
	2-Restrito ao forame apical				
	3-Localizado até ½ do EPA				
	4-Localizado acima de ½ do EPA				
Reabsorção Cementária Apical	1-Ausente				
	2-Presente até ½ da espes. de cimento				
	3-Presente além da ½ da espes. de cimento				
	4-Presente atingindo a dentina				
Selamento apical	1. Total				
	2. Além da metade da abertura apical				
	3. Até da metade da abertura apical				
	4. Ausente				

#### **4.10 Análise estatística**

##### **Avaliação Microbiológica**

Foi empregada a análise de variância de dois fatores, complementada pelo teste de Tukey, ambas ao nível de 5% de significância para a avaliação das contagens de microrganismos transformadas para logaritmo.

##### **Avaliação Radiográfica**

Cada um dos examinadores realizou duas leituras, de onde se extraiu uma média. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo método de Mann-Whitney, que comparou os grupos entre si, após a obturação e após o período de preservação de 180 dias. Para avaliação das amostras pareadas de um mesmo grupo, nestes dois períodos, foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon.

##### **Análise Histopatológica**

Os escores estabelecidos para fenômenos histopatológicos analisados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Este teste comparou os três grupos experimentais entre si, para posteriormente, quando observada diferença significativa em nível de 5%, fosse realizada a comparação entre os grupos, pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, buscando diferenciações entre eles.

## *5. Resultados*

---

## 5. Resultados

### 5.1 Análise da Microbiota dos Canais Radiculares por Meio de Cultura

Nas amostras colhidas dos canais radiculares dos casos de necropulpectomia I e II (Grupos II e III), previamente ao tratamento endodôntico, foram quantificados anaeróbios estritos, anaeróbios facultativos e aeróbios (APÊNDICE A).

Nos dois grupos, foram utilizados diferentes meios de cultura, onde foram realizadas leituras anteriormente ao preparo biomecânico. Os dados obtidos após a contagem foram transformados em logaritmos, o que normalizou os dados, permitindo a aplicação de testes paramétricos para análise estatística.

Não foram detectadas em nenhuma das amostras *Streptococcus mutans*, estafilococos e bacilos gram-negativos. Em todas as amostras havia microrganismos mesmo que em quantidade inferior a 20ufc/mL, como pôde ser observado na cultura em meio Tio's.

Na Tabela 1 são apresentadas as contagens de microrganismos, em ufc, relativas aos grupos II e III e também as estatísticas descritivas: mínimo, máximo, mediana, média e desvio padrão. A observação dessas medidas mostra que as contagens não variam simetricamente em torno da média e que a variabilidade, medida pelo desvio padrão, é muito diferente de um grupo de microrganismos para o outro. Então, para viabilizar a análise estatística, essas contagens foram transformadas para logaritmo, expostos na Tabela 2.

**Tabela 1** - Contagens de microrganismos, em ufc, relativas ao grupo II e III e algumas estatísticas descritivas.

Estatísticas	Grupo II – Necropulpectomia I			Grupo III – Necropulpectomia II		
	Anaeróbio	Aeróbio	Estreptococos	Aeróbio	Anaeróbio	Estreptococos
Mínimo	4500	600	40	0	0	0
Máximo	7600000	1400000	56000	510000	180000	21000
Mediana	460000	300000	8800	1195	1095	345
Média	981086	315924	15778	42096	15328	1971
Desvio padrão	1955104	378231	19390	135384	47519	5518

Aplicou-se, então, a análise de variância de dois fatores, grupos e espécies de microrganismos, para a avaliação dos resultados. O sumário desta análise está apresentado na Tabela 3 onde se observa, em primeiro lugar, que não há efeito significativo da interação ao nível de 5% de significância, pois o valor de probabilidade p é maior do que 0,05. Então, os efeitos de grupos e de espécies de microrganismo sobre o número de microrganismo são independentes e podem ser analisados separadamente. A diferença entre médias de contagens de grupos é altamente significativa ( $p < 0,001$ ), o mesmo acontecendo com as médias de contagens das espécies de microrganismos.

Para identificar as médias de contagens significativamente diferentes quanto às espécies, foi empregado o teste de Tukey cujos valores de probabilidade estão explicitados na Tabela 4. Observando-se os valores p menores do que 0,05, as médias de contagens de Anaeróbio e Aeróbio são ambas significativamente maiores do que de Estreptococos, mas não há

evidência de que sejam diferentes entre si. Este resultado vale em qualquer um dos dois grupos.

**Tabela 2** - Contagem de microrganismos, em logaritmo de ufc, relativas aos grupos II e III e algumas estatísticas descritivas.

Estatísticas	Grupo II – Necropulpectomia I			Grupo III – Necropulpectomia II		
	Anaeróbio	Aeróbio	Estreptococos	Anaeróbio	Aeróbio	Estreptococos
	3,65	2,78	1,61	3,86	2,61	2,72
	6,88	3,99	3,75	0,00	0,00	0,00
	4,51	4,73	2,28	3,20	3,02	3,08
	4,90	2,86	4,08	2,81	3,06	2,73
	5,72	5,58	4,71	3,38	3,26	3,42
	5,58	5,56	4,45	1,61	1,79	0,00
	5,67	5,56	4,11	4,02	3,89	2,26
	5,65	5,38	4,15	4,72	4,03	2,62
	5,45	4,94	2,66	2,90	3,87	2,26
	5,68	5,56	4,56	5,71	5,26	4,32
	6,20	6,15	3,52	3,24	3,43	2,56
	5,91	5,82	3,06	2,63	2,79	2,18
	6,00	5,71	4,75	2,52	2,81	2,52
	3,94	2,96	1,61	2,76	2,43	2,15
Mínimo	3,65	2,78	1,61	0,00	0,00	0,00
Máximo	6,88	6,15	4,75	5,71	5,26	4,32
Mediana	5,66	5,47	3,91	3,05	3,04	2,54
Média	5,41	4,83	3,52	3,10	3,02	2,34
Desvio padrão	0,88	1,18	1,10	1,35	1,21	1,15

**Tabela 3** – Sumário da análise de variância para a comparação de médias de contagens de microrganismos de acordo com o grupo e a espécie.

Efeitos	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
Grupo	1	65,54	49,31	<0,001
Espécie	2	13,25	9,97	<0,001
Grupo*Espécie	2	2,26	1,70	0,190
Resíduo	78	1,33		

**Tabela 4** – Valores de probabilidade p do teste de Tukey para a comparação de médias de logaritmos de contagens das espécies de microrganismos.

Espécies	Média	Anaeróbio	Aeróbio	Estreptococos
Anaeróbio	4,25	-	0,528	<0,001
Aeróbio	3,92	0,528	-	0,006
Estreptococos	2,93	<0,001	0,006	-

## 5.2 Análise da Microbiota dos Canais Radiculares por Meio de Hibridação DNA – DNA *Checkerboard*

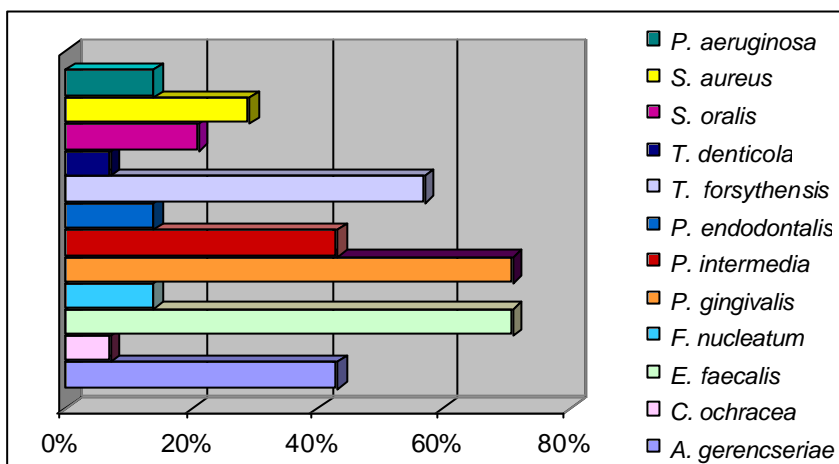
A técnica de hibridação DNA – DNA *checkerboard* permitiu a identificação de 12 espécies bacterianas diferentes nos casos de necropulpectomia I e 5 espécies nos casos de necropulpectomia II (Figuras 9 e 10). Na necropulpectomia I (Grupo II), o número de canais que apresentaram crescimento bacteriano positivo foi maior, 12 de um total de 14 canais avaliados, quando comparado a necropulpectomia II (Grupo III), onde 5 dos 14 canais apresentaram crescimento positivo. O número de células bacterianas também foi maior nos canais radiculares do Grupo II (Figuras 11 e 12).

No grupo II, constituído por canais radiculares com necrose pulpar sem lesão periapical crônica foram detectados *Actinomyces gerencseriae* (ATCC 23860), *Tannerella forsythensis* (atual nomenclatura, segundo Klein & Gonçalves (2003) para a espécie *Bacteroides forsythus* (ATCC 43037), *Capnocytophaga ochracea* (ATCC 33596), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Streptococcus oralis* (ATCC 33037) e *Treponema denticola* (cepa B1, Forsyth Dental Center, Boston, MA). (APÊNDICE B e C).

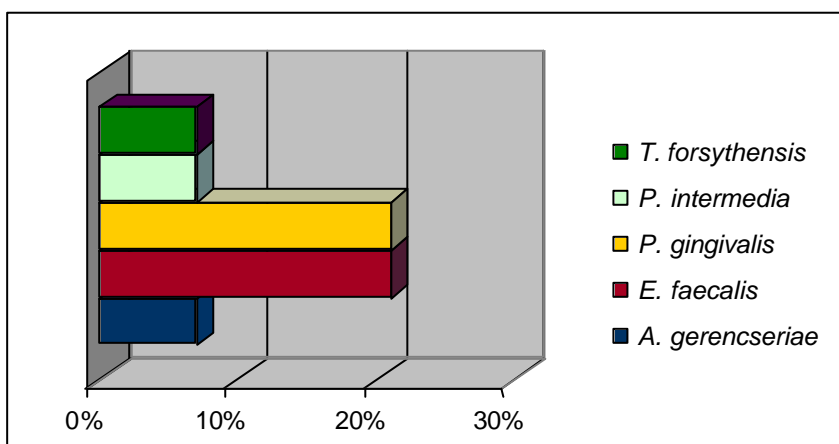
Nos canais radiculares com necrose pulpar e lesão periapical crônica (Grupo III), foram detectados *Actinomyces gerencseriae* (ATCC 23860), *Tannerella forsythensis* (ATCC 43037), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212),

*Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611) (APÊNDICE D e E).

As Figuras 9 e 10 apresentam a prevalência das espécies detectadas nos dois grupos experimentais.

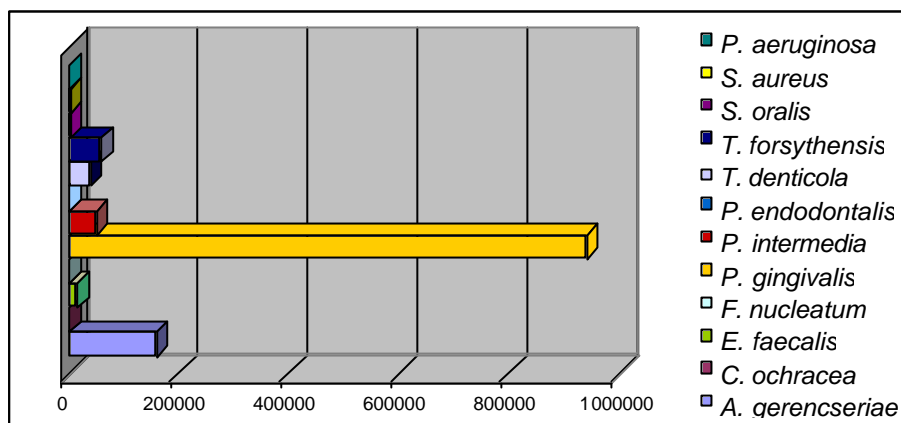


**Figura 9** – Espécies bacterianas detectadas nos canais radiculares do grupo II.

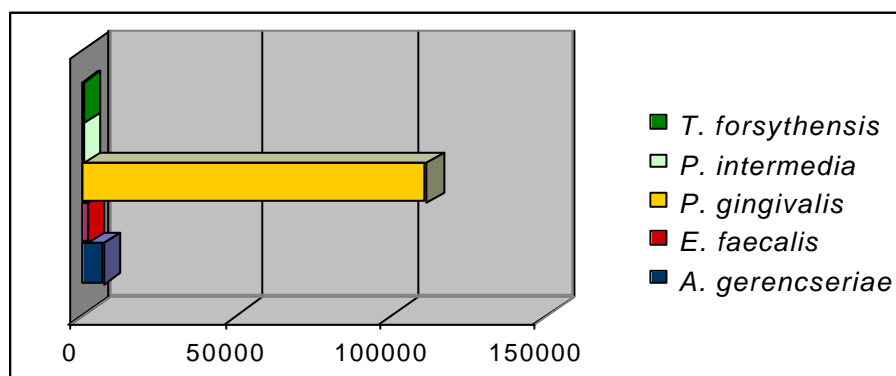


**Figura 10** - Espécies bacterianas detectadas nos canais radiculares do grupo III.

As Figuras 11 e 12 mostram o número de células bacterianas das espécies bacterianas detectadas nos canais radiculares dos grupos II e III.



**Figura 11** – Número de células das espécies bacterianas detectadas nos canais radiculares do grupo II.



**Figura 12** - Número de células das espécies bacterianas detectadas nos canais radiculares do grupo III.

No Quadro 5, são apresentados os números aproximados de células bacterianas detectadas em cada uma das amostras, por meio dos métodos de cultura e *checkerboard*.

**Quadro 5** – Número de células bacterianas presentes nos canais radiculares, detectadas por meio dos métodos de cultura e *checkerboard*.

Amostras	Grupo II		Grupo III	
	Necropulpectomia I		Necropulpectomia II	
	Cultura	Checkerboard	Cultura	Checkerboard
1	5140	0	8230	10000
2	7615300	2810000	0	0
3	86190	680000	3830	10000
4	92720	1120000	2330	0
5	951000	10000	6800	10000
6	768000	1130000	100	0
7	842900	0	18480	0
8	704200	50000	64120	1030000
9	367460	10000	8370	0
10	876000	20000	711000	650000
11	3003300	50000	4801	0
12	1481160	40000	1190	0
13	1576000	1810000	1300	0
14	9660	10000	990	0

### 5.3 Avaliação Radiográfica

No Quadro 6 encontra-se disposta a frequência dos escores, para cada aspecto radiográfico avaliado, distribuídas em função de sua ocorrência nos dois grupos experimentais submetidos à análise radiográfica.

**Quadro 6** – Frequência dos escores de acordo com os aspectos radiográficos avaliados, distribuídos em função dos grupos experimentais.

Aspectos Radiográficos	Condições Observadas	GII (n=20)	GIII (n=20)
No momento da obturação	1 - Aspecto normal	4	
	2 - Espessamento do espaço do ligamento periodontal	13	
	3 - Rompimento da lâmina dura e/ou presença de reabsorção não nítida do trabeculado ósseo periapical	3	4
	4 - Reabsorção óssea periapical bem definida		16
Após 180 dias de preservação	1 - Aspecto normal	1	
	2 - Espessamento do espaço do ligamento periodontal	4	
	3 - Rompimento da lâmina dura e/ou presença de reabsorção não nítida do trabeculado ósseo periapical	4	8
	4 - Reabsorção óssea periapical bem definida	11	12

### Resultados estatísticos da análise radiográfica

As frequências apresentadas no Quadro 6 foram dispostas de modo a propiciar a aplicação do teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney. Este teste comparou os dois grupos (II e III) entre si, nos diferentes momentos, logo após a obturação e 180 dias após a obturação. Estes dados estão dispostos nas Tabelas 5 e 6, com a soma de postos e postos médios dos grupos experimentais.

**Tabela 5** – Dados do teste de Mann-Whitney comparando o aspecto radiográfico dos grupos II e III logo após a obturação dos canais radiculares.

GRUPO	SOMA DOS POSTOS	POSTO MÉDIO	n
Grupo II – Necropulpectomia I	216	10,8	20
Grupo III – Necropulpectomia II	604	30,2	20
Probabilidade <0,0001 (significante) (Teste bicaudal)			

**Tabela 6** – Dados do teste de Mann-Whitney comparando o aspecto radiográfico dos grupos II e III 180 dias após a obturação.

GRUPO	SOMA DOS POSTOS	POSTO MÉDIO	n
Grupo II – Necropulpectomia I	380	19	20
Grupo III – Necropulpectomia II	440	22	20
Probabilidade = 0,4169 (não significante) (Teste bicaudal)			

Logo após a obturação, o teste de Mann-Whitney apontou diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados ( $p < 0.001$ ). No entanto, após o período de 180 dias, a diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

Para a comparação de um mesmo grupo, nos dois períodos de tempo, logo após a obturação, e 180 dias após a obturação, foi aplicado o teste não paramétrico de Wilcoxon, para amostras pareadas, conforme descrito nas Tabelas 7 e 8.

**Tabela 7** – Dados do teste de Wilcoxon comparando o aspecto radiográfico do grupo II logo após a obturação dos canais radiculares e após 180 dias.

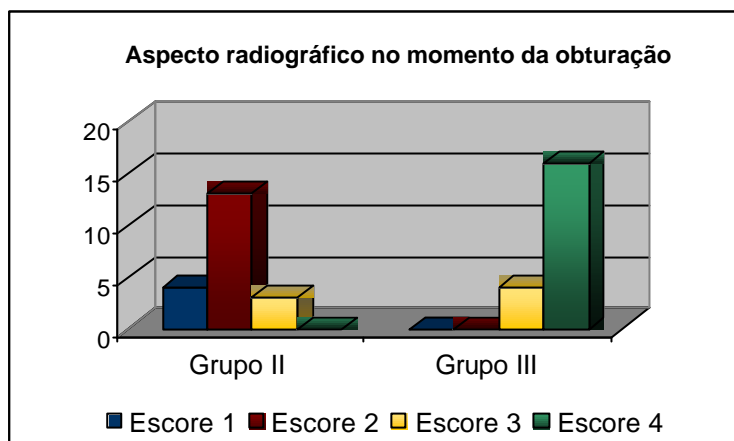
	Mediana	
Logo após a obturação	2,000000000	Número inicial de pares de valores: 20
180 dias após a obturação	3,000000000	Número de pares com diferença nula: 3
Aproximação normal $Z = -3,519874$		Probabilidade = 0,0004317520
<b>DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTE ENTRE OS PERIODOS</b>		

**Tabela 8** – Dados do teste de Wilcoxon comparando o aspecto radiográfico do grupo III logo após a obturação dos canais radiculares e após 180 dias.

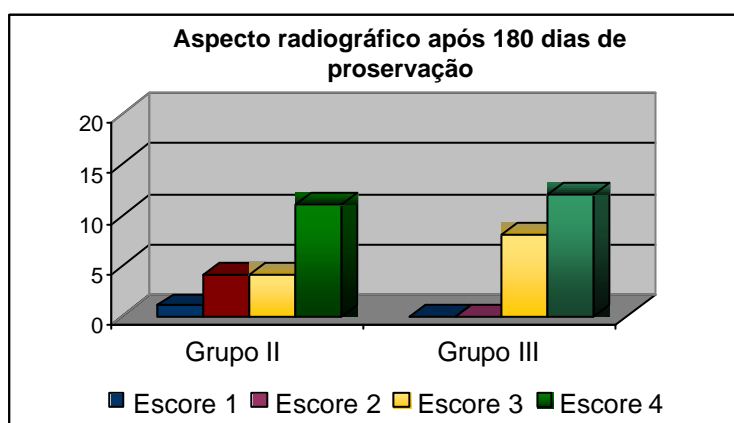
	Mediana	
Logo após a obturação	4,000000000	Número inicial de pares de valores: 20
180 dias após a obturação	4,000000000	Número de pares com diferença nula: 12
Aproximação normal $Z = 1,4142136$		Probabilidade = 0,1572992070
NÃO HÁ DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTE ENTRE OS PERÍODOS		

O teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas apontou diferença estatisticamente significativa para o grupo II, nos dois diferentes períodos de avaliação ( $p < 0,001$ ). Ao considerarmos o grupo III, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois períodos de observação radiográfica ( $p > 0,05$ ).

## Representação Gráfica da Análise Radiográfica



**Figura 13** – Representação gráfica dos escores atribuídos às radiografias no momento da obturação nos dois grupos experimentais avaliados.



**Figura 14** – Representação gráfica dos escores atribuídos às radiografias após 180 dias de preservação, nos dois grupos experimentais avaliados.

## 5.4 Avaliação Histopatológica

### Intensidade do Infiltrado Inflamatório Periapical

O Quadro 7 apresenta as médias da contagem de células inflamatórias para cada espécime nos diferentes grupos experimentais e seus respectivos escores atribuídos segundo os intervalos determinados pela contagem geral de células inflamatórias.

**Quadro 7** – Valores da contagem de células inflamatórias e respectivos escores para os diferentes espécimes, distribuídos em função dos grupos experimentais.

Espécime	GI (n=16)	escore	GII (n=20)	escore	GIII (n=19)	escore
1	9,3	1	91,8	3	110,6	3
2	7,3	1	138,6	4	128,0	4
3	17,7	1	132,2	4	135,0	4
4	7,5	1	104,0	3	172,2	4
5	3,0	1	85,0	2	120,0	3
6	13,4	1	108,0	3	121,5	3
7	28,6	2	91,2	2	141,4	4
8	7,3	1	84,0	2	100,3	3
9	16,2	1	37,0	2	97,6	3
10	4,75	1	90,0	2	124,2	3
11	6,25	1	131,4	4	114,4	3
12	3,75	1	115,2	3	73,5	2
13	10,4	1	173,6	4	134,0	4
14	6,7	1	128,6	4	79,2	2
15	9,0	1	48,0	2	124,0	3
16	31,0	2	58,3	2	86,7	2
17			146,8	4	171,6	4
18			110,3	3	127,0	3
19			60,0	2	128,8	4
20			61,2	2		

## Espaço Periodontal Apical

O Quadro 8 apresenta os resultados da medida do espaço periodontal apical em milímetros, obtida em cada espécime nos diferentes grupos experimentais e seus respectivos escores atribuídos segundo os intervalos determinados pelos valores globais da medida do espaço periodontal apical.

**Quadro 8** – Valores da medida do espaço periodontal apical (em mm) e respectivos escores para os diferentes espécimes, distribuídos em função dos grupos experimentais.

Espécime	GI (n=16)	escore	GII (n=20)	escore	GIII (n=19)	escore
1	0,11	1	1,82	4	0,66	2
2	0,14	1	0,97	3	1,11	3
3	0,24	1	0,50	2	1,06	3
4	0,20	1	1,67	4	0,88	2
5	0,12	1	1,24	4	1,28	4
6	0,19	1	1,70	4	1,03	3
7	0,52	2	1,18	4	1,02	3
8	0,22	1	1,57	4	0,97	3
9	0,26	1	0,68	2	1,07	3
10	0,17	1	1,31	4	1,13	3
11	0,16	1	1,26	4	0,82	3
12	0,13	1	1,27	4	0,77	2
13	0,19	1	1,00	3	1,15	3
14	0,14	1	1,18	4	0,92	3
15	0,17	1	0,54	2	0,67	2
16	0,38	2	0,84	2	0,70	2
17			1,27	4	0,39	2
18			0,97	3	1,02	3
19			0,82	2	0,98	3
20			1,17	4		

No Quadro 9 encontra-se disposta a freqüência dos escores, para cada aspecto histopatológico avaliado, distribuídas em função de sua ocorrência nos diversos grupos experimentais.

**Quadro 9** – Freqüência dos escores de acordo com os aspectos histopatológicos avaliados distribuídos em função dos grupos experimentais.

Aspectos Histológicos	Condições Observadas	GI (n=16)	GII (n=20)	GIII (n=19)
Intensidade do Infiltrado Inflamatório	1-De 0 a 23,2 células inflamatórias	14		
	2-De 23,3 a 91,2 células inflamatórias	2	9	3
	3-De 91,3 a 127,5 células inflamatórias		5	9
	4-Acima de 127,6 células inflamatórias		6	7
Espaço Periodontal Apical (EPA)	1-De 0 a 0,34mm	14		
	2-De 0,35 a 0,88mm	2	5	6
	3-De 0,89 a 1,16mm		3	12
	4-Acima de 1,17mm		12	1
Reabsorção Óssea	1-Ausente	13		
	2-Áreas reparadas	3		
	3-Pequenas áreas ativas		5	4
	4- Grandes áreas ativas		15	15
Localização do Infiltrado Inflamatório	1-Ausente	10		
	2-Restrito ao forame apical	6		
	3-Localizado até ½ do EPA			1
	4-Localizado acima de ½ do EPA		20	18
Reabsorção Cementária Apical	1-Ausente	16		
	2-Presente até ½ da espes. de cimento		9	9
	3-Presente além da ½ da espes. de cimento		9	10
	4-Presente atingindo a dentina		2	
Selamento apical	1. Total	4		
	2. Além da metade da abertura apical	8		
	3. Até da metade da abertura apical	2		2
	4. Ausente	2	20	17

A freqüência dos escores atribuídos ao nível apical da obturação nos três grupos experimentais está expressa no Quadro 10.

**Quadro 10** – Frequência dos escores atribuídos ao nível apical da obturação nos grupos I, II e III.

Nível apical da obturação		GI (n=16)	GII (n=20)	GIII (n=19)
1 – De 0,5 a 2 mm aquém do ápice		14	17	16
2 – Do limite apical até 0,5 mm aquém		1	3	3
3 – Extravasamento para a região periapical		1		

### **Análise histopatológica descritiva do Grupo I – Biopulpectomia (Figura 15)**

Neste grupo, foram avaliadas 16 raízes cujos canais radiculares foram tratados após pulpectomia. De um modo geral, eram evidentes os fenômenos de reparação dos tecidos apicais e periapicais.

Para avaliação da intensidade do infiltrado inflamatório foi realizada a contagem de células inflamatórias de todos os grupos experimentais, possibilitando a atribuição de escores aos espécimes. O escore 1, representativo da menor quantidade de células inflamatórias foi predominante para este grupo, sendo atribuído para 14 dos 16 casos.

Quanto à localização do infiltrado inflamatório, em 10 espécimes, o infiltrado inflamatório periapical estava ausente, e em 6, restrito a região do forame apical. A maior parte dos espécimes apresentou medidas do espaço periodontal apical menor que 0,35mm, sendo o escore 1, representativo de menor aumento do espaço periodontal apical, atribuído a 14 raízes.

A reabsorção radicular apical não foi observada nos espécimes do grupo I. Também não foi possível observar a ocorrência de reabsorção óssea ativa nestes espécimes. Em 13 espécimes a reabsorção estava ausente, sendo observada reabsorção óssea reparada em 3 casos.

Apenas 2 casos do grupo I não apresentaram sinais de ocorrência de selamento da abertura apical. Em 4 casos, o selamento foi considerado total; em 8 espécimes abrangendo mais da metade da abertura apical; e em 2 raízes estava presente, porém envolvendo menos que a metade da abertura apical.

## **Análise histopatológica descritiva do Grupo II – Necropulpectomia I - (Figura 16)**

Neste grupo, 20 canais radiculares foram obturados em dentes que apresentavam necrose pulpar sem lesão periapical visível radiograficamente no momento do tratamento endodôntico.

A contagem de células inflamatórias foi realizada para avaliação da intensidade do infiltrado inflamatório periapical, possibilitando a atribuição de escores, sendo determinados escores de 2 a 4 para os espécimes deste grupo. Nove casos receberam o escore 2, 5 espécimes foram avaliados com o escore 3 e 6 com escore 4, representativo da maior intensidade de células inflamatórias.

Quanto à extensão do infiltrado inflamatório apical, em todos os 20 espécimes do grupo II foi possível observar a presença de infiltrado inflamatório em grande extensão, correspondendo a mais da metade do espaço do ligamento periodontal.

As medidas do espaço periodontal apical foram medidas e após a determinação dos escores, 5 casos receberam escore 2 e 3 espécimes foram avaliados com escore 3. Doze casos apresentaram medidas do espaço periodontal apical com medidas acima de 1,17mm, correspondente ao escore 4, representativo das maiores medidas de espaço periodontal apical.

Também a reabsorção apical foi observada em todos os espécimes do grupo II, com extensão até a metade do cimento em 9 raízes; presente além da metade do cimento em 9 espécimes; e atingindo o tecido dentinário em 2 raízes.

Grandes áreas de reabsorção óssea ativa foram observadas em 15 espécimes, sendo que nos outros 5, a reabsorção óssea estava restrita à pequenas áreas. Nenhum espécime dos casos de necropulpectomia I apresentou sinais de selamento da abertura apical.

### **Análise histopatológica descritiva do Grupo III – Necropulpectomia II – (Figura 17)**

No grupo III, 19 raízes foram tratadas, envolvendo casos de necrose pulpar com lesão periapical visível radiograficamente, sendo composto. A contagem de células inflamatórias determinou para maioria das raízes a atribuição dos escores 3 e 4, relacionados a maior intensidade de células inflamatórias. Três raízes receberam escore 2, sendo que 9 casos apresentaram média de 91,3 a 127,5 células inflamatórias (escore 3), e 7 raízes apresentaram uma média acima de 127,6 células (escore 4).

Em 18 espécimes do grupo III, o infiltrado inflamatório localizava-se além da metade do espaço do ligamento periodontal e em apenas 1 até a metade do espaço periodontal.

As medidas do espaço do ligamento periodontal apical após a determinação dos escores foram na sua maioria (n=12) de 0,89 a 1,16, sendo atribuído o escore 3 para estes espécimes. Seis espécimes receberam escore 2 e um recebeu escore 4.

Nos casos de necropulpectomia II, em todas raízes havia reabsorção óssea ativa, sendo que em 15 espécimes, foram observadas grandes áreas de reabsorção ativa. A reabsorção cementária apical também estava presente em todos os espécimes do grupo III, sendo 9 casos com escore 2 (até a metade da espessura de cimento), e 10 com escore 3 (além da metade da espessura de cimento). Na maioria dos casos havia ausência de selamento da abertura apical por tecidos mineralizado (17 casos) e apenas 2 espécimes apresentaram deposição até metade da abertura apical.

## Resultados Estatísticos da Avaliação Histopatológica

As freqüências apresentadas no Quadro 9 foram dispostas de modo a receberem escores em forma crescente de severidade da reação inflamatória e reabsorção dos tecidos mineralizados, propiciando a aplicação do teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis. Este teste comparou os três grupos experimentais entre si, para posteriormente quando observada diferença significativa em nível de 5% fosse realizada a comparação entre os grupos, pelo teste de comparações múltiplas de Dunn buscando diferenciações entre eles. Os dados relativos a cada aspecto histológico avaliado (intensidade e extensão do infiltrado inflamatório periapical, espessura do espaço periodontal apical, reabsorção apical, reabsorção óssea e selamento apical) foram submetidos à análise estatística.

Estes dados estão dispostos nas Tabelas 9 a 23, com a soma de postos e postos médios dos grupos experimentais. Quando verificada diferença significativa entre os grupos, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Dunn obtendo-se as comparações entre os postos médios dos diferentes grupos, dois a dois.

Adicionalmente, uma análise global foi realizada, considerando todos os dados dos aspectos estudados.

### Intensidade do infiltrado inflamatório

Quando analisada a intensidade do infiltrado inflamatório, o menor posto médio foi apresentado pelo grupo I, seguido pelos grupos II e III. O resultado do teste de Dunn confirma a diferença mostrada pelo teste de Kruskal-Wallis. A Tabela 10 mostra a diferença entre o grupo I, quando comparado ao grupo II ( $p < 0,001$ ) e com o grupo III ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 9** – Comparação dos dados pelo teste de Kruskal-Wallis, relacionados à intensidade do infiltrado inflamatório periapical.

Grupos experimentais	Soma de Postos	Posto Médio	n
G I – Biopulpectomia	148,00	9,250	16
G II – Necropulpectomia I	665,00	33,250	20
G III – Necropulpectomia II	727,00	38,263	19
Kruskal-Wallis KW = 33,98			
GRUPOS EXPERIMENTAIS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES			

**Tabela 10** - Comparação dois a dois, entre os postos médios dos grupos experimentais quanto à intensidade do infiltrado inflamatório, de acordo com o teste de Dunn.

Comparação entre os grupos	Diferença entre os postos médios	Significância n.s.=5%
GI X GII	24,00	*** p<0,001
GI X GIII	29,01	*** p<0,001
GII X GIII	-5,013	ns p>0,05
DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTE ENTRE GRUPOS EXPERIMENTAIS (I e II) (I e III)		

### Espessura do espaço periodontal apical

Quando analisado o espessamento do espaço periodontal apical, o menor posto médio foi apresentado pelo grupo I, seguido pelos grupos III e II. O resultado do teste de Dunn confirma a diferença mostrada pelo teste de Kruskal-Wallis. Na Tabela 12 estão expressos os valores para as diferenças entre o grupo I e II ( $p < 0,001$ ) e I e III ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 11** - Comparação dos dados pelo teste de Kruskal-Wallis, relacionados à espessura do espaço periodontal apical.

Grupos experimentais	Soma de Postos	Posto Médio	n
G I – Biopulpectomia	147,00	9,188	16
G II – Necropulpectomia I	798,00	39,900	20
G III – Necropulpectomia II	595,00	31,316	19
Kruskal-Wallis KW = 30,71			
GRUPOS EXPERIMENTAIS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES			

**Tabela 12** – Comparação dois a dois, entre os postos médios dos grupos experimentais quanto à espessura do espaço periodontal apical, de acordo com o teste de Dunn.

Comparação entre os grupos	Diferença entre os postos médios	Significância	
		***	n.s.=5%
GI X GII	30,71	***	$p < 0,001$
GI X GIII	22,13	***	$p < 0,001$
GII X GIII	8,584	ns	$p > 0,05$
DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTE ENTRE GRUPOS EXPERIMENTAIS (I e II) (I e III).			

## Reabsorção óssea

Quando analisado a reabsorção óssea, o menor posto médio foi apresentado pelo grupo I, seguido pelos grupos II e III. O resultado do teste de Dunn confirma a diferença mostrada pelo teste de Kruskal-Wallis. Na Tabela 14 estão expressos os valores para as diferenças entre o grupo I e II ( $p < 0,001$ ) e I e III ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 13** – Comparação dos dados pelo teste de Kruskal-Wallis, relacionados à reabsorção óssea.

Grupos experimentais	Soma de Postos	Posto Médio	n
G I – Biopulpectomia	136,00	8,500	16
G II – Necropulpectomia I	712,50	35,625	20
G III – Necropulpectomia II	691,50	36,395	19
Kruskal-Wallis KW =40,78			
GRUPOS EXPERIMENTAIS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES			

**Tabela 14** – Comparação dois a dois, entre os postos médios dos grupos experimentais quanto à reabsorção óssea, de acordo com o teste de Dunn.

Comparação entre os grupos	Diferença entre os postos médios	Significância
		n.s.=5%
GI X GII	27,125	*** p<0,001
GI X GIII	27,895	*** p<0,001
GII X GIII	-0,7697	ns p>0,05
DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTE ENTRE GRUPOS EXPERIMENTAIS (I e II) (I e III).		

### Extensão do infiltrado inflamatório periapical

Quando analisado a extensão do infiltrado inflamatório, o menor posto médio foi apresentado pelo grupo I, seguido pelos grupos III e II. O resultado do teste de Dunn confirma a diferença mostrada pelo teste de Kruskal-Wallis. Na Tabela 16 estão expressos os valores para as diferenças entre o grupo I e II ( $p < 0,001$ ) e I e III ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 15** – Comparação dos dados pelo teste de Kruskal-Wallis, relacionados à extensão do infiltrado inflamatório periapical.

Grupos experimentais	Soma de Postos	Posto Médio	n
G I – Biopulpectomia	153,00	9,000	16
G II – Necropulpectomia I	720,00	36,000	20
G III – Necropulpectomia II	558,00	34,875	19
Kruskal-Wallis KW =50,47			
GRUPOS EXPERIMENTAIS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES			

**Tabela 16** – Comparação dois a dois, entre os postos médios dos grupos experimentais quanto ao infiltrado inflamatório periapical, de acordo com o teste de Dunn.

Comparação entre os grupos	Diferença entre os postos médios	Significância	
		n.s.=5%	
GI X GII	28,00	***	$p < 0,001$
GI X GIII	26,97	***	$p < 0,001$
GII X GIII	1,026	ns	$p > 0,05$
DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTE ENTRE GRUPOS EXPERIMENTAIS (I e II) (I e III).			

## Reabsorção apical

Quando analisado a extensão da reabsorção apical, o menor posto médio foi apresentado pelo grupo I, seguido pelos grupos III e II. O resultado do teste de Dunn confirma a diferença mostrada pelo teste de Kruskal-Wallis. Na Tabela 18 estão expressos os valores para as diferenças entre o grupo I e II ( $p < 0,001$ ) e I e III ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 17** – Comparação dos dados pelo teste de Kruskal-Wallis, relacionados com a reabsorção das estruturas mineralizadas apicais.

Grupos experimentais	Soma de Postos	Posto Médio	n
G I – Biopulpectomia	136,00	8,500	16
G II – Necropulpectomia I	743,50	37,175	20
G III – Necropulpectomia II	660,50	34,763	19
Kruskal-Wallis KW =37,42			
GRUPOS EXPERIMENTAIS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES			

**Tabela 18** – Comparação dois a dois, entre os postos médios dos grupos experimentais quanto à reabsorção das estruturas mineralizadas apicais, de acordo com o teste de Dunn.

Comparação entre os grupos	Diferença entre os postos médios	Significância	
		n.s.=5%	
GI X GII	28,68	***	$p < 0,001$
GI X GIII	26,26	***	$p < 0,001$
GII X GIII	2,412	ns	$p > 0,05$
DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTE ENTRE GRUPOS EXPERIMENTAIS (I e II) (I e III).			

## Selamento apical

Quando analisado a extensão do selamento apical, o menor posto médio foi apresentado pelo grupo I, seguido pelos grupos III e II. O resultado do teste de Dunn confirma a diferença mostrada pelo teste de Kruskal-Wallis. Na Tabela 20 estão expressos os valores para as diferenças entre o grupo I e II ( $p < 0,001$ ) e I e III ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 19** – Comparação dos dados pelo teste de Kruskal-Wallis, relacionados com o selamento da abertura apical.

Grupos experimentais	Soma de Postos	Posto Médio	n
G I – Biopulpectomia	181,00	11,313	16
G II – Necropulpectomia I	730,00	36,500	20
G III – Necropulpectomia II	629,00	33,105	19
Kruskal-Wallis KW =37,40			
GRUPOS EXPERIMENTAIS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES			

**Tabela 20** –Comparação dois a dois, entre os postos médios dos grupos experimentais quanto ao selamento da abertura apical, de acordo com o teste de Dunn.

Comparação entre os grupos	Diferença entre os postos médios	Significância	
		n.s.=5%	
GI X GII	25,188	***	$p < 0,001$
GI X GIII	21,793	***	$p < 0,001$
GII X GIII	3,395	ns	$p > 0,05$
DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTE ENTRE GRUPOS EXPERIMENTAIS (I e II) (I e III).			

### Nível da obturação

Quando analisado o nível da obturação, o teste de Kruskal-Wallis não apontou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 21).

**Tabela 21** – Comparação dos dados pelo teste de Kruskal-Wallis, relacionados com o nível apical da obturação.

Grupos experimentais	Soma de Postos	Posto Médio	n
G I – Biopulpectomia	442,00	27,625	16
G II – Necropulpectomia I	561,00	28,050	20
G III – Necropulpectomia II	537,00	28,263	19
Kruskal-Wallis KW =0,03766			
GRUPOS EXPERIMENTAIS NÃO SÃO ESTATISTICAMENTE DIFERENTES			

### Análise global dos parâmetros

Quando analisados os parâmetros de forma global, o menor posto médio foi apresentado pelo grupo I, seguido pelos grupos III e II. O resultado do teste de Dunn confirma a diferença mostrada pelo teste de Kruskal-Wallis. Na Tabela 23 estão expressos os valores para as diferenças entre o grupo I e II ( $p < 0,001$ ) e I e III ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 22** – Dados da comparação pelo teste de Kruskal-Wallis, considerando-se os aspectos avaliados de maneira global – intensidade e extensão do infiltrado inflamatório periapical, espessura do espaço periodontal apical e reabsorção cementária/dentinária e óssea.

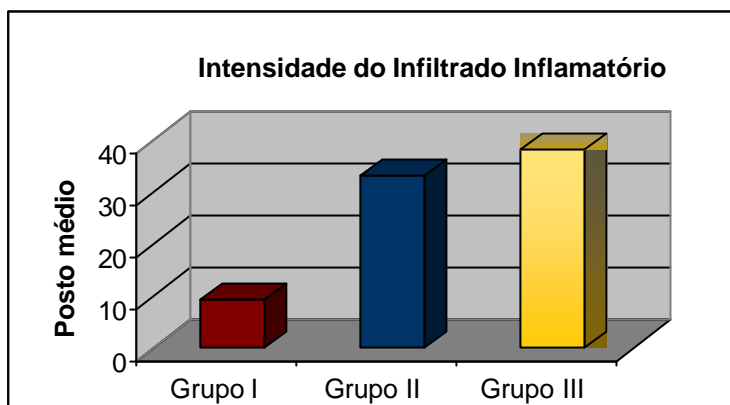
Grupos experimentais	Soma de Postos	Posto Médio	n
G I – Biopulpectomia	5515	57,448	16
G II – Necropulpectomia I	24628	212,31	20
G III – Necropulpectomia II	21860	198,73	19
Kruskal-Wallis KW = - 5882,0			
GRUPOS EXPERIMENTAIS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES (I e II) (I e III)			

**Tabela 23** –Comparação dois a dois, entre os postos médios dos grupos experimentais quanto à análise global dos parâmetros, de acordo com o teste de Dunn.

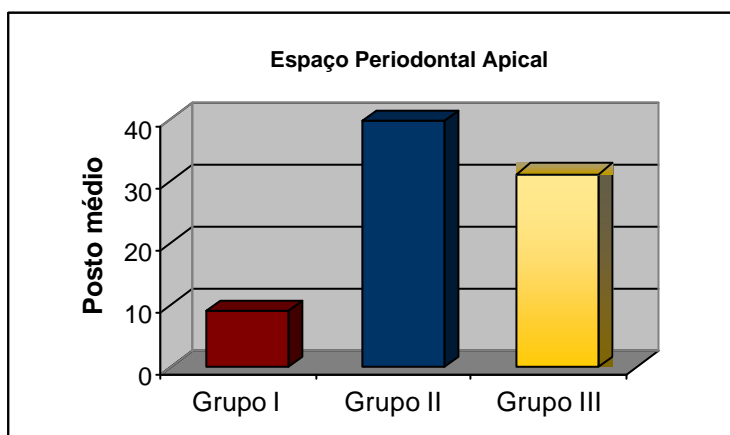
Comparação entre os grupos	Diferença entre os postos médios	Significância	
		n.s.=5%	
GI X GII	-154,86	***	p<0,001
GI X GIII	-141,28	***	p<0,001
GII X GIII	13,583	ns	p>0,05

DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTE ENTRE GRUPOS  
EXPERIMENTAIS (I e II) (I e III).

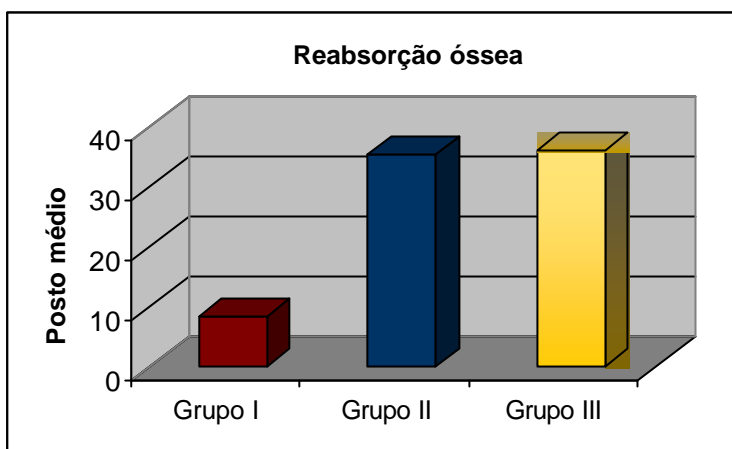
### Avaliação Histopatológica – Representação gráfica



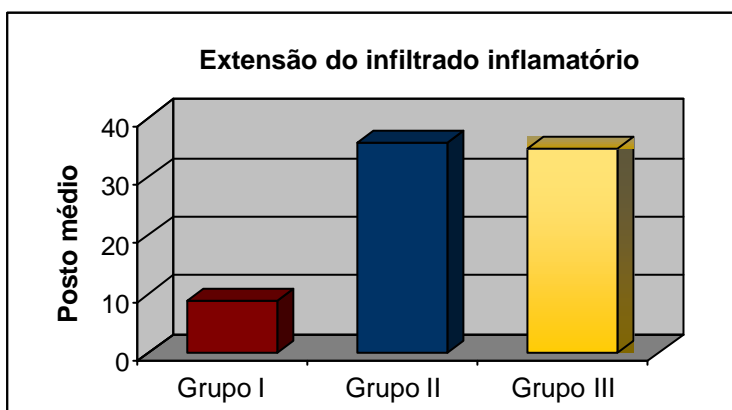
**Figura 18** – Representação gráfica dos postos médios da intensidade do infiltrado inflamatório de acordo com o grupo experimental.



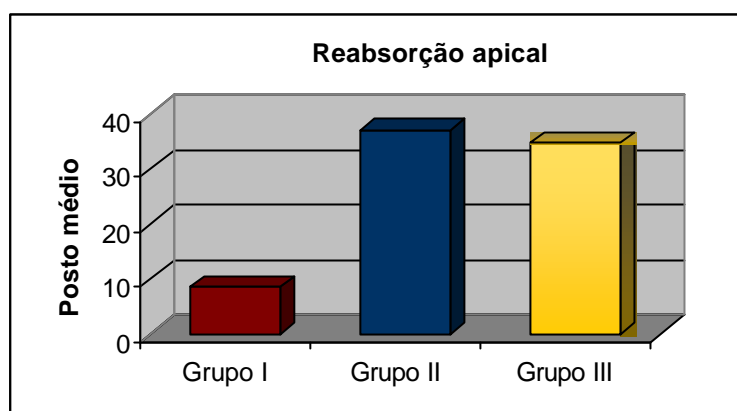
**Figura 19** – Representação gráfica dos postos médios da espessura do espaço periodontal apical, de acordo com o grupo experimental.



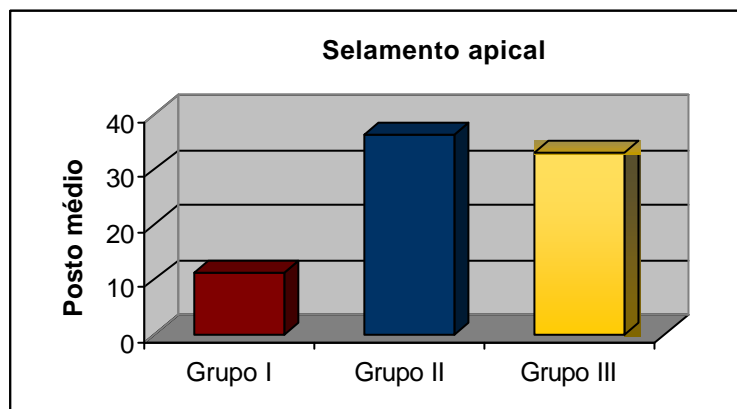
**Figura 20** – Representação gráfica dos postos médios da reabsorção do osso alveolar de acordo com o grupo experimental.



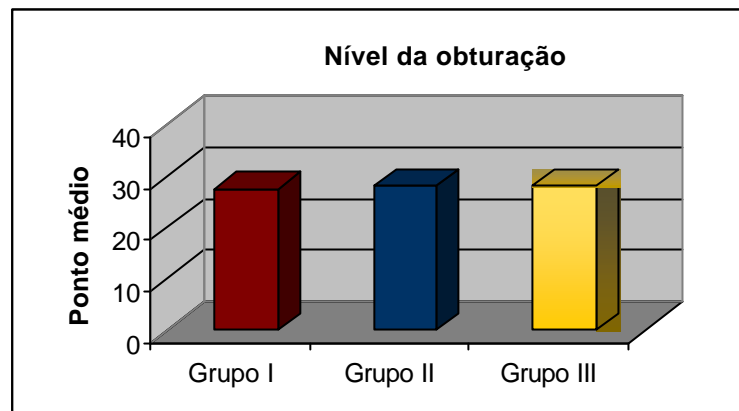
**Figura 21** – Representação gráfica dos postos médios da extensão do infiltrado inflamatório de acordo com o grupo experimental.



**Figura 22** – Representação gráfica dos postos médios da reabsorção apical de acordo com o grupo experimental.



**Figura 23** – Representação gráfica dos postos médios do selamento apical de acordo com o grupo experimental.



**Figura 24** – Representação gráfica dos postos médios do nível da obturação de acordo com o grupo experimental.

## *6. Discussão*

## 6. *Discussão*

### 6.1 **Discussão da Metodologia**

O tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar e presença de lesão visível radiograficamente é considerado um processo infeccioso de longa duração, sendo predominantes os microrganismos anaeróbios estritos com intensa presença de LPS bacteriano em todo o sistema de canais radiculares, região apical radicular externa e tecidos periapicais (ANDO; HOSHINO<sup>6</sup>, 1990; ARMITAGE<sup>8</sup>, 1983; LEONARDO et al<sup>90</sup>. 1994; SHOVELTON<sup>145</sup>, 1964). Esta situação implica na necessidade de um preparo biomecânico adequado com o uso de soluções irrigadoras anti-sépticas, aliado ao emprego de um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio para que ocorra a desinfecção e detoxificação dos tecidos mineralizados e periapicais, previamente à obturação dos canais radiculares, favorecendo desta forma, a reparação dos tecidos apicais e periapicais (LEONARDO et al.<sup>94,99</sup>, 2002, 2003; NELSON-FILHO et al.<sup>119</sup>, 2002; TANOMARU-FILHO et al.<sup>186,187,188</sup>, 1996, 1998, 2002).

No entanto, o tratamento endodôntico de dentes portadores de necrose pulpar sem lesão periapical visível radiograficamente, continua sendo um desafio para a endodontia biológica, que se preocupa não só com a técnica endodôntica correta, mas também com a preservação dos tecidos vitais, sem que ocorra a injúria dos mesmos. Isso se deve ao fato de que não existem até o momento, estudos histopatológicos que comprovem a necessidade do uso do curativo de demora nesta situação. Sabe-se que a condição de necrose pulpar indica um processo infeccioso. No entanto, após a necrose pulpar, se torna difícil estabelecer clínica e radiograficamente, a extensão do processo; a propagação dos microrganismos para o sistema de canais; as alterações da microbiota, ou seja, quando passam a predominar os microrganismos anaeróbios estritos com presença de LPS bacteriano.

Para melhor fundamentação científica do tratamento de dentes com necrose pulpar, torna-se importante avaliar as condições microbiológicas dos canais radiculares e o aspecto radiográfico e histopatológico após o

tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar com e sem lesão visível radiograficamente.

O cão é o modelo de estudo animal que mais se assemelha à espécie humana, no que se refere ao processo de reparo apical e periapical (CITROME et al.<sup>33</sup>, 1979). Apresentam dentes com estruturas mineralizadas semelhantes às do homem. Além disso, possui diversas vantagens como rápida taxa de crescimento, para que se obtenha resultados em um intervalo de tempo relativamente reduzido, além de serem animais de fácil obtenção e manuseio, sendo utilizado por diversos autores como Alencar et al.<sup>2</sup> (1997); Almeida<sup>4</sup> (1993); Barker et al.<sup>11</sup> (1971); Berbert et al.<sup>19</sup> (2002); Grecca et al.<sup>59</sup> (2001); Holland et al.<sup>67,69,70</sup> (1989, 1992, 1999); Leonardo et al.<sup>89,90,91,100</sup> (1994, 1995, 1996, 1998); Silva et al.<sup>146</sup> (2002); Watts e Paterson<sup>196</sup> (1992).

A idade dos cães utilizados neste estudo, entre 12 e 18 meses permite que os canais radiculares apresentem-se com os ápices já formados, e boa condição anatômica para o tratamento endodôntico (LEONARDO et al.<sup>100</sup> 1996; SOARES<sup>168,169</sup>, 1999, 2003).

Anteriormente a cada intervenção, os animais foram pré-anestesiados com injeção intramuscular de 2 mL de Rompum e posteriormente anestesiados com solução de Nembutal Sódico, em uma dosagem de 15 mg/Kg de peso do animal, segundo indicação das normas da ISO 10993-2.

Para padronização das tomadas radiográficas periapicais, foi utilizado um posicionador desenvolvido por Cordeiro et al.<sup>38</sup> (1995) para tomadas radiográficas periapicais padronizadas dos dentes de cães. Para possibilitar a comparação das radiografias nos períodos experimentais, as tomadas radiográficas, filme, aparelho de raios X, tempo de exposição, e processamento foram padronizados.

O estudo radiográfico foi realizado como um complemento às avaliações microbiológica e histológica. Foi utilizado para comprovação da indução das lesões periapicais nos casos de necropulpectomia II, e para avaliação após 30 dias de exposição dos canais radiculares ao meio bucal, nos casos de necropulpectomia I, para a verificação da não formação de lesão periapical; e para preservação dos casos.

A escolha dos segundos, terceiros e quartos pré-molares superiores ocorreu em função dos mesmos apresentarem igual número de raízes e canais amplos e retos, facilitando as tomadas radiográficas e o processamento histopatológico (LEONARDO et al.<sup>100</sup> 1996; SOARES<sup>168,169</sup>, 1999, 2003).

A ponte de esmalte oclusal foi preservada durante a abertura coronária com o objetivo de manter a resistência da coroa dentária, evitando as fraturas coronárias (BARKER; LOCKETT<sup>11</sup>, 1971).

A metodologia aplicada para indução de lesões periapicais foi a metodologia preconizada pela Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), desenvolvida por Silva<sup>147</sup> (1991), na qual o canal radicular, após a realização da pulpectomia, permanece exposto ao meio bucal por 7 dias. Neste período ocorre a contaminação do canal radicular. O selamento coronário favorece o crescimento e proliferação das lesões em aproximadamente 60 dias. Esta metodologia foi avaliada por Polisel Neto<sup>132</sup> (2002), que a comparou com a técnica utilizada na Faculdade de Odontologia de Araraçatuba, onde se mantém o canal radicular exposto ao meio bucal por 180 dias. Segundo o autor, o selamento coronário após a contaminação da cavidade pulpar por 7 dias, possibilita maior rapidez no processo de indução de lesão periapical em dentes de cães. Esta metodologia já vem sendo utilizada por autores como Berbert et al.<sup>19</sup> (2002); Leonardo et al.<sup>89,90,91,94,99</sup> (1994, 1995, 1998, 2002, 2003); e Tanomaru-Filho<sup>186,187,188</sup> (1996, 1998, 2002).

A metodologia aplicada para infecção dos canais radiculares nos casos de necropulpectomia I, onde os canais radiculares permaneceram expostos ao meio bucal por 30 dias, foi escolhida baseada na metodologia utilizada para indução de lesão periapical visível radiograficamente, na qual os canais radiculares permanecem expostos durante 180 dias (HOLLAND et al.<sup>69</sup>, 1992; SOARES<sup>169</sup>, 1999). Assim, a manutenção dos canais expostos ao meio bucal por 30 dias permitiu a infecção dos canais radiculares sem a formação de lesão periapical radiográfica, sendo observado em parte dos casos, espessamento do espaço periodontal.

A técnica de cultura é um método utilizado há muitas décadas, com baixa eficácia na detecção de alguns microrganismos de difícil

crescimento, sendo capaz de identificar apenas microrganismos viáveis. Diversos autores têm utilizado esta técnica para identificação dos microrganismos presentes nas infecções endodônticas (ABOU-RASS; BOGEN<sup>1</sup> 1998; ANDO; HOSHINO<sup>6</sup>, 1990; BAUMGARTNER; FALKLER<sup>15</sup>, 1991; EGAN et al.<sup>47</sup>, 2002; FUKUSHIMA et al.<sup>52</sup>, 1990; GOMES et al.<sup>55,56</sup>, 1996; LE GOFF et al.<sup>88</sup> 1997; SOARES<sup>168</sup>, 2003).

A colheita do conteúdo dos canais radiculares foi realizada sob isolamento absoluto e após a anti-sepsia do campo operatório, para minimizar o risco de contaminação dos canais radiculares durante o processo.

Nos casos de necropulpectomia II, onde as coroas estavam seladas, o cimento provisório foi removido com uma sonda exploradora nº 5, evitando a contaminação do campo operatório e da câmara pulpar pelos aerossóis do alta rotação.

A microbiota dos canais radiculares dos grupos II e III foi avaliada por meio de cultura e de *checkerboard*.

As técnicas de biologia molecular para detecção e identificação de microrganismos têm colaborado para a melhor compreensão da microbiota envolvida nas infecções endodônticas. O método de hibridação DNA-DNA *checkerboard* foi desenvolvido por Socransky et al.<sup>171</sup> (1994), e apresenta como vantagens a facilidade de execução, a possibilidade de análise de várias amostras clínicas, identificando até 40 espécies bacterianas diferentes em uma mesma membrana, além de detectar espécies fastidiosas e de difícil crescimento pelos métodos convencionais de cultura (De SOETE et al.<sup>43</sup>, 2001; SIQUEIRA Jr., et al.<sup>152,157, 159,160,162,163</sup>, 2000, 2001, 2002; SUNDE et al.<sup>178</sup>, 2000).

As amostras microbiológicas foram obtidas introduzindo-se seqüencialmente cones de papel absorvente esterilizados, 3 deles utilizados para a técnica de cultura e 2 para o exame *checkerboard*. Antes de introduzir os cones de papel nos canais radiculares, acrescentava-se soro fisiológico, agitando o conteúdo do canal radicular com uma lima Kerr nº 40, com o objetivo de manter em suspensão o material do interior do canal radicular (ALENCAR<sup>2</sup>, 1997; BYSTROM et al.<sup>25,26,27,28,29,30</sup>, 1981, 1983, 1985, 1985, 1987; SILVEIRA<sup>148</sup>, 1997; SOARES<sup>168,169</sup>, 1999, 2003).

As amostras colhidas para cultura foram transferidas para tubos de ensaio contendo 1,5 mL de fluido de transporte reduzido (RTF) e colocadas em um recipiente térmico, contendo gelo, e levados para o processamento microbiológico. O meio RTF mantém a viabilidade das bactérias entre o período de colheita e início da cultura. No meio RTF, a possibilidade de reprodução microbiana é bastante reduzida, o que atenua as variações quantitativas ou qualitativas em relação ao sítio de origem da amostra (ALENCAR<sup>2</sup>, 1997; BYSTROM et al.<sup>25,26,27,28,29,30</sup>, 1981, 1983, 1985, 1987; FABRICIUS<sup>48</sup>, 1982; KONTAKIOTIS et al.<sup>84</sup>, 1995).

O material colhido para *checkerboard* foi transferido para tubos Eppendorf contendo 1 mL de dimethyl-sulfóxido 5% em caldo trypticase(TSV-DMSO), e imediatamente congelados a -70°C para posterior processamento das amostras, todas em um mesmo momento (COLOMBO et al.<sup>36</sup>, 2002; SIQUEIRA Jr. et al.<sup>152,164</sup>, 2001, 2002).

Os quatro quadrantes do mesmo cão tiveram seus canais radiculares preparados em uma mesma sessão, iniciando-se pelos casos de biopulpectomia. Nestes casos, onde havia vitalidade pulpar, após a abertura coronária e determinação do comprimento de trabalho, foi realizado o arrombamento apical com limas tipo K até a de número 20, 25 ou 30. A solução irrigadora utilizada nestes casos foi o hipoclorito de sódio a 1%, recentemente titulado. O uso de uma solução de hipoclorito de sódio titulada se justifica uma vez que a concentração de cloro ativo está diretamente relacionada à ação antimicrobiana destas soluções (BYSTRÖM; SUNDQVIST<sup>28,29,30</sup>, 1981, 1983, 1985; SUNDQVIST<sup>181</sup>, 1989).

Nos demais grupos, onde os canais radiculares não apresentavam vitalidade pulpar, foi realizada a neutralização imediata do conteúdo séptico-tóxico dos canais radiculares, de acordo com a técnica clássica, utilizada por autores como Almeida<sup>3,4</sup>, 1993, 1997; Berbert<sup>19</sup>, 2002; Grecca<sup>59</sup>, 2001 e Leonardo<sup>94,99</sup>, 2002, 2003.

Após a neutralização do conteúdo séptico-tóxico dos canais radiculares nos grupos II e III, foi realizado o arrombamento do ápice radicular com o objetivo de padronizar o diâmetro da abertura apical de todos os canais.

Para o preparo biomecânico, foram empregadas limas tipo K no Comprimento Real de Trabalho, realizando a técnica clássica, de acordo com Leonardo e Leal<sup>92</sup> (1998). O uso desta técnica de instrumentação se justifica uma vez que os canais radiculares dos pré-molares de cães são amplos, retos e de fácil acesso. O preparo foi realizado até a lima número 60 para os segundos pré-molares inferiores e até o número 70 para os demais dentes, o que permite a limpeza adequada das paredes do canal radicular, respeitando a conformação anatômica principalmente da região apical destes canais.

A irrigação, durante todo o preparo biomecânico foi realizada utilizando o hipoclorito de sódio a 2,5% para os casos de necropulpectomia II e a 1% para os casos de biopulpectomia e necropulpectomia I, de acordo com a técnica preconizada pela Faculdade de Odontologia de Araraquara (LEONARDO; LEAL<sup>92</sup>, 1998), auxiliando na desinfecção do canal, e evitando o acúmulo de raspas de dentina na porção apical do canal radicular.

Durante a instrumentação, acumulam-se nas paredes dos canais radiculares, restos de tecido pulpar e de tecido dentinário que constituem a camada residual ou "smear layer". A presença desta camada nas paredes dos canais age como uma barreira mecânica, obstruindo a entrada dos túbulos dentinários (BAUMGARTNER; MADER<sup>16</sup>, 1987; LEONARDO et al.<sup>90</sup>, 1994; YAMASHITA et al.<sup>205</sup>, 2003). Sua remoção permite um melhor escoamento do material obturador, promovendo um melhor selamento (HOLLAND et al.<sup>68</sup>, 1988). No presente estudo, à semelhança de outros trabalhos já relatados na literatura<sup>(3,4,19,30,31,59,65)</sup> após a realização do preparo biomecânico, foi utilizada uma substância quelante, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), responsável pela remoção da camada residual. A solução de EDTA foi levada ao canal e agitada por três minutos, com o auxílio de uma lima endodôntica tipo K de pequeno diâmetro.

A obturação foi realizada utilizando-se a técnica clássica modificada, na qual o cone de guta-percha principal é envolto por cimento e levado ao canal radicular. A obturação foi complementada com a condensação lateral ativa, empregando-se cones de guta-percha auxiliares. Foi utilizado o cimento resinoso AH Plus devido às suas excelentes propriedades físico-químicas (ALMEIDA<sup>5</sup>, 2000; COBANKARA et al.<sup>34</sup>, 2002; De DEUS et al.<sup>42</sup>,

2002; LEONARDO et al.<sup>97</sup>, 2000; LUSSI; IMWINKELRIED STICH<sup>102</sup>, 1999; MILÉTIC et al.<sup>106,107</sup>, 1999, 2002; ORSTAVIK et al.<sup>124</sup>, 2001; SCHAFER; OLTHOFF<sup>140</sup>, 2002; SIQUEIRA Jr. et al.<sup>150</sup>, 2001; TIMPAWAT et al.<sup>189</sup>, 2001; ZMENER et al.<sup>207</sup>, 1997) e biocompatibilidade tanto em dentes com vitalidade pulpar quanto em casos de necrose pulpar com lesão periapical crônica (ALMEIDA<sup>3</sup>, 1997; BERBERT et al.<sup>19</sup>, 2002; HERNANDÉZ<sup>65</sup>, 2002; LEONARDO et al.<sup>94,96</sup>, 1999, 2003).

O uso de um cimento obturador à base de hidróxido de cálcio favoreceria o processo de reparo (HOLLAND<sup>69</sup>, 1992; LEONARDO et al.<sup>95</sup>, 1997; SONAT et al.<sup>172</sup>, 1990; TANOMARU-FILHO<sup>186</sup>, 1996), influenciando desta forma na avaliação das diferentes condições de reparação nos casos de biopulpectomia, necropulpectomia I e necropulpectomia II, proposta neste estudo.

As aberturas coronárias foram seladas com amálgama de prata condensado sobre uma base de cimento de fosfato de zinco, materiais já utilizados por Sonat et al.<sup>172</sup> (1990) e por Grecca et al.<sup>59</sup> (2001).

As amostras microbiológicas foram semeadas nos meios Ágar-sangue (As), incubado em aerobiose, ágar Mitis salivaris (Ms), incubado em microaerofilia, e Ágar-sangue suplementado com hemina e menadiona (Ask), incubado em anaerobiose, permitindo condições adequadas de crescimento para a variada microbiota dos canais radiculares. Os meios ágar gema de ovo hipertônico, e ágar McConkey foram utilizados para verificar o crescimento de *Staphylococcus* e de bactérias Gram-negativas, respectivamente. Além disso, todas as amostras foram semeadas em meio SB20, para que nos certificássemos que não havia ocorrido contaminação por *Streptococcus mutans*, uma vez que esta espécie não faz parte da microbiota bucal do cão.

De acordo com Loesche et al.<sup>101</sup> (1992), a metodologia de cultura não é indicada para ser utilizada isoladamente em estudos de prevalência. De acordo com o autor, os métodos que utilizam reagentes imunológicos ou a hibridação DNA-DNA *checkerboard* usada em nosso estudo, são significativamente superiores ao método convencional de cultura na detecção de espécies bacterianas.

Foi incluída neste estudo a técnica de hibridação DNA-DNA

*checkerboard*, para a melhor investigação da microbiota endodôntica, visto que diversos estudos têm demonstrado a presença de espécies de difícil crescimento na técnica de cultura, detectados apenas quando utilizados métodos de biologia molecular (CONRADS<sup>37</sup>, 1997; De Soete et al.<sup>43</sup>, 2001; MUNSON et al.<sup>116</sup>, 2002; SIQUEIRA Jr. et al.<sup>149,152,153,154,156,157,161,162,163</sup> 2000, 2001, 2003; XIA et al.<sup>202,203</sup> 2000, 2003).

As sondas de DNA utilizadas foram de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (ATCC 29523), *Actinomyces gerencseriae* (ATCC 23860), *Actinomyces meyeri* (35568), *Actinomyces naeslundii* genospecies 1 (ATCC 12104), *Actinomyces odontolyticus* (ATCC 17929), *Tannerella forsythensis* (ATCC 43037), *Campylobacter rectus* (ATCC 33238), *Capnocytophaga ochracea* (ATCC 33596), *Eikenella corrodens* (ATCC 23834), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Prevotella melaninogenica* (ATCC 25845), *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Propionibacterium acnes I* (ATCC 11827), *Streptococcus anginosus* (ATCC 33397), *Streptococcus constellatus* (ATCC 27823), *Streptococcus intermedius* (ATCC 27335), *Streptococcus gordonii* (ATCC 10558), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus oralis* (ATCC 33037), *Treponema denticola* (cepa B1, Forsyth Dental Center, Boston, MA). Estas espécies foram selecionadas devido a sua associação com diferentes tipos de infecções endodônticas e outras infecções orais (HAFFAJEE; SOCRANSKY<sup>62</sup>, 1994; HAFFAJEE et al.<sup>61</sup>, 1997; MOORE; MOORE<sup>113</sup>, 1994).

A determinação da microbiota endodôntica utilizando a técnica de “checkerboard DNA-DNA hybridization” foi realizada de acordo com a técnica descrita por Socransky et al.<sup>171</sup> (1994) e utilizada por Colombo et al.<sup>36</sup> (2002), Siqueira et al.<sup>163</sup> (2000) e Souza<sup>173</sup> (2003).

## 6.2 Discussão dos Resultados

### Discussão dos Resultados Microbiológicos

Em todas as amostras colhidas dos canais radiculares dos casos de necropulpectomia I e II (Grupos II e III), e analisadas por meio da técnica de cultura, foram detectados anaeróbios estritos, anaeróbios facultativos e aeróbios. Não foram detectadas em nenhuma das amostras *Streptococcus mutans*, estafilococos e bacilos gram-negativos não exigentes. Estes achados estão de acordo com outros estudos e também demonstraram que as infecções endodônticas são, em geral, polimicrobianas, com predomínio de bactérias anaeróbias estritas (FUKUSHIMA et al.<sup>52</sup>, 1990; GOMES<sup>54,55,56</sup>, 1994, 1996; KOBAYASHI et al.<sup>83</sup>, 1990; SOARES<sup>168,169</sup>, 1999, 2003; SUNDQVIST<sup>179</sup>, 1992).

Em todas as amostras foram detectados microrganismos, mesmo que em quantidade inferior a 20 ufc/mL, como pôde ser observado pela cultura em meio Tio's.

A diferença entre as médias do número de microrganismos encontrados nos casos de necrose sem e com lesão periapical crônica foi altamente significativa ( $p < 0,001$ ). Esta diferença pode estar relacionada ao fato de que para indução dos casos de necropulpectomia II, os canais radiculares foram expostos ao meio bucal por 7 dias, e depois selados por 60 dias, quando a colheita microbiológica foi realizada. Nos casos de necropulpectomia I, os canais radiculares foram expostos ao meio bucal por 30 dias, permitindo a

colonização por um maior número de células e espécies bacterianas.

Um outro fator que pode ter contribuído para o maior número de células bacterianas no grupo II que no grupo III, foi o selamento dos canais radiculares do grupo III, após 7 dias de exposição ao meio bucal. Esta mudança abrupta do ambiente, pode ter estressado a microbiota, ainda na fase de estabelecimento, prejudicando desta forma, a ocorrência do *shift* microbiano de maneira natural. No grupo II no entanto, além do maior tempo de exposição ao meio bucal, que facilitou a implantação de um maior número de espécies microbianas, a mudança da microbiota pôde ocorrer livremente, e apesar de 30 dias de exposição ser um tempo relativamente curto, este período já pode representar tempo suficiente para a ocorrência do *shift* microbiano, podendo inclusive, a colheita ter sido realizada ainda na fase inicial da mudança da microbiota.

A ausência de estudos em humanos, e também em cães, que relatem o período suficiente para que ocorra a mudança da microbiota de predominantemente aeróbia facultativa para anaeróbia, nos impede de afirmar se 30 dias de contaminação dos canais radiculares já representa tempo suficiente para a ocorrência do *shift* microbiano.

Visando melhor compreensão sobre a mudança de microbiota do sistema de canais radiculares, Fabricius et al.<sup>48</sup> observaram que após o selamento da câmara pulpar de dentes de macacos previamente expostos ao meio bucal, a quantidade de microrganismos anaeróbios obrigatórios em relação aos facultativos aumentou progressivamente com o decorrer do tempo. Deste modo, a relação de anaeróbios obrigatórios e facultativos aos 7, 90, 180 e 1060 dias foi de 1,7; 3,9; 6,5 e 11,3 respectivamente. Assim, a porcentagem de anaeróbios obrigatórios nas amostras iniciais era de 50% enquanto aos 1060 dias atingia 98%, sendo formada predominantemente por bactérias Gram negativas.

Também, Tani-Ishi et al.<sup>183</sup>, em 1994, verificaram a microbiota dos canais radiculares em dois períodos evolutivos da lesão periapical em dentes de ratos. Aos 7 e 15 dias, os anaeróbios obrigatórios aumentaram de 24,3 para 47,3% correspondendo à fase de expansão da lesão periapical. Nesta fase foi observada maior incidência de espécies de *Peptostreptococcus*,

*Neisseria, Prevotella e Porphyromonas.*

Sabe-se que os microrganismos que infectam a cavidade pulpar não se limitam à câmara pulpar e à luz do canal principal. Os canais laterais, secundários e acessórios, os cementoplastos apicais e os túbulos dentinários vão sendo progressivamente invadidos pelos microrganismos (RIBEIRO<sup>133</sup>, 1997; SILVEIRA<sup>148</sup>, 1997; LEONARDO et al.<sup>93</sup>, 2002; ANDO; HOSHINO<sup>6</sup>, 1990; ORSTAVIK; HAAPASALO<sup>123</sup>, 1990; PETERS<sup>127</sup>, 2002). Tendo em vista esta progressiva infecção dos canais radiculares, é provável que nos casos onde não havia evidência radiográfica de lesão periapical (Grupo II), apesar do alto número de anaeróbios na luz do canal principal, não se pode afirmar com certeza que a propagação microbiana já tivesse ocorrido para o sistema de canais radiculares, uma vez que a colheita foi realizada no canal radicular principal, portanto, nossos resultados refletem as condições microbiológicas do canal principal, e não do sistema de canais radiculares. Nossos resultados relataram um maior número de espécies e de células bacterianas no grupo onde os canais radiculares foram expostos por 30 dias.

Também a diferença entre as médias de contagens das espécies de microrganismos foi estatisticamente significativa, com predomínio de anaeróbios estritos e aeróbios sobre os facultativos. O fato de não ter ocorrido predomínio absoluto de anaeróbios, pode estar relacionado com a técnica de cultura utilizada neste estudo, a qual não foi realizada em câmara de anaerobiose, inviabilizando o crescimento de um grande número de anaeróbios estritos.

A detecção de microrganismos em todas as amostras pela técnica de cultura microbiológica e somente em alguns casos pela técnica de *checkerboard* pode ser explicado pelo fato de que a técnica de hibridação DNA-DNA *checkerboard* permite a detecção das espécies bacterianas somente quando ocorre a presença mínima de  $10^4$  células. Além disso, a técnica de *checkerboard* identifica apenas as espécies incluídas nas sondas utilizadas neste estudo. Desta forma, algumas das células bacterianas detectadas pelo método de cultura, podem ser de espécies não investigadas pelo método *checkerboard* neste estudo.

Gatti et al.<sup>53</sup> (2000) identificam por meio de DNA-DNA

*hibridization* as espécies bacterianas presentes em lesões periapicais assintomáticas. Em todas as amostras foi detectado DNA bacteriano. Sete sondas de DNA (*Bacteroides fragilis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter concisus*, *Capnocytophaga ochracea*, *Campylobacter sputorum* ss *sputorum*, *Selonomus noxia*, e *Porphyromonas endodontalis*) foram negativas em todas as lesões. Apenas as espécies *Bacteroides forsythus* e *Actinomyces naeslundii* estavam presentes em um grande número, independente da técnica de incisão utilizada.

Jung et al.<sup>73</sup> (2000) investigaram a epidemiologia de supostos patógenos presentes nos canais radiculares de dentes com periodontite apical. A metodologia utilizada fez uso de PCR e hibridação, usando sondas de oligonucleotídeos baseados em rRNA. As espécies encontradas com maior frequência foram *Fusobacterium* sp. (68,4%), seguida de *Peptostreptococcus micros* (44,7%), e *Porphyromonas gingivalis* (26,3%). Dezesesseis canais radiculares (42,1%) continham uma ou mais espécies das bactérias avaliadas. *Bacteroides forsythus* e *Treponema* sp. foram detectadas em 8 e 6 casos, respectivamente.

Os resultados destes estudos demonstram a variabilidade na prevalência das espécies bacterianas, principalmente em decorrência das metodologias utilizadas. Além disso, cabe ressaltar que um outro fator que pode influenciar nos resultados é o fato das amostras serem advindas de canais radiculares de dentes de cães.

A partir do estudo de Kakehashi et al.<sup>75</sup> (1965), que comprovou o papel dos microrganismos na etiopatogenia das patologias pulpares e periapicais, houve um aumento no número de estudos microbiológicos. Até o início da década de 70, as investigações apontavam a microbiota endodôntica como predominantemente facultativa (MORSE<sup>115</sup>, 1971). Com o surgimento das técnicas de isolamento e cultura em anaerobiose, os estudos começaram a apontar uma maior prevalência de bactérias anaeróbias estritas nas infecções endodônticas (SUNDQVIST<sup>180</sup>, 1976).

A técnica de hibridação DNA-DNA *checkerboard* permitiu a identificação de 12 espécies bacterianas diferentes nos casos de necropulpectomia I, sendo 6 delas de microrganismos anaeróbios estritos, 5 de

espécies bacterianas facultativas e 1 de aeróbio; e 5 espécies nos casos de necropulpectomia II, entre elas 4 de anaeróbios estritos e 1 de facultativo. Na necropulpectomia I, o número de canais que apresentaram bactérias foi maior, 12 de um total de 14 canais avaliados, quando comparado a necropulpectomia II, onde 5 dos 14 canais apresentaram DNA bacteriano. Cabe ressaltar que o método de identificação pela análise do DNA bacteriano, ou *checkerboard*, permite a detecção das espécies bacterianas somente quando ocorre a presença mínima de  $10^4$  células.

Além disso, o fato das amostras serem oriundas de canais radiculares de dentes de cães, pode ser um fator contribuinte para o menor número de espécies e de células bacterianas detectadas. Estudos onde a colheita foi realizada em canais radiculares de humanos, apresentaram números maiores de espécies bacterianas (SUNDE et al.<sup>178</sup>, 2000; SIQUEIRA Jr. et al.<sup>161,162,163,164</sup>, 2000, 2002; SOUZA<sup>173</sup>, 2003).

Em estudo de Siqueira Jr. et al.<sup>163</sup> (2000), o conteúdo de 28 canais radiculares de dentes de humanos foi examinado pela técnica de hibridação DNA-DNA *checkerboard*, onde 22 das 42 sondas utilizadas foram reativas com pelo menos uma das amostras, e o número de espécies bacterianas em cada amostra foi em média de 4,7 espécies, variando de 1 a 17. Das 28 amostras, 17 foram positivas para pelo menos uma das sondas de DNA.

O número de células bacterianas também foi maior nos canais radiculares do Grupo II. Estes resultados estão de acordo com os encontrados pelo método de cultura, que mostraram um maior número de microrganismos nos casos de canais radiculares com necrose pulpar sem lesão periapical visível radiograficamente que nos casos onde já existia evidência radiográfica de lesão periapical.

No grupo II, constituído por canais radiculares com necrose pulpar sem lesão periapical crônica, foram detectadas espécies de anaeróbios estritos como *Tannerella forsythensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* e *Treponema denticola*; anaeróbios facultativos como *Actinomyces gerencseriae*, *Capnocytophaga ochracea*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e

*Streptococcus oralis*, e *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria aeróbia Gram-negativa.

Foram detectadas, em 2 casos do grupo II, 11 espécies em um mesmo canal radicular, e 10 espécies em um dos canais. As espécies encontradas com maior frequência foram *Porphyromonas gingivalis*, e *Enterococcus faecalis*, presentes em 10 casos cada uma; e *Actinomyces gerencseriae* e *Prevotella intermedia*, detectadas em 6 casos.

Nos canais radiculares com necrose pulpar e lesão periapical crônica (Grupo III), foram detectadas 4 espécies de anaeróbios estritos, entre elas *Actinomyces gerencseriae*, *Tannerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e uma de anaeróbios facultativos, *Enterococcus faecalis*.

O número máximo de espécies detectadas nos canais do grupo III foi 4 espécies, sendo que as espécies mais frequentemente observadas foram, assim como no grupo II, *P. gingivalis* e *E. faecalis*, presentes em 3 casos.

Sabe-se que a infecção do tecido pulpar é inicialmente composta predominantemente por anaeróbios facultativos, ocorrendo alterações dos níveis de oxigênio, disponibilidade de nutrientes e interações microbianas, o que irá determinar com o passar do tempo, o maior predomínio de anaeróbios estritos (FABRICIUS et al.<sup>48</sup>, 1982; BASSLER<sup>14</sup>, 1999). Isto sugere que nos dois grupos, no momento da colheita, já houvesse ocorrido o *shift* microbiano, uma vez que houve predomínio de anaeróbios nos dois grupos. No entanto, não podemos afirmar em que momento ocorreu esta mudança da microbiota, e se ela estava restrita à luz do canal, ou se já havia ocorrido em todo o sistema de canais radiculares.

O fato de não haver predomínio de anaeróbios estritos no método de cultura, pode estar relacionado ao fato de que o processamento das amostras não foi realizado em câmara de anaerobiose, mas pelo sistema GasPak, o que permitiu que os microrganismos não viáveis, neste caso os Gram-negativos, anaeróbios estritos, fossem detectados apenas pelo método de hibridação DNA-DNA *checkerboard*, e não pelo método de cultura.

Os estudos epidemiológicos têm demonstrado que das mais de

500 espécies microbianas capazes de colonizar a cavidade bucal, apenas de 15 a 30 espécies têm sido freqüentemente detectadas nos canais radiculares infectados. Como supostos patógenos endodônticos, comumente associados com necrose pulpar e lesão periapical crônica, estão as espécies de *Bacteroides*, *Treponema*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Eubacterium*, *Actinomyces* e *Campylobacter*. Devemos salientar também, que mesmo as mais avançadas técnicas de biologia molecular não possibilitaram a detecção de pelo menos uma espécie envolvida em todos os casos de infecção endodôntica.

Os resultados deste estudo da microbiota dos canais radiculares confirmam o caráter polimicrobiano da infecção endodôntica, e a necessidade de estudos adicionais utilizando métodos de biologia molecular associados à técnica de cultura utilizando a câmara de anaerobiose, para melhor compreensão da microbiota endodôntica.

## **Discussão dos Resultados Radiográficos e Histopatológicos**

As periapicopatias ocorrem como consequência da infecção pulpar, sendo decorrente principalmente da evolução do processo de cárie. O estímulo contínuo dos microrganismos e seus produtos presentes no sistema de canais radiculares infectado promovem resposta imunológica, acarretando no

desenvolvimento da lesão periapical (KATEBZADEH et al.<sup>78</sup> 2000). Estas respostas envolvem mecanismos imunológicos com objetivo de proteção dos tecidos pulpar e periapical, mas que em acabam por mediar a reação inflamatória e reabsorção dos tecidos apicais e periapicais (STASHENKO<sup>176</sup>, 1992).

A relação entre a reação inflamatória periapical e a infecção bacteriana dos canais radiculares foi demonstrada em estudo clássico de Kakehashi et al.<sup>75</sup> (1965), que compararam as alterações pulpares e periapicais resultantes da exposição pulpar em ratos germ free e em ratos portadores de microbiota normal. No geral, ocorreu necrose do tecido pulpar na presença de bactérias, resultando no desenvolvimento de lesões periapicais crônicas. Nos animais germ free, não foi observada necrose pulpar, formação de granuloma apical ou abscessos. Também Sundqvist<sup>180</sup> (1976), avaliou 32 dentes unirradiculados sem vitalidade pulpar e sem exposição da câmara pulpar em 27 pacientes, e demonstrou o papel fundamental dos microrganismos na etiologia e desenvolvimento das lesões periapicais, com predomínio de anaeróbios estritos sobre aeróbios. Esta relação também foi comprovada por Moller et al.<sup>111</sup> (1981), que não obtiveram indução de formação de lesão periapical crônica após a remoção do tecido pulpar e selamento da câmara pulpar de dentes de macacos sem contaminação dos canais radiculares. Ao contrário, quando o tecido pulpar foi exposto ao meio bucal para contaminação, e posteriormente foi realizado o selamento coronário, os canais radiculares examinados após 6 meses demonstraram presença de microrganismos como *Streptococcus* alfa-hemolíticos, *Enterococcus*, e anaeróbios como os bacteróides, eubactéria, propionibactéria, e *Peptostreptococcus*, sendo que 90% dos dentes desenvolveram lesões periapicais visíveis radiograficamente.

A presença de resposta imunoinflamatória é detectada pela evidência radiográfica de destruição dos tecidos apicais e periapicais (KATEBZADEH et al.<sup>78</sup> 2000). Os resultados da análise radiográfica deste estudo demonstraram ausência de alterações radiográficas periapicais ou formação de espessamento da lâmina dura na maior parte dos canais radiculares expostos ao meio bucal durante 30 dias (Grupo II). Estes resultados

sugerem que no grupo II foi possível reproduzir as condições clínico-radiográficas do tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar sem lesão periapical crônica.

O estímulo e a curta duração do processo infeccioso não foi suficiente para promover reabsorção óssea compatível com a determinação do aspecto radiográfico da lesão periapical após período de contaminação no grupo II. Porém, nos casos relacionados à necropulpectomia II (Grupo III), onde as câmaras pulpares foram abertas, expostas ao meio bucal por 7 dias e em seguida seladas, foi observada evidência radiográfica de lesão periapical, após um período de 60 dias, conforme metodologia preconizada para indução de lesões periapicais por Leonardo et al., 1994<sup>90</sup>. Também, foi demonstrado pela coloração de Brown e Brenn que tal metodologia de indução da formação de lesões periapicais promove condições de propagação dos microrganismos para o sistema de canais radiculares (TANOMARU<sup>185</sup> 2004), assim como evidência radiográfica da formação das lesões periapicais (POLISELI-NETO<sup>132</sup> 2002).

Os microrganismos não constituem os únicos responsáveis pela indução da resposta imunoinflamatória que levará à formação das lesões periapicais. Também, e de forma bastante significativa, os componentes da parede celular dos microrganismos Gram-negativos, prevalentes neste estudo, de acordo com os resultados microbiológicos, tais como o lipopolissacarídeo ou o LPS tem sido apontado como responsável pelo desenvolvimento e manutenção do processo inflamatório na região periapical (DAHLEN; BERGENHOLTZ<sup>40</sup>, 1980; SHEIN; SCHILDER<sup>141</sup>, 1975; SCHONFELD et al.<sup>142</sup>, 1982; TANOMARU et al.<sup>184</sup>, 2003; NELSON-FILHO et al.<sup>119</sup>, 2002, SILVA et al.<sup>146</sup>, 2002). Nos grupos experimentais II e III, observamos intenso infiltrado inflamatório misto, com presença de linfócitos, macrófagos e plasmócitos. Estes achados estão de acordo com autores que caracterizaram a lesão periapical crônica (STASHENKO et al.<sup>174</sup>, 1994; STASHENKO; YU<sup>175</sup>, 1989; TORABINEJAD et al.<sup>190</sup>, 1985).

Os aspectos biológicos e microbiológicos são fundamentais na determinação das condutas da terapia endodôntica, destacando-se as diferenças no tratamento de um dente com vitalidade pulpar e sem vitalidade

pulpar. Nos casos de dentes com vitalidade pulpar, a polpa e a dentina radicular não estarão infectadas, sendo ideal a manutenção destas condições durante todo o tratamento. Desta forma, a reparação tecidual ocorrerá com um alto índice de sucesso (LEONARDO et al.<sup>95,96</sup>, 1997, 1999; ALMEIDA<sup>3</sup>, 1997), desde que respeitada a biologia dos tecidos apicais e periapicais. Neste estudo, observamos a manutenção da integridade dos tecidos apicais e periapicais ao exame radiográfico, após 180 dias, nos espécimes do grupo I, onde foram tratados os casos de biopulpectomia. Ocorreu em parte dos casos a formação de selamento da abertura apical por tecidos mineralizados ao exame histopatológico, além de ausência de reabsorção apical e periapical e manutenção da espessura normal do espaço do ligamento periodontal. A obtenção destes resultados em casos de biopulpectomia é possível desde que sejam seguidos princípios biológicos quanto à manutenção da cadeia asséptica, respeito aos tecidos apicais e periapicais, além do emprego de material obturador biológico.

A obturação, o mais hermética possível do sistema de canal radicular, é de fundamental importância para promover condições de reparação dos tecidos apicais e periapicais pós-tratamento endodôntico, possibilitando a formação do selamento apical biológico pela deposição de tecido mineralizado (LEONARDO; LEAL<sup>92</sup>, 1998). Esta reparação, considerada ideal, foi observada apenas após tratamento endodôntico de dentes com vitalidade pulpar, não sendo observada nos grupos em que a necropulpectomia foi realizada, uma vez que a indução do selamento biológico é possível em condições ideais de reparação, sendo incompatível com a intensa reação inflamatória observada nestes grupos experimentais.

Histologicamente, canais radiculares de pré-molares de cães, com vitalidade pulpar, que receberam o cimento AH Plus como material obturador mostraram reparação dos tecidos apicais com deposição de tecido mineralizado ao nível apical (LEONARDO et al.<sup>96</sup>, 1999). No entanto, nos casos de necropulpectomia, somente foi observada reparação satisfatória dos tecidos apicais e periapicais em dentes de cães com lesão periapical quando adequada desinfecção do sistema de canais radiculares foi obtida pelo uso de curativo de demora à base de hidróxido de cálcio (BERBERT<sup>19</sup> et al., 2002).

Nosso estudo demonstrou melhores resultados de reparação dos tecidos apicais e periapicais nos casos de biopulpectomia com diferença significativa quanto aos resultados observados nos casos de dentes sem vitalidade pulpar com ou sem lesão periapical radiográfica ( $p < 0,05$ ), os quais apresentaram reparação insatisfatória dos tecidos apicais e periapicais.

Maior intensidade nos fenômenos da resposta inflamatória e de reabsorção dos tecidos mineralizados apicais e periapicais foi observada nos grupos relacionados ao tratamento endodôntico de dentes sem vitalidade pulpar (grupos II e III), sem diferença significativa entre eles ( $p > 0,05$ ). Nestes casos, a região apical apresentava superfície do cimento com extensas áreas de reabsorção em quase todos os espécimes, envolvendo em algumas situações a dentina. A reabsorção do osso alveolar também era intensa promovendo grande extensão de aumento do espaço periodontal apical. Junto à abertura foraminal era freqüente a presença de focos concentrados de células inflamatórias, com extensão difusa para toda região periapical.

A análise global dos resultados histopatológicos mostrou reparo satisfatório dos tecidos apicais e periapicais apenas no grupo relacionado ao tratamento endodôntico de dentes com vitalidade pulpar. A avaliação do infiltrado inflamatório dos tecidos periapicais revela também diferença significativa entre os grupos com ou sem vitalidade pulpar ( $p < 0,05$ ). Nos grupos relacionados aos dentes sem vitalidade pulpar, a presença intensa de células inflamatórias, assim como sua disposição focal ou multifocal, levou-nos a inferir que, a presença de bactérias, seus produtos e subprodutos, bem como a endotoxina bacteriana, não foram inativados pela ação mecânica dos instrumentos e química da solução irrigadora utilizada durante o preparo biomecânico.

Nossos resultados sugerem que no tratamento endodôntico de dentes sem vitalidade pulpar e sem reação periapical crônica radiográfica (Grupo II) a desinfecção do sistema de canais radiculares foi insuficiente para promover reparação dos tecidos apicais e periapicais, uma vez que resultado insatisfatório foi observado, semelhante aos dentes com lesão periapical ( $p > 0,05$ ). Neste grupo, o uso de um curativo demora à base de hidróxido de cálcio estaria indicado com o objetivo de promover desinfecção do sistema de canais

radiculares, criando condições para a reparação apical e periapical.

Autores com Sjögren et al.<sup>167</sup>, 1997, Leonardo et al.<sup>90</sup>, 1994, Tanomaru Filho et al.<sup>187</sup> 2002 atribuem ao curativo de demora a diferença de porcentagem de sucesso existente entre os dentes com lesão periapical visível radiograficamente, obturados em única sessão, ou após o emprego da medicação intracanal. Esses autores afirmaram que a presença de lesão periapical representa uma condição de maior propagação da microbiota endodôntica pelo sistema de canais radiculares, impedindo que o preparo biomecânico seja capaz de atingir uma completa desinfecção do mesmo, tornando fundamental o emprego do curativo de demora. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a condição microbiológica presente no grupo II, embora sem lesão periapical visível radiograficamente, foi semelhante ao Grupo III onde as lesões periapicais radiográficas eram evidentes, uma vez que os resultados de reparação periapical foram semelhantes entre os grupos.

A dificuldade no estabelecimento exato do momento em que ocorre o rompimento da cortical óssea e a propagação da infecção endodôntica ocorre em função da deficiência do exame radiográfico na reprodução das condições encontradas no exame histopatológico (BARTHEL et al.<sup>12</sup>, 2004). Nossos resultados revelaram a presença de infiltrado inflamatório severo e reabsorção cementária e óssea mesmo nos casos onde o exame radiográfico demonstrou regressão parcial da lesão periapical, conforme demonstrado por Leonardo et al.<sup>90</sup>, 1994.

A relação entre o aspecto histológico e o aspecto radiográfico tem sido demonstrada por alguns estudos que afirmam que a aparência radiográfica da lesão periapical crônica é sempre menor que sua real extensão, observada no exame histopatológico. Assim, nossos resultados concordam que a ausência de sinais de lesão periapical radiográfica não exclui sua presença.

Corroborando com nossos estudos, estão os resultados de Pitt Ford<sup>130</sup> (1984), que investigou a correlação entre os exames radiográficos e histológicos de lesões periapicais de 26 canais radiculares de dentes de cães após o tratamento endodôntico. Os resultados demonstraram que o exame radiográfico coincidiu com o exame histológico mais freqüentemente na detecção da lesão do que na detecção de tecido periapical normal; sendo que,

quando as lesões foram detectadas radiograficamente, lesões histológicas estavam presentes em 85% das raízes; e quando a lesão não foi observada radiograficamente, os tecidos estavam normais em somente 58% dos casos.

Os resultados radiográficos e histopatológicos confirmaram os relatos de diversos autores, no que tange o insucesso do tratamento dos casos de necrose pulpar com lesão periapical crônica (Grupo III) em uma única sessão (PITT FORD<sup>129</sup>, 1982; LEONARDO et al.<sup>89,90</sup>, 1994, 1995; HOLLAND et al.<sup>69</sup>, 1992; SJÖGREN et al.<sup>167</sup>, 1997). No grupo III o exame radiográfico após 180 dias de preservação, demonstrou em sua totalidade, presença de reabsorção não nítida do trabeculado ósseo periapical (escore 3) ou reabsorção óssea periapical bem definida (escore 4).

Nos casos de dentes sem vitalidade pulpar e com ausência de lesão periapical visível radiograficamente, há uma carência de estudos que comprovem a eficácia do tratamento endodôntico em sessão única, dificultando o estabelecimento de um protocolo de tratamento para esses casos.

Radiograficamente, os canais radiculares do grupo II, os quais não apresentavam evidência radiográfica de lesão periapical, após 180 dias apresentaram sinais de rarefação óssea periapical ou lesão nítida em 78% dos casos. Isso provavelmente se deve ao fato de que após a obturação, apesar da diminuição da infecção endodôntica, foi possível a propagação da infecção e conseqüentemente de indução da reabsorção óssea periapical, uma vez que esta passou a ser nítida radiograficamente após 180 dias do tratamento endodôntico.

## *7. Conclusão*

---

## 7. Conclusão

De acordo com a metodologia empregada neste estudo podemos concluir que:

1. Nos casos de necrose pulpar com e sem lesão periapical visível radiograficamente, a infecção endodôntica é polimicrobiana, com predomínio de anaeróbios estritos, de acordo com o método *checkerboard*.
2. Foi possível observar um maior número de espécies e de células bacterianas no grupo II, onde os canais radiculares permaneceram expostos ao meio bucal por 30 dias.
3. A reparação dos tecidos apicais e periapicais após tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar com ou sem lesão periapical visível radiograficamente foi semelhante ( $p > 0,05$ ).
4. Os dentes com vitalidade pulpar apresentaram melhor reparação dos tecidos apicais e periapicais que os dentes sem vitalidade pulpar, com ou sem lesão periapical ( $p < 0,05$ ).

## *8. Referências*

---

## Referências\*

1. ABOU-RASS, M.; BOGEN, G. Microorganisms in closed periapical lesions. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.31, n.1, p.39-47, Jan. 1998.
2. ALENCAR, A.H.G.; LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B.; SILVA, R.S.; ITO, I.Y. Determination of the p-monochlorophenol residue in the calcium hydroxide + p-monochlorophenol combination used as an intracanal dressing in the pulpless teeth of dogs with induced chronic periapical lesion. **J. Endod.**, Chicago, v.23, n.8, p.522-524, Aug. 1997.
3. ALMEIDA, W.A. **Cimentos obturadores de canais radiculares. Avaliação histológica da resposta dos tecidos apicais e periapicais em dentes de cães após biopulpectomia. Estudo da infiltração marginal apical.** 1997. 192f. Tese (Doutorado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.
4. ALMEIDA, W.A. **Diferentes técnicas de tratamento de canais radiculares em dentes de cães com reação periapical crônica. Estudo radiográfico e histobacteriológico da reparação apical e periapical.** 1993. 190f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1993.
5. ALMEIDA, W.A.; LEONARDO, M.R.; TANOMARU FILHO, M.; SILVA, L.A.B. Evaluation of apical sealing of three endodontic sealers. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.33, n.1, p.25-27, Jan. 2000.
6. ANDO, N.; HOSHINO, E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentin. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.23, n.1, p.20-27, Jan. 1990.
7. ANDREASEN, J.O.; RUD, J.A. A histobacteriologic study of dental and periapical structures after endodontic surgery. **Int. J. Oral. Surg.**, Copenhagen, v.1, n.5, p.272-281, Nov. 1972.
8. ARMITAGE, G.C.; RYDER, M.I.; WILCOX, S.E. Cemental changes in teeth with heavily infected root canals. **J. Endod.**, Chicago, v.9, n.4, p.127-130, Apr. 1983.

---

\* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023 : informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

9. ASSED, S.; ITO, I.Y.; LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B.; LOPATIN, D.E. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.12, n.2, p.66-69, Apr. 1996.
10. BAE, K.S.; BAUMGARTNER, J.C.; SHEARER, T.R.; DAVID, L.L. Occurrence of *Prevotella intermedia* in infections of endodontic origin. **J. Endod.**, Chicago, v.23, n.10, p.620-623, Oct. 1997.
11. BARKER, B.C.; LOCKETT, B.C. An unusual response by dog pulp to calcium hydroxide. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.32, n.5, p.785-794, Nov. 1971.
12. BARTHEL, C.R.; ZIMMER, S.; TROPE, M. Relationship of radiologic and histologic signs of inflammation in human root-filled teeth. **J. Endod.**, Chicago, v.30, n.2, p.75-79, Feb. 2004.
13. BARTHEL, C.R.; LEVIN, L.G.; REISNER, H.M.; TROPE, M. TNF- $\infty$  release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.30, n.3, p.155-159, May 1997.
14. BASSLER, B.L. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. **Curr. Opin. Microbiol.**, London, v.2, n.6, p.582-587, 1999.
15. BAUMGARTNER, J.C.; FALKLER Jr., W.A. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. **J. Endod.**, Chicago, v.17, n.8, p.380-383, Aug. 1991.
16. BAUMGARTNER, J.C.; MADER, C.L. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. **J. Endod.**, Chicago, v.13, n.4, p.147-157, Apr. 1987.
17. BAUMGARTNER, J.C.; WATKINS, B.J.; BAE, K.S.; XIA, T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. **J. Endod.**, Chicago, v.25, n.6, p.413-415, June, 1999.
18. BAUMGARTNER, J.C.; WATTS, C.M.; XIA, T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. **J. Endod.**, Chicago, v.26, n.12, p.695-698, Dec. 2000.
19. BERBERT, F.L.; LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.; TANOMARU FILHO, M.; BRAMANTE, C.M. Influence of root canal dressings and sealers on repair of apical periodontitis after endodontic treatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.93, n.2, p.184-189, Feb. 2002.
20. BERG, J.O.; NORD, C.E. A method for isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.81, n.2, p.163-166, Feb. 1973.
21. BERGER, C.R. Tratamento Endodôntico em sessão única ou múltipla. Pesquisa clínica comparativa em dentes sem vitalidade pulpar. **RGO**, Porto Alegre, v.39, n.2, p.93-97, mar./abr. 1991.

22. BOGEN, G.; SLOTS, J. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.32, n.3, p.204-210, May, 1999.
23. BONIFÁCIO, K.C. MEV – **Avaliação do ápice radicular em dentes de humanos com e sem vitalidade pulpar**. 2000. 169f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.
24. BROWN, L.R.; RUDOLPH, C.E. Isolation and identification of microorganisms from unexposed canals of pulp-involved teeth. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.10, n.10, p.1094-1099, Oct. 1957.
25. BYSTROM, A.; CLAESSEON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.1, n.5, p.170-175, Oct. 1985.
26. BYSTROM, A.; HAPPONEN, R.P.; SJOGREN, U.; SUNDQVIST, G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endontic treatment with controlled asepsis. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.3, n.2, p.58-63, Apr. 1987.
27. BYSTRÖM, A.; HAPPONEN, R.P.; SJOGREN, U.; SUNDQVIST, G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.3, n.2, p.58-63, Apr. 1987.
28. BYSTROM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.55, n.3, p.307-312, Mar. 1983.
29. BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.89, n.4, p.321-328, Aug. 1981.
30. BYSTROM, A.; SUNDQVIST, G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.18, n.1, p.35-40, Jan.1985.
31. CÉSAR, C.A.S. **Efeito do curativo de demora à base de hidróxido de cálcio na reparação apical e periapical pós-tratamento de canais radiculares de dentes de cães com necrose pulpar e reação periapical crônica induzida: análise histopatológica**. 2003. 316f. Tese (Doutorado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
32. CHÁVEZ DE PAZ, L.E.; DAHLÉN, G.; MOLANDER, A.; MÖLLER, A.; BERGENHOLTZ. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.36, n. 7, p.500-508, July 2003.
33. CITROME, G.P.; KAMINSKI, E.J.; HEUER, M.A. A comparative study of tooth apexification in the dog. **J. Endod.**, Chicago, v.5, n.10, p.290-297, Oct. 1979.

34. COBANKARA, F.K.; ADANIR, N.; BELLI, S.; PASHLEY, D.H. A quantitative evaluation of apical leakage of four root-canal sealers. **Int. End. J.**, Oxford, v.35, n.12, p.979-984, Dec. 2002.
35. COBANKARA, F.K.; ALTIONOZ, H.C.; ERGANI, O.; KAV, K.; BELLI, S. In vitro antibacterial activities of root-canal sealers by using different methods. **J. Endod.**, Chicago, v.30, n.1, p.57-60, Jan. 2004.
36. COLOMBO, A.P.V.; TELES, R.P.; TORRES, M.C.; SOUTO, R.; ROSALÉM JR., W.; MENDES, M.C.S.; UZEDA, M. Subgingival microbiota of brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v.73, n.4, p.360-369, Apr. 2002.
37. CONRADS, G.; GHARBIA, S.E.; GULABIVALA, K.; LAMPERT, F.; SHAH, H.N. The use of a 16S rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. **J. Endod.**, Chicago, v.23, n.7, p.433-437, Jul. 1997.
38. CORDEIRO, R.C.; LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B.; CERRI, P.S. Desenvolvimento de um dispositivo para padronização de tomadas radiográficas em cães. **RPG**, São Paulo, v.2, n.3, p.138-140, jul./set. 1995.
39. COUTINHO-FILHO, T; GURGEL FILHO, E.D.; DIBLASI, F. Filosofia de trabalho nas obturações imediatas em dentes necrosados e com lesão periapical. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v.54, n.5, p.281-284, set./out.1997.
40. DAHLÉN, G.; BERGENHOLTZ, G.R. Endodontic activity in teeth with necrotic pulps. **J. Dent. Res.**, Oklahoma, v.59, n.6, p.1033-1040, June, 1980.
41. DAHLÉN, G.; MAGNUSSON, B. C.; MÖLLER, A. Histological and histochemical study of the influence of lipopolysaccharide extracted from *Fusobacterium nucleatum* on the periapical tissues in the monkey *Macaca fascicularis*. **Archs. Oral. Biol.**, Oxford, v.26, n.7, p.591-598, 1981.
42. De DEUS, G.; GURGEL FILHO, E.D.; FERREIRA, C.M.; COUTINHO FILHO, T. Penetração intratubular de cimentos endodônticos. **Pesq. Odontol. Bras.**, São Paulo, v.16, n.4, p.332-336, out./dec. 2002.
43. De SOETE, M.; MONGARDINI, C.; PAUWELS, M.; HAFFAJEE, A.; SOCRANSKY, S.; van STEENBERGHE, D.; QUIRYNEN, M. One-stage full-mouth disinfection. Long-term microbiological results analyzed by checkerboard DNA-DNA hybridization. **J. Periodontol.**, Chicago, v.72, n.3, p.374-382, Mar. 2001.
44. DOUGHERTY, W.J.; BAE, K.S.; WATKINS, B.J.; BAUMGARTNER, J.C. Black-pigmented bacteria in coronal and apical segments of infected root canals. **J. Endod.**, Chicago, v.24, n.5, p.356-358, May 1998.
45. DUARTE, M.A.; DERMARCHI, A.C.; MORAES, I.G. Determination of pH and calcium ion release provided by pure and calcium hydroxide-containing AHPlus. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.37, n.1, p.42-45, Jan. 2004.

46. DWYER, T.G.; TORABINEJAD, M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat. **J. Endod.**, Chicago, v.7, n.1, p.31-35, Jan. 1981.
47. EGAN, M.W.; SPRATT, D.A.; NG, Y-L.; LAM, J.M.; MOLES, D.R.; GULABIVALA, K. Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.35, n.4, p.321-329, Apr. 2002.
48. FABRICIUS, L.; DAHLÉN, G.; OHMAN, A.E.; MÖLLER, A.J. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.90, n.2, p.134-144, Apr. 1982.
49. FIELD, J.W.; GUTMANN, J.L.; SOLOMON, E.S.; RAKUSIN, H. A clinical radiographic retrospective assessment of the success rate of single-visit root canal treatment. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.37, n.1, p.70-82, Jan. 2004.
50. FOUAD, A.F.; BARRY, J.; CAIMANO, M.; CLAWSON, M.; ZHU, Q.; CARVER, R.; HAZLETT, K.; RADOLF, J.D. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.40, n.9, p.3223-3231, Sept. 2002.
51. FOUAD, A.F.; WALTON, R.E.; RITTMAN, B.R. Induced periapical lesions in ferret canines: histologic and radiographic evaluation. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.8, n.2, p.56-62, Apr. 1992.
52. FUKUSHIMA, H.; YAMAMOTO, K.; HIROHATA, K.; SAGAWA, H.; LEUNG, K-P.; WALKER, C.B. Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. **J. Endod.**, Chicago, v.16, n.11, p.534-538, Nov. 1990.
53. GATTI, J.J.; DOBECK, J.M.; SMITH, C.; WHITE, R.R.; SOCRANSKY, S.S., SKOBE, Z. Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA-DNA hybridization. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.16, n.5, p.197-204, Oct. 2000.
54. GOMES, B.P.F.A.; DRUCKER, D.B.; LILLEY, J.D. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.27, n.6, p.291-298, Nov. 1994.
55. GOMES, B.P.F.A.; LILEY, J.D.; DRUCKER, D.B. Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.29, n.2, p.69-75, Mar. 1996.
56. GOMES, B.P.F.A.; LILLEY, J.D.; DRUCKER, D.B. Clinical significance fo dental root canal microflora. **J. Dent.**, Bristol, v.24, n.1-2, p.47-55, Jan./Mar. 1996.
57. GONÇALVES, R.B.; MOUTON, C. Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in infected root canals. **J. Endod.**, Chicago, v.25, n.5, p.336-340, May, 1999.

58. GONÇALVES, R.B.; ROBITAILLE, M.; MOUTON, C. Identical clonal types of *Porphyromonas gingivalis* or *Prevotella nigrescens* recovered from infected root canals and subgingival plaque. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.14, n.3, p.197-200, June, 1999.
59. GRECCA, F.S.; LEONARDO, M.R.; da SILVA, L.A.; TANOMARU FILHO, M.; BORGES, M.A. Radiographic evaluation of periradicular repair after endodontic treatment of dog's teeth with induced periradicular periodontitis. **J. Endod.**, Chicago, v.27, n.10, p.610-612, Oct. 2001.
60. GROSSMAN, L.I. Bacteriologic status of periapical tissue in 150 cases of pulpless teeth. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.38, n.1, p.101-104, Jan./Feb. 1959.
61. HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; DIBART, S.; SMITH, C.; KENT, R.L.J.; SOCRANSKY, S.S. The effect of SPR on clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, v.24, n.5, p.324-334, May, 1997.
62. HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. **Periodontol.** 2000, Munksgaard, v.5, p.78-111, June, 1994.
63. HASHIMURA, T.; SATO, M.; HOSHINO, E. Detection of *Slackia exigua*, *Mogibacterium timidum* e *Eubacterium saphenum* from pulpal and periradicular samples using the polymerase chain reaction (PCR) method. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.34, n.6, p.463-470, Sep. 2001.
64. HASHIOKA, K.; YAMASAKI, M.; NAKANE, A.; HORIBA, N.; NAKAMURA, H. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. **J. Endod.**, Chicago, v.18, n.11, p.558-561, Nov. 1992.
65. HERNÁNDEZ, M.A.F. **Avaliação histopatológica da reparação apical e periapical pós-tratamento de canais radiculares de dentes de cães, com lesão periapical crônica induzida, utilizando curativos de demora à base de hidróxido de cálcio em diferentes períodos de tempo e obturação com cimento endodôntico à base de resina epóxica.** 2002. 196f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.
66. HOLLAND, R.; OTOBONI FILHO, J.A.; SOUZA, V.; NERY, M.J.; BERNABÉ, P.F.E.; DEZAN Jr, E. A comparison of one versus two appointment endodontic therapy in dogs' teeth with apical periodontitis. **J. Endod.**, Chicago, v.29, n.2, p.121-124, Feb. 2003.
67. HOLLAND, R.; OTOBONI FILHO, J.A.; SOUZA, V.; NERY, M.J.; BERNABÉ, P.F.E.; DEZAN JÚNIOR, E. Reparação dos tecidos periapicais com diferentes formulações de Ca(OH)<sub>2</sub>, estudo em cães. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v.53, n.4, p.327-321, jul./ago. 1999.

68. HOLLAND, R.; SILVA, A.C.F.; BAZAGLIA, A.M.; BARROS, V.C.L.; MAGRO, V.M. Influência do uso de soluções descalcificadoras na obturação do sistema de canais radiculares. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v.45, n.2, p.16-22, mar./abr. 1988.
69. HOLLAND, R.; SOARES, I.J.; SOARES, I.M. Influence of irrigation and intracanal dressing on the healing process of dogs' teeth with apical periodontitis. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.8, n.6, p.223-229, Dec. 1992.
70. HOLLAND, R.; SOARES, I.J.; SOARES, I.M.L.; DIAS, N.V. Efeito do curativo de demora na reação tecidual de dentes de cães após o emprego de plug de raspas de dentina em casos de necropulpectomia. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v.18, n.1-2, p.101-108, 1989.
71. HORIBA, N.; MAEKAWA, Y.; MATSUMOTO, T.; NAKAMURA, H. A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. **J. Endod.**, Chicago, v.16, n.7, p.331-334, July 1990.
72. HORSTED-BINDSLEV, P.; LOVSCHALL, H. Treatment outcome of vital pulp treatment. **Endod. Topics**, Oxford, v.2, n.1, p.24-34, July 2002.
73. JUNG, I.Y.; CHOI, B.K.; KUM, K.Y.; ROH, B.D.; LEE, S.J.; LEE, C.Y.; PARK, D.S. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. **J. Endod.**, Chicago, v.26, n.10, p.599-604, Oct. 2000.
74. JUNG, I.Y.; CHOI, B.K.; KUM, K.Y.; YOO, Y.J.; YOON, T.C.; LEE, S.J.; LEE, C.Y. Identification of oral spirochetes at the species level, and their association with other bacteria in endodontic infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol Endod.**, St. Louis, v.92, n.3, p.329-334, Sept. 2001.
75. KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R.; FITZGERALD, R.J. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.20, n.3, p.340-349, Sept. 1965.
76. KANTZ, W.E.; HENRY, C.A. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non-vital teeth in man. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.19, n.1, p.91-96, Jan. 1974.
77. KAPLAN, A.E.; PICCA, M.; GONZALEZ, M.I.; MACCHI, R.L.; MOLGATINI, S.L. Antimicrobial effect of six endodontic sealers: an in vitro evaluation. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.15, n.1, p.42-45, Feb. 1999.
78. KATEBZADEH, D.; SIGURDSSON, A.; TROPE, M. Radiographic evaluation of periapical healing after obturation of infected root canals: an in vivo study. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.33, n.1, p.60-66, Jan. 2000.
79. KATEBZADEH, N.; HUPP, J.; TROPE, M. Histological periapical repair after obturation of infected root canals in dogs. **J. Endod.**, Chicago, v.25, n.5, p.364-368, May, 1999.

80. KEUDELL, K.; CONTE, M.; FUJIMOTO, L.; ERNEST, M.; BERRY, H.G. Microorganisms isolated from pulp chambers. **J. Endod.**, Chicago, v.2, n.5, p.146-148, May, 1976.
81. KIRYU, T.; HOSHINO, E.; IWAKU, M. Bacteria invading periapical cementum. **J. Endod.**, Chicago, v.20, n.4, p.169-171, Apr. 1994.
82. KLEIN, M.I.; GONÇALVES, R.B. Detection of *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) and *Porphyromonas gingivalis* by polymerase chain reaction in subjects with different periodontal status. **J. Periodontol.**, Chicago, v.74, n.6, p.798-802, June, 2003.
83. KOBAYASHI, T.; HAYASHI, A.; YOSHIKAWA, R.; OKUDA, K.; HARA, K. The microbial flora from root canals and periodontal pockets of non-vital teeth associated with advanced periodontitis. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.23, n.2, p.100-106, Mar. 1990.
84. KONTAKIOTIS, E.; NAKOU, M.; GEORGOPOULOU, M. In vitro study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.28, n.6, p.285-289, Nov. 1995.
85. KOULAOUZIDOU, E.A.; PAPAISIS, K.T.; BELTES, P.; GEROMICHALOS, G.D.; KORTSARIS, A.H. Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers: an in vitro evaluation. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.14, n.4, p.182-185, Aug. 1998.
86. LAI, C.C.; HUANG, F.M.; YANG, H.W.; CHAN, Y.; HUANG, M.S.; CHOU, M.Y.; CHANG, Y.C. Antimicrobial activity of four root canal sealers against endodontic pathogens. **Clin. Oral Investig.**, Berlin, v.5, n.4, p.236-239, Dec. 2001.
87. LANA, M.A.; RIBEIRO-SOBRINHO, A.P.; STEHLING, R.; GARCIA, G.D.; SILVA, B.K.C.; HAMDAN, J.S.; NICOLI, J.R.; CARVALHO, M.A.R.; FARIAS, M.L. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.16, n.2, p.100-105, Apr. 2001.
88. LE GOFF, A.; BUNETEL, L.; MOUTON, C.; BONNAURE-MALLET M. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.12, n.5, p.318-322, Oct. 1997.
89. LEONARDO, M.R.; ALMEIDA, W.A.; BEZERRA DA SILVA, L.A.; UTRILLA, L.S. Histopathological observations of periapical repair in teeth with radiolucent areas submitted to two different methods of root canal treatment. **J. Endod.**, Chicago, v.21, n.3, p.137-141, Mar. 1995.
90. LEONARDO, M.R.; ALMEIDA, W.A.; ITO, I.Y.; SILVA, L.A.B. Radiographic and microbiologic evaluation of posttreatment apical and periapical repair of root canals of dog's teeth with experimentally induced chronic lesion. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.78, n.2, p.232-238, Aug. 1994.

91. LEONARDO, M.R.; ALMEIDA, W.A.; SILVA, L.A.B.; UTRILLA, L.S. Histological evaluation of the response of apical tissues to glass ionomer and zinc oxide-eugenol based sealers in dog teeth after root canal treatment. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.14, n.6, p.257-261, Dec. 1998.
92. LEONARDO, M.R.; LEAL, J.M. **Endodontia: tratamento de canais radiculares**. 3.ed. São Paulo: Panamericana, 1998. 908p.
93. LEONARDO, M.R.; ROSSI, M.A.; SILVA, L.A.; ITO, I.Y.; BONIFÁCIO, K.C. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. **J. Endod.**, Chicago, v.28, n.12, p.815-818, Dec. 2002.
94. LEONARDO, M.R.; SALGADO, A.A.; da SILVA, L.A.; TANOMARU-FILHO, M. Apical and periapical repair of dogs' teeth with periapical lesions after endodontic treatment with different root canal sealers. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v.17, n.1, p.69-74, jan./mar. 2003.
95. LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.; UTRILLA, L.S.; ASSED, S.; ETHER, S.S. Calcium hydroxide root canal sealers: histopathologic evaluation of apical and periapical repair after endodontic treatment. **J. Endod.**, Chicago, v.23, n.7, p.428-432, July, 1997.
96. LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B.; ALMEIDA, W.A.; UTRILA, L.S. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.15, n.1, p.28-32, Feb. 1999.
97. LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B.; TANOMARU FILHO, M.; BONIFÁCIO, K.C.; ITO, I.Y. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. **J. Endod.**, Chicago, v.26, n.7, p.391-394, July 2000.
98. LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B.; TANOMARU FILHO, M.; SILVA, R.S. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St Louis, v.88, n.2, p.221-225, Aug. 1999.
99. LEONARDO, M.R.; SILVEIRA, F.F.; SILVA, L.A.; TANOMARU FILHO, M.; UTRILLA, L.S. Calcium hydroxide root canal dressing. Histopathological evaluation of periapical repair at different time periods. **Braz. Dent. J.**, São Paulo, v.13, n.1, p.17-22, 2002.
100. LEONARDO, M.R.; UTRILLA, L.S.; ASSED, S.; SILVA, L.A.B. Avaliação histopatológica dos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães após biopulpectomia e utilização de diferentes curativos de demora. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v.32, n.1, p.14-19, jan. 1996.
101. LOESCHE, W.J.; LOPATIN, D.E.; STOLL, J.; van POPERIN, N.; HUJOEL, P.P. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference standard?. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.30, n.2, p.418-426, Feb. 1992.

102. LUSSI, A.; IMWINKELRIED STICH, H. Obturation of root canals with different sealers using non-instrumentation technology. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.32, n.1, p.17-23, Jan. 1999.
103. MELVILL, T.H.; BIRCH, R.H. Root canal and periapical floras of infected teeth. **Oral Surg.**, St. Louis, v.23, n.1, p.93-98, Jan. 1967.
104. MICKEL, A.K.; NGUYEN, T.H.; CHOGLE, S. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. **J. Endod.**, Chicago, v.29, n.4, p.257-258, Apr. 2003.
105. MILÉTIĆ, I.; ANIC, I.; KARLOVIC, Z.; MARSAN, T.; PEZELJ-RIBARIC, S.; OSMAK, M. Cytotoxic effect of four root filling materials. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.16, n.6, p.287-290, Dec. 2000.
106. MILÉTIĆ, I.; ANIC, I.; PEZELJ-RIBARIC, S.; JUKIC, S. Leakage of five root canal sealers. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.32, n.5, p.415-418, Sept. 1999.
107. MILÉTIĆ, I.; PRPIC-MEHICIC, G.; MARSAN, T.; TAMBIC-ANDRASEVIC, A.; PLESKO, S.; KARLOVIC, Z.; ANIC, I. Bacterial and fungal microleakage of AH26 and AH Plus root canal sealers. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.35, n.5, p.428-432, May, 2002.
108. MILÉTIĆ, I.; RIBARIC, S.P.; KARLOVIC, Z.; JUKIC, S.; BOSNJAK, A.; ANIC, I. Apical leakage of five root canal sealers after one year of storage. **J. Endod.**, Chicago, v.28, n.6, p.431-432, June, 2002.
109. MILLER, W.D. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. **Dent. Cosmos**, Philadelphia, v.36, n.7, p.505-528, July, 1894.
110. MOLANDER, A.; REIT, C.; DAHLÉN, G.; KVIST, T. Microbiological status of root-filled teeth with periapical periodontitis. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.31, n.1, p.1-7, Jan. 1998.
111. MOLLER, A.J.; FABRICIUS, L.; DAHLEN, G.; OHMAN, A.E.; HEYDEN, G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.89, n.6, p.474-486, Dec. 1981.
112. MOLLER, A.J.; FABRICIUS, L.; DAHLEN, G.; SUNDQVIST, G.; HAPPONEN, R.P. Apical periodontitis development and bacterial response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains. **Eur. J. Oral Sci.**, v.112, n.3, p.207-215, June 2004.
113. MOORE, W.E.; MOORE, L.V. The bacteria of periodontal diseases. **Periodontol.** 2000, Munksgaard, v.5, p.66-77, June, 1994.

114. MORAES, S.R.; SIQUEIRA Jr., J.F.; COLOMBO, A.P.; ROÇAS, I.S.; DOMINGUES, R. Comparison of the effectiveness of bacterial culture, 16S rDNA directed polymerase chain reaction, and checkerboard DNA-DNA hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic infections. **J. Endod.**, Chicago, v.28, n.2, p.86-89, Feb. 2002.
115. MORSE, D.R. The endodontic culture technique: an impractical and unnecessary procedure. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.15, n.6, Oct. 1971.
116. MUNSON, M.A.; PITT FORD, T.; CHONG, B.; WEIGHTMAN, A.; WADE, W.G. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.81, n.11, p.761-766, Nov. 2002.
117. NAIR, P.N.R. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. **J. Endod.**, Chicago, v.13, n.1, p.29-39, Jan. 1987.
118. NAIR, P.N.R.; SJÖGREN, U.; KREY, G.; KAHNBERG, K-E.; 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.**, Chicago, v.16, n.12, p.580-588, Dec. 1990.
119. NELSON-FILHO, P.; LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B.; ASSED, S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues in dogs. **J. Endod.**, Chicago, v.28, n.1, p.694-696, Oct. 2002.
120. OLIET, S. Single-visit endodontics: a clinical study. **J. Endod.**, Baltimore, v.9, n.4, p. 147-152, Apr. 1983.
121. OLIVEIRA, J.C.M.; RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA JR., J.F. Detecção de *Porphyromonas endodontalis* em casos de abscesso perirradicular agudo pelo método da reação em cadeia da polimerase. **J. Bras. Endod.**, Curitiba, v.3, n.11, p.282-285, out./dez. 2002.
122. OLIVEIRA, J.C.M.; SIQUEIRA Jr., J.F.; ALVES, G.B.; HIRATA Jr., R.; ANDRADE, A.F.B. Detection of *Porphyromonas endodontalis* in infected root canals by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. **J. Endod.**, Chicago, v.26, n.12, p.729-732, Dec. 2000.
123. ORSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. Disinfection by endodontic irrigants and dressing of experimentally infected dentinal tubules. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.6, n.4, p.142-149, Aug. 1990.
124. ORSTAVIK, D.; NORDAHL, I.; TIBBALLS, J.E. Dimensional change following setting of root canal sealer materials. **Dent. Mater.**, Copenhagen, v.17, n.6, p.512-519, Nov. 2001.

125. PECIULIENE, V.; REYNAUD, A.H.; BALCIUNIENE, I.; HAAPASALO, M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.34, n.6, p.429-434, Sep. 2001.
126. PETERS, L.B.; WESSELINK, P.R.; BUIJS, J.F.; van WINKELHOFF, A.J. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. **J. Endod.**, Chicago, v.27, n.2, p.76-81, Feb. 2001.
127. PETERS, L.B.; WESSELINK, P.R.; van WINKELHOFF, A.J. Combinations of bacterial species in endodontic infections. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.35, n.8, p.698-702, Aug. 2002.
128. PINHEIRO, E.T.; GOMES, B.P.F.A.; FERRAZ, C.C.R.; SOUSA, E.L.R.; TEIXEIRA, F.B.; SOUZA-FILHO, F.J. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.36, n.1, p.1-11, Jan. 2003
129. PITT FORD, T.R. The effects on the periapical tissues of bacterial contamination of the filled root canal. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.15, n.1, p.16-22, Jan. 1982.
130. PITT FORD, T.R. The radiographic detection of periapical lesions in dogs. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.57, n.6, p.662-667, June 1984.
131. PITTS, D.L.; WILLIAMS, B.L.; MORTON, T.H. Investigation on the role of endotoxin in periapical inflammation. **J. Endod.**, Chicago, v.8, n.1, p.1018, Jan. 1982.
132. POLISELI NETO, A.P.N. **Métodos de indução experimental de lesões periapicais em cães. Avaliação microbiológica e radiográfica.** 2002. 199f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.
133. RIBEIRO, F.C. **Distribuição das bactérias nas estruturas mineralizadas dos dentes com necrose pulpar e granuloma apical.** 1997, 172p. Tese (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, 1997.
134. RIBEIRO, F.C.; CONSOLARO, A. Bactérias nas estruturas mineralizadas de dentes com necrose pulpar e granuloma apical. **Rev. Dent. Press. Biol. Oral**, Bauru, v.1, n.1, jan./abr. 2000. 1 CD-ROM.
135. RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA JR., J.F.; ANDRADE, A.F.B.; UZEDA, M. Oral treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.36, n.1, p.20-26, Jan. 2003.
136. ROÇAS, I.N.; SIQUEIRA Jr., J.F.; SANTOS, K.R. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J. Endod.**, Chicago, v.30, n.5, p.315-320, May 2004.

137. RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA JR., J.F.; SANTOS, K.R.N.; COELHO, A.M.A. "Red complex" (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. **Oral Surg. Oral Med. Oral Patol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.91, n.4, p.468-471, Apr. 2001.
138. SALEH, I.M.; RUYTER, I.E.; HAAPASALO, M.; ORSTAVIK, D. Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.37, n.3, p.193-198, Mar. 2004.
139. SALGADO, A.A.M. **Cimentos obturadores. Avaliação histopatológica da reparação apical e periapical após tratamento de canal radicular de dentes de cães com necrose pulpar e lesão periapical experimentalmente induzida.** 2001. 168f. Tese (Doutorado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.
140. SCHAFER, E.; OLTHOFF, G. Effect of three different sealers on the sealing ability of both thermafil obturators and cold laterally compacted Gutta-Percha. **J. Endod.**, Chicago, v.28, n.9, p.638-642, Sept. 2002.
141. SCHEIN, B.; SCHILDER, H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. **J. Endod.**, Chicago, v.1, n.1, p.19-21, Jan. 1975.
142. SCHONFELD, S.E.; GREENING, A.B.; GLICK, D.H.; FRANK, A.L.; SIMON, J.H.; HERLES, S.M. Endotoxic activity in periapical lesions. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.53, n.1, p.82-87, Jan. 1982.
143. SCHWARZE, T.; FIELDLER, I.; LEYHAUSEN, G.; GEURTSSEN, W. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. **J. Endod.**, Chicago, v.28, n.11, p.784-786, Nov. 2002.
144. SCHWARZE, T.; LEYHAUSEN, G.; GEURTSSEN, W. Long-term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. **J. Endod.**, Chicago, v.28, n.11, p.749-53, Nov. 2002.
145. SHOVELTON, D.S. The presence and distribution of microorganisms within non-vital teeth. **Br. Dent. J.**, London, v.117, n.3, p.101-107, Aug. 1964.
146. SILVA, L.A.; NELSON-FILHO, P.; LEONARDO, M.R.; ROSSI, M.A.; PANSANI, C.A. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. **J. Endod.**, Chicago, v.28, n.2, p.94-98, Feb. 2002.
147. SILVA, L.A.B. **Rizogênese incompleta: efeito dos curativos de demora e expectante no tratamento de canais radiculares de dentes de cães com reação periapical crônica. Avaliação radiográfica e histopatológica.** 1991. 192f. Tese (Doutorado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1991.

148. SILVEIRA, F.F. **Efeito do tempo de ação do curativo de demora à base de hidróxido de cálcio utilizado em canais radiculares de dentes de cães com lesão periapical crônica induzida. Análise histopatológica e microbiológica.** 1997. 218f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.
149. SIQUEIRA Jr., J.; RÔÇAS, I.N. *Treponema socranskii* in primary endodontic infections as detected by nested PCR. **J. Endod.**, Chicago, v.29, n.4, p.244-247, Apr. 2003.
150. SIQUEIRA Jr., J.F.; FAVIERI, A.; GAHYVA, S.M.M.; MORAES, S.R.; LIMA, K.C.; LOPES, H.P. Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. **J. Endod.**, Chicago, v.26, n.5, p.274-277, May, 2000.
151. SIQUEIRA Jr., J.F.; LOPES, H.P. Bacteria on the apical root surfaces of untreated teeth with periradicular lesion: a scanning electron microscopy study. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.34, n.3, p.216-220, Apr. 2001.
152. SIQUEIRA Jr., J.F.; ROÇAS, I.; SOUTO, R.; UZEDA, M.; COLOMBO, A.P.V. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA - DNA hybridization. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.92, n.4, p.451-457, Oct. 2001.
153. SIQUEIRA Jr., J.F.; ROÇAS, I.N. *Bacteroides forsythus* in primary endodontic infections as detected by nested PCR. **J. Endod.**, Chicago, v.29, n.6, p.390-393, June, 2003.
154. SIQUEIRA Jr., J.F.; ROÇAS, I.N. *Campylobacter gracilis* and *Campylocater rectus* in primary endodontic infections. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.36, n.3, p.174-180, Mar. 2003.
155. SIQUEIRA Jr., J.F.; ROÇAS, I.N. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.97, n.1, p.85-94, Jan. 2004.
156. SIQUEIRA Jr., J.F.; ROÇAS, I.N.; ANDRADE, A.F.B.; UZEDA, M. *Peptostreptococcus micros* in primary endodontic infections as detected by 16S rDNA-based polymerase chain reaction. **J. Endod.**, Chicago, v.29, n.2, p.111-113, Feb. 2003.
157. SIQUEIRA Jr., J.F.; RÔÇAS, I.N.; FAVIERI, A.; OLIVEIRA, J.C.M.; SANTOS, K.R.N. Polymerase chain reaction detection of *Treponema denticola* in endodontic infections within root canals. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.34, n.4, p.280-284, June 2001.
158. SIQUEIRA JR., J.F.; RÔÇAS, I.N.; LOPES, H.P. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.93, n.2, p.174-178, Feb. 2002.

159. SIQUEIRA Jr., J.F.; ROÇAS, I.N.; OLIVEIRA, J.C.; SANTOS, K.R. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origins. **J. Endod.**, Chicago, v.27, n.9, p.563-566, Sept. 2001.
160. SIQUEIRA Jr., J.F.; RÔÇAS, I.N.; OLIVEIRA, J.C.M.; SANTOS, K.R.N. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA-directed polymerase chain reaction. **J. Endod.**, Chicago, v.27, n.3, p.164-167, Mar. 2001.
161. SIQUEIRA Jr., J.F.; ROÇAS, I.N.; *Pseudoramibacter alactolyticus* in primary endodontic infections. **J. Endod.**, Chicago, v.29, n.11, p.735-738, Nov. 2003.
162. SIQUEIRA Jr., J.F.; ROÇAS, I.N.; SOUTO, R.; UZEDA, M.; COLOMBO, A.P. *Actinomyces* species, *Streptococci*, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. **J. Endod.**, Chicago, v.28, n.3, p.168-172, Mar. 2002.
163. SIQUEIRA Jr., J.F.; ROÇAS, I.N.; SOUTO, R.; UZEDA, M.; COLOMBO, A.P. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.89, n.6, p.744-748, June, 2000.
164. SIQUEIRA Jr., J.F.; ROÇAS, I.N.; UZEDA, M.; COLOMBO, A.P.; SANTOS, K. Comparison of 16S rDNA-based PCR and checkerboard DNA-DNA hybridization. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v.51, n.12, p.1090-1096, Dec. 2002.
165. SIQUEIRA Jr., J.F.; ROÇAS, I.N.; VALOIS, C.R. Apical sealing ability of five endodontic sealers. **Aust. Endod. J.**, Sydney, v.27, n.1, p.33-35, Apr. 2001.
166. SIQUEIRA Jr., J.F.; SEN, B.H. Fungi in endodontic infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.97, n.5, p.632-641, May 2004.
167. SJÖGREN, U.; FIGDOR, D.; PERSSON, S.; SUNDQVIST, G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.30, n.5, p.297-306, Sept. 1997.
168. SOARES, J.A. **Avaliação microbiológica, histopatológica e histomicrobiológica de dentes de cães com reação periapical crônica induzida, após preparo biomecânico automatizado e aplicação de curativos de demora à base de hidróxido de cálcio.** 2003. 645f. Tese (Doutorado em Endodontia). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

169. SOARES, J.A. **Estudo microbiológico dos canais radiculares, histopatológico e histobacteriológico dos tecidos apicais e periapicais, em função do preparo biomecânico e de dois curativos de demora à base de hidróxido de cálcio, utilizados em dois períodos de avaliação, no tratamento endodôntico de dentes de cães, com reação periapical crônica induzida.** 1999. 408f. Dissertação (Mestrado em Endodontia). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1999.
170. SOCRANSKY, S.S.; McDONALD, J.B.; SAWYER, S. The cultivation of *Treponema microdentium* as surface colonies. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.1, n.2, p.171-172, Oct. 1959.
171. SOCRANSKY, S.S.; SMITH, C.; MARTIN, L.; PASTER, B.J.; DEWHIRST, F.E.; LEVIN, A.E. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. **Biotechniques**, Natick, v.17, n.4, p.788-892, Oct. 1994.
172. SONAT, B.; DALAT, D.; GÜNHAN, O. Periapical tissue reaction to root fillings with Sealapex. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.23, n.1, p.46-52, Jan. 1990.
173. SOUZA, C.A.S. **Hidróxido de cálcio como medicação intracanal na terapia endodôntica: avaliação microbiológica pela técnica de biologia molecular "checkerboard DNA-DNA hybridization"**. 2003. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.
174. STASHENKO, P.; WANG, C.Y.; TANI-ISHII, N.; YU, S.M. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.78, n.4, p.494-502, Oct. 1994.
175. STASHENKO, P.; YU, S.M. T helper and T suppressor cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.68, n.5, p.830-834, May 1989.
176. STASHENKO, P.; YU, S.M.; WANG, C.Y. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. **J. Endod.**, Chicago, v.18, n.9, p.422-426, Sept, 1992.
177. SUNDE, P.T.; OLSEN, I.; DEBELIAN, G.J.; TRONSTAD, L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. **J. Endod.**, Chicago, p.304-310, Apr. 2002.
178. SUNDE, P.T.; TRONSTAD, L.; ERIBE, E.R.; LIND, P.O.; OLSEN, I. Assessment of periradicular microbiota by DNA-DNA hybridization. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.16, n.5, p.191-196, Oct. 2000.
179. SUNDQVIST, G. Associations between microbial species in dental root canal infections. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.7, n.5, p.257-262, Oct. 1992.

180. SUNDQVIST, G. **Bacteriological studies of necrotic dental pulps.** 1976. Tese (PhD) – Universidade de Umea, Umea, Suécia.
181. SUNDQVIST, G.; JOHANSSON, E.; SJOGREN, U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. **J. Endod.**, Chicago, v.15, n.1, p.13-19, Jan. 1989.
182. SUNDQVIST, G.; REUTERVING, C.O. Isolation of *Actinomyces israelii* from periapical lesion. **J. Endod.**, Chicago, v.6, n.6, p.602-606, June, 1980.
183. TANIISHII, N.; WANG, C-Y.; TANNER, A.; STASHENKO, P. Changes in root canal microbiota during the development or rat periapical lesions. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.9, n.3, p.129-135, June 1994.
184. TANOMARU, J.M.G.; LEONARDO, M.R.; TANOMARU-FILHO, M.; BONETTI-FILHO, I.; SILVA, L.A.B. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.36, n.11, p.733-739, Nov. 2003.
185. TANOMARU, J.M.G. **Métodos de indução experimental de lesão periapical em dentes de cães. Análise histopatológica e histomicrobiológica.** 2004. 152f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.
186. TANOMARU-FILHO, M. **Comportamento dos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães portadores de reação periapical crônica em função da técnica de neutralização do conteúdo séptico-tóxico e do cimento obturador empregado no tratamento endodôntico. Avaliação radiográfica e histopatológica.** 1996. 296f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1996.
187. TANOMARU-FILHO, M.; LEONARDO, M.R.; 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.**, Chicago, v.28, n.4, p.295-299, Apr. 2002.
188. TANOMARU-FILHO, M.; LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.; UTRILLA, L.S. Effect of different root canal sealers on periapical repair of teeth with chronic periradicular periodontitis. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.31, n.2, p.85-89, Mar. 1998.
189. TIMPAWAT, S.; AMORNCHAT, C.; TRISUWAN, W. Bacterial coronal leakage after obturation with three root canal sealers. **J. Endod.**, Chicago, v.27, n.1, p.36-39, Jan. 2001.
190. TORABINEJAD, M.; EBY, W.C.; NAIDORF, I.J. Inflammatory and immunological aspects of the pathogenesis of human periapical lesions. **J. Endod.**, Chicago, v.11, n.11, p.479-488, Nov. 1985.

191. TRONSTAD, L.; BARNETT, F.; RISO, K.; SLOTS, J. Extraradicular endodontic infections. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.3, n.2, p.86-90, Apr. 1987.
192. TROPE, M. DELANO, E.O.; ORSTAVK, D. Endodontic treatment of teeth with periodontitis: single visit versus multivisit treatment. **J. Endod.**, Baltimore, v.25, n.5, p.345-350, May 1999.
193. VIGIL, J.V.; WAYMAN, B.E.; DAZEY, S.E.; FOWLER, C.B.; BRADLEY, D.V. Identification and antibiotics sensitivity of bacteria isolated from periapical lesions. **J. Endod.**, Chicago, v.23, n.2, p.110-114, Feb. 1997.
194. WALTIMO, T.M.T.; SIRÉN, E.K.; TORKKO, H.L.K.; OLSEN, I.; HAAPSALO, M.P.P. Fungi in therapy resistant apical periodontitis. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.30, n.2, p.96-101, Mar. 1997.
195. WASFY, M.; McMAHON, K.T.; MINAH, G.A.; FALKLER JR., W.A. Microbiological evaluation of periapical infections in Egypt. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.7, n.2, p.100-105, Apr. 1992.
196. WATTS, A.; PATERSON, R.C. Usage testing of root canal sealing materials: a personal view. **J. Dent.**, v.20, n.5, p.266-267, Oct. 1992.
197. WAYMAN, B.E.; MURATA, S.M.; ALMEIDA, R.J.; FOWLER, C.B. A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. **J. Endod.**, Chicago, v.18, n.4, p.152-155, Apr. 1992.
198. WEIGER, R.; ROSENDAHL, R.; LÖST, C. Influence of calcium hydroxide intracanal dressings on the prognosis of teeth with endodontically induced periapical lesions. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.33, n.3, p.219-226, Mar. 2000.
199. WILLERSHAUSEN, B.; MARROQUIN, B.B.; SCHAFFER, D.; SCHULZE, R. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. **J. Endod.**, Chicago, v.26, n.12, p.703-707, Dec. 2000.
200. WINKLER, K.C.; van AMERONGEN, J. Bacteriologic results from 4000 root canal cultures. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.12, n.7, p.857-875, July, 1959.
201. WITTGOW, W.C.; SABISTON, C.B. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. **J. Endod.**, Chicago, v. 1, n.15, p.168-171, May, 1975.
202. XIA, T.; BAUMGARTNER, J.C. Occurrence of *Actinomyces* in infections of endodontic origin. **J. Endod.**, Chicago, v.29, n.9, p.549-552, Oct. 2003.
203. XIA, T.; BAUMGARTNER, J.C.; DAVID, L.L. Isolation and identification of *Prevotella tannarae* from endodontic infections. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.15, n.4, p.273-275, Aug. 2000.

204. YAMASHITA, J.C. **Avaliação da microbiota e da reparação apical e periapical após preparo biomecânico de canais radiculares com diferentes soluções irrigadoras, em dentes de cães com reação periapical crônica.** 2004. 197f. Tese (Doutorado em Endodontia). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.
205. YAMASHITA, J.C.; TANOMARU FILHO, M.; LEONARDO, M.R.; ROSSI, M.A.; SILVA, L.A. Scanning electron microscopic study of the cleaning ability of chlorhexidine as a root-canal irrigant. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.36, n.6, p.391-394, June, 2003.
206. ZAVISTOSKI, J.; DZINK, J.; ONDERDONK, A.; BARLETT, J. Quantitative bacteriology of endodontic infections. **Oral Surg.**, St. Louis, v.49, n.2, p.171-174, Feb. 1980.
207. ZMENER, O.; SPIELBERG, C.; LAMBERGHINI, F.; RUCCI, M. Sealing properties of a new epoxy resin-based root-canal sealer. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.30, n.5, p.332-334, Sept. 1997.

*Anexo*

---



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CÂMPUS DE ARARAQUARA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Rua Humaitá, 1680 – CEP 14801-903 – Caixa Postal 331 Fax (0xx16) 222-4823 – Araraquara - SP  
Fone: (0xx16) 201-6431 - e-mail: [diretor@foar.unesp.br](mailto:diretor@foar.unesp.br) / home page: <http://www.foar.unesp.br>  
Comitê de Ética na Experimentação Animal - CEEA

IAOB.

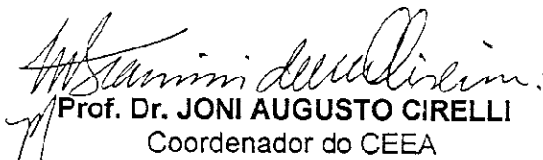
Araraquara, 10 de setembro de 2002

Ofício CEEA-FO/Ar. nº 37/2002

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA da Faculdade de Odontologia de Araraquara, reunido em 05/09/2002, após a avaliação final do Projeto de sua responsabilidade intitulado "*Avaliação microbiológica e do reparo da região apical e periapical após tratamento endodôntico de dentes de cães com vitalidade pulpar e sem vitalidade com ou sem reação periapical crônica*", considerou-o **APROVADO**, devendo o **relatório final** ser apresentado em **agosto/2004**.

Atenciosamente.

  
Prof. Dr. JONI AUGUSTO CIRELLI  
Coordenador do CEEA

Ao  
Prof. Dr. MÁRIO TANOMARU FILHO  
DD. Pesquisador Responsável  
Nesta

*Apêndice*

---

Apêndice A - Número de UFC de anaeróbios obrigatórios, aeróbios e estreptococos nos grupos onde foram realizadas necropulpectomia I e II (Grupos II e III).

Grupo II – Necropulpectomia I					Grupo III – Necropulpectomia II			
Amostras	Anaeróbios estritos	Aeróbios	Estreptococos	Tio's	Anaeróbios estritos	Aeróbios	Estreptococos	Tio's
1	4500	600	40	+	7300	410	520	+
2	7600000	9700	5600	+	0	0	0	+
3	32000	54000	190	+	1600	1040	1190	+
4	80000	720	12000	+	650	1150	530	+
5	520000	380000	51000	+	2400	1800	2600	+
6	380000	360000	28000	+	40	60	0	+
7	470000	360000	12900	+	10500	7800	180	+
8	450000	240000	14200	+	53000	10700	420	+
9	280000	87000	460	+	790	7400	180	+
10	480000	360000	36000	+	510000	180000	21000	+
11	1600000	1400000	3300	+	1727	2714	360	+
12	820000	660000	1160	+	430	610	150	+
13	1010000	510000	56000	+	330	640	330	+
14	8700	920	40	+	580	270	140	+









