

Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

*MÉTODOS DE INDUÇÃO EXPERIMENTAL DE
LESÃO PERIAPICAL EM DENTES DE CÃES.
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E
HISTOMICROBIOLÓGICA*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia - Área de Endodontia.

Orientador: *Prof.Dr. Mário Roberto Leonardo*

ARARAQUARA
2004

Tanomaru, Juliane Maria Guerreiro

Métodos de indução experimental de lesão periapical em dentes de cães. Análise histopatológica e histomicrobiológica/ Juliane Maria Guerreiro Tanomaru. – Araraquara : [s.n.], 2004. 152f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Mario Roberto Leonardo

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

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley Cristina Chiusoli Montagnoli CRB 8/5646

Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

Dados Curriculares

Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

FILIAÇÃO Olavo Benedito Guerreiro
Maria das Graças Conceição Guerreiro

1993/1996 Curso de Graduação
Faculdade de Odontologia da Pontifícia
Universidade Católica de Campinas

1997 Curso de Atualização em Endodontia,
Faculdade de Odontologia de Araraquara -
UNESP

1998/2000 Curso de Especialização em Endodontia,
Faculdade de Odontologia de Araraquara -
UNESP

2000/2002 Curso de Pós-Graduação em Endodontia,
nível de Mestrado, Faculdade de Odontologia
de Araraquara – UNESP

2002/2004 Curso de Pós-Graduação em Endodontia,
nível de Doutorado, Faculdade de Odontologia
de Araraquara – UNESP

À Deus,

*"Pela inesgotável fonte de luz, energia e
amor reabastecida constantemente no meu
interior..."*

*Pela oportunidade de existir, viver, desafiar,
conquistar e cumprir gradativamente minha missão
nesta passagem..."*

**Minha gratidão e reconhecimento
em forma de prece**

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais

Maria e Olavo

Agradeço a vocês por tudo que fizeram por mim. Obrigada pelos seus conselhos, carinhos, broncas, beijos.

Vocês deixaram seus sonhos para que eu sonhasse.

Derramaram lágrimas para que eu fosse feliz

Vocês perderam noites de sono para que eu dormisse tranqüila.

Acreditaram em mim.

Ser educador é ser um poeta do amor.

Jamais esqueçam que eu levarei para sempre um pedaço dos seus seres dentro do meu próprio ser.

Ter vocês como meus pais, é viver a alegria de quem sabe que recebeu um presente da vida.

**Dedico esta conquista
com muito amor e gratidão**

*Ao meu marido **Mário***

Pelo amor, carinho, amizade e compreensão que tem me dispensado nestes quatro anos da nossa união e de muito trabalho. Você se faz presente em todos os momentos, fáceis ou difíceis, alegres ou tristes, sempre me fazendo acreditar na minha capacidade e valor.

Obrigada por respeitar esta face da minha vida e profissão.

Sempre lhe serei grata.

e

*Ao Professor **Mário Tanomaru Filho**,*

Pelo incentivo e oportunidade na realização de pesquisas, pela seriedade com que cuida e escreve seus trabalhos, qualidades que tento seguir como exemplo. Agradeço também pela grande colaboração na realização deste trabalho, principalmente na documentação fotográfica e correção do texto. Pelo exemplo de carinho e dedicação demonstrado por seus alunos e principalmente pelo amor à pesquisa e à docência.

***Dedico este trabalho com
muito amor e carinho,
esta conquista é nossa!***

Aos meus irmãos **Cristiano** e **Rodrigo** pela ótima convivência
que sempre tivemos, pelo amor com que vocês me tratam e por todo
incentivo que sempre recebi na luta para alcançar meus objetivos. Tenho
certeza que vocês estão
muito orgulhosos de sua irmã.

À **Júlia**, minha linda e amada sobrinha. Pelo seu amor,
sinceridade, alegria e pureza. Você é uma pessoa muito especial e estará
sempre no meu coração.

Ao amigo **Oswaldo**, pelo apoio, orientação e
carinho com que sempre me atendeu.

Aos meus **familiares** e **amigos**, pelo apoio e
carinho com que sempre me acolheram, acreditando e
confiando sempre na minha pessoa.

Dedico à vocês

*Ao meu orientador Prof. Dr. **Mário Roberto Leonardo**,*

Obrigada pela contribuição e orientação na minha formação de Mestre e Pesquisadora, por partilhar deste momento único em minha vida, pelos ensinamentos e exemplo de professor, pela amizade e confiança depositada em mim.

"Ensinar é um dom, mas mais que ensinar é cativar os corações de seus seguidores, para que além de seus ensinamentos permaneça na memória a imagem de um mestre. O verdadeiro mestre é aquele que transcende as barreiras do tempo e espaço e mantém vivos na mente de seus discípulos a sua sabedoria, seus princípios de vida e suas idéias, para toda a eternidade."

Minha eterna gratidão!

*À Profa. Dra. **Léa Assed Bezerra da Silva**,*

Pelo exemplo de mulher batalhadora, competente e principalmente forte, luta pelo seu ideal e não desanima. Um exemplo de pesquisadora e mãe.

Nossa convivência contribuiu para que aumentasse ainda mais minha estima e admiração, e desejo seguir todos ensinamentos que me foram transmitidos e fazer jus a este aprendizado. Os meus agradecimentos especiais e a certeza de que os seus ensinamentos e as suas idéias permanecerão vivos na minha e transmitidos para a mente de meus discípulos de amanhã.

*À Prof. Dra. **Izabel Yoko Ito**,*

Pela orientação, contribuição e sugestões que foram dadas na fase histomicrobiológica desde trabalho. Pelo exemplo de dedicação como professora, pesquisadora e ser humano, minha admiração por sua sabedoria e humildade. Por iluminar a minha trajetória com seus exemplos de garra, sabedoria de vida e conhecimentos científicos. Todas as palavras ainda seriam poucas para expressar o quanto gosto e admiro a sua pessoa.

Minha eterna admiração!

Agradecimentos especiais

***Ao Prof. Dr. Roberto Miranda Esberard,,
Ao Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho,
Ao Prof. Dr. Renato Toledo Leonardo,
Ao Prof. Dr. Fábio Luiz de C. Villela Berbert,***

*Não poderia agradecê-los separadamente, pois todos possuem igual
importância em minha formação profissional. Gostaria que soubessem
que tenho muito orgulho em estar concluindo a pós-graduação na*

Disciplina de Endodontia de Araraquara .

*Saibam que serei uma eterna aluna, sempre pronta
para atendê-los da melhor maneira possível.*

*Obrigada pelo companheirismo e de como me acolheram, pois saibam que
vocês foram os primeiros amigos que fiz em Araraquara.*

*Se hoje, a aluna que chegou para fazer o curso de Atualização em 1997,
fez a Especialização, o Mestrado e agora está concluindo o Doutorado,
foi porque vocês conseguiram fazer com que ela admirasse ainda mais a
Endodontia e por isso conseguiu chegar até aqui.*

Muito obrigada à todos vocês!

***Meu respeito pelo aprendizado,
companheirismo, amizade, e
pela contribuição na
minha formação profissional.***

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, nas pessoas do Diretor, Prof. Dr. Ricardo Samith Georges Abi Rached, e Vice-Diretor, Prof. Dr. Roberto Miranda Esberard.

Aos professores e funcionários do Departamento de Odontologia Social, em especial à Profa. Andréia, Profa. Patrícia, Prof. Oscar, Prof. Borelli e Prof. Maurício , pela oportunidade da convivência com a docência, pelos ensinamentos e amizade.

Ao amigo Marco Húngaro Duarte pela atenção e ajuda na elaboração da estatística.

Aos professores da Disciplina de Histologia, Prof. Paulo Sérgio Cerri e Profa. Estela Sasso Cerri, pela ajuda e ensinamentos na análise histopatológica.

Ao Sr. Edson Luis Mori, pela colaboração que prestou na realização da parte experimental deste trabalho, pelos ensinamentos muito valiosos e pelo carinho com que tratou nossos cães.

Ao ex-aluno do curso de mestrado Angelo Poliseli Neto, pela convivência durante nosso curso de mestrado e por sua participação na realização da parte experimental deste trabalho.

*Ao funcionário da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, **Marco Antônio dos Santos**, pelo auxílio no processamento histológico.*

*Aos funcionários do Setor do Biotério do Câmpus de Araraquara-UNESP, em especial ao Sr. **Fernando**, e ao nosso veterinário **Dr. Alessandro** pelos cuidados dispensados no tratamento dos animais em pesquisa.*

*Ao Sr. **Júlio César de Matos** e sua esposa Sra. **Cláudia**, pela amizade, paciência e dedicação na documentação fotográfica e impressão desta.*

*Aos funcionários da Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, em especial à Sra. **Célia**, Sra. **Creusa**, Sr. **Pedro**, Sr. **Mário**, Sra. **Adriana**, Sra. **Aparecida** e Sra. **Luíza**, pelo convívio amigável e atenção que sempre me dispensaram.*

*Aos colegas do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, especialmente da minha turma de doutorado na área de Endodontia, **João Vicente**, **Marcos Só**, **Paulo** e **Eliane**. pela convivência e amizade.*

*Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, **Mara**, **Vera**, **Rosângela** e **Silvia**, pela atenção, educação e carinho com que sempre me trataram.*
*Às Bibliotecárias **Maria Helena** e*

Maria José, pela orientação precisa na organização desta tese e das referências bibliográficas e à **Marley**, pela ajuda na confecção da ficha catalográfica. Também agradeço aos funcionários da biblioteca **Silvia , Adriano, Maria Inês e Eliana** , os quais sempre me atenderam com muita educação e amizade nas buscas bibliográficas.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro à realização deste Curso de Doutorado e principalmente à realização deste trabalho.

Aos alunos das 75^ª e 76^ª turmas do Curso de Graduação em Odontologia da UNESP-Araraquara, pelo apoio, amizade e respeito com que sempre me trataram, durante meus estágios de docência.

Aos **Animais** utilizados neste experimento, que sempre foram respeitados e contribuíram para a realização de mais uma pesquisa, de fundamental importância para os seres humanos

"E à todos aqueles que de alguma forma ou palavra colaboraram na minha formação de Pesquisadora e na realização deste trabalho"

Obrigada!

sumário

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Dos métodos de indução de lesão periapical crônica em dentes de animais.	21
2.2 Da identificação dos microrganismos nos tecidos dentários pela coloração de Brown & Brenn	31
3 PROPOSIÇÃO	34
4 MATERIAL E MÉTODO	36
4.1 Procedimentos de indução das lesões periapicais.....	37
4.2 Procedimentos Laboratoriais.....	42
4.3 Análise Histopatológica.....	43
4.4 Processamento Histomicrobiológico.....	51
4.5 Análise Histomicrobiológica.....	53
4.6 Metodologia estatística.....	54
5 RESULTADO	55
5.1 Avaliação histopatológica.....	56
5.2 Avaliação Histomicrobiológica.....	60
5.3 Resultados Estatísticos - Avaliação Histopatológica.....	81
5.4 Representação gráfica - Avaliação Histopatológica.....	84
5.5 Resultados Estatísticos da Avaliação Histomicrobiológica.....	94
5.6 Representação gráfica - Avaliação Histomicrobiológica.....	95
6 DISCUSSÃO	97
6.1 Metodologia	98
6.2 Resultados	110
7. CONCLUSÃO	123
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
<i>Resumo</i>	147
<i>Abstract</i>	150

1 Introdução

O emprego de modelos animais em pesquisas biológicas vem sendo relatado desde a antigüidade. Hipócrates (450aC) já relacionava, com finalidade didática, o aspecto macroscópico de órgãos humanos doentes com o de animais. A primeira pesquisa científica utilizando animais foi publicada em 1638 por William Harvey, descrevendo um estudo experimental sobre a fisiologia circulatória em mais de 80 diferentes espécies. (GOLDIM; RAYMUNDO³⁰, 1997)

A pesquisa envolvendo animais tem importante papel no desenvolvimento dos fundamentos biológicos do tratamento endodôntico. Segundo Spängberg¹⁰⁵ (2001), a prática clínica baseada em evidências científicas é possível, por meio da sua comprovação *in vivo*, sendo considerada a análise histopatológica dos tecidos periapicais de acordo com os diferentes protocolos de tratamento. Os efeitos biológicos dos materiais obturadores de canais radiculares e substâncias empregadas nas diversas fases do tratamento endodôntico, podem ser estudados pelo “Usage Test”, denominação da ANSI/ADA, para os métodos de avaliação que reproduzem em primatas ou cães, as condições clínicas de uso dos materiais odontológicos (WATTS; PATERSON¹²⁸, 1992).

As primeiras pesquisas científicas endodônticas que utilizaram cães datam da década de 30 do século passado, quando vários pesquisadores como: Kronfeld, Gottlieb, Orban, Stein, Schawarz, Dixon,

Rickert, Coolidge, dentre outros, enfatizaram em seus estudos²¹, a importância das pesquisas *in vivo*, especialmente em dentes de cães. Orban⁷⁵, em 1932, relatou: *“está claramente demonstrado e aceito em Paris, que os tecidos periodontais e as reações inflamatórias nos cães, são muito semelhantes às que ocorrem nos humanos”* (DIXON; RICKERT²¹, 1938).

No Brasil, pesquisadores como Holland e Leonardo merecem destaque no desenvolvimento de uma endodontia biológica pelos inúmeros estudos realizados em dentes de cães, os quais exercem importante papel na definição dos princípios biológicos que orientam a terapia endodôntica.

As alterações patológicas endodônticas são principalmente de origem bacteriana (KAKEHASHI et al.⁴⁷, 1965; FOUAD et al. ²⁵, 1992), sendo comprovada a relação entre as alterações pulpares e periapicais com a infecção microbiana. Assim, nos casos de dentes sem vitalidade pulpar, o objetivo principal do tratamento endodôntico é a eliminação da infecção do sistema de canais radiculares, sendo maior a dificuldade de obtenção desta meta nos dentes que apresentam necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente, caracterizando um processo infeccioso de longa duração, no qual os microrganismos e seus produtos e subprodutos já alcançaram todo o sistema de canais radiculares além dos tecidos apicais e periapicais (SHOVELTON⁹⁴, 1964; ARMITAGE⁵, 1983; ANDO; HOSHINO⁴, 1990; LEONARDO et al.⁵⁴, 1994).

A microbiota endodôntica, seus produtos e subprodutos bacterianos, o biofilme apical, a infecção extra-radicular, assim como os efeitos sistêmicos decorrentes do processo infeccioso persistente, constituem a razão da diferença nos índices de sucesso observados após tratamento endodôntico de dentes sem vitalidade pulpar com lesão periapical. Assim, grande número de pesquisas têm sido realizadas visando a obtenção de um melhor prognóstico após o tratamento endodôntico de dentes com lesão periapical, os quais apresentam nas pesquisas menores índices de sucesso (HOLLAND et al.⁴⁴, 1983; LEONARDO⁵³, 1998). Entretanto, são inúmeras as implicações microbiológicas e patológicas, freqüentemente interrelacionadas, que devem ser observadas durante o tratamento endodôntico desses dentes (LEONARDO; LEAL⁵⁶, 1998).

As observações citadas, conduzem a uma maior preocupação quanto à definição dos conceitos e procedimentos envolvidos no tratamento endodôntico de dentes sem vitalidade pulpar e com reação periapical crônica. Desta forma, para avaliação dos materiais e técnicas utilizados no tratamento endodôntico nesses casos, devem ser consideradas as condições particulares envolvidas, especialmente quanto à anatomia do sistema de canais radiculares, além dos aspectos microbiológicos e patológicos. Torna-se evidente a necessidade de modelos experimentais animais que possibilitem a indução experimental das lesões periapicais, reproduzindo as condições específicas observadas.

A escolha do cão como modelo experimental, está relacionada à facilidade de manutenção e obtenção, resistência a prolongados períodos de anestesia, mas principalmente, por apresentarem dentes com estruturas mineralizadas, dentina e cimento semelhantes ao homem, assim como o processo de reparação (KUKIDOME⁵¹, 1957; STROMBERG¹¹⁰, 1969; CITROME¹⁸, 1979). Além destas vantagens, Rowe⁸⁶, em 1980 relatou que o cão possui crescimento rápido, o que permite a obtenção de resultados em menores períodos de tempo, quando comparado ao humano.

A indução experimental das lesões periapicais crônicas em dentes de cães pode ser realizada com diferentes metodologias. As variações nos métodos utilizados podem estar relacionadas ao meio de contaminação dos canais radiculares, ou seja, por microrganismos da cavidade bucal do cão, ou por meio de inoculação de cepas isoladas, sendo esta última menos utilizada atualmente (STEIN¹⁰⁹, 1931; DIXON; RICKERT²¹, 1938; SMITH et al.¹⁰¹, 1984). Também tem sido empregados diferentes períodos de tempo para contaminação dos canais radiculares após exposição destes ao meio bucal, bem como a realização ou não do selamento da abertura coronária durante o processo de desenvolvimento da lesão periapical. Outra variável que pode ser introduzida nos métodos de indução das lesões periapicais está relacionada ao arrombamento do delta apical presente no ápice radicular dos dentes de cães, o qual pode ser realizado antes ou após o período experimental de indução.

Atualmente, merecem destaque duas técnicas de indução de lesão periapical em dentes de cães. Uma técnica na qual os canais radiculares são mantidos expostos ao meio bucal por todo o período de indução, sendo necessário aproximadamente 180 dias para obtenção das lesões periapicais (HOLLAND et al.^{38,42}, 1992, 2003; PANZARINI et al.⁷⁸, 1998; OTOBONI FILHO⁷⁷, 2000). A outra técnica de indução utilizada, preconiza um período de 7 dias de exposição dos canais radiculares para sua contaminação, e posterior selamento da abertura coronária, sendo as lesões periapicais visíveis radiograficamente, após 45 a 60 dias. (ALENCAR et al.², 1997; HERNANDÉZ³³, 2002; LEONARDO et al.^{54,55,62,60,57}, 1994, 1995, 1998, 2002, 2003; MATTOS⁶⁶, 2001; NELSON FILHO et al.⁷², 2002; TANOMARU FILHO et al.^{114,113}, 1998; 2002; SHABANHANG et al.⁹³, 1999; SILVA et al.⁹⁸, 2002).

Sendo a metodologia de fundamental importância para a interpretação dos resultados de uma pesquisa, julgamos importante a avaliação das lesões periapicais induzidas em dentes de cães utilizando os métodos citados acima, possibilitando uma definição do quadro histopatológico apical e periapical e da propagação microbiana, de acordo com as técnicas de indução.

Desde a década de 30 do século passado, os pesquisadores da área de Endodontia já utilizavam modelos animais experimentais para o estudo dos tratamentos endodônticos em dentes com necrose pulpar e lesão periapical crônica. Na revisão da literatura, constatamos a preocupação dos autores com o tratamento desses dentes, decorrente da grande incidência de insucessos após tratamentos endodônticos de dentes com presença de lesão periapical crônica, assim como a necessidade de criar metodologias que simulam estas condições em dentes de animais.

Orban⁷⁵, em seu artigo publicado em 1932, demonstra a preocupação com o estabelecimento de protocolos para experimentos endodônticos utilizando dentes de cães e relata que a maioria dos pesquisadores aceita o cão como modelo ideal para estes testes, devido as respostas teciduais desses animais serem semelhantes às dos seres humanos.

No mesmo ano, Hill³⁵ estudou a indução de granulomas em dentes de cães, visando a comparação destes aos granulomas de dentes de humanos. O autor utilizou como contaminação dos canais radiculares a inoculação de *Streptococcus*, sendo os dentes selados com amálgama. Os resultados histopatológicos mostraram que os aspectos morfológicos e histopatológicos desses granulomas induzidos, foram semelhantes aos existentes nos humanos.

Genvert et al.²⁸ (1940), utilizaram o método de indução de lesão periapical crônica em dentes de macacos, para o estudo da relação entre infecções periapicais e doenças sistêmicas. As lesões periapicais induzidas foram realizadas de duas formas: através

da exposição do canal radicular ao meio oral ou da inoculação de cepas de *Streptococcus viridans* na cavidade pulpar. O período experimental variou de 3 a 400 dias. Foram utilizados métodos aeróbios e anaeróbios para as análises microbiológicas, incluindo culturas dos dentes, do sangue venoso antes da morte e do sangue do coração após a morte, das vísceras e dos intestinos. Somente 1 dos 15 macacos apresentou mudanças sistêmicas associadas à indução de lesão periapical crônica apresentando uma extensa celulite e osteomielite.

Em estudo clássico, Kakehashi et al.⁴⁷ (1965) compararam as alterações resultantes de exposições pulpares não tratadas em ratos *germ-free* e em ratos portadores de microbiota bucal normal. As exposições foram feitas através de perfuração na superfície oclusal do primeiro molar superior direito. Após intervalos operatórios, variando de 1 a 42 dias, os animais foram sacrificados 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 bucal convencional, demonstrando a necrose da polpa coronária e parte da radicular, levando, ao final do experimento, ao desenvolvimento de lesões periapicais crônicas. Nos animais “germ-free” no entanto, não foram observadas 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 21º e o 28º dia.

Möller et al.⁶⁷, em 1981, após expor o tecido pulpar de dentes de macacos ao ambiente oral, efetuou o selamento dos dentes durante seis meses. Nesse período os autores observaram que todas as polpas expostas se tornaram infectadas por microrganismos como *Streptococcus* alfa-hemolíticos, *Enterococcus*, *Coliformes*, e anaeróbios como os bacteróides, eubactéria, propionibactéria, e *Peptostreptococcus* e que 90% dos dentes desenvolveram lesões periapicais visíveis radiograficamente.

Pitts et al.⁸⁰, em 1982, estudaram o envolvimento das endotoxinas na inflamação periapical. Para esta finalidade, foram utilizados canais radiculares de dentes de cães, que receberam após pulpectomia, a endotoxina de *Salmonella minnesota*, sendo utilizado como grupo controle, canais radiculares que receberam somente a solução salina. Foram realizados exames radiográficos semanais e efetuada a avaliação histológica após 4 e 5 semanas. Os canais radiculares que receberam a endotoxina apresentaram alterações radiográficas mais severas e rápidas que aqueles que receberam solução salina. Os mesmos resultados foram observados na avaliação histológica, sendo observada maior destruição óssea periapical e severa resposta inflamatória, sugerindo assim que, as endotoxinas teriam relação direta com a inflamação periapical e reabsorção óssea.

Fabircius et al.²³, em 1982, analisaram o conteúdo microbiano de 24 canais radiculares infectados de dentes de macacos após 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 o selamento dos canais expostos, o percentual de anaeróbios em relação aos aeróbios aumentou com o decorrer do tempo. *Bacteróides melaninogenicus*, agora denominados *Prevotella melaninogenicus* foram encontrados em alto percentual na região apical. Bacteróides, agora *Porphyromonas* e *Prevotella*, têm se mostrado capaz de induzir abscessos em uma variedade de modelos de estudo experimental, tanto em culturas puras quanto em associação com outros microrganismos facultativos.

Walton e Garnick¹²⁶ (1986) induziram lesões periapicais em 34 molares de macacos, para estudar o processo da inflamação periapical. Após abertura coronária, o tecido pulpar foi exposto ao meio bucal por sete dias, quando então as aberturas foram seladas com amálgama. Exames radiográficos mensais foram realizados durante sete meses, seguido pela

morte dos animais. Histologicamente foi possível observar que a direção da inflamação na região periapical, além de avaliar a natureza da reação inflamatória, a reabsorção óssea e radicular e as alterações nos tecidos moles (ligamento periodontal e espaços medulares). Observaram que em 53% das lesões periapicais a inflamação direcionava-se primariamente para a região de furca, em 32% para direção méso-distal e 15% para as direções vestibular, lingual e apical. Ocorreu predominância de células inflamatórias mononucleares, principalmente macrófagos e polimorfonucleares, principalmente nas regiões próximas ao forame apical. A reabsorção radicular apresentava ausência de reparo por cemento ou osso, sendo esta definida e restrita às áreas inflamadas. A reabsorção óssea, no entanto, foi mais evidente que a reabsorção radicular e não estava restrita às áreas inflamadas.

Fouad et al.²⁵, em 1992, induziram lesões periapicais em dentes caninos de furão. Após abertura coronária e remoção da polpa radicular, os canais radiculares foram mantidos expostos ao meio bucal por 7 dias, quando então realizaram o selamento dos dentes. A cada 2 semanas, durante 3 meses, realizavam exames radiográficos até que fossem verificadas aparentes áreas de rarefação óssea o que ocorreu próximo a 4 semanas tendo estas áreas um aumento de tamanho com o passar do tempo. Histologicamente verificaram que as lesões periapicais consistiam principalmente de infiltrado inflamatório mononuclear, predominando macrófagos e linfócitos. Com a coloração de Brown & Brenn, bactérias foram detectadas no espaço pulpar dos dentes com lesão periapical e nas ramificações do sistema de canal radicular. Somente uma amostra apresentou bactéria no interior da lesão periapical, a qual histologicamente caracterizava um abscesso.

Walton & Ardjmand¹²⁵ (1992), realizaram um estudo para determinar a existência de bactérias no tecido necrótico dos canais radiculares de dentes de macacos com lesão periapical crônica induzida. Foram realizadas aberturas coronárias e removidas as

polpas radiculares. Os dentes foram mantidos abertos durante 7 dias para contaminação e posteriormente foram selados com amálgama para indução da lesão periapical, as quais foram detectadas radiograficamente após 7 meses. Os macacos foram mortos sendo a seguir realizados cortes histológicos, que receberam a coloração de Brown & Brenn, para examinar a incidência e a localização das bactérias. As bactérias gram-positivas foram predominantes, em todos os canais radiculares analisados e estas, na maioria das amostras, não ultrapassavam o limite do forame apical, e estavam relacionadas à presença de polimorfonucleares nos tecidos periapicais.

Comparando o desenvolvimento de lesões periapicais induzidas em dentes de macacos, quanto ao selamento ou não, Jansson et al.⁴⁶, em 1993, estudaram os aspectos histopatológicos correlacionados aos aspectos radiográficos. Os períodos de indução foram de 1, 2, 4, 7 e 10 meses, divididos em dois grupos: a) Selados com IRM, após 10 a 14 dias de exposição à cavidade oral ; b) mantidos abertos por todo período experimental. Os autores concluíram que, os dentes selados apresentaram lesões periapicais em período de tempo menor do que o grupo mantido aberto. Histologicamente, ao final do período experimental, os grupos foram semelhantes, diferindo somente na forma de difusão focal do infiltrado inflamatório no grupo em que os dentes foram mantidos abertos durante todo período experimental. O infiltrado inflamatório, porém, foi composto de células mononucleares, predominantemente macrófagos, e presença de polimorfonucleares em regiões próximas ao ápice radicular.

Yamasaki et al.¹³², em 1994, desenvolveram um trabalho para estudar a reação nos tecidos pulpaes e periapicais após exposição pulpar em dentes de rato. Foram utilizados 40 ratos sendo escolhidos os molares, nos quais, após as aberturas coronárias, as

câmaras pulpares permaneceram abertas até o sacrifício dos animais nos períodos de 1,3,7,14,21,28,42 e 56 dias. Observaram aos 28 dias necrose total da polpa, com aparecimento de reabsorção óssea aos 7 dias e reabsorção radicular apical aos 21 dias. Os achados mostraram que a lesão periapical estende-se primeiramente no sentido mesio-distal reabsorvendo osso esponjoso e inter radicular e posteriormente avança no sentido vertical reabsorvendo cortical óssea e cimento.

Poliseli Neto⁸¹, em 2002, 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 arrombamento do ápice radicular. Foram utilizados 58 canais radiculares, divididos em 4 grupos experimentais, sendo que nos dois primeiros (grupos I e II), os canais radiculares foram expostos ao meio bucal por 7 dias e após este período selados com cimento de óxido de zinco e eugenol por 53 dias. Nos demais grupos (III e IV) os canais radiculares permaneceram sem selamento coronário por 180 dias. Nos grupos I e III não foi realizado arrombamento do ápice radicular, sendo o mesmo realizado nos Grupos II e IV. Inicialmente e ao final dos períodos experimentais, radiografias padronizadas foram realizadas para avaliação das lesões induzidas. Ao final dos períodos de indução das lesões, foi realizada a colheita microbiológica do conteúdo dos canais radiculares, sendo verificado o crescimento de microrganismos anaeróbios e aeróbios. Para avaliação radiográfica as imagens obtidas foram digitalizadas e submetidas a delimitação das áreas radiolúcidas periapicais. Os resultados da avaliação microbiológica demonstraram que a quantidade de microrganismos foi maior para os Grupos III e IV, os quais permaneceram abertos por todo o período experimental ($p < 0,05$). A proporção de microrganismos, com maior número de anaeróbios em relação aos aeróbios foi mantido para as duas técnicas. A avaliação radiográfica ao final de cada período experimental, demonstrou que as áreas radiolúcidas

periapicais observadas para todos os grupos experimentais foram semelhantes ($p>0,05$), sem interferência do método ou arrombamento do ápice radicular.

No mesmo ano, Silva et al.⁹⁸ avaliaram, in vivo, o efeito da endotoxina (LPS) associada ou não ao hidróxido de cálcio, sobre os tecidos apicais e periapicais de dentes de cães, por meio de avaliação histopatológica. Foram utilizadas 59 raízes de pré-molares de 3 cães que, após abertura coronária e biopulpectomia, foram preenchidos, por 30 dias, com diferentes materiais, de acordo com os seguintes grupos: Grupo I: LPS; Grupo II: LPS/hidróxido de cálcio; Grupo III: soro fisiológico; Grupo IV: lesões periapicais experimentalmente induzidas por meio da exposição do canal radicular ao meio bucal durante 7 dias seguido pelo selamento coronário com óxido de zinco e eugenol durante todo período experimental (30 dias). Decorrido este período, os animais foram sacrificados, as peças removidas e submetidas ao processamento histológico. Verificou-se que a intensidade do infiltrado inflamatório, a espessura do ligamento periodontal e a presença de reabsorções cementárias, dentinárias e ósseas no Grupo I (LPS) foram semelhantes ao Grupo IV (indução experimental de lesões periapicais), diferindo quanto à difusão das células inflamatórias. Sendo o Grupo II (LPS/hidróxido de cálcio) semelhante ao Grupo III (soro fisiológico). Concluiu-se que a endotoxina bacteriana (LPS) ocasionou o desenvolvimento de reação periapical, e que o hidróxido de cálcio foi capaz de inativar os efeitos tóxicos da mesma, in vivo.

2.2 - Da identificação dos microrganismos nos tecidos dentários pela coloração de Brown & Brenn.

Langeland et al.⁵², em 1977, realizaram estudo histopatológico e histomicrobiológico, de biópsias obtidas de 35 dentes de humanos, portadores de lesão periapical. As peças histológicas foram coradas pela hematoxilina e eosina, Brown & Brenn, corante de Johns Hokins modificado e tricrômico de Masson. Somente um caso apresentou, simultaneamente, bactérias no tecido desintegrado presente no canal radicular e na região periapical.

Winkler et al.¹³⁰ (1972) avaliaram microbiologicamente, lesões periapicais aderidas ao ápice radicular de 15 dentes humanos extraídos, diagnosticadas como granulomas periapicais. Notaram elevada incidência de bactérias no lúmen do canal radicular e com certa frequência nos túbulos dentinários. Em 13 lesões periapicais, os microrganismos estavam uniformemente dispersos no tecido, com concentração leve à moderada, com predomínio de cocos gram-positivos nos canais radiculares e lesões periapicais, com rara presença de gram-negativas.

Analisando a microbiologia de 20 biópsias de lesões periapicais, Bohórquez Avila⁹, (1995) verificou que em 90% das amostras, os bacilos e cocos gram-positivos, estavam em 58,3% e 45,0% dos cortes avaliados, respectivamente, seguidos pelos bacilos gram-negativos (26,7%). A localização mais comum para os microrganismos na área periapical, foi

nas proximidades do forame, entre as células do infiltrado inflamatório periapical, constituindo o chamado biofilme apical. Cocos e bacilos gram-positivos também foram vistos na cavidade de dois cistos periodontais apicais instalados.

Com o objetivo de analisar a distribuição das bactérias nos granulomas apicais humanos, Ribeiro e Consolaro⁸³ (2000), utilizaram 32 raízes dentárias, com lesões periapicais firmemente aderidas à seus ápices e 16 lesões isoladas. Evidenciaram alta frequência de cocos gram-positivos e bacilos gram-positivos ou gram-negativos, no terço apical radicular, distribuídos isoladamente ou em colônias, por vezes aderidos às paredes dos canais. Nos túbulos dentinários, os mesmos morfotipos anteriores invadiram o terço circunferencial da dentina externa, com predominância de bactérias gram-negativas. Na superfície radicular apical externa, notou-se áreas de reabsorções em variados graus. Todas amostras apresentavam colônias bacterianas no canal cementário, livres ou aderidas às suas paredes, principalmente nas lacunas de Howship e em sete casos nos cementoplastos. Em dois espécimes, notaram quantidade exagerada de colônias bacterianas superpostas, de aspectos morfológicos variados, constituindo-se em verdadeiro “plug bacteriano” apical. Na superfície apical, observou-se bactérias gram-negativas e gram-positivas, predominantemente cocos e bacilos gram-negativos, isoladamente ou em placas firmemente aderidas à superfície apical, como se tivessem revestindo a superfície radicular. No corpo dos granulomas, bactérias foram vistas em 26 amostras de um total de 28, atestando também a presença de cocos e bacilos gram-positivos ou negativos, distribuídos em colônias ou isoladamente, na intimidade do tecido granulomatoso. Quando isoladas, encontravam-se nos espaços extracelulares e/ou nos vacúolos dos macrófagos.

3 Proposição

Este estudo teve como objetivo a análise histopatológica da região apical e periapical de dentes de cães, após o emprego de dois diferentes métodos de indução experimental de lesões periapicais, utilizando ou não o selamento coronário após exposição dos canais radiculares, e com ou sem a realização do arrombamento apical. Foi efetuada também a avaliação histomicrobiológica da presença de microrganismos nos tecidos apicais e periapicais.

4 Material e método

▪ 4.1 Procedimentos de indução das lesões periapicais

Foram utilizados 3 cães, de ambos os sexos, sem raça definida, com aproximadamente 1 ano de idade e pesando entre 10 e 15 Kg. Os animais foram mantidos por um período de 30 a 45 dias anteriormente às intervenções endodônticas sob cuidados relacionados à dieta e medicações sistêmicas, tais como, vermífugos e vacinas. Durante esta fase e em todo o período experimental, os mesmos foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara- Câmpus-UNESP.

Os dentes selecionados para o estudo foram os segundos, terceiros e quartos pré-molares inferiores e segundos e terceiros pré-molares superiores, totalizando 58 raízes, em razão da presença de dois segundos pré-molares inferiores uniradiculados.

Para a realização dos procedimentos operatórios nos cães, inicialmente, foi efetuada a pré-anestesia com injeção intramuscular de 2 mL do relaxante muscular Rompum (Cloridrato de dihidroxiazina – Bayer do Brasil S/A, Produtos Veterinários, São Paulo, SP), sendo, em seguida, realizada a anestesia geral pela aplicação via endovenosa de solução de Nembutal Sódico 3% (Thionembital – Abbott Laboratórios do Brasil Ltda., Rio de Janeiro, RJ), na dosagem de 0,15 mg/Kg de peso do animal, aplicada na veia tibial anterior de uma das pernas do animal.

Durante os procedimentos operatórios, foi mantida a solução isotônica de cloreto de sódio administrada endovenosamente e, quando necessário, efetuada a complementação anestésica.

De acordo com a proposição deste estudo, os cães foram divididos em 4 grupos segundo a técnica de indução das lesões periapicais, apresentando como variáveis o selamento da abertura coronária e o arrombamento apical, conforme o Quadro 1. Cada grupo experimental foi efetuado em um dos quadrantes do animal em sistema de rodízio, possibilitando a realização de todos os grupos experimentais em cada animal.

Quadro 1 – Distribuição dos grupos em função do método de indução experimental de lesões periapicais e arrombamento apical.

TÉCNICA	GRUPO EXPERIMENTAL
Canais radiculares expostos ao meio bucal durante 180 dias.	GRUPO I – Com arrombamento apical GRUPO II – Sem arrombamento apical
Canais radiculares expostos ao meio bucal durante 7 dias e selados por 53 dias.	GRUPO III – Com arrombamento apical GRUPO IV – Sem arrombamento apical

Após anestesia do cão, foi efetuada limpeza mecânica das coroas dentais com curetas periodontais e gaze esterilizada, seguida de radiografias periapicais dos dentes selecionados pela técnica da bissetriz. Após estes procedimentos, foi realizada a anestesia terminal

infiltrativa na região periapical dos dentes envolvidos no quadrante empregando o anestésico à base de Cloridrato de Prilocaina com Felipressina – Citanest a 3% com Octapressim (Astra Química e Farmacêutica, São Paulo, SP).

▪ **4.1.1 Procedimentos experimentais nos Grupos I e II**

Inicialmente foram realizados os procedimentos relacionados aos Grupos I e II. Assim, de acordo com a distribuição dos grupos experimentais, as aberturas coronárias foram realizadas com broca esférica diamantada número 1012 ou 1013 (KG Sorensen, São Paulo, SP), montada em turbina de alta velocidade refrigerada a ar e água, sendo realizadas duas aberturas, uma mesial e outra distal, mantendo-se a ponte de esmalte com o objetivo de prevenir fraturas coronárias. As aberturas coronárias foram complementadas com ponta diamantada tronco-cônica de extremidade inativa de número 3081 (K.G. Sorensen, São Paulo, SP), também em alta rotação.

Removida a polpa coronária, realizou-se a irrigação da câmara pulpar com soro fisiológico acondicionado em tubetes anestésicos, empregando-se seringa do tipo Carpule e agulha descartável longa (27 G- Becton Dickinson, Ind. Cirúrgica Ltda., Juiz de Fora, MG). Com base nas radiografias para diagnóstico, foi efetuada a exploração dos canais radiculares com limas tipo K nº 20 (Dentsply-Maillefer,

Ballaigues, Suíça), até o nível do “platô” apical, situado aproximadamente de 1,5 a 2 mm do ápice radiográfico. A seguir, a remoção da polpa radicular foi efetuada nesta extensão com auxílio de limas tipo Hedstroen (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) de número 25 ou 30, sendo a irrigação/aspiração do canal radicular realizada com soro fisiológico. Com limas tipo K número 25 posicionadas no nível do platô apical foram realizadas as tomadas radiográficas periapicais para obtenção das medidas da odontometria.

Nos grupos I e II, após abertura coronária, as câmaras pulpares permaneceram expostas ao meio bucal por 180 dias com a finalidade de indução da formação das lesões periapicais.

Nos dentes relacionados ao grupo I, na mesma sessão da abertura coronária, foi realizado o arrombamento do delta apical. Desta forma, a partir da medida odontométrica, o arrombamento apical foi efetuado com auxílio de limas tipo K de nº 20, até a de nº 30, no Comprimento Real do Dente (CRD), previamente estabelecido, determinando o Instrumento Apical Foraminal (IAF). Durante este procedimento a irrigação dos canais radiculares foi realizada empregando-se solução fisiológica.

▪ **4.1.2 Procedimentos experimentais nos Grupos III e IV**

Decorridos 120 dias da realização dos procedimentos nos Grupos I e II, foram efetuados nos demais quadrantes dos cães, os Grupos III e IV. Os procedimentos de anestesia do animal e abertura coronária dos dentes envolvidos foram realizados segundo os métodos já descritos. Nestes grupos, após a abertura coronária e remoção pulpar, os canais radiculares foram mantidos expostos ao meio bucal por 7 dias com a finalidade de contaminação. Decorrido este período, as aberturas coronárias foram seladas com cimento de óxido de zinco e eugenol (Pulposan- S.S.White, Rio de Janeiro, RJ) colocado sobre uma mecha de algodão esterilizada, posicionada na câmara pulpar. O selamento coronário foi mantido por 53 dias para indução das lesões periapicais crônicas.

Segundo a distribuição dos métodos, no grupo III, foi realizado o arrombamento apical como descrito no Grupo I, na mesma sessão em que foi realizada a abertura coronária, ou seja, antes da exposição dos canais radiculares para contaminação.

O momento de realização dos grupos experimentais foi determinado, respeitando os períodos de indução das lesões periapicais indicados para cada técnica, ou seja 180 dias após abertura coronária para os grupos I e II, e 60 dias, para os grupos III e IV. Decorridos os períodos experimentais, os animais foram mortos por sobredose anestésica.

Após a morte dos animais, as maxilas e mandíbulas foram removidas e reduzidas, sendo fixadas em solução de cacodilato de sódio em associação com sacarose e glutaraldeído (SOARES¹⁰³, 1999).

Em condições ideais, considerando a presença de 20 raízes em cada cão, seria possível a inclusão de 60 raízes no estudo. Em função da presença de 2 pré-molares inferiores uniradiculados e da perda de 1 raiz durante o processamento histológico, 57 espécimes foram avaliadas ao final do experimento.

4.2 Procedimentos Laboratoriais

▪ 4.2.1 Processamento Histopatológico – Fixação e Desmineralização

A maxila e a mandíbula foram cortadas longitudinalmente, por meio de discos diamantados, montados em torno elétrico, sobre constante refrigeração com água, obtendo-se blocos, contendo cada raiz, as quais foram fixadas em solução à base de glutaraldeído e sacarose cacodilato, por 24 horas. Posteriormente, a desmineralização foi realizada com solução à base de EDTA tamponada, contendo glutaraldeído, sacarose e cacodilato de sódio ativada pelo forno de microondas ajustado na potência 2 e com tempo de exposição de 4 minutos. Após cada exposição, a temperatura da solução era verificada, para mantê-la entre 30 e 36° C. A cada seis exposições, as peças foram

agitadas em solução tampão de cacodilato de sódio (fixadora) e imersas em nova solução desmineralizadora, sendo as exposições repetidas até que a completa desmineralização fosse observada. O período necessário para o processo de desmineralização foi de aproximadamente 3 semanas e a constatação efetuada por meio de tomada radiográfica das peças.

Composição da solução fixadora (para 1 litro)

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

Composição da solução desmineralizadora:

EDTA- diidratado USP.....	93,05 g
Solução aquosa de glutaraldeído 25%.....	20,0mL
Sacarose.....	34,25 g
Solução tamponada de cacodilato de sódio(pH7,4)	280,0 mL
Água destilada	200,0mL
Solução de hidróxido de sódio 0,1N	qsp
PH final da solução	pH 7,4

4.3 Análise Histopatológica

Constatada a desmineralização, as peças foram submetidas à rotina histológica, sendo lavadas em água corrente por 24 horas,

desidratadas em álcool de concentrações crescentes, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os blocos contendo as raízes dentárias dispostas longitudinalmente, foram reduzidos, pela microtomia, a cortes seriados com espessura de 6µm. Para a análise histopatológica, os cortes foram corados pela Hematoxilina e Eosina (HE) e pelo tricrômico de Mallory.

▪ **4.3.1 Método de Avaliação Histopatológica Quantitativo**

4.3.1.1 Intensidade do Infiltrado Inflamatório

A avaliação da intensidade da reação inflamatória periapical foi realizada por meio da contagem de células inflamatórias na região periapical (BERNABÉ, 1994). Cortes histológicos corados pela Hematoxilina e Eosina (HE) foram selecionados, e analisados em fotomicroscópio binocular (Olympus BX50, Japan), com auxílio de uma lente ocular (Carl Zeiss, Germany), contendo uma área teste de 10x10mm, sendo utilizado o aumento de 1.000X, 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 1. A partir dos 5 valores obtidos para cada corte histológico e considerando os

resultados obtidos nas 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 para escores. Desta forma, a partir dos valores globais obtidos nos 4 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 72,1 células inflamatórias.
- 2- 72,2 a 87,2 células inflamatórias.
- 3- 87,3 a 115,8 células inflamatórias.
- 4- Acima de 115,9 células inflamatórias.

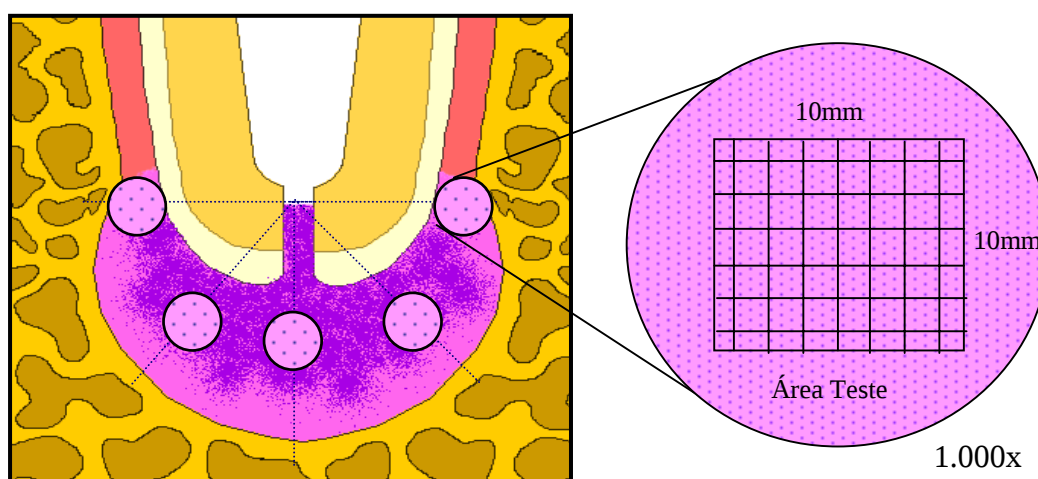


Figura 1 - Esquema dos campos de contagem das células inflamatórias (1.000x).

4.3.1.2 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 2. Para isto, foram realizadas fotomicrografias utilizando microscópio binocular (Olympus BX50, Japan), em aumento de 40X empregando filme fotográfico (Reala Supéria ASA 100, Fuji, Jajjan).

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 (UTHSCSA Image Tool for Windows version 3.0, San Antonio, TX, USA). 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 da 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 4 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:

- 1- 0 a 1,068mm
- 2- 1,069 a 1,389mm
- 3- 1,390 a 1,769mm
- 4- acima de 1,770mm

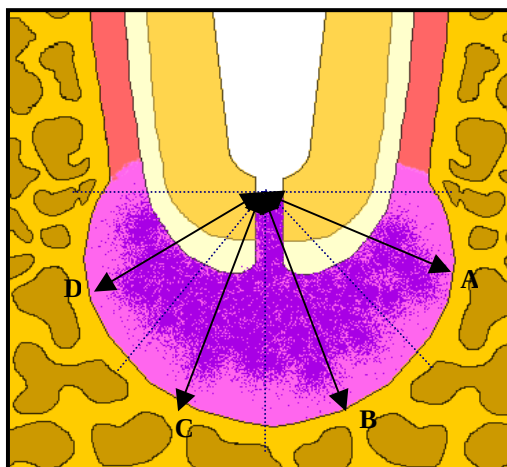


Figura 2 - Representação esquemática das regiões empregadas para medida da espessura do espaço periodontal apical (40X).

4.3.1.3 Reabsorção Óssea

A análise da reabsorção óssea foi realizada considerando-se a mediana obtida a partir das médias dos valores do espaço periodontal apical. O escore 1 representa reabsorção ausente e o escore 2, áreas de reabsorção reparadas. Os escores 3 e 4, que representam a presença de reabsorção óssea, foram divididos em dois intervalos: menores que 1,389 mm (mediana das médias do espaço

periodontal apical) para o escore 3, e maiores ou iguais que 1,389 mm para o escore 4. Os escores ficaram distribuídos da seguinte maneira:

- 1 – Ausente
- 2 – Presente e reparadas
- 3 – Presente e com média do espaço periodontal apical menores que 1,389mm
- 4 – Presente e com média do espaço periodontal apical maiores ou iguais a 1,389mm

▪ **4.3.2 Método de Avaliação Histopatológica Qualitativo**

Para avaliação histopatológica dos espécimes foram utilizados 5 parâmetros de análise, sendo determinados escores de 1 a 4, da menor para a maior intensidade de fenômenos inflamatórios ou de reabsorção dos tecidos mineralizados. Para os três primeiros parâmetros os intervalos de valores relacionados aos escores foram estabelecidos conforme já descrito. Os parâmetros de avaliação foram os seguintes:

a) Intensidade do Infiltrado Inflamatório Periapical (Fig.1):

- 1- 0 a 72,1 células inflamatórias(cél.infl.)
- 2 – 72,2 a 87,2 cél. infl.
- 3 – 87,3 a 115,8 cél. infl.
- 4 – acima de 115,9 cél. infl.

b) Espessura do Espaço Periodontal Apical - EPA(Fig.2):

- 1 – 0 a 1,068mm
- 2 - 1,069 a 1,389mm
- 3 – 1,390 a 1,769mm
- 4 – acima de 1,770mm

c) Reabsorção óssea:

- 1 – Ausente
- 2 – Presente e reparadas
- 3 – Presente e com média do (EPA) < 1,389mm
- 4 – Presente e com média do (EPA) $\geq$ 1,389mm

d) Extensão do Infiltrado Inflamatório Periapical (Fig. 3):

- 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

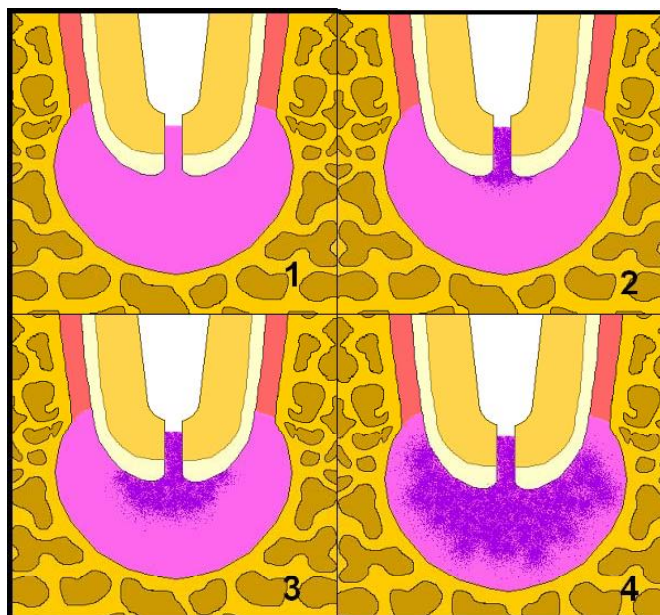


Figura 3 - Representação esquemática dos escores atribuídos à extensão do infiltrado inflamatório.

e) Reabsorção Cementária Apical (Fig. 4):

- 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

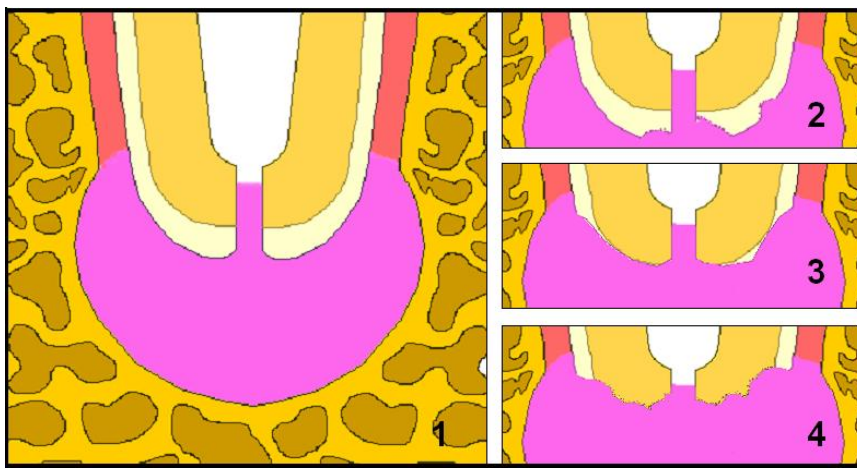


Figura 4 - Representação esquemática dos escores atribuídos à reabsorção cementária apical..

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

Quadro 2 - Modelo de ficha utilizada para anotação dos resultados histopatológicos.

Aspectos Histológicos	Condições Observadas	Cão Raiz	Cão Raiz	Cão Raiz	Cão Raiz
Intensidade do Infiltrado Inflamatório	1-De 0 a 72,1 células inflamatórias				
	2-De 72,2 a 87,2 células inflamatórias				
	3-De 87,3 a 115,8 células inflamatórias				
	4-Acima de 115,9 células inflamatórias				
Espaço Periodontal Apical (EPA)	1-De 0 a 1,068mm				
	2-De 1,068 a 1,389 mm				
	3-De 1,390 a 1,769 mm				
	4-Acima de 1,770mm				
Reabsorção Óssea	1-Ausente				
	2-Áreas reparadas				
	3-Áreas não reparadas c/ médias do EPA < 1,389mm				
	4- Áreas não reparadas c/ médias do EPA ≥ 1,389mm				
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				

4.4 Processamento Histomicrobiológico

Cortes seriados, intercalados foram corados pelo método de Brown & Brenn¹² (1931) para evidenciação de microrganismos. Previamente à coloração, foram efetuadas a desparafinização com xilol (Ecibra, Cetus Ind. Com. Prod. Quim. Ltda.), durante 3 minutos, por 2

vezes e a hidratação, durante 3 minutos, com álcool absoluto (Merck S.A.), por 3 vezes; álcool 95° (Merck S.A.), por 3 minutos; água corrente, por 5 minutos e água destilada, onde as lâminas ficaram armazenadas. A seguir, foi realizada a coloração pelo método de Brown & Brenn, como segue:

- Aplicar cristal violeta (Ecibra, Cetus) “tamponado”, com bicarbonato de sódio a 5% (Pheniz), sobre as lâminas, por 30 segundos. Lavar em água destilada.
- Mergulhar as lâminas em solução de iodo (Ecibra, Cetus) de gram, durante 1 minuto. Lavar em água destilada. Secar rapidamente com papel de filtro.
- Banhar em éter-acetona 1:1, até que a coloração azul cesse de escorrer da lâmina. Lavar em água destilada para remover a solução éter-acetona.
- Mergulhar as lâminas em fucsina básica (Ecibra, Cetus) a 0,25mg/ml, durante 1 minuto. Lavar em água destilada.
- Mergulhar em ácido pícrico (2:4:4 Trinitrophenol; May & Baker Ltda., England), aquoso, por 1 minuto. Lavar em água destilada e secar em papel de filtro.
- Mergulhar em acetona P.A. (CH_3COCH_3 : Ecibra, Cetus), por 15 minutos.
- Mergulhar rapidamente em acetona-xilol (Ecibra, Cetus), a 1:1.
- Introduzir em xilol I, II e III (Ecibra, Cetus), com mergulhos de 3 minutos cada.
- Montar em bálsamo de Canadá (Merse Art. Lab. Ltda.).

▪ **4.5 Análise Histomicrobiológica**

Uma vez submetidos à coloração de Brown & Brenn, os microrganismos foram observados à luz da microscopia de imersão a óleo, em aumento de 1.000X, nos 2 mm apicais, nos seguintes sítios:

- 1- Delta Apical
- 2- Cementoplastos
- 3- Paredes do Canal Principal
- 4- Túbulos Dentinários
- 5- Áreas de Reabsorção Cementária Apical
- 6- Região Periapical

Para cada raiz foram analisadas, em média 6 secções. A diferenciação das bactérias dos artefatos foi baseada em critérios propostos por Winkler et al.¹²⁸ (1972), como a seguir:

- 1º- As bactérias devem estar no mesmo plano que os tecidos adjacentes.
- 2º- A morfologia dos microrganismos deve ser uniforme.
- 3º- A resposta de coloração dos microrganismos deve ser consciente.
- 4º- As células inflamatórias devem estar presentes nos mesmos planos das bactérias, adjacentes a elas ou englobando os microrganismos.

▪ **4.6 Metodologia estatística**

4.6.1 Análise dos Resultados Histopatológicos

As frequências de escores observados nos diferentes parâmetros de avaliação histopatológica foram analisadas por meio de Teste Não-Paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando observada diferença em nível de 5%, entre os grupos experimentais, comparações individuais entre os grupos foram realizadas empregando-se o Teste Múltiplo de Dunn. Da mesma forma, foi realizada a comparação global dos grupos experimentais reunindo-se os dados obtidos para todos os parâmetros analisados, visando a diferenciação entre grupos. Quando o Teste de Dunn não foi capaz de identificar a diferença, detectado pelo teste de Kruskal-Wallis, foi realizada nova avaliação entre os grupos experimentais com valores extremos por meio do teste de Mann-Whitney.

4.6.2. Análise dos Resultados Histomicrobiológicos

Para análise estatística dos resultados histomicrobiológicos, os dados relacionados a cada região avaliada quanto à presença de microrganismos foram submetidos ao teste exato de Fisher para comparação entre os grupos experimentais.

5 Resultado

•5.1 Avaliação histopatológica

5.1.1 Intensidade do infiltrado inflamatório periapical

O Quadro 3 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 3 – Valores da contagem de células inflamatórias e respectivos escores para os diferentes espécimes, distribuídos em função dos grupos experimentais

Espécime	GI (n=14)	escore	GII (n=14)	escore	GIII (n=14)	escore	GIV (n=15)	escore
1	57,8	1	79,3	2	100,4	3	128,7	4
2	72,0	1	58,9	1	97,9	3	115,6	3
3	70,9	1	80,9	2	74,2	2	163,2	4
4	83,3	2	75,9	2	94,5	3	106,3	3
5	65,0	1	72,5	2	95,3	3	91,0	3
6	68,2	1	79,5	2	115,8	3	151,6	4
7	65,5	1	79,3	2	115,9	4	125,0	4
8	118,2	4	68,4	1	125,4	4	131,4	4
9	67,7	1	95,1	3	93,7	3	137,3	4
10	87,2	2	59,9	1	112,5	3	85,7	2
11	62,2	1	104,2	3	141,6	4	149,5	4
12	35,2	1	55,4	1	165,7	4	64,8	1
13	86,7	2	78,2	2	179,1	4	155,2	4
14	87,3	3	73,7	2	83,6	2	108,9	3
15							95,7	3

	GI		GII		GIII		GIV	
--	----	-------	-----	-------	------	-------	-----	-------

[illegible]

[illegible]

No Quadro 6 encontram-se dispostas as frequências dos espécimes, para cada aspecto histopatológico avaliado, distribuídas em função de suas ocorrências nos diversos grupos experimentais.

Quadro 6 - Frequência dos espécimes de acordo com os aspectos histopatológicos avaliados, distribuídos em função dos grupos experimentais

ASPECTOS HISTOLÓGICOS	CONDIÇÕES OBSERVADAS	GI (n=14)	GII (n=14)	GIII (n=14)	GIV (n=15)
Intensidade do Infiltrado Inflamatório	1-De 0 a 72,1 células inflamatórias	9	4		1
	2-De 72,2 a 87,2 células inflamatórias	3	8	2	1
	3-De 87,3 a 115,8 células inflamatórias	1	2	7	5
	4-Acima de 115,9 células inflamatórias	1		5	8
Espaço Periodontal Apical (EPA)	1-De 0 a 1,068mm	2	9	2	1
	2-De 1,068 a 1,389 mm	4	4	2	5
	3-De 1,390 a 1,769 mm	5	1	2	6
	4-Acima de 1,770mm	3		8	3
Reabsorção Óssea	1-Ausente				
	2-Áreas reparadas				
	3-Áreas não reparadas c/ médias do EPA < 1,389mm	6	13	3	6
	4- Áreas não reparadas c/ médias do EPA ≥ 1,389mm	8	1	11	9
Extensão do Infiltrado Inflamatório	1-Ausente				
	2-Restrito ao forame apical				
	3-Localizado até ½ do EPA		5		4
	4-Localizado acima de ½ do EPA	14	9	14	11
Reabsorção Cementária Apical	1-Ausente				
	2-Presente até ½ da espes. de cimento	5	11	10	12
	3-Presente além da ½ da espes. de cimento	7	3	3	3
	4-Presente atingindo a dentina	2		1	

▪ 5.2 Avaliação Histomicrobiológica – Padrão de Infecção do Sistema de canais radiculares

Pela avaliação das lâminas coradas pelo método de Brown & Brenn foi possível observar a presença de microrganismos nos 2 milímetros apicais do sistema de canais radiculares, bem como na região periapical, em 52 raízes, uma vez que 5 foram perdidas durante o processamento histológico, perfazendo um total de 312 cortes histomicrobiológicos. Os resultados dos quatro grupos experimentais estão representados no quadro 7.

Quadro 7- Distribuição dos microrganismos nos 2 milímetros apicais do sistema de canais radiculares e região periapical

Grupos	Regiões Avaliadas Histomicrobiologicamente					
	Delta Apical	Cemento-plastos	Paredes do Canal Principal	Túbulos Dentinários	Áreas de Reabsorção Cementária	Região Periapical
GI (n=13)	11 (84,6%)	8 (61,5%)	13 (100%)	9 (69,2%)	6 (46,2%)	6 (46,2%)
GII (n=13)	11 (84,6%)	4 (30,8%)	13 (100%)	7 (53,8%)	1 (7,7%)	2 (15,4%)
GIII (n=13)	11 (84,6%)	5 (38,5%)	13 (100%)	10 (76,9%)	4 (30,8%)	9 (69,2%)
GIV (n=13)	12 (92,3%)	9 (69,23)	13 (100%)	10 (76,9%)	3 (23,1%)	4 (30,8%)

▪ **Análise histopatológica descritiva do Grupo I – Canais radiculares abertos por 180 dias e com realização do arrombamento apical**

Neste grupo, onde os canais radiculares foram mantidos expostos ao meio bucal durante o período de 180 dias e o arrombamento apical foi realizado na mesma sessão da abertura coronária, nas 14 raízes avaliadas, foi observada intenso concentrado de células inflamatórias e reabsorção de tecidos mineralizados (cimento e osso)(Figuras 5 e 7).

Na região periapical, o infiltrado de células inflamatórias era denso e composto predominantemente por células mononucleares sendo observados escassos neutrófilos. A contagem de células inflamatórias, possibilitou a atribuição de escores aos grupos experimentais, sendo predominante para este grupo experimental o escore 1, que ocorreu, em 9 casos (menor quantidade de células inflamatórias). Três espécimes apresentaram escore 2, sendo 1 caso, classificado como escore 3 e 4 (com maiores valores de contagem de células inflamatórias).

No ligamento periodontal as células inflamatórias se localizavam difusamente por toda a região periapical sendo observado em vários espécimes focos concentrados de células inflamatórias próximo à abertura apical. Em todos os casos (14 espécimes), o espaço periodontal apical mostrava-se aumentado com espessura média equivalente a 1,558mm.

As medidas do espaço periodontal apical após determinação dos escores, permitiram classificar 2 espécimes no escore 1, e 4 no escore 2. Em cinco raízes o aumento do espaço periodontal apical foi equivalente ao escore 3 e em 3 espécimes ao escore 4.

As reabsorções radiculares apicais em 5 raízes ocorreram em extensão menor que a metade do cimento, sendo a mesma, maior que essa espessura em 8 espécimes. Reabsorção cementária atingindo a dentina ocorreu em 2 espécimes.

A reabsorção do osso alveolar foi observada em todos os casos, abrangendo grandes áreas, havendo na superfície óssea numerosos osteoclastos.

▪ **Análise histomicrobiológica descritiva do Grupo I – Canais radiculares abertos por 180 dias e com realização do arrombamento apical.**

Neste grupo, foram avaliadas 13 raízes, nas quais em 100% das amostras foram observados microrganismos nas paredes do canal radicular. Microrganismos foram detectados no delta apical, no interior dos túbulos dentinários e nas lacunas cementárias, em 84,6%, 69,2% e 61,5% respectivamente. (Figuras 6 e 7). Os principais morfotipos visualizados foram cocos, bacilos e filamentosos gram-positivos e negativos. Estes microrganismos foram identificados em biofilmes, principalmente nas paredes do canal radicular e nos canais do delta e cimento apical. Nas áreas de reabsorção do cimento apical e região periapical, microrganismos foram observados em 46,2% das amostras.

(FIGURA 5)

(FIGURA 6)

(FIGURA 7)

▪ **Análise histopatológica descritiva do Grupo II - Canais radiculares abertos por 180 dias e sem realização do arrombamento apical.**

Neste grupo, onde os canais radiculares ficaram expostos ao meio bucal durante o período de 180 dias e nos quais não foi realizado o arrombamento apical, nas 14 raízes avaliadas foi observada a presença de infiltrado inflamatório na região apical e periapical e de reabsorção de tecidos mineralizados, porém em menor intensidade que a observada no grupo I (Figuras 8 e 10).

Na região periapical, o infiltrado das células inflamatórias era composto predominantemente por células mononucleares. Após a contagem de células inflamatórias e determinação dos escores, os resultados mostraram que, na maior parte dos casos, ocorreu escores 1 e 2 (4 espécimes com escore 1 e 8 com escore 2). Apenas 2 casos foram classificados com escore 3, não sendo observado escore 4 em nenhum espécime.

No ligamento periodontal apical as células inflamatórias encontravam-se difusamente espalhadas por extensa área da região periapical. Em 5 espécimes, o infiltrado inflamatório ocupava menos que a metade do espaço periodontal apical enquanto em 9 raízes, essa extensão era maior que a metade do EPA. A espessura média do ligamento periodontal periapical foi de 0,903mm.

A reabsorção cementária apical ocorreu em todos os casos, sendo em 11 raízes de extensão menor que a metade da extensão

cementária. Em 3 raízes essa extensão atingia até a metade do cimento, não havendo reabsorção radicular atingindo a dentina em nenhum espécime.

A reabsorção do osso alveolar foi observada em todos espécimes, a qual abrangia área menor que a média do EPA (1,389 mm) em 13 casos e maior que esta medida apenas em 1 caso.

▪ **Análise histomicrobiológica descritiva do Grupo II – Canais radiculares abertos por 180 dias e sem realização do arrombamento apical.**

Nas 13 raízes avaliadas, pôde ser observado microrganismos nas paredes do canal radicular em 100% das amostras, sob a forma de biofilme. No delta apical e nos túbulos dentinários foram detectados microrganismos em 84,6% e 53,8%, respectivamente (Figuras 9 e 10). Os morfotipos mais encontrados foram bacilos e filamentosos gram-positivos e negativos, sendo visualizados poucos cocos. Somente em um caso foi encontrada levedura. Nos cementoplastos, áreas de reabsorção e região periapical foram detectados microrganismos em 30,8%, 7,7% e 15,4%, respectivamente. Os morfotipos encontrados, geralmente se apresentavam sob a forma de biofilme.

(FIGURA 8)

(FIGURA 9)

(FIGURA 10)

▪ **Análise histopatológica descritiva do Grupo III – Canais radiculares expostos ao meio bucal durante 7 dias e selados posteriormente com arrombamento apical.**

Nas 14 raízes do grupo III, onde os canais radiculares foram mantidos expostos ao meio bucal durante 7 dias, seguido pelo arrombamento apical, e selamento coronário por 53 dias, foi observado intenso infiltrado inflamatório e reabsorção de tecidos mineralizados na região apical e periapical (Figuras 11 e 13).

Na região periapical, o infiltrado inflamatório era misto com predomínio de células mononucleares, particularmente macrófagos e plasmócitos, havendo ocasionais neutrófilos. Após a contagem das células inflamatórias e determinação dos escores, pode-se observar que 7 espécimes pertenciam ao escore 3 e 5 ao escore 4. Dois casos foram classificados no escore 2, não sendo classificado nenhum espécime no escore 1.

No ligamento periodontal, em todos os casos havia células inflamatórias difusas por toda a região periapical, sendo observado em vários espécimes focos inflamatórios localizados adjacente à abertura apical.

A espessura do espaço periodontal apical encontrava-se aumentada em 14 espécimes, com aumento médio equivalente a 1,728mm. Oito casos foram classificados com escore 4, sendo as demais raízes classificadas nos escores 1, 2 ou 3 (2 casos para cada avaliação).

Reabsorções radiculares foram observadas em todas as 14 raízes, sendo que 10 atingiram a metade da espessura de cimento. Em 3 casos, essa extensão era maior que a metade da extensão cementária, tendo a mesma atingido a dentina em apenas 1 espécime.

Reabsorções do osso alveolar foram observadas envolvendo extensas áreas (maior que 1,389 mm de espessura do EPA) em 11 das 14 raízes.

▪ **Análise histomicrobiológica descritiva do Grupo III – Canais radiculares expostos ao meio bucal durante 7 dias e selados posteriormente com arrombamento apical.**

Neste grupo, foram avaliadas 13 raízes, nas quais, em 100% das amostras havia microrganismos nas paredes do canal radicular. Foi detectada a presença de microrganismos no delta apical, no interior dos túbulos dentinários e nos cementoplastos, em 84,6%, 76,9% e 38,5% respectivamente. (Figuras 12 e 13). Os principais morfotipos visualizados foram cocos, bacilos e filamentosos gram-positivos e negativos. Estes microrganismos formaram biofilmes, principalmente nas paredes do canal radicular e nos canais do delta e cimento apical. Nas áreas de reabsorção e região periapical, microrganismos foram observados em 30,8% e 69,2%, respectivamente.

(FIGURA 11)

(FIGURA 12)

(FIGURA 13)

- **Análise histopatológica descritiva do Grupo IV – Canais radiculares expostos ao meio bucal durante 7 dias, seguido pelo selamento coronário e sem o arrombamento apical.**

Nas 15 raízes do grupo IV, onde os canais radiculares foram mantidos expostos ao meio bucal durante 7 dias, seguido pelo selamento coronário e, sem a realização do arrombamento apical, foi observado infiltrado inflamatório na região apical e periapical e reabsorção de tecidos mineralizados. (Figuras 14 e 16).

Na região periapical, o infiltrado inflamatório era misto e composto por células mononucleares, principalmente macrófagos e plasmócitos, com pequena quantidade de neutrófilos. Após a contagem das células inflamatórias e determinação de escores, pode-se observar que neste grupo ocorreu o escore 4 em 8 espécimes, 3 em 5 casos e 1 e 2 em 1 espécime para cada avaliação.

No ligamento periodontal apical as células inflamatórias estavam difusamente espalhadas por toda a região periapical sendo observado em vários espécimes focos inflamatórios localizados próximo à abertura apical. Em 11 espécimes havia extensa área da região periapical ocupada por células inflamatórias, sendo que em 4 casos, essa extensão era menor que a metade do EPA.

Quanto à espessura do EPA, cinco espécimes foram classificados no escore 2, 6 no escore 3, 3 no escore 4 e 1 no escore 1. A

espessura do espaço periodontal apical apresentou média equivalente a 1,466mm.

Reabsorções radiculares ocorreram em 12 raízes, cuja extensão estava próximo à metade da extensão do cimento, e em 3 casos, além da mesma.

Reabsorções do osso alveolar foram observadas envolvendo extensas áreas (maior que 1,389 mm de espessura do EPA) em 9 raízes e com extensão menor em 6 espécimes .

▪ **Análise descritiva do Grupo IV – Canais radiculares expostos ao meio bucal durante 7 dias e selados posteriormente sem arrombamento apical.**

Nas 13 raízes, foram observados em 100% das amostras, microrganismos sob a forma de biofilme, nas paredes do canal radicular. No delta apical e nos túbulos dentinários foram detectados microrganismos em 92,3% e 76,9%, respectivamente (Figuras 15 e 16). Os morfotipos mais encontrados foram cocos, bacilos e filamentosos gram-positivos e negativos. Somente em um caso foi encontrada levedura. Nos cementoplastos, áreas de reabsorção e região periapical havia microrganismos em 62,23%, 23,1% e 30,8%, respectivamente.

(FIGURA 14)

(FIGURA 15)

(FIGURA 16)

▪ **5.3 Resultados Estatísticos da Avaliação Histopatológica**

As frequências apresentadas no Quadro 6 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 quatro grupos experimentais entre si, para posteriormente, quando observada diferença significativa em nível de 5%, fosse realizada a comparação entre os grupos, dois a dois, pelo Teste de comparações múltiplas de Dunn ou de Mann-Whitney, buscando as diferenciações entre eles. Os dados relativos à cada aspecto histológico avaliado: infiltrado inflamatório periapical, espessura do espaço periodontal apical, reabsorção dos tecidos mineralizados cemento e osso alveolar, foram submetidos aos testes estatísticos. Assim, foram compostas as tabelas de número 1 a 14, as quais apresentam a soma de postos e postos médios dos grupos experimentais. Nos seus rodapés encontram-se os dados dos resultados do teste de Kruskal-Wallis. Quando ocorreu diferença significativa entre os grupos, foi realizado o Teste de comparações múltiplas de Dunn ou Mann-Whitney, dos quais se obteve uma tabela complementar, apresentando os dados das comparações entre os postos médios dos diferentes grupos, dois a dois. Uma análise global foi realizada considerando todos os dados dos aspectos estudados.

5.3.1 Do parâmetro intensidade do infiltrado inflamatório.

Tabela 1 – Dados da comparação pelo Teste de Kruskal-Wallis, relacionados ao parâmetro intensidade do infiltrado inflamatório periapical.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	SOMA DE POSTOS	POSTO MÉDIO	n
GI – Aberto com arrombamento apical	218,50	15,607	14
GII- Aberto sem arrombamento apical	274,00	19,571	14
GIII- Selado com arrombamento apical	547,50	39,107	14
GIV- Selado sem arrombamento apical	613,00	40,867	15
Kruskal-Wallis KW = 28,253 (significante)			
GRUPOS EXPERIMENTAIS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES			

Tabela 2 – Comparação, dois a dois, entre postos médios dos grupos experimentais, quanto a intensidade do infiltrado inflamatório, de acordo com o teste de comparações múltiplas de Dunn.

COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS	DIFERENÇA ENTRE POSTOS MÉDIOS	SIGNIFICÂNCIA
		n.s. = 5%
GI X GII	-3,964	ns p>0,05
GI X GIII	-23,500	*** p<0,001
GI X GIV	-25,260	*** p<0,001
GII X GIII	-19,536	** p<0,01
GII X GIV	-21,295	** p<0,01
GIII X GIV	-1,760	ns p>0,05
DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTE ENTRE GRUPOS EXPERIMENTAIS (I E II), (I E III), (II E III), (II E IV)		

Quando analisada a intensidade do infiltrado inflamatório, o menor posto médio foi apresentado pelo grupo I, seguido pelos grupos II, III e IV. O resultado do Teste de Dunn confirma a diferença mostrada pelo teste Kruskal-Wallis. A Tabela 2 mostra diferença entre o grupo I, quando comparado com os grupos II(p<0,001) e III(p<0,001) e entre o grupo II, quando comparado com os grupos III(p<0,01) e IV(p<0,01).

5.3.2 Do parâmetro Espessura do Espaço Periodontal Apical

Tabela 3 – Dados da comparação pelo Teste de Kruskal-Wallis, relacionados ao parâmetro espessura do espaço periodontal apical.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	SOMA DE POSTOS	POSTO MÉDIO	n
GI – Aberto com arrombamento apical	437,00	31,214	14
GII- Aberto sem arrombamento apical	192,00	13,714	14
GIII- Selado com arrombamento apical	536,00	38,286	14
GIV- Selado sem arrombamento apical	488,00	32,533	15
Kruskal-Wallis (Hc) = 18,327 (significante)			
GRUPOS EXPERIMENTAIS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES			

Tabela 4 – Comparação, dois a dois, entre postos médios dos grupos experimentais, quanto a espessura do espaço periodontal apical de acordo com o teste de comparações múltiplas de Dunn.

COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS	DIFERENÇA ENTRE POSTOS MÉDIOS	SIGNIFICÂNCIA
		n.s. = 5%
GI X GII	17,500	* p<0,05
GI X GIII	-7,071	ns p>0,05
GI X GIV	-1,319	ns p>0,05
GII X GIII	-24,571	*** p<0,001
GII X GIV	-18,819	** p<0,01
GIII X GIV	5,752	ns p>0,05
DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTE ENTRE GRUPOS EXPERIMENTAIS (I E II), (II E III), (II E IV)		

Quando analisado o espessamento do espaço periodontal apical, o menor posto médio foi apresentado pelo grupo II, seguido pelos grupos I, IV e III. O resultado do Teste de Dunn confirma a diferença mostrada pelo teste Kruskal-Wallis. A Tabela 4 mostra diferença entre o grupo I, quando comparado com o grupo II ($p<0,05$) e entre o grupo II, quando comparado com os grupos III ($p<0,001$) e IV ($p<0,01$).

5.3.3 Do parâmetro reabsorção óssea

Tabela 5 – Dados da comparação pelo Teste de Kruskal-Wallis, para reabsorção óssea.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	SOMA DE POSTOS	POSTO MÉDIO	n
GI – Aberto com arrombamento apical	431,00	30,786	14
GII- Aberto sem arrombamento apical	231,50	16,536	14
GIII- Selado com arrombamento apical	516,50	36,893	14
GIV- Selado sem arrombamento apical	474,00	31,600	15
Kruskal-Wallis (Hc) = 15,454 (significante)			
GRUPOS EXPERIMENTAIS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES			

Tabela 6 – Comparação, dois a dois, entre postos médios dos grupos experimentais, quanto a reabsorção óssea de acordo com o teste de comparações múltiplas de Dunn.

COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS	DIFERENÇA ENTRE POSTOS MÉDIOS	SIGNIFICÂNCIA
		n.s. = 5%
GI X GII	14,250	ns p>0,05
GI X GIII	-6,107	ns p>0,05
GI X GIV	-0,8143	ns p>0,05
GII X GIII	-20,357	** p<0,01
GII X GIV	-15,064	* p<0,05
GIII X GIV	5,293	ns p>0,05
DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTE ENTRE GRUPOS EXPERIMENTAIS (II E III), (II E IV)		

Quando analisada a reabsorção óssea, o menor posto médio foi apresentado pelo grupo II, seguido pelos grupos I, IV e III. O resultado do Teste de Dunn confirma a diferença mostrada pelo teste Kruskal-Wallis. A Tabela 6 mostra diferença entre o grupo II, quando comparado com os grupos III ($p<0,01$) e IV ($p<0,05$).

5.3.4 Do parâmetro extensão do infiltrado inflamatório periapical

Tabela 7 – Dados da comparação pelo Teste de Kruskal-Wallis, relacionados ao parâmetro extensão do infiltrado inflamatório periapical.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	SOMA DE POSTOS	POSTO MÉDIO	n
GI – Aberto com arrombamento apical	469,00	33,500	14
GII- Aberto sem arrombamento apical	326,50	23,321	14
GIII- Selado com arrombamento apical	469,00	33,500	14
GIV- Selado sem arrombamento apical	388,50	25,900	15
Kruskal-Wallis (Hc) = 10,576 (significante)			
GRUPOS EXPERIMENTAIS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES			

Tabela 8 – Dados do teste de Mann-Whitney, comparando individualmente os grupos I e II

GRUPO	SOMA DOS POSTOS	POSTO MÉDIO	n
GI – Aberto com arrombamento apical	238,0	17,000	14
GII – Aberto sem arrombamento apical	168,0	12,000	14
Z= 2,42272	Probabilidade= 0,015404856	(Teste bicaudal)	

Para o parâmetro extensão do infiltrado inflamatório, o teste de Kruskal-Wallis apontou diferença significativa entre os grupos. Porém, pelo teste de Dunn não foi possível a detecção desta diferença. Quando aplicado o teste de Mann-Whitney entre os grupos que mostraram os postos médios extremos, foi observada diferença significativa entre o grupo I e o grupo II ($p < 0,05$). Considerando-se a semelhança de valores também fica estabelecida a diferença entre os grupos II e III ($p < 0,05$).

5.3.5 Do parâmetro reabsorção das estruturas mineralizadas apicais

Tabela 9 – Dados da comparação pelo Teste de Kruskal-Wallis, para as reabsorções das estruturas mineralizadas apicais (cimento e dentina).

GRUPOS EXPERIMENTAIS	SOMA DE POSTOS	POSTO MÉDIO	n
GI – Aberto com arrombamento apical	535,00	38,214	14
GII- Aberto sem arrombamento apical	354,00	25,286	14
GIII- Selado com arrombamento apical	390,50	27,893	14
GIV- Selado sem arrombamento apical	373,50	24,900	15
Kruskal-Wallis (Hc) = 8,792 (significante)			
GRUPOS EXPERIMENTAIS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES			

Tabela 10 – Dados do teste de Mann-Whitney, comparando individualmente os grupos I e IV

GRUPO	SOMA DOS POSTOS	POSTO MÉDIO	n
GI – Aberto com arrombamento apical	259,5	18,5357	14
GIV – Selado sem arrombamento apical	175,5	11,700	15
Z= 2,48116	Probabilidade= 0,013095666	(Teste bicaudal)	

Para o parâmetro reabsorção dos tecidos mineralizados, o teste de Kruskal-Wallis apontou diferença significativa entre os grupos. Porém, pelo teste de Dunn não foi possível a detecção desta diferença. Quando aplicado o teste de Mann-Whitney entre os grupos que mostraram os postos médios extremos, foi observada diferença significativa entre o grupo I e o grupo IV ($p < 0,05$).

5.3.6 Da análise global dos parâmetros

Tabela11– 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 rebsorções cementária/dentinária e óssea.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	SOMA DE POSTOS	POSTO MÉDIO	n
GI – Aberto com arrombamento apical	9994,5	142,78	70
GII- Aberto sem arrombamento apical	7229,0	103,27	70
GIII- Selado com arrombamento apical	11988	171,25	70
GIV- Selado sem arrombamento apical	11544	153,92	75
Kruskal-Wallis (Hc) = 4021,3 (significante)			
GRUPOS EXPERIMENTAIS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES			

Tabela 12 – Comparação, dois a dois, entre postos médios dos grupos experimentais, considerando-se os aspectos avaliados de maneira global – intensidade e extensão do infiltrado inflamatório periapical, espessura do espaço periodontal apical e rebsorções cementária/dentinária e óssea.

COMPARAÇÃO	DIFERENÇA ENTRE POSTOS MÉDIOS	SIGNIFICÂNCIA
ENTRE GRUPOS		n.s. = 5%
GI X GII	39,507	* p<0,05
GI X GIII	-28,471	n.s. p>0,05
GI X GIV	-11,141	n.s. p>0,05
GII X GIII	-67,979	*** p<0,001
GII X GIV	-50,649	*** p<0,001
GIII X GIV	17,330	n.s. p>0,05
DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTE ENTRE GRUPOS EXPERIMENTAIS (I E II); (II E III) E (II E IV).		

A análise global dos aspectos histológicos estudados, de acordo com as Tabelas 11 e 12, demonstra que o grupo em que o canal radicular foi mantido exposto ao meio bucal e não foi realizado o arrombamento apical (GII), apresentou diferença significativa em relação aos demais grupos experimentais, com menor intensidade quanto aos fenômenos inflamatórios e de reabsorção dos tecidos mineralizados apicais e periapicais. Foi observada diferença ao nível de significância de 5% entre os grupos I e II e ao nível de 1% entre os grupos II e III e entre os grupos II e IV.

5.4 Representação gráfica de alguns eventos da Avaliação Histopatológica

Intensidade do Infiltrado Inflamatório

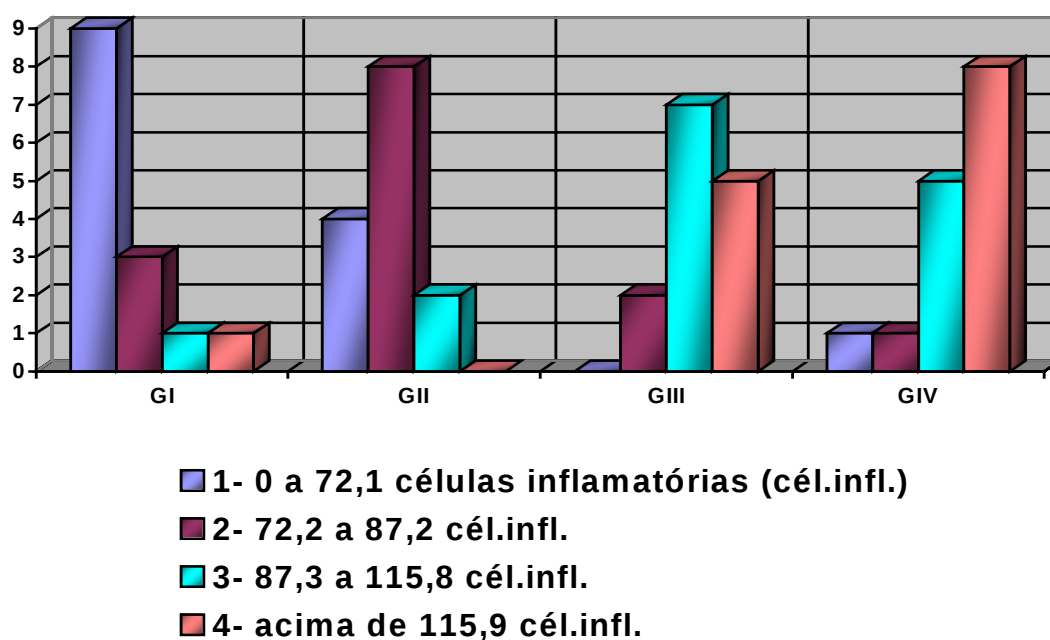


Figura 17 – Representação gráfica da frequência da intensidade do infiltrado inflamatório periapical de acordo com o grupo experimental

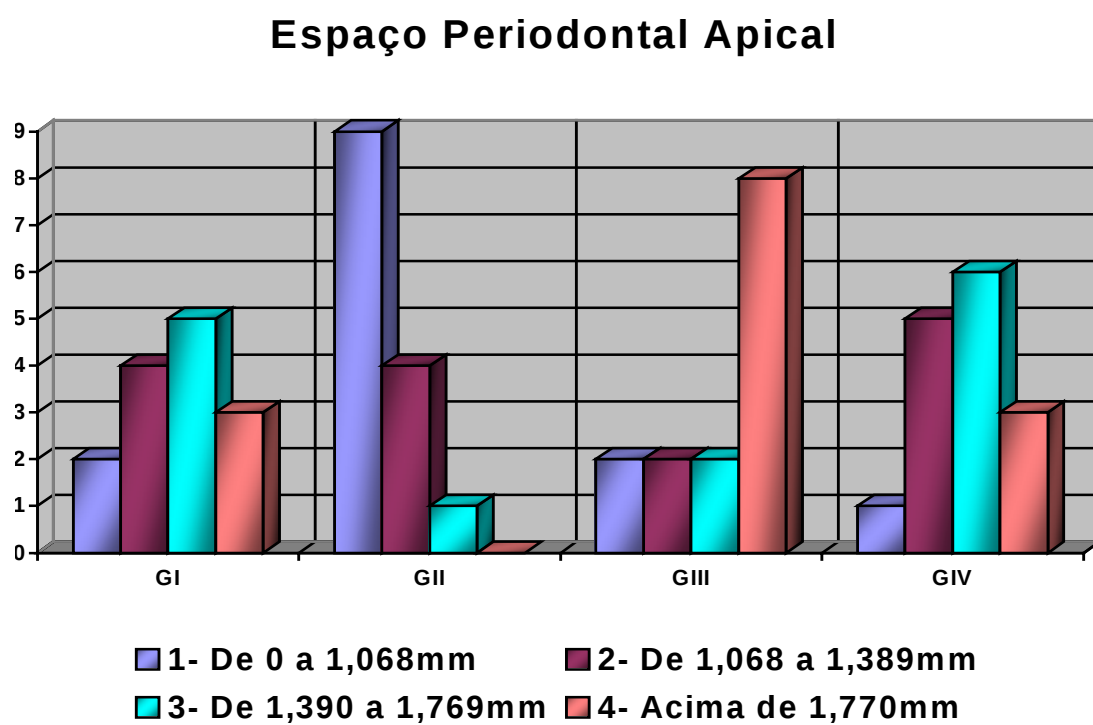


Figura 18 – Representação gráfica da frequência dos escores do espaço periodontal apical de acordo com o grupo experimental

Reabsorção Óssea

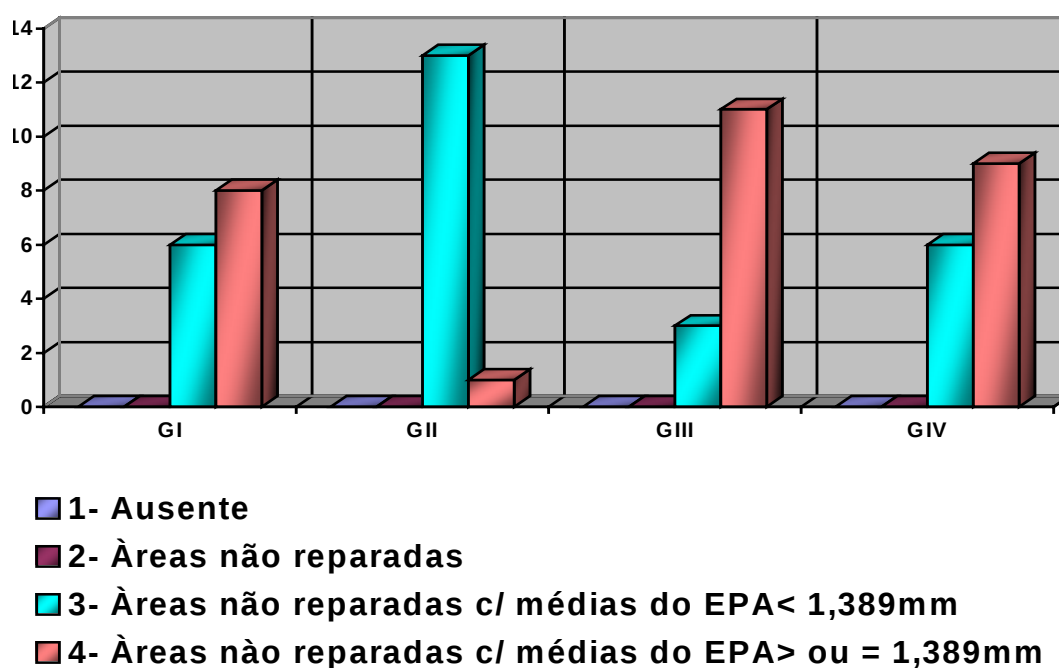


Figura 19 - Representação gráfica da frequência dos escores da reabsorção do osso alveolar de acordo com o grupo experimental

Extensão do Infiltrado Inflamatório

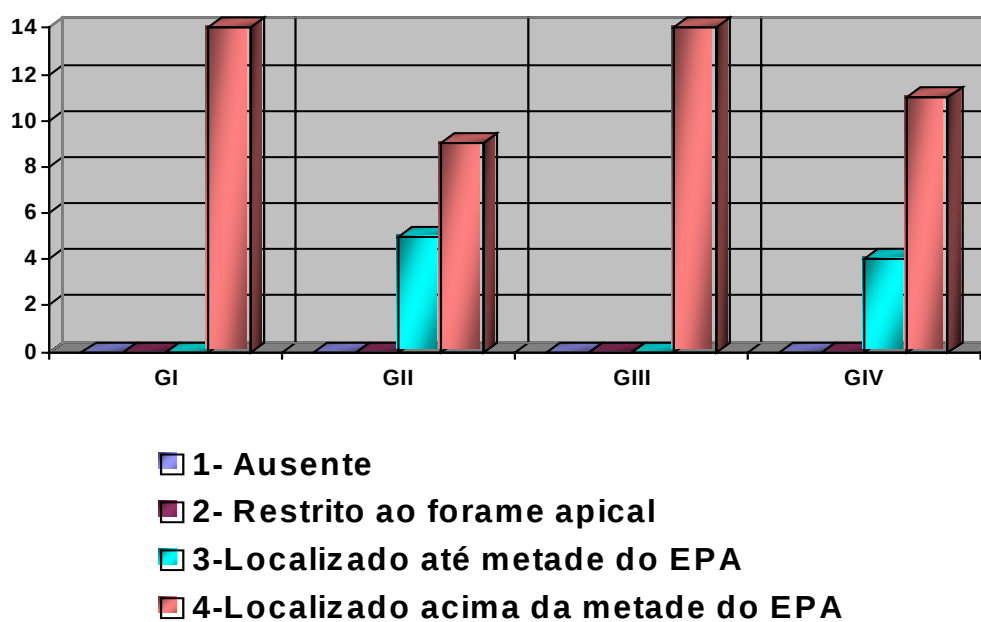


Figura 20 - Representação gráfica da frequência dos escores da extensão do Infiltrado Inflamatório de acordo com o grupo experimental

Reabsorção Cementária

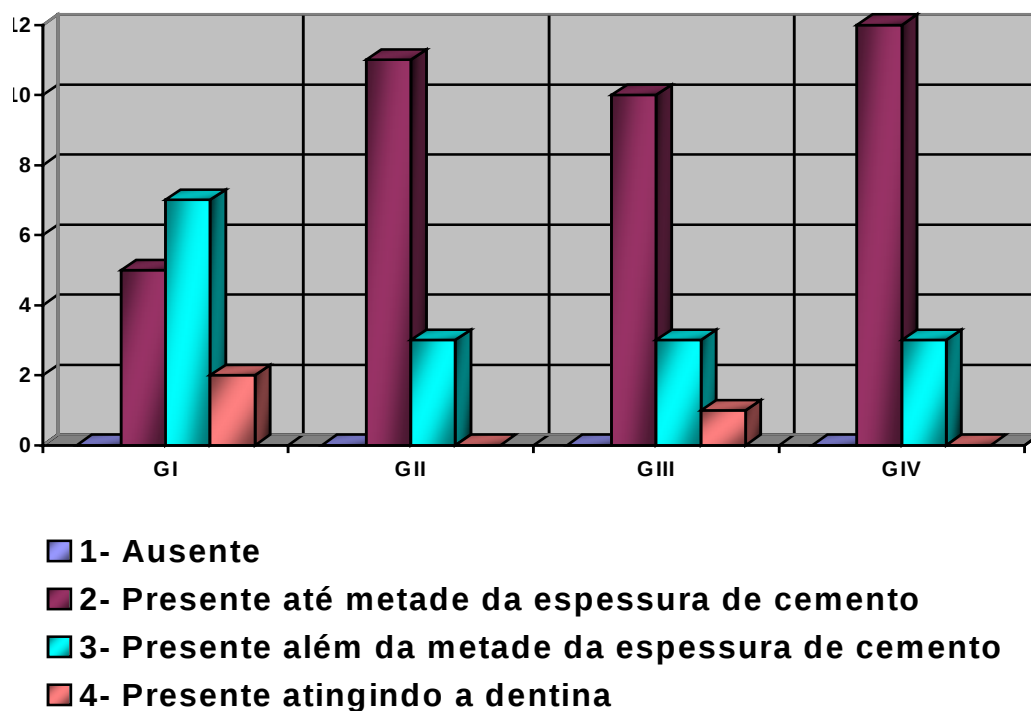


Figura 21 - Representação gráfica da frequência dos escores da reabsorção cementária de acordo com o grupo experimental

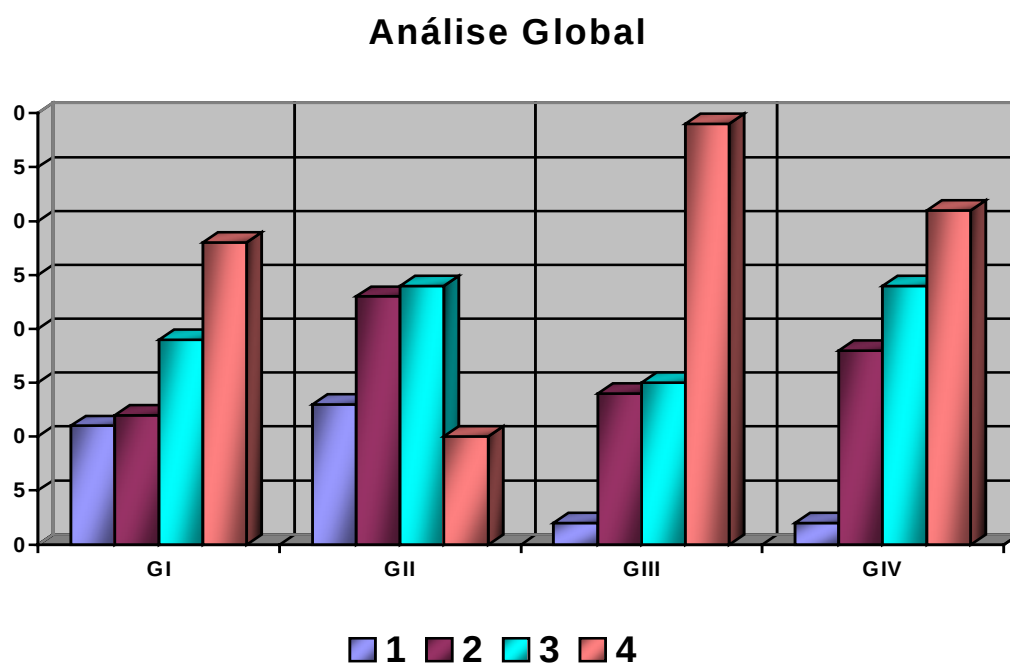


Figura 22 - Representação gráfica da análise global dos eventos histopatológicos de acordo com o grupo experimental

▪ 5.5 Resultados Estatísticos da Avaliação Histomicrobiológica

Na análise estatística dos resultados histomicrobiológicos foi utilizado o Teste Exato de Fisher, o teste mais indicado frente a natureza dos dados obtidos, pelo qual os grupos foram confrontados dois a dois e identificada a existência ou não da diferença significativa quanto presença de microrganismos no sistema de canais radiculares e região periapical. O teste não detectou diferenças significantes entre os grupos, quanto à presença de microrganismos no delta apical, lacunas cementárias, paredes do canal radicular, túbulos dentinários e áreas de reabsorções cementárias. Para a análise da região periapical foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre o Grupo II e o Grupos III ($p < 0,05$).

Tabela 13 – Comparação, dois a dois, pelo teste exato de Fisher, considerando-se a presença de microrganismos na região periapical.

	AUSÊNCIA	PRESENÇA	TOTAL
Grupo II	11	2	13
Grupo III	4	9	13
TOTAL	15	11	26
FISHER (BI) P = 0,017 (SIGNIFICANTE)			

▪ 5.6 Representação gráfica de alguns eventos da Avaliação Histomicrobiológica

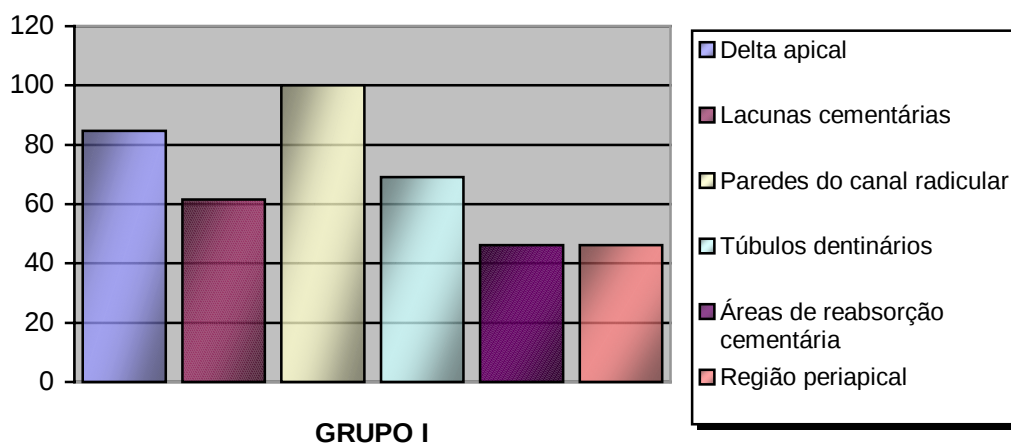


Figura 23 - Representação gráfica da distribuição de microrganismos nos diferentes sítios do Grupo I

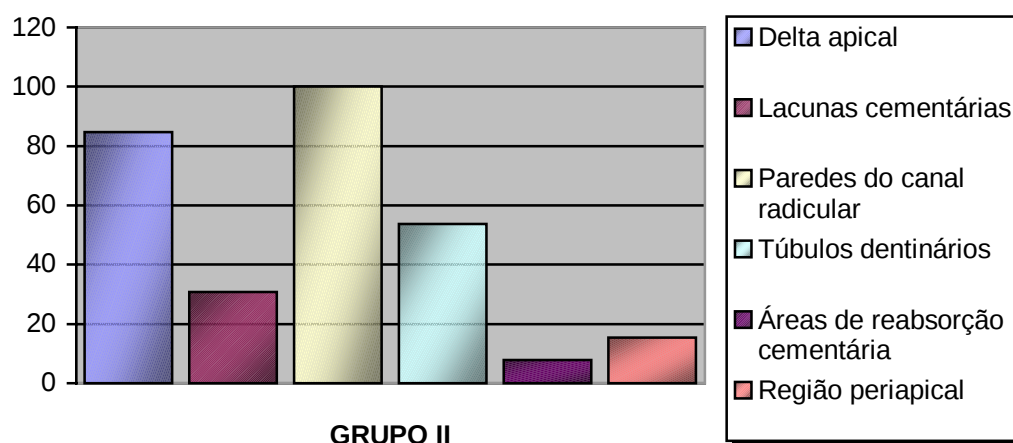


Figura 24 - Representação gráfica da distribuição de microrganismos nos diferentes sítios do Grupo II

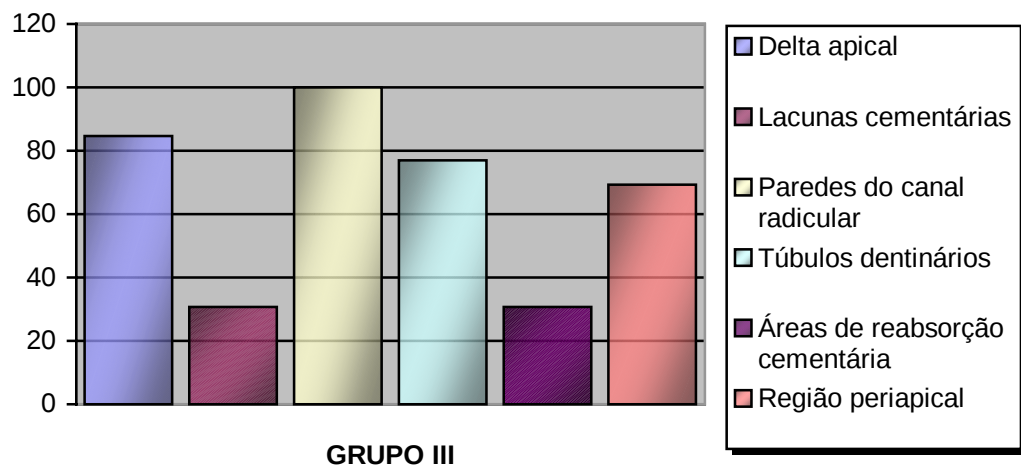


Figura 25 - Representação gráfica da distribuição de microrganismos nos diferentes sítios do Grupo III

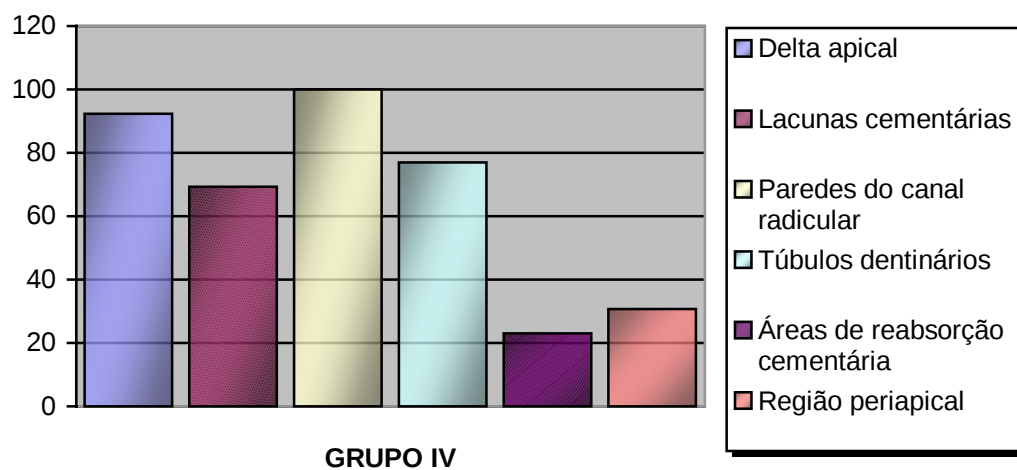


Figura 26 - Representação gráfica da distribuição de microrganismos nos diferentes sítios do Grupo IV

Discussão

▪ 6.1 Da Metodologia

6.1.1 Escolha do Animal Experimental

O efeito biológico dos materiais e técnicas utilizados no tratamento de canais radiculares ocorre, fundamentalmente, pela resposta dos tecidos apicais e periapicais. O método de avaliação desta resposta é representado clinicamente pela análise dos sinais e sintomas, além da avaliação do aspecto radiográfico. No entanto, a reparação dos tecidos apicais e da região periapical, somente pode ser avaliada com precisão após realização de cirurgia periapical, seguida de exame histopatológico (PATERSON; WATTS⁷⁹, 1990). No entanto, esta avaliação exigiria a remoção da porção apical radicular e região periapical adjacente, não sendo condizente com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos. Assim, torna-se essencial a utilização de um modelo animal que possibilite o exame microscópico das respostas celulares apicais e periapicais aos materiais e técnicas utilizados durante o tratamento endodôntico. (BROWNE¹⁴, 1994).

Rowe⁸⁶, em 1980, salientando que a seleção de um modelo experimental não é simples, discute os seus aspectos desejáveis. Dentre eles, considera que o padrão mastigatório do animal deve ser fisiologicamente semelhante ao humano, assim como sua resistência à

infecção, o tamanho e a morfologia dental, devem ser compatíveis aos da espécie humana, e seu padrão de crescimento deve ser também semelhante, porém, rápido o suficiente para que os resultados sejam obtidos em menor período de tempo.

Com este objetivo, vários animais de experimentação já foram testados. Dentre os fatores importantes para a sua seleção, são considerados a facilidade de obtenção e manutenção do animal, bem como a morfologia, tamanho e número de dentes por animal. Também a resposta tecidual deve ser semelhante à do homem, assim como a possibilidade de utilização de anestesia por período prolongado (ROWE⁸⁶, 1965; TORNECK; SMITH¹¹⁸, 1970; CALLIS¹⁶, 1987; SILVA⁹⁷, 1995).

Dentre os animais utilizados para a indução experimental de lesões periapicais, Dwyer e Torabinejad²² (1981) e Stabholtz e Sela¹⁰⁶ (1983), indicaram o gato, os quais apesar de serem de fácil obtenção, são difíceis de serem mantidos confinados, como também apresentam restrições anatômicas, como o número reduzido de dentes por animal. O padrão de reparo apical e periapical é diferente do humano, como também não resistem a longos períodos de anestesia (ROWE⁸⁶, 1980).

Tani-Ishii et al.¹¹⁴ e Yamasaki et al.¹³², no ano de 1994, utilizaram dentes de rato para indução de lesões periapicais e estudo da sua microbiota e Fouad et al.^{25,26} (1992, 1993), utilizaram dentes caninos de furão, para reproduzir as lesões periapicais.

O macaco já foi muito utilizado como modelo

experimental, não se mostrando satisfatório, em função da dificuldade da manutenção destes animais sob anestesia por períodos prolongados. Os dentes de macacos, dependendo da raça, são de tamanho reduzido, com canais radiculares estreitos e curvos, difíceis de serem manipulados, sendo, ainda, a obtenção, domesticação e criação desses animais, de alto custo, o que leva a diminuição de seu emprego. Sabe-se ainda, que a resistência orgânica do macaco é superior a do humano (TORNECK et al.¹¹⁹, 1973; HOLLAND et al.⁴⁰, 1980).

O cão tem se mostrado um modelo experimental de uso freqüente, em função de sua fácil obtenção, manutenção e baixo custo, já tendo sido recomendado desde 1938 por Dixon e Rikert ²¹ Alguns autores têm verificado semelhanças no processo de reparação entre o cão e o homem (ORBAN⁷⁵, 1932; KUKIDOME⁵¹, 1957; STROMBERG¹⁰⁹, 1969). Em função destes fatores, este animal tem sido amplamente utilizado como modelo experimental de escolha para indução de lesão periapical.

Os cães são animais fáceis de serem anestesiados e, com resistência a prolongados períodos de anestesia, ideais para o tratamento endodôntico, onde o tempo exigido para o ato operatório, com o animal sob anestesia pode ser prolongado. Além disso, o cão apresenta dentes com estruturas mineralizadas, dentina e cimento, semelhantes às do homem, assim como o processo de reparação apical e periapical (CITROME¹⁸, 1979). Rowe⁸⁶ (1980) relata que o cão preenche o requisito de possuir uma taxa de crescimento rápido, o suficiente para permitir a

obtenção de resultados em menores períodos de tempo.

O cão, como modelo animal de experimentação tem sido empregado em muitos estudos para avaliação do tratamento endodôntico de dentes com lesão periapical induzida, como os realizados por Silva^{95,96}(1988, 1991); Bonetti Filho¹¹ (2000); Soares^{103,104} (1999, 2003); Mattos⁶⁶ (2001); Hernández³³ (2002); César¹⁷ (2003); Felipe²⁴ (2003); Yamashita¹³⁴ (2004); Holland et al.^{41,40,37,38,43,42} (1978, 1980, 1989, 1992, 1999, 2003); Leonardo et al.^{58,54,55,62,60,57} (1993, 1994, 1995, 1998, 2002, 2003);); Katebzadeh et al.^{48,49} (1999, 2000); Tanomaru Filho et al.^{116,115} (1998, 2001); Shabanhag et al.⁹³ (1999); Silva et al.⁹⁸ (2002).

Os cães devem apresentar para utilização em experimentos endodônticos, idade entre 1 a 1,5 anos, uma vez que o volume da cavidade pulpar tem grande influência sobre o tempo necessário para desenvolvimento das reações periapicais crônicas, as quais formam-se em menor período de tempo quando os dentes apresentam cavidade pulpar com maiores dimensões. Os segundos, terceiros e quartos pré-molares inferiores e os segundos e terceiros pré-molares superiores, são os dentes geralmente selecionados por apresentarem semelhança anatômica, igual número de raízes e canais radiculares amplos e retos, permitindo uma padronização dos procedimentos técnicos durante o tratamento endodôntico e processamento histológico (SILVA⁹⁷, 1995; LEONARDO et al.⁶¹, 1996; SOARES¹⁰³, 1999).

6.1.2 Métodos de Indução experimental das lesões periapicais

O tratamento de canais radiculares de dentes de cães com reação periapical crônica induzida tem sido avaliado em vários trabalhos de pesquisa (ALLARD et al.³, 1987; HOLLAND et al.^{41,40,37,38,43,42}, 1978, 1980, 1989, 1992, 1999, 2003; LEONARDO et al.^{58,54,55,62,60,57}, 1993; 1994; 1995; 1998; 2002, 2003; KATEBZADEH et al.^{48,49}, 1999, 2000). Nesses casos, a metodologia utilizada para indução experimental das lesões periapicais em dentes de cães, apresentou diferenciação quanto aos período utilizados para contaminação dos canais radiculares, selamento ou não da abertura coronária e contaminação do canal radicular pelas bactérias do meio oral, por meio da inoculação de microrganismos ou da colocação de placa bacteriana no interior dos mesmos. (ALLARD et al.³, 1987; DIXON; RICKERT²¹, 1938 FUJII; MACHIDA²⁷, 1991; HOLLAND et al.^{41,39,37,36,38,43,42}, 1978, 1985, 1989, 1990, 1992, 1999, 2003 ; JANSSON et al.⁴⁶, 1993; LEONARDO et al.^{58,59,54,55,62,60,57}, 1993(a)(b), 1994, 1995, 1998, 2002, 2003)

Com o objetivo de induzir lesões periapicais, tem sido difundida a metodologia preconizada por Leonardo et al.⁵⁴ (1994), na qual após abertura coronária e remoção do tecido pulpar, os canais radiculares são mantidos expostos ao meio bucal pelo período de 7 dias, com finalidade de contaminação dos mesmos. Posteriormente, é realizado o selamento coronário, até a observação radiográfica de áreas

radiolúcidas periapicais, o que ocorre em aproximadamente 45 a 60 dias.

Essa metodologia tem sido empregada por autores como Leonardo et al.^{54,55,62,60,57}, (1994; 1995; 1998; 2002, 2003); Silveira et al.⁹⁹ (2001); Tanomaru Filho et al.^{116,115} (1998; 2002); Berbert et al.⁶ (2002); Soares^{103,104} (1999, 2003); Bonetti Filho^{10,11} (1990,2000), dentre outros.

Walton e Ardjmand¹²⁵ (1992), Fouad et al.^{25,26} (1992, 1993) e Tanomaru Filho et al.^{116,115} (1998; 2002) concordam que o selamento da abertura coronária, após a contaminação dos canais radiculares reduz o tempo necessário para o desenvolvimento das lesões periapicais, confirmadas pelo exame radiográfico, sendo aproximadamente 45 a 60 dias após selamento coronário o período necessário, conforme descrito por Leonardo et al.⁵⁴ (1994).

Katebzadeh et al.⁴⁸ (1999) preconizam, para indução das lesões periapicais em dentes de cães, a realização da abertura coronária, instrumentação dos canais radiculares até a lima tipo K 45 e contaminação dos mesmos com placa dental, seguido do selamento coronário por 45 dias.

Shabanhag et al.⁹³ (1999) preconizaram essa metodologia como sendo a de escolha para indução de lesões periapicais em dentes de cães com rizogênese incompleta, conforme descrito por Leonardo et al.⁵⁸ (1993a), destacando que o selamento dos dentes, após serem mantidos expostos ao meio bucal, favorece o aparecimento das

lesões periapicais em menor período de tempo.

Por outro lado, Holland et al.^{36,38,43,42} (1990, 1992, 1999, 2003) e Panzarini et al.⁷⁸ (1998), utilizaram método no qual os canais radiculares são mantidos expostos ao meio bucal durante todo o período de indução das lesões periapicais, as quais são visíveis radiograficamente após o período de 180 dias, justificando que estas lesões teriam características mais próximas de uma lesão inflamatória crônica e maior propagação bacteriana (NERY⁷³, 2001).

Jansson et al.⁴⁶ (1993), utilizando os dois métodos de indução de lesão periapical, com ou sem selamento coronário, nos períodos que variaram de 1 a 10 meses, observaram histológica e radiograficamente que, quando o selamento coronário era realizado, o desenvolvimento da lesão periapical ocorria em período menor do que quando as mesmas permaneciam abertas, salientando que, o ambiente fechado, favoreceria o desenvolvimento seletivo de espécies bacterianas anaeróbias gram-negativas as quais, de acordo com Bystrom e Sundqvist¹⁵ (1981), são as principais responsáveis pelo desenvolvimento das lesões periapicais.

Baseando-se na divergência dos trabalhos existentes quanto ao emprego do selamento coronário, nosso estudo teve como objetivo, avaliar em dentes de cães, a intensidade da reação inflamatória periapical, espessura do espaço periodontal apical, reabsorções cementárias apicais e reabsorção óssea, além da propagação bacteriana,

nas duas condições já citadas, pois, de acordo Poliseli Neto⁸¹(2002), a microbiota endodôntica e a dimensão da lesão periapical radiográfica não apresentaram diferenças quanto ao selamento coronário.

6.1.3 Arrombamento apical

Os canais radiculares dos pré-molares de cães, comumente empregados nas pesquisas, são amplos e retos, e apresentam um delta apical com várias ramificações, diferindo do ápice radicular do dente humano, o qual possui normalmente um forame principal e algumas foraminas. Com a finalidade de obtenção de condição experimental mais próxima a do dente humano, e para permitir padronização da abertura apical e do diâmetro de contato dos materiais empregados no tratamento endodôntico com a região periapical, tem sido realizado arrombamento do ápice radicular dos dentes dos cães com lima tipo K até a de número 30.

O arrombamento do forame apical radicular imediatamente após a abertura coronária, ou seja, anteriormente ao período de indução das reações periapicais crônicas, tem sido empregado em vários estudos, como os realizados por Soares^{103,104}(1999; 2003), Bonetti Filho^{10,11} (1990, 2000) e Tanomaru et al.¹¹⁵ (2002).

Por outro lado, Tanomaru Filho et al.¹¹⁶ (1998), Rasquin⁸² (1997), Silveira et al.⁹⁹ (2001), Grecca et al.³¹ (2001), Mattos⁶⁶ (2001) e Leonardo et al.^{54,55,62,60,57} (1994, 1995, 1998, 2002, 2003),

realizaram o arrombamento apical após a indução das lesões periapicais, ou seja, na mesma sessão dos procedimentos técnicos endodônticos.

Possivelmente, o arrombamento anterior ao processo de indução da lesão permitiria maior acesso dos microrganismos, seus produtos e sub-produtos aos tecidos periapicais, proporcionando o desenvolvimento de lesões periapicais de maior volume em menor período de tempo. No entanto, o arrombamento realizado antes do período de indução parece ser mais agressivo, pois, a comunicação direta com os tecidos apicais e periapicais, permitiria uma ação mais rápida da microbiota endodôntica e intensa agressão aos tecidos da região periapical, podendo levar o cão ao sofrimento.

O diâmetro do arrombamento apical também é variável de acordo com os diferentes estudos, sendo realizado com lima tipo K de número 30, conforme Bonetti Filho^{10,11} (1990,2000); Silva⁹⁷ (1995); Soares^{103,104}(1999, 2003); Leonardo et al.^{54,55,62,60,57} (1994, 1995, 1998, 2002, 2003); Tanomaru Filho et al.^{116,115} (1998, 2002). Holland et al.^{36,42} (1990, 2003), empregaram lima tipo K número 20. Outros autores, como Soares et al.¹⁰² (1990) e Panzarini et al.⁷⁸ (1998), optaram pelo diâmetro de arrombamento equivalente à lima tipo K de número 25, sendo que Holland e Souza³⁹ (1985), utilizaram a lima K número 40. A padronização do diâmetro de arrombamento da abertura apical é importante para manutenção de diâmetro semelhante da área de contato dos materiais empregados durante o tratamento endodôntico com a região periapical e,

consequentemente eliminando esta variável durante a avaliação histopatológica da reparação da região apical e periapical.

Resultados diferenciados de reparo histológico dependem dos fatores envolvidos no método de indução das lesões, uma vez que o grau de reparação observado dependerá da severidade de agressão dos tecidos previamente aos procedimentos realizados em determinado estudo.

Otoboni Filho⁷⁷, em 2000, justifica o arrombamento até o instrumento tipo K nº 20, após a formação da lesão periapical, pois esse diâmetro estaria próximo à realidade dos dentes humanos com rizogênese completa.

No presente estudo, quando realizado o arrombamento apical, o diâmetro de escolha foi baseado em outros da literatura, ou seja, pesquisas onde foi utilizada a lima K número 30 (BONETTI FILHO^{10,11}, 1990,2000; SILVA⁹⁷, 1995; SOARES^{103,104}, 1999, 2003; LEONARDO et al.^{54,55,62,60,57}, 1994, 1995, 1998, 2002, 2003; TANOMARU FILHO et al.^{116,115}, 1998, 2002).

6.1.4 Processo de Fixação e Desmineralização das Raízes Dentárias

A coloração de Brown e Brenn possibilita o exame de cortes de tecidos desmineralizados, incluídos em parafina, determinando a presença de microrganismos. No entanto, a técnica original de Brown e

Brenn¹² (1931) não representa um método preciso de quantificação de dos microrganismos, pois a perda de sua estrutura provocada pelos ácidos empregados na desinfecção, fixação e desmineralização, conduzem à significativa redução das bactérias nas secções histomicrobiológicas (Watts e Paterson¹²⁷, 1990). Assim, Wijnbergen e Van Mullem¹²⁹ (1987), observaram que a desmineralização com ácido fórmico pode reduzir a coloração das bactérias gram-positivas na relação de 15/1, enquanto para o EDTA esse efeito se faz menos acentuado, sendo da ordem de 3/1.

Com o objetivo de minimizar o efeito prejudicial do ácido fórmico na integridade da parede das células bacterianas (WATTS; PATERSON¹²⁷, 1990; WIJNBERGEN; MULLEN¹²⁹, 1987), este estudo foi realizado utilizando processo de fixação e desmineralização diferenciado. Deste modo, o glutaraldeído em solução de sacarose foi utilizado como agente fixador dos tecidos, à semelhança dos procedimentos de fixação para análise em microscópio eletrônico de varredura, conforme descrito por Nair⁷⁰ (1987), Nair et al.⁷¹ (1990), Tronstad et al.¹²¹ (1990), Sen et al.⁹⁰ (1995) e Waltino et al.^{124,123} (1997, 1999).

Segundo Nair et al.⁷¹ (1990), o processo de desmineralização pode ser realizado com solução de EDTA e 4% de glutaraldeído suplementado com sacarose no período de 6 a 12 semanas. Dentre os métodos utilizados para desmineralização, atualmente, o emprego de quelantes tem sido recomendado, devido a conservação das

estruturas histológicas, favorecendo a observação dos microrganismos por colorações específicas como a de Brown e Brenn.

Para aceleração do processo de desmineralização tem sido proposta a ativação da solução em forno de microondas. Utilizando este princípio, Rode et al.⁸⁵, em 1996, utilizando uma solução à base de EDTA com pH 7,3, obtiveram a desmineralização das peças num período 83% menor, em relação a temperatura ambiente, sem prejuízo da preservação morfológica dos tecidos.

No presente estudo, empregou-se solução tamponada à base de glutaraldeído e EDTA, sendo observada a desmineralização em aproximadamente 20 dias, com utilização de forno de microondas. Essa maior velocidade de desmineralização tem sido atribuída ao efeito das ondas, da temperatura do forno, ou ambos (VONGSAVAN et al.¹²², 1990).

O estudo histomicrobiológico permitiu observar, nas secções analisadas, formações de biofilmes em vários sítios do sistema de canais radiculares e região cementária apical, com grande quantidade de microrganismos gram-negativos. Esses resultados comprovam que a metodologia de desmineralização permitiu a preservação dos microrganismos nas estruturas, uma vez que, em outros estudos (SOARES¹⁰³, 1999; SILVEIRA et al.⁹⁹, 2001), foram observadas pequenas porcentagens de microrganismos gram-negativos no sistema de canais radiculares.

▪ 6.2 Dos Resultados

6.2.1 Avaliação Histopatológica

Poucos estudos são relatados na literatura quanto aos métodos de indução experimental de lesões periapicais em dentes de animais^{25,26,28,46,47,65,80,81,118,119,125,126,132}. A maioria deles utilizaram dentes de macacos como modelo, sendo também realizados estudos de indução de lesão periapical em dentes de cães, gatos, ratos e furão.

Quanto à lesão periapical induzida, nossos resultados foram semelhantes aos já relatados na literatura, uma vez que todas as técnicas experimentais avaliadas conduziram ao desenvolvimento de lesão periapical, a qual apresentava intenso infiltrado de células inflamatórias, com predomínio de células mononucleadas, caracterizando uma reação inflamatória crônica. As células inflamatórias, especialmente linfócitos, plasmócitos e macrófagos, apresentavam distribuição por todo espaço periodontal apical. Polimorfonucleares neutrófilos eram observados principalmente na região adjacente ao forame apical, porém em menor quantidade.

Os resultados da avaliação global envolvendo todos os parâmetros histopatológicos analisados, demonstraram que a lesão periapical induzida apresentou menor intensidade quanto ao fenômenos inflamatórios e reabsorção dos tecidos mineralizados apicais e periapicais no grupo em que os canais radiculares foram mantidos

expostos e sem arrombamento apical (Grupos II) quando comparados aos demais grupos experimentais ($p < 0,05$).

Possivelmente, neste grupo experimental, foi necessário maior período de tempo para a mudança que ocorre na microbiota endodôntica. As modificações de microbiota são determinadas pela redução da tensão de oxigênio, além das interações entre microrganismos e disponibilidade de substrato, promovendo a seleção de microrganismos, com predomínio de anaeróbios estritos, os quais apresentam fatores de virulência importantes, como as enzimas proteolíticas, subprodutos do metabolismo microbiano e endotoxina, presente nas bactérias gram-negativas. Estes fatores estão diretamente relacionados ao desenvolvimento da lesão periapical (JANSSON et al.⁴⁶, 1993; RIETCHEL; BRADE⁸⁴, 1992; STASHENKO¹⁰⁷, 1990; YAMASAKI et al.¹³³, 1992; TANOMARU et al.¹¹⁷, 2003). Tem sido demonstrado em dentes de cães que na presença da endotoxina de bactérias gram-negativas nos canais radiculares, reações periapicais crônicas visíveis radiograficamente podem ocorrer em 30-60 dias (SILVA et al.⁹⁸, 2002; TANOMARU et al.¹¹⁷, 2003).

Os resultados obtidos sugerem que nos dentes cujos canais radiculares foram selados, o *shift* microbiano ocorreu com maior velocidade, possibilitando a colonização mais rápida da região apical radicular pelas bactérias anaeróbias. Como consequência, ocorreu a indução da reação inflamatória periapical e da reabsorção dos tecidos

mineralizados da região apical e do periápice radicular, bem como as reações de defesa do sistema imunológico na região periapical (FABRICIUS et al.²³, 1982; STASHENKO¹⁰⁷, 1990; STASHENKO et al.¹⁰⁸, 1992). Nestes casos, quando os canais radiculares foram selados (Grupos III e IV), o fator arrombamento apical não foi significativo, uma vez que as lesões periapicais induzidas foram semelhantes ($p>0,05$).

Nos grupos em que o selamento coronário não foi realizado, o fator arrombamento apical demonstrou importância no desenvolvimento das lesões, uma vez que quando este foi realizado a lesão periapical induzida demonstrou intensidade dos fenômenos inflamatórios e de reabsorção dos tecidos mineralizados apicais e periapicais semelhante aos grupos experimentais que utilizaram o selamento coronário (Grupos III e IV, com $p>0,05$). Possivelmente nesta situação, houve maior acesso para os microrganismos, seus produtos e subprodutos, sendo provável que o arrombamento apical propiciou condições mais rápidas de desenvolvimento da reação inflamatória crônica periapical.

Os resultados obtidos sugerem que para o grupo II, sem selamento coronário e sem arrombamento apical, empregando-se um maior período de tempo para indução, as condições da reação inflamatória periapical e reabsorção dos tecidos mineralizados do ápice radicular seriam semelhantes aos demais grupos, sendo que para este

quadro deve ter sido acelerado para o Grupo I, em função do arrombamento apical.

Dentre os fenômenos histopatológicos avaliados, os parâmetros que possibilitaram o emprego de métodos quantitativos de avaliação (contagem de células inflamatórias e medida da espessura do espaço periodontal apical) para determinação dos intervalos relativos aos escores utilizados, proporcionaram maior diferenciação entre os espécimes, permitindo também diferenciação entre os grupos, evidenciando ocorrer maior intensidade de células inflamatórias e aumento do espaço periodontal apical nos grupos experimentais submetidos ao selamento coronário após exposição dos canais radiculares (Grupos III e IV, com $p < 0,05$).

Nos demais aspectos avaliados, extensão da reação inflamatória periapical, reabsorção dos tecidos mineralizados apicais (cimento e dentina) e reabsorção óssea, a distribuição dos escores ocorreu com maior intensidade nas avaliações mais severas, sendo menos destacada a diferenciação entre grupos. Para avaliação do parâmetro reabsorção óssea foi utilizada uma adaptação das medidas obtidas para medida da espessura do espaço periodontal apical, considerando-se que a reabsorção óssea é proporcional a esta medida.

Para os grupos experimentais em que o selamento coronário foi realizado após contaminação dos canais radiculares (Grupos III e IV), o fator arrombamento apical não foi significativo, uma vez que o

desenvolvimento de lesões periapicais, as quais apresentaram grande intensidade dos fenômenos inflamatórios e de reabsorção dos tecidos mineralizados apicais e periapicais mostrou-se semelhante para os dois grupos ($p>0,05$).

Nossos resultados demonstram que as lesões periapicais foram induzidas por todos os métodos avaliados, destacando o menor período de tempo necessário para o método que emprega o selamento coronário do canal radicular após período de contaminação em relação à técnica na qual o canal radicular é mantido exposto ao meio bucal durante todo período experimental. Este fato concorda com estudo de Jansson et al.⁴⁶ (1993), que avaliaram diferentes métodos de indução de lesões periapicais em dentes de macacos, mantendo a cavidade pulpar exposta ao meio bucal por 10 a 14 dias e realizando o selamento coronário após este período ou deixando os canais radiculares expostos pelos períodos experimentais de 1, 2, 4, 7 e 10 meses. Os autores demonstraram que nos dentes cujos canais radiculares foram selados, o período para o desenvolvimento das lesões periapicais foi significativamente menor.

Jansson et al.⁴⁶ (1993), assim como ocorreu no presente estudo, observaram reabsorção do tecido ósseo alveolar periapical e do cemento apical radicular aos 2 meses após o selamento coronário, sendo o infiltrado inflamatório presente predominantemente composto por células mononucleadas. Para os dentes cujos canais radiculares foram

mantidos sem selamento coronário, a reação inflamatória periapical somente foi determinada aos sete meses. O nosso estudo diferiu do realizado por Jansson et al.⁴⁶, que utilizaram como modelo experimental o macaco, o qual possui maior resistência imunológica que o cão, podendo explicar o maior período de tempo necessário para obtenção de lesões periapicais. Este fato pode estar relacionado aos grupos em que os canais radiculares foram mantidos expostos, pois nos grupos em que os canais radiculares receberam selamento coronário as lesões periapicais desenvolveram-se tanto nos macacos quanto em cães, no período de 2 meses.

Outro estudo sobre a indução experimental de lesões periapicais foi realizado em dentes de furões por Foad et al.²⁵ (1992). Os dentes foram mantidos expostos ao meio oral por 1 semana e selados posteriormente, sendo analisados aos 3 meses. Os resultados obtidos quanto a presença de reabsorção óssea periapical, cementária apical e reação inflamatória crônica, com predominância de mononucleares (macrófagos), foram semelhantes aos nossos resultados.

Considerando o processo que conduz à reabsorção óssea, Stashenko⁸⁵ (1990), correlacionou a participação dos componentes bacterianos, como a endotoxina, constituintes da parede celular das bactérias gram-negativas, atuando como substâncias antigênicas, indutoras da resposta imune específica, com ativação e proliferação de linfócitos T e B. Estes antígenos bacterianos também desencadeiam

respostas imunes inespecíficas, com participação dos neutrófilos e macrófagos. Esse mecanismo, mantido ativo por determinado período de tempo, resultará na formação da lesão periapical, visível radiograficamente.

6.2.2 Avaliação Histomicrobiológica

A relação direta entre os microrganismos e a etiologia das doenças pulpares e desenvolvimento das lesões periapicais foi demonstrada por Kakehashi et al.⁴⁷ (1965), em estudo clássico da literatura endodôntica. Posteriormente, pesquisando dentes de humanos que apresentavam história de trauma, sem resposta aos testes de sensibilidade pulpar e com coroas clinicamente íntegras, Sundqvist¹¹² (1976, apud Morse, 1981), observou presença de microrganismos, predominantemente anaeróbios obrigatórios, somente nos dentes que apresentavam áreas radiolúcidas periapicais. Avaliando o desenvolvimento da lesão periapical em dentes de macacos, Möller et al.⁶⁷ em 1981, observaram o desenvolvimento de lesões periapicais somente em dentes com canais radiculares infectados.

Os microrganismos que adentram a cavidade pulpar não ficam restritos simplesmente à luz do canal radicular principal. Os canais laterais, secundários e acessórios, os cementoplastos apicais e túbulos dentinários, são progressivamente invadidos por

bactérias^(1,7,8,11,12,32,54,94,103) e algumas espécies de fungos^(63,90,91,92). Há evidências que os cocos sejam os primeiros a colonizar os túbulos dentinários, seguido pelos bacilos (NAGAOKA et al.⁶⁹, 1995). Segundo Ando e Hoshino⁴ (1990), em função da baixa tensão de oxigênio nos túbulos dentinários, 80% das amostras de dentina infectada, apresentavam microrganismos anaeróbios estritos, tipo bacilos ou cocos gram-positivos.

Quanto à presença de microrganismos os resultados obtidos no estudo histomicrobiológico mostraram por meio da coloração de Brown e Brenn, grande quantidade de microrganismos distribuídos em todo o sistema de canais radiculares nos quatro grupos experimentais, sendo os mesmos diretamente relacionados ao desenvolvimento das lesões periapicais. Assim, a presença bacteriana foi demonstrada em todos os grupos experimentais, nas paredes do canal radicular, lacunas cementárias, ramificações do delta apical, túbulos dentinários, áreas de reabsorção cementária, túbulos dentinários e região periapical.

Quanto aos tipos de microrganismos presentes no sistema de canais radiculares, os cocos, bacilos e filamentosos gram-positivos e negativos foram os mais freqüentes, concordando com outros estudos em cães (LEONARDO et al.⁵⁴, 1994; PANZARINE et al.⁷⁸, 1998); e em humanos (BOHORQUEZ- AVILA⁸, 1995; RIBEIRO; CONSOLARO⁸³, 2000). Estes achados sugerem alguma similaridade entre a microbiota endodôntica de cães e de humanos, o que torna esse modelo

experimental adequado aos estudo dos procedimentos de desinfecção do sistema de canais radiculares e sua correlação com os procedimentos realizados em pacientes.

Concordando com os resultados microbiológicos, tem sido relatada a importância da presença bacteriana na região cementária do ápice radicular de dentes com lesão periapical, com formação do biofilme apical, como demonstrado em dentes de humanos, por meio da microscopia eletrônica de varredura (TRONSTAD et al.¹²¹ 1990, LEONARDO et al.⁶⁰, 2002). Também em dentes de humanos, empregando a técnica de coloração de Brown e Brenn, empregada neste estudo, Ribeiro e Consolaro⁸³ (2001), demonstraram intensa propagação dos microrganismos para todo o sistema de canais radiculares e formação do biofilme apical, definido o mesmo como sendo uma matriz gelatinosa depositada sobre a superfície apical radicular, constituída principalmente de polissacarídeos e proteínas, na qual os microrganismos, seus produtos e sub-produtos ficam aderidos ou retidos. A matriz polissacarídea funciona como uma armadura, onde os microrganismos convivem em comunidade, aderindo-se à superfície cementária apical, proporcionando proteção à esta comunidade microbiana, com condições adversas para atuação dos mecanismos de defesa do hospedeiro (GILBERT et al.²⁹, 1997; COSTERTON et al. ^{19,20}, 1987, 1995; ODELL; WU⁷⁴, 1992).

Nossos resultados revelaram padrão de infecção endodôntica compatível com o observado em dentes com lesão periapical,

uma vez que foi demonstrada intensa propagação de microrganismos por todo o sistema de canais radiculares, incluindo ramificações do delta apical e região cementária apical.

Avaliando o desenvolvimento das lesões periapicais em dentes de macacos, Fabricius et al.²³ (1982) observaram que os microrganismos anaeróbios facultativos da microbiota endodôntica eram, progressivamente, substituídos pelos anaeróbios estritos, especialmente bacilos gram-negativos, com maior proporção na região apical dos canais radiculares.

Inicialmente a microbiota predominante é formada por bactérias aeróbias, ocorrendo em função da mudança das condições bioquímicas na cavidade endodôntica, alteração desta microbiota que passa a ser composta por microrganismos anaeróbios facultativos e posteriormente por anaeróbios estritos, caracterizando o denominado shift microbiano (WITTGOW; SABISTRON Jr.¹³¹, 1975; KEUDELL et al.⁵⁰, 1976; MÖLLER et al.⁶⁷ 1981; FABRICIUS et al.²³, 1982; OLETO; MELO⁷⁶, 1984/1985; SUNDQVIST¹¹¹, 1992; SUNDQVIST et al.¹¹³, 1989; TANI-ISHII et al.¹¹⁴, 1994; SIQUEIRA et al.¹⁰⁰, 2001; JACINTO et al.⁴⁵, 2003).

Dentre os microrganismos anaeróbios estritos predominam os gram-negativos, os quais foram observados em grande intensidade neste estudo, através da coloração de Brown & Brenn. Estes microrganismos apresentam coloração em tons de vermelho, sendo importante para que sejam observados a preservação de sua estrutura, a

qual pode ser destruída durante o processo de desmineralização, conforme descrito por Wijnbergen e Mullen¹²⁹ (1987). O emprego da técnica de desmineralização empregando EDTA e ácido cacodílico tem proporcionado condições de preservação de suas estruturas (SOARES¹⁰⁴, 2003), possibilitando desta forma a observação frente à coloração pela técnica de Brown e Brenn.

Os resultados ora obtidos são concordantes com os de Sundqvist¹¹² (1976), Moenning et al.⁶⁴ (1989) e Tronstad et al.¹²¹ (1990), que demonstraram a ocorrência de grande concentração de microrganismos anaeróbios gram-negativos, os quais se distribuem pelo sistema de canais radiculares, atingindo a região apical e periapical, em dentes sem vitalidade pulpar e com reação periapical crônica.

A presença de grande concentração de microrganismos anaeróbios gram-negativos e conseqüentemente de endotoxinas são considerados importantes fatores para o desenvolvimento da reabsorção óssea periapical e da lesão periapical visível radiograficamente (SCHEIN; SHILDER⁸⁷, 1975; SCHONFELD et al.⁸⁸, 1982; SUNDQVIST¹¹¹, 1992).

Considerando-se os resultados do estudo histomicrobiológico, a presença e propagação de microrganismos no sistema de canais radiculares foi intensa para os dois métodos de indução experimental de lesões periapicais nos 4 grupos experimentais. A maior intensidade de freqüência de microrganismos foi observada nas paredes do canal radicular, delta apical e túbulos dentinários, seguido

das lacunas cementárias, região periapical e áreas de reabsorção cementária.

Apenas quanto ao item presença de microrganismo na região periapical foi detectada diferença estatística, com maior presença de microrganismos para o grupo III em relação ao Grupo II ($p < 0,05$).

O tratamento endodôntico de dentes com reação periapical crônica proporciona um prognóstico mais desfavorável, levando a um menor índice de sucesso (HOLLAND et al.⁴⁴, 1983; LEONARDO et al.⁶², 1998) em função da microbiota envolvida e de sua propagação para o sistema de canais radiculares. Estudos estão relacionados ao tratamento endodôntico, como o preparo biomecânico, empregando-se soluções irrigadoras bactericidas, curativo de demora, com diferentes substâncias auxiliares no combate à infecção no sistema de canais radiculares (SUNDQVIST¹¹⁰, 1992; HERNÁNDEZ³³, 2002; YAMASHITA¹³⁴, 2004; HOLLAND et al.^{38,42}, 1992, 2003; LEONARDO et al.^{54,55,57}, 1994,

7 Conclusão

Nas condições experimentais em que esta pesquisa foi conduzida e, com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- Em todos os grupos experimentais foi observado o desenvolvimento de lesões periapicais crônicas.
- O grupo sem selamento coronário e sem arrombamento apical (Grupo II) apresentou menor intensidade de fenômenos inflamatórios na região periapical e de reabsorção dos tecidos mineralizados apicais e periapicais que os demais grupos ($p < 0,05$).
- O grupo em que não foi realizado selamento coronário e com arrombamento apical (Grupo I) e os grupos com selamento coronário, como ou sem arrombamento apical (Grupos III e IV) apresentaram lesões periapicais induzidas semelhantes ($p > 0,05$).
- A maior incidência de microrganismos em todos os grupos experimentais, foi observada nas paredes do canal radicular, delta apical e túbulos dentinários, seguido das lacunas cementárias, região periapical e áreas de reabsorção cementária.

8 Referências bibliográficas^{*}

1. AKPATA, E.S; BLECHMAN, H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall *in vitro*. **J. Dent. Res.**, Washington, DC, v.61, n.2, p.435-438, Feb. 1982.
2. ALENCAR, A.H.; LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B.; SILVA, R.S.; ITO, I.Y. Determination of the p-monochlorophenol residue in the hydroxide + p-monochlorophenol combination used as na intracanal dressing in pulpless teeth of dogs with induced chronic periapical lesion. **J. Endod.**, Baltimore, v.23, n.8, p.522-524, Aug. 1997.
3. ALLARD. U; STROMBERG, U.; STROMBERG, T. Endodontic treatment of experimentally induced apical periodontitis in dogs. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.3, n.5, p.240-244, Oct. 1987.
4. ANDO, N., HOSHINO, E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentine. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.23, n.1, p.20-27, Jan. 1990.
5. ARMITAGE, G.C., RYDER, M.I., WILCOX, S.E. Cemental changes in teeth with heavily infected root canals. **J. Endod.**, Baltimore, v. 9, n.4, p.127-130, Apr. 1983.
6. 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.**, St. Louis, v.93, n.2, p.184-189, Feb. 2002.

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

7. BERNABÉ, P.F.E. **Estudo histopatológico realizado em dentes de cães com lesão periapical após apicectomia e tratamento endodôntico via retrógrada. Influência do nível da obturação e do material obturador.** 1994. 164f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Odontologia, Universidade estadual Paulista, Araçatuba.
8. BERUTTI, E.; MARINI, R.; ANGERETTI, A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. **J. Endod.**, Baltimore, v.23, n.12, p.725-727, Dec.1997.
9. BOHÓRQUEZ AVILA, S.D.P. **Avaliação da presença e localização de bactérias nos canais radiculares e nas lesões periapicais crônicas pelo método de coloração de Brown & Brenn e da *Prevotella intermedia* pela imunofluorescência indireta.** 1994. 128f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) – Faculdade de odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru.
10. BONETTI FILHO, I. **Avaliação da biocompatibilidade de quatro técnicas de obturação de canais radiculares. Estudo em dentes de cães.** 1990. 110p. Tese (Doutorado em Dentística Restauradora) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1990.
11. BONETTI FILHO, I. **Tratamento de canal radicular de dentes de cães com necrose pulpar e lesão periapical crônica induzida, realizado em sessão única e duas sessões, utilizando três diferentes curativos de demora. Avaliação radiográfica e histopatológica e histomicrobiológica.** 2000. 336p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

12. BROWN, J.H.; BRENN, L.A. A method for differential staining of gram-positive and gram-negative bacteria in tissue sections. **Bull Johns Hopk.**, v.48, p.69-73, 1931.
13. BROWN, L.R.; RUDOLPH JR., 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
14. BROWNE, R. M. Animal tests for biocompatibility of dental materials – relevance, advantages and limitations. **J. Dent.**, v.22, suppl.2, p.S21-S24, 1994.
15. BYSTROM, 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.
16. CALLIS, P.D. Tissue response to retrograde root fillings in the ferret canine: a comparison of a glass ionomer cement and gutta percha with sealer. **Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol.**, St. Louis, v.64, p. 475-479, 1987.
17. 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.
18. CITROME, G.P.; KAMINSKI, E.J.; HEUER, M.A. A comparative study of tooth apexification in the dog. **J. Endod.**, Baltimore, v.5, n.10, p.290-297, Oct. 1979.

19. COSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; GEESEY, G.G.; LADD, T.I.; NICKEL, J.C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.41, p.435-464, 1987.
20. COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.49, p.711-745, 1995.
21. DIXON, C., RIKERT, V.G. Histologic verification of results of root canal therapy in experimental animals. **J.A.D.A. & D. Cos.**, v.25, n.1, p.1781-1803, Nov. 1938.
22. DWYER, T.G., TORABINEJAD, M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat. **J. Endod.**, Baltimore, v.7, p.31-35, Jan. 1981.
23. FABRICIUS, L., DAHLEN, G., ÖHMAN, A. E., MÖLLER, A. J. R. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after various times of closure. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.90, n.2, p.134-144, Apr. 1982.
24. FELIPPE, M.C.S. **Efeito de trocas de hidróxido de cálcio sobre os processos de apicificação e de reparo periapical de dentes de cães com rizogênese incompleta.** 2003. 125f. Tese (Doutorado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
25. 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.

26. FOUAD, A.F.; WALTON, R.E.; RITTMAN, B.R. Healing of induced periapical lesions in ferret canines. **J. Endod.**, Baltimore , v.19, n.9, p.123-129, 1993.
27. FUJII, H.; MACHIDA, Y. Histological study of therapy for infected nonvital permanent teeth with incompletely formed apices. **Bull Tokyo Dent. Coll.**, v.32, n.1, p.35-45, Feb. 1991.
28. GENVERT, H.; MILLER, H.; BURN, C.G. Experimental production of apical lesions of teeth in monkeys, and their relation to systemic disease. **Yale J. Biol. Med.**, v.13, n.1, p.649-661, 1940.
29. GILBERT, P.; DAS, J.; FOLEY, L. Biofilm susceptibility to antimicrobials. **Adv. Dent. Res.**, v.11, n.1, p.160-167, Apr. 1997.
30. GOLDIM, J.R.; RAYMUND, M.M. **Pesquisa em Saúde e os direitos dos animais**. 2ed. Porto Alegre: HCPA, 1997.
31. 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.**, Baltimore, v.27, n.10, p.610-612, Oct. 2001.
32. HAIKEL, Y.; WITTENMEYER, W.; BATEMAN, G.; BENTALEB, A.; ALLEMANN, C. A new method for the quantitative analysis of endodontic microleakage. **J. Endod.** Baltimore, v.25, n.3, p.172-177, Mar.1999.
33. 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.

34. HESS, W.; KELLER, O. Le tevole anatomiche. **Scientifiche Oral B** Itália, 1988. In: OTOBONI FILHO, J.A. **Processo de reparo de dentes de cães com lesão periapical após tratamento endodôntico em uma ou duas sessões: influência do tempo de curativo de demora e do tipo de material obturador.** 2000. 336f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2000.
35. HILL, T.J. Experimental dental granulomas in dogs. **J.A.D.A.**, v.19, p.1389-1398, Aug. 1932.
36. HOLLAND, R., MELLO, W., SOUZA, V., NERY, M.J., BERNABÉ, P.F.E., OTOBONI FILHO, J.A. Comportamento dos tecidos periapicais de dentes de cães após a obturação de canal com Sealapex acrescido ou não de iodofórmio. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v.19, p.97-104, 1990.
37. 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.
38. HOLLAND, R., SOARES, I.J., SOARES, I.M.L. 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.

39. HOLLAND, R., SOUZA, V. Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. **J. Endod.**, Baltimore, v. 11, p. 535-543, 1985.

40. HOLLAND, R., SOUZA, V., NERY, M.J., BERNABÉ, P.F.E., MELLO, W., OTOBONI FILHO, J.A. Overfiling and refiling monkeys pulpless. **J. Cari. Dent. Assoc.**, v.46, p.387-390, 1980.

41. HOLLAND, R., SOUZA, V., NERY, M.J., MELLO, W., BERNABÉ, P.F.E., OTOBONI FILHO, J.A. Root canal treatment of pulpless teeth with calvital or zinc oxide-eugenol, in one or two sittings. **Rev. Fac. Odontol. Araçatuba**, Araçatuba, v.7, p.47-51, 1978.

42. 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.**, Baltimore, v.29, n.2, p.121-124, Feb. 2003.

43. HOLLAND, R., OTOBONI FILHO, J.A., SOUZA, V., NERY, M.J., BERNABÉ, P.F.E., DEZAN Jr., E. Reparação dos tecidos periapicais com diferentes formulações de Ca(OH)₂ – estudo em cães. Influence of bone resorption on endodontic treatment. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v. 53, n.4, p. 327-331, jul./ago.1999.

44. HOLLAND, R.; VALLE, G.F.; TAINTOR, J.F.; INGLE, J.I. Influence of bone resorption on endodontic treatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.55, p.191-203, 1983.

45. JACINTO, R.C.; GOMES, B.P.; FERRAZ, C.C.; ZAIA, A.A.; FILHO, F.J. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.18, n.5, p.285-292, Oct. 2003.
46. JANSSON, L.; EHNEVID, H.; LINDSKOG, S.; BLOMLÖF, L. Development of periapical lesions. **Swed. Dent. J.**, Estocolmo, v.17, p.85-93, 1993.
47. KAKEHASHI, S., STALEY, H.R., FITZGERALD, R.J. The effects of surgical exposures 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.
48. KATEBZADEH, N.; HUPP, J.; TROPE, M. Histological periapical repair after obturation of infected root canals in dogs. **J. Endod.**, Baltimore, v.25, n.5, p.364-368, May 1999.
49. KATEBZADEH, N., 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, p. 60-66, 2000.
50. KEUDELL, K.; POWELL, G.; DIEMER, R. Humoral antibodies to anaerobic bacteria isolated from patients with pulpal-periapical disease. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St.Louis, v.53, n.2, p.194-197, Feb. 1982.
51. KUKIDOME, K. Histopatological study on healing of periapical tissues after infected root canal treatment of human teeth. **Tokyo**

Dent. Coll. Bull Oral Pathol., v.2, p.65-87, 1957.

52. LANGE LAND, K.; BLOCK, R.M.; GROSSMAN, L.I. A histopathologic and histobacteriologic study of 35 periapical endodontic surgical specimens. **J. Endod.**, Baltimore, v.3, n.1, p.8-23, Jan. 1977.
53. LEONARDO, M.R. Reparo apical e periapical pós tratamento endodôntico. In: LEONARDO, M.R; LEAL, J.M. **Endodontia: tratamento endodôntico de canais radiculares**. 3. Ed. São Paulo: Panamericana, 1998, cap 31, p.661-711.
54. 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 dogs teeth with experimentally induced chronic lesion. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.78, n.2, p.232-238, Aug.1994.
55. LEONARDO, M.R. ALMEIDA, W.A., SILVA, L.A.B., UTRILLA, L.S. Histopathological observations of periapical repair in teeth with radiolucent areas sumited to two different methods of root canal treatment. **J. Endod.**, Baltimore, v.21, n.3, p.137-141, Mar.1995.
56. LEONARDO, M.R., LEAL, J.M. **Endodontia: tratamento de canais radiculares**. 3.ed. São Paulo: Panamericana, 1998.
57. LEONARDO, M.R.; SALGADO, A.A.; SILVA, L.A.B.; TANOMARU FILHO, M. Apical and periapical repair of dog's teeth with periapical lesions after endodontic treatment with different root canal sealers. **Pesq. Odontol. Bras.** São Paulo, v.17, n.1, p.69-74, jan./mar. 2003.

58. LEONARDO, M.R., SILVA, L.A.B., LEONARDO, R.T., UTRILLA, L.S., ASSED, S. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. **J. Endod.**, Baltimore, v.19, n.7, p.348-352, Jul. 1993(a).
59. LEONARDO, M. R., SILVA, L.A.B., UTRILLA, I.S., LEONARDO, R.T., CONSOLARO, A. Effect of intracanal dressing on repair and apical bridging of teeth with incomplete root formation. **Endod Dent Traumatol.**, Copenhagen, v.9, n.1, p.25-30, Feb. 1993(b).
60. LEONARDO, M.R.; SILVEIRA, F.F.; SILVA, L.A.B.; 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.
61. 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. Brás. Odontol.**, Rio de Janeiro, v.32, n.1, p.14-9, Jan.1996.
62. LEONARDO, M.R.; TANOMARU FILHO, M.; SILVA, L.A.B.; UTRILLA, L.S.; ITO, I.Y. Histomicrobiology evaluation after root canal treatment of dog's teeth with induced chronic periodontitis filled with different sealers. **Bras. Endod. J.**, Goiânia, v.3, n.1, p.24-29, 1998
63. LOMÇALI, G.; SEM,B.H.; ÇANKAYA, H. Scanning electron microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.12,

p.70-76, 1996.

64. MOENNING JE, NELSON CL, KOHLER RB. The microbiology and chemotherapy of odontogenic infections. **J. Oral Maxillofac. Surg.** v.47, n.9, p.976-985, Sep. 1989.
65. MALOOLEY Jr., J., PATTERSON, S.S., KAFRAWY, A. Response of periapical pathosis to endodontic treatment in monkeys. **Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol.**, St Louis, v.47, n.6, p.545-554, June 1979.
66. MATTOS, A.F.R. **Avaliação radiográfica e histopatológica do reparo apical e periapical de dentes de cães com necrose pulpar e reação experimentalmente induzida. Efeito da neutralização e do curativo de demora.** 2001. 345f. Tese (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.
67. MÖLLER, A.J., FABRICIUS, L., DAHLEN, G., ÖHMAN. 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, p.475-84, 1981.
68. MORSE, D.R. Endodontic microbiology in the 1970s. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.14, p.69-79, 1981.
69. NAGAOKA, S.; MIYAZAKI, Y.; LIU, H.J.; IWAMOTO, Y.; KITANO, M.; KAWAGOE, M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. **J. Endod.**, Baltimore, v.21, n.2, p.70-73, Feb. 1995.
70. NAIR, P.N.R. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. **J. Endod.**, Baltimore, v.13, n.1, p.29-

39, Jan. 1987.

71. NAIR, P.N.R.; SJOGREN, U.; KREY, G.; SUNDQVIST, G. Therapy-resistant foreign body giant cell granuloma at the periapex of a root-filled human tooth. **J. Endod.**, v.18, n.12, p.589-595, 1990.
72. 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.**, Baltimore, v.28, n.1, p.694-696, Oct. 2002.
73. NERY, M.J. **Tratamento de dentes com lesões periapicais crônicas: influência das substâncias utilizadas no preparo biomecânico de canais radiculares obturados com o cimento Sealapex.** 2001. 330f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2001..
74. ODELL, E.W.; WU, P.J. Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* and *P. assaccharolytica* to the non-oxidative killing mechanisms of human neutrophils. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.37, n.597-601, 1992.
75. ORBAN, B. The problem of root canal treatment. **J.A.D.A.**, v.19, p.1384-1388, Aug. 1932
76. OLETO, E.M.O.; MELO, G.R. Do emprego do hipoclorito de sódio, paramonoclorofenol e hidróxido de cálcio em necrose pulpar (estudo clínico em dentes humanos). **Arq. Cent. Est. Cur. Odont. UFMG.**, Belo Horizonte, v.21/22, n.2/1, p.113-126, 1984/85.
77. OTOBONI FILHO, J.A. **Processo de reparo de dentes de cães com lesão periapical após tratamento endodôntico em uma ou**

- duas sessões: influência do tempo de curativo de demora e do tipo de material obturador.** 2000. 336f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2000.
78. PANZARINI, S.R.; SOUZA, V.; HOLLAND, R.; DEZAN JUNIOR, E. Tratamento de dentes com lesão periapical crônica. Influência de diferentes tipos de curativo de demora e do material obturador de canal radicular. **Rev. Odontol. Unesp**, v.27, n.2, p.509-526, 1998.
79. PATTERSON, R.C.; WATTS, A. Pulpal involvement and endodontic treatment. In: ELDERTON B.J. **The Dentition na Dental Care** – Oxford Heinemann Medical Books Chap 15, 1990.
80. PITTS, D.L.; WILLIAMS, B.L.; MORTON, T.H. Investigation on the role of endotoxin in periapical inflammation. **J. Endod.**, Baltimore, v.8, n.1, p.10-15, Jan. 1982.
81. 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.
82. RASQUIN, L.C. **Avaliação histopatológica da reparação apical e periapical em dentes de cães portadores de lesão periapical crônica, experimentalmente induzida, após tratamento de canais radiculares e obturação com três cimentos à base de hidróxido de cálcio.** 1997. 196f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.

83. RIBEIRO, F.C.; CONSOLARO, A. Bactérias nas estruturas mineralizadas de dentesw com necrose pulpar e granuloma apical. **Rev. Dent. Press. Biol. Oral**, Bauru, v.1, n.1, jan./abr. 2000.1 CD-ROM.
84. RIETSCHEL, E.T., BRADE, H. Bacterial endotoxins. **Sci. Am.**, v.267, p.54-61, 1992.
85. RODE, S.M.; FARIA, M.R.; MONTEIRO, M.P. O uso de microondas para descalcificação de tecidos mineralizados da mandíbula de ratos. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.10, n.1, p.15-18, jan./mar. 1996.
86. ROWE, A.H.R. Problems of intracanal testing of endodontic materials. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.13, p.96-103, 1980.
87. SCHEIN, B.; SHILDER, H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. **J. Endod.**, v.1, n.1, p.19-21, 1975.
88. SCHONFELD, S.E.; GREENING, A.B.; GLICK, D.H.; FRANK, A.L.; SIMON, J.H.; HERLES, S.M. Endotoxin activity in periapical lesions. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.53, p.82-87, 1982.
89. SELTZER, S. **Endodontology biologic considerations in endodontic procedures**. New York: Mc Graw- Hill, 1971.
90. SEN, B.H., PISKIN, B., DERMIRCI, T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.11, p.6-9, 1995.
91. SEN, B.H.; SAFAVI, K.E.; SPÁNGBERG, L.S. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.42, n.7, p.513-520, 1997.

92. SEN, B.H.; SAFAVI, K.E.; SPÄNGBERG, L.S. Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Oral Endod.**, St.Louis, v.84, n.1, p.68-73, July, 1997.
93. SHABANHANG, S., TORABINEJAD, M., BOYNE, P.P., ABEDI, H., McMILLAN, P. A comparative study of root end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate in dogs. **J. Endod.**, Baltimore, v.25, p.1-5, 1999.
94. SHOVELTON, D.S. The presence and distribution of microorganisms within non-vital teeth. **Braz. Dent. J.**, São Paulo, v.117, p.101-107, 1964.
95. SILVA, L.A.B. **Rizogênese incompleta – efeito de diferentes pastas à base de hidróxido de cálcio na complementação radicular e na reparação periapical em dentes de cães – estudo histológico.** 1988. 168f. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1988.
96. SILVA, L.A.B. **Rizogênese incompleta: efeito dos curativos de demossra 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.

97. SILVA, L.A.B. **Cimentos obturadores de canal radicular à base de hidróxido de cálcio – avaliação histopatológica do reparo apical e periapical em dentes de cães, da resposta inflamatória em tecido subcutâneo e da migração celular em cavidade peritoneal de camundongos. Análise do pH, concentração de cálcio total e condutividade.** 1995. 191f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1995.
98. 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.**, Baltimore, v.28, n.2, p.94-98, Feb. 2002.
99. SILVEIRA, F.F; LEONARDO, M.R.; ITO, I.Y.; SILVA, L.A.B.; TANOMARU FILHO, M. Avaliação histomicrobiológica após curativo de demora com pastas à base de hidróxido de cálcio por diferentes períodos de tempo. **R.B.O.**, Rio de Janeiro, v.58, n.4, p.224-227, 2001.
100. SIQUEIRA, J.F.Jr.; RJCAS, I.N.; OLIVEIRA, J.C.; SANTOS, K.R. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. **J. Endod.**, Baltimore, v.27, n.9, p.563-566, 2001.
101. SMITH, J.W., LEEB, I.J., TORNEY, D.L. A comparison of calcium hydroxide and barium hydroxide as agents for inducing apical closure. **J. Endod.**, Baltimore, v.10, p.64-70, 1984.
102. SOARES, I.J., GOLDBERG, F., MASSONE, E.J., SOARES, I.M. Periapical tissue response to two calcium hydroxide-containing endodontics sealers. **J. Endod.**, Baltimore, v.16, p.166-169, 1990.

103. 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. 455f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1999.
104. 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.
105. SPÄNGBERG, L. S. W. Evidence-based endodontics: the one-visit treatment idea. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.91, n.6, p.617-618, 2001.
106. STABHOLTZ, A., SELA, M.N. The role of oral microorganisms in the pathogenesis of periapical pathosis. I. Effectc of the *Streptococcus mutans* and its cellular constituents on the dental pulp and periapical tissue of cats. **J. Endod.**, Baltimore, v.9, n.5, p.171-175, May 1983.
107. STASHENKO, P. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.6, p.89-96, 1990.
108. STASHENKO, P.; YU, S.M.; WANG, C.Y. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. **J. Endod.**,

- Baltimore, v.18, n.9, p.422-426, Sept. 1992.
109. STEIN, G. Experimental root canal treatment, 1931 apud DIXON, C.M.; RICKERT, U.G. Histologic verification of results of root-canal therapy in experimental animals. **J.A.D.A. & D. Cos.**, v.25, p.1781-1803, Nov.1938.
110. STROMBERG, T. Wound healing after total pulpectomy in dogs. A comparative study between root fillings with calcium hydroxide, dibasic calciumphosfatase, and gutta precha. **Odontol. Rev.**, v.20, p.147-163, 1969.
111. SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. **J. Endod.**, Oxford, v.18, n.9, p.427-430, Sept. 1992.
112. SUNDQVIST, G. Bacterial studies of necrotic pulps. Sweden, 1976. Dissertation n.7, Umea University Odontological apud MORSE, D.R. Endodontic microbiology in the 1970s. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.14, p.69-79, 1981.
113. SUNDQVIST, G.; JOHANSSON, E.; SJOGREN, U. Prevalence of black-pigmented *Bacteroides species* in root canal infections. **J. Endod.**, Baltimore, v.15, n.1, p.13-19, Jan. 1989.
114. TANI-ISHII, N., WANG, C.Y, TANNER, A., STASHENKO, P. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.9, p.129-135, 1994.
115. TANOMARU FILHO, M.; LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B. 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.**, Baltimore, v.28, n.4, p.295-299, Apr. 2002.

116. TANOMARU FILHO, M.; LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B.; UTRILLA, L.S. Effect of different root canal sealers on periapical repair of teeth with chronic perirradicular periodontitis. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.31, n.2, p.85-89, Mar. 1998.
117. 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.
118. TORNECK, C.D., SMITH, J.S. Biologic effects of endodontic procedures on developing incisor teeth. I Effect of partial and total pulp removal. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.30, p.258-266, 1970.
119. TORNECK, C.D., SMITH, J.S., GRINDALL, P. Biologic effects of endodontic procedures on developing incisor teeth. III Effect of debridement and disinfection procedures in the treatment of experimentally induced pulp and periapical disease. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.35, n.4, p.532-540, Apr. 1973.
120. TRONSTAD, L. Recent development in endodontic research. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.100, p.52-59, 1992.
121. TRONSTAD, L, BARNETT, F., CERVONE, F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.6, p.73-77, 1990.
122. VONGSAVAN, N., MATTHEUS, B., HARRISON, G.K. Decalcification of teeth in a microwave oven. **Histochem. J.**, London, v.22, p.377-380, 1990.
123. WALTINO, T.M.T., SIRÉN, E.K., ORSTAVIK, D., HAAPASALO, M.P.P. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide

- M.P.P. Suceptibility of oral *Candida species* to calcium hydroxide *in vitro*. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.32, n.2, p.94-98, 1999.
124. WALTINO, T.M.T., SIRÉN, E.K., TORKKO, H.L.I., OLSEN, I., HAAPASALO, M.P.P. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.30, p.96-101, 1997.
125. WALTON, R.E., ARDJMAND, K. Histological evaluation of the presence of bacteria in induced periapical lesions in monkeys. **J. Endod.**, Baltimore, v.18, p.216-221, 1992.
126. WALTON, R.E., GARNICK, J.J. The histology of periapical inflammatory lesions in permanent molars in monkeys. **J. Endod.**, Baltimore, v.12, n.2, p.49-53, Feb. 1986.
127. WATTS, A., PATERSON, R. C. Detection of bacteria in histological sections of the dental pulp. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.23, p.1-12, 1990.
128. WATTS, A., PATERSON, R. C. "Usage" testing of root canal sealing materials – a person view. **J. Dent.**, v.20, p.266-271, 1992
129. WIJNBERGEN, M., van MULLEN, P.J. Effect of histological decalcifying agents on number and stainability of gram-positive bacteria. **J. Dent. Res.**, Washington, DC, v.66, n.5, p.1029-1031, May 1987.
130. WINKLER, T.F.; MITCHEL, D.F.; HEALEY, H.J. A bacterial study of human periapical pathosis employing a modified gram tissue stain. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.34, p.109-116, 1972.
131. WITTGOW, T.F.; SABISTON JR., C.B. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. **J. Endod.**, Baltimore,

v.1, n.5, p.168-171, May 1975.

132. YAMASAKI, M., KUMAZAWA, M., KOHSAKA, T., NAKAMURA, H., KAMEYAMA, Y. Pulpal and periapical tissue reactions after experimental pulpal exposure in rats. **J. Endod.**, Baltimore, v.20, n.1, p.13-17, Jan. 1994.
133. YAMASAKI, M., NAKANE, A., KUMAZAWA, M., HASHIOKA, K., HORIBA, N., NAKAMURA, H. Endotoxin and gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. **J. Endod.**, Baltimore, v.18, n.10, p.501-504, Oct. 1992.
134. 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.

TANOMARU, J.M.G. Métodos de indução experimental de lesão periapical em dentes de cães. Análise histopatológica e histomicrobiológica. Araraquara, 2004. 152. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Câmpus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Resumo

Diante da necessidade de avaliação de técnicas e materiais empregados no tratamento endodôntico de dentes com lesão periapical, tornam-se necessários métodos de indução experimental de lesões periapicais crônicas que possibilitem reprodução das condições envolvidas. O objetivo do presente trabalho foi a avaliação histopatológica e histomicrobiológica das lesões periapicais induzidas por diferentes métodos de indução experimental. Foram utilizados pré-molares de dentes de cães, os quais foram divididos em quatro grupos: GI- canais radiculares mantidos abertos por 180 dias e realização do arrombamento apical; GII- canais radiculares mantidos abertos por 180 dias, sem realização do arrombamento apical; GIII- canais radiculares mantidos abertos por 7 dias e selados posteriormente por 53 dias, com realização do arrombamento apical; GIV- canais radiculares mantidos abertos por 7 dias e selados posteriormente por 53 dias sem realização do arrombamento apical. O resultado histopatológico da análise dos

aspectos da reação inflamatória periapical e reabsorção dos tecidos mineralizados apicais e periapicais demonstraram diferença significativa entre os grupos, com menor intensidade dos fenômenos avaliados para o grupo II em relação aos demais ($p < 0,05$). A análise histomicrobiológica demonstrou presença de microrganismos em todo o sistema de canais radiculares em todos os grupos experimentais, destacando-se as paredes do canal radicular, delta apical e túbulos dentinários, seguido das lacunas cementárias, região periapical e áreas de reabsorção cementária.

Palavras-chave: 1. Periodontite periapical. 2. Endodontia – Métodos.
3. Cavidade da polpa dentária – Microbiologia.

TANOMARU, J.M.G. *Methods of experimental induction of periapical lesions in dog's teeth. Histopathological and histomicrobiological evaluation.* Araraquara, 2004. 152. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Câmpus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Abstract

The use of methods for experimental induction of periapical lesion is necessary to the evaluation of materials and techniques used for the endodontic treatment of teeth with periapical lesion. The methods of experimental induction of periapical lesion must reproduce the particular conditions. The aim of this study was to evaluate the histological and histomicrobiological periapical lesion induced by different methods. It was used pre-molars from dogs' teeth. The teeth were divided into four groups: GI- root canals exposition to the bucal environment for 180 days, with apical perforation; GII- root canals exposition to the bucal environment for 180 days, without apical perforation; GIII- root canals exposition to the bucal environment for 7 days, followed by the crown sealing for 53 days, with apical perforation; GIV- root canals exposition to the bucal environment for 7 days, followed by the crown sealing for 53 days, without apical perforation. Histopathological results in global evaluation of periapical inflammatory lesion and apical and periapical resorption showed a significant difference

for group II and the other groups ($p < 0,05$), with less inflammatory response and apical and periapical resorption. The histomicrobiological evaluation showed microorganisms presence in all root canal system in all groups. More presence of microorganisms were observed in root canal walls, apical delta and dentinal tubules, followed by cemental spaces, periapical region and cemental resorption region.

Keywords: 1.Periapical lesion; 2.Endodontics – methods.
3. Pulp dental cavity - Microbiology