

Sandra Maria de Melo Maltos

**INFLUÊNCIA DA DOSE INFECTANTE
NA COLONIZAÇÃO BACTERIANA DO
SISTEMA DE CANAIS RADICULARES
E NA TRANSLOCAÇÃO PARA
LINFONODOS SUBMANDIBULARES
EM CAMUNDONGOS
GNOTOBIÓTICOS**

Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2001

Sandra Maria de Melo Maltos

Influência da Dose Infectante na Colonização
Bacteriana do Sistema de Canais Radiculares e na
Translocação para Linfonodos Submandibulares
em Camundongos Gnotobióticos

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em
Odontologia como requisito exigido à
obtenção do título de mestre.

Área de Concentração: Endodontia.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz de Macêdo de Farias

Co-orientador:

Prof. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho

Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2001

Dedico este trabalho,

Ao meu pai, *Agostinho*, à minha mãe *Cleópatra* e à Tia *Zábia*, exemplos de carinho e compreensão.

Obrigada, por me passarem sentimentos nobres como: amor, dignidade e perseverança.

Agradeço,

Ao PROF. LUIZ DE MACÊDO DE FARIAS, pelo apoio, confiança e oportunidade de um novo caminho a percorrer.

Ao PROF. ANTÔNIO PAULINO RIBEIRO SOBRINHO, mestre e amigo, minha gratidão, pela orientação segura, dedicação, confiança e estímulo aos meus ideais.

Ao PROF. JACQUES ROBERT NICOLI, pelas valiosas sugestões, disponibilidade, apoio e carinho.

À KÁTIA LUCY DE MELO MALTOS, pelo convívio, amizade, paciência e sabedoria.

À PROF^a. MARIA AUXILIADORA ROQUE DE CARVALHO, pela disponibilidade e orientação durante a realização desta pesquisa.

A *Deus*, pelo amparo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores de Endodontia da FO/UFMG, *Helenaure Pereira Machado Carvalhais, Juliana Vilela Bastos e Maria Ilma de Souza Côrtes*, pelo incentivo e apoio.

À Professora *Lêda Quércia Vieira*, pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

À Professora *Sílvia Beleza de Moura* e ao Professor *Gilberto Rocha Melo* pela participação na banca de pré-defesa, cujas valiosas orientações foram imprescindíveis para a concretização deste estudo.

À Professora *Maria Ignácio Vieira* pela correção de Português.

À *Fernanda, Patrícia e Claudinha*, pela atenção, amizade e ajuda constante, com quem compartilho este trabalho.

À *Carla, Cristina, Edson, Elis, Aninha, Ana Carolina, Ivaldir e Ricardo*, meu carinho.

À *Maria Gorete Barbosa Ribas*, pelos ensinamentos e colaboração em todos os momentos.

Aos colegas do laboratório, *Regina, Andréia, Dani, Rinaldo, Kênia, Márcia, Francisca, Flávio e Vânia*, minha gratidão.

Aos colegas *Rodrigo, Marcello e Érika*, pela amizade.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

Muito Obrigada

“Somos o que decidimos, possuímos o que desejamos, estamos onde preferimos e encontraremos a vitória conforme imaginamos”.

Nathanael Ribeiro de Melo

SUMÁRIO

LISTAS DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Histórico.....	16
2.2 Microbiota do Sistema de Canais Radiculares Infectados.....	19
2.2.1 Ecopatologia do Sistema de Canais Radiculares: Composição e Distribuição dos Microrganismos.....	19
2.2.2 Patogenicidade da Microbiota do S.C.R.....	35
2.2.3 Papel do Preparo Mecânico-químico na Redução do Número de Microrganismos do S.C.R.....	39
2.3 Translocação Bacteriana.....	41
3 METODOLOGIA.....	44
3.1 Etapa Clínica.....	44
3.1.1 Animais.....	44
3.1.2 Anestesia.....	44

3.1.3 Instrumentação do Sistema de Canais Radiculares.....	45
3.2 Etapa Microbiológica.....	48
3.2.1 Microrganismos.....	48
3.2.2 Recuperação das Amostras Bacterianas.....	48
3.2.3 Preservação das Amostras Bacterianas Recuperadas.....	48
3.2.4 Obtenção do Inóculo.....	49
3.2.5 Inoculação Bacteriana.....	49
3.2.6 Verificação da Implantação e Translocação Microbianas.....	50
4 RESULTADOS.....	52
5 DISCUSSÃO.....	61
6 CONCLUSÕES.....	67
7 ABSTRACT.....	68
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Concentrações de <i>E. faecalis</i> e <i>P. nigrescens</i> inoculadas nos SCR de Camundongos Gnotobióticos.....	50
TABELA 2 – Porcentagem cumulativa de implantação de <i>E. faecalis</i> nos SCR de camundongos gnotobióticos e translocação para os linfonodos submandibulares, em diferentes concentrações de inóculo.....	54
TABELA 3 – Porcentagem de implantação de <i>E. faecalis</i> no SCR de camundongos gnotobióticos e translocação para os linfonodos submandibulares, ao longo do tempo de avaliação.....	55
TABELA 4 – Porcentagem cumulativa de Implantação de <i>P. nigrescens</i> nos SCR de camundongos gnotobióticos e translocação para os linfonodos submandibulares, em diferentes concentrações do inóculo.....	56
TABELA 5 – Porcentagem de implantação de <i>P. nigrescens</i> no SCR de camundongos gnotobióticos e translocação para os linfonodos submandibulares, ao longo do tempo de avaliação.....	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fluxo Laminar, Microisolador e Camundongos IG...	46
FIGURA 2 – Incisivos centrais inferiores de Camundongos IG...	46
FIGURA 3 – Localização do canal radicular	47
FIGURA 4 – Instrumentação do canal radicular – Incisivo central inferior.....	47
FIGURA 5 – Implantação de <i>E. faecalis</i> no SCR de camundongos gnotobióticos inoculados com 10^1 UFC e translocação para linfonodos submandibulares.....	58
FIGURA 6 – Implantação de <i>E. faecalis</i> no SCR de camundongos gnotobióticos inoculados com 10^2 UFC e translocação para linfonodos submandibulares.....	59
FIGURA 7 – Implantação de <i>P. nigrescens</i> no SCR de camundongos gnotobióticos inoculados com 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5 UFC e translocação para linfonodos submandibulares.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

SCR	Sistema de Canais Radiculares
ATCC	American Type Culture Colletion
IG	Isentos de Germes (<i>germ free</i>)
LSM	Linfonodos Submandibulares
UFC	Unidade Formadora de Colônia
mL	mililitro
BPN	Bacteroide produtor de Pigmento Negro
BNPN	Bacteroide Não produtor de Pigmento Negro
CV	Convencionais
BHI-S	Brain Heart Infusion suplementado
BHI-A-S	Brain Heart Infusion Agar suplementado

RESUMO

A terapia endodôntica visa, por meio do preparo mecânico-químico, eliminar ou pelo menos reduzir o número de bactérias viáveis presentes no sistema de canais radiculares (SCR) infectados. Acredita-se que, apesar de não se alcançar a esterilidade, após essa conduta, o número de microrganismos remanescentes é insuficiente para recolonizar os SCR. O objetivo deste estudo foi estabelecer a concentração de *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083) e de *Prevotella nigrescens* (ATCC 33563) capaz de se implantar nos SCR de camundongos isentos de germes (IG), e de se translocar para os linfonodos submandibulares (LSM). Utilizaram-se 72 camundongos IG, de 1 mês de idade e de ambos os sexos, dos quais os canais radiculares foram instrumentados e inoculados, em monoinfecção, com *E. faecalis* nas concentrações 10^2 e 10^1 UFC e com *P. nigrescens* nas concentrações 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 UFC e, posteriormente selados. Três animais, para cada dose infectante, foram sacrificados, nos 2º, 3º, 6º e 10º dias. Os resultados demonstraram que o *E. faecalis* implantou-se, em 83,33% dos casos, nas concentrações 10^2 e 10^1 UFC. A translocação ocorreu em 58,33%, para o inóculo de 10^2 UFC e em 33,33% para o inóculo de 10^1 UFC. A *P. nigrescens* implantou-se em 25%, 16,67%, 8,33% e 0%, para os inóculos 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 UFC, respectivamente. Em nenhuma concentração utilizada, para a referida espécie, observou-se o fenômeno da translocação. Estes resultados nos permitem concluir que: dependendo da espécie bacteriana, a capacidade de implantação no SCR e de translocação para os LSM varia, provavelmente, em função do tipo morfo-tinturial (Gram + ou Gram -) bem como do tipo respiratório (anaeróbio estrito – ANS – ou anaeróbio facultativo – ANF).

1 INTRODUÇÃO

A importância atribuída aos microrganismos, na etiopatogenia das alterações pulpar e periapical, data de 1894, quando W. D. MILLER demonstrou a presença de bactérias no tecido pulpar inflamado. Desde então, os microrganismos vêm sendo considerados importantes agentes no desenvolvimento dessas alterações. O estudo clássico de KAKEHASHI et al. (1965) demonstrou esse inter-relacionamento, uma vez que esses pesquisadores observaram que a necrose pulpar e a destruição óssea periapical só se desenvolveram em ratos convencionais e não nos isentos de germes, quando suas câmaras pulpares foram expostas à cavidade oral.

Definido o importante papel dos microrganismos na etiopatogenia das alterações pulpoperiapicais (KAKEHASHI et al. 1965; SUNDQVIST, 1976; MÖLLER et al., 1981; FABRICIUS, 1982 a, b; NAIR et al., 1990; STASHENKO et al, 1994), o tratamento endodôntico busca eliminar uma possível infecção, presente no sistema de canais radiculares (SCR), ou prevenir uma futura infecção ou reinfecção do mesmo (CARLSSON & SUNDQVIST, 1980; PITTFORD, 1982; KLEVANT & EGGINK, 1983; HAAPASALO, 1989, MALTOS, 1990; LEONARDO et al., 1994; SIQUEIRA JR. et al., 1997b, 1999; LANA et al., 2001).

A presença de uma infecção no SCR pode permitir a passagem de microrganismos desse sítio para os vasos sanguíneos (DEBELIAN et al., 1992 e 1994). Um fenômeno bastante estudado no trato gastrointestinal relaciona-se à translocação bacteriana, definida por BERG & CARLINGTON (1979), como sendo a passagem de bactérias indígenas viáveis de um dado sítio do organismo para outro. Nas infecções de origem endodôntica, dados preliminares de um recente estudo (RIBEIRO SOBRINHO et al., 2001) mostram que a

translocação pode também ocorrer do SCR para os linfonodos submandibulares (LSM), em camundongos gnotobióticos.

A literatura apresenta um grande número de estudos sobre a microbiota das infecções endodônticas. Contudo, consideráveis variações, nos resultados, são observadas, dependendo do tipo de dente, das precauções tomadas durante a recuperação e processamento dos espécimes microbianos (SUNDQVIST, 1976; CARLSSON & SUNDQVIST, 1980; ZAVISTOSKI et al., 1980; SUNDQVIST, 1992 a, b; VIGIL et al., 1997, NODA et al. 1999; MOREIRA JR. et al, 1999).

As técnicas quantitativas de cultura são rotineiramente realizadas, por exemplo, dentre outras, em exames de urina e contribuem para a definição de uma antibioticoterapia e decisões cirúrgicas, que são freqüentemente baseadas nesses achados. Entretanto, estudos quantitativos da microbiota infectante, no SCR, que poderiam avaliar quais microrganismos predominariam em determinadas condições clínicas, e a proporção dos diferentes tipos de bactérias, que estariam aí presentes, são escassos na literatura (CARLSSON & SUNDQVIST, 1980). Os estudos quantitativos esbarram na sensibilidade dos métodos de colheita dos espécimes e seu cultivo, considerando-se a diversidade da microbiota e o número de células presentes, nem sempre suficiente para sua recuperação “in vitro”, como observado por ZAVISTOSKI et al.,1980. A isso se acrescenta a peculiaridade dos SCR, sítios, normalmente, estéreis e, eventualmente, expostos à colonização microbiana, cuja sucessão ecológica e implicações dependem de inúmeros fatores ainda não completamente conhecidos.

Considerando-se a relevância da presença de *E. faecalis* e *P. nigrescens*, nas infecções humanas de origem endodôntica, este estudo objetivou estabelecer a concentração microbiana necessária para que ocorra sua implantação nos sistemas de canais radiculares e sua translocação para os linfonodos submandibulares de camundongos gnotobióticos, uma vez que esse é um fator de colonização pouco estudado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

Entre os povos da antigüidade, as enfermidades eram consideradas de origem sobrenatural, enviadas pelos deuses como castigo aos homens por seus pecados. O conceito de contágio e as normas de higiene não eram, porém, totalmente desconhecidos. O princípio de contágio, por seres invisíveis, foi registrado por Varro, no século II a.C. Em 1632 – 1723, Antonie van Leeuwenhoek, após a invenção do microscópio, foi o primeiro a visualizar as bactérias, descrevendo-as como bastonetes, esferas e espirais.(JOCLIK et al., 1995).

Durante muitas décadas, certas infecções sistêmicas foram consideradas de origem endodôntica. Com a proposição da “Teoria da Infecção Focal”, por BILLINGS, em 1912, a Odontologia vivenciou uma era mutiladora, em que a exodontia dos dentes infectados era realizada como forma de se prevenir tais infecções. Em resposta a essa questão, na década de 30, os estudos referentes à microbiologia do SCR infectado apresentaram um grande avanço: ressurgiram os tratamentos endodônticos menos empíricos e mais centrados em critérios biológicos (BELLIZZI & CRUSE, 1980; DE DEUS, 1992).

O papel das bactérias, no desenvolvimento das alterações patológicas, nos tecidos pulpar e periapical dos dentes, foi demonstrado, experimentalmente, por KAKEHASHI et al. (1965), que observaram o desenvolvimento de lesões periapicais em ratos convencionais e não em ratos isentos de germes, quando suas câmaras pulpares foram expostas à microbiota presente na cavidade oral.

À medida que os estudos relacionados à microbiologia do sistema de canais radiculares se desenvolveram, a clínica

endodôntica passou a ter necessidade de realizar culturas microbiológicas antes da sua obturação. Com a melhoria das técnicas de colheita, transporte e cultivo microbiológico, as pesquisas, realizadas nas últimas décadas, mostram que a população microbiana das infecções endodônticas típicas é considerada uma infecção mista, com os anaeróbios excedendo os aeróbios, dependendo do estágio de infecção do SCR (MÖLLER, 1966; AKPATA, 1974; BERGENHOLTZ, 1974; KANTZ & HENRY, 1974; WITTGOW & SABISTON, 1975; SUNDQVIST, 1976; GOODMAN, 1977; CARLSSON & SUNDQVIST 1980; ZAVISTOSKI et al., 1980; FABRICIUS et al., 1982(a, b); BYSTRON & SUNDQVIST, 1983; HAAPASALO, 1989; MOENNING et al., 1989; MALTOS, 1990; FUKUSHIMA, et al., 1990; TANI-ISHI et al., 1994; VIGIL, et al., 1997; SUNDQVIST et al., 1998, LANA et al., 2001).

Inicialmente, as condições de colheita e cultivo microbianos, em dentes infectados, permitiam somente a detecção de microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos, o que tornou axiomático serem os *Staphylococcus* e os *Streptococcus* os microrganismos prevalentes nessas infecções (MORSE, 1981). Entretanto, o significado de uma cultura negativa, obtida do SCR foi motivo de muita discussão, pois os métodos utilizados nessa prática eram limitados (INGLE & ZELDOW, 1963). MORSE (1971) examinou alguns fatores específicos envolvidos nas culturas falso-positivas e falso-negativas, tais como: inadequada esterilização do campo operatório, dos instrumentais e dos materiais; contaminação pelo dique de borracha; respiração; ar atmosférico; sinusite maxilar; trato fistuloso e selamento provisório, além das dificuldades técnicas em se obter o espécime clínico do SCR. Segundo INGLE & ZELDOW (1963) e UMEMOTO (1995), fatores como: a interação entre o número de microrganismos invasores, a virulência desses microrganismos, a resistência do hospedeiro, além da anatomia da área envolvida, são determinantes para se alcançar o sucesso da terapia endodôntica e não, apenas, a mera detecção de microrganismos residuais no momento precedente à obturação do SCR.

Alguns pesquisadores sugeriram que a técnica de cultura microbiológica dos SCR fosse aperfeiçoada de modo a refletir o seu verdadeiro estado microbiológico (MORAES et al., 1971; ZIELK et al., 1976).

2.2 MICROBIOTA DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES INFECTADOS

2.2.1 Ecopatologia do Sistema de Canais Radiculares: Composição e Distribuição dos microrganismos

Uma infecção odontogênica se deve à interdependência e ao sinergismo de uma variedade de microrganismos (MOENNING et al., 1989; KANANGARA et al., 1980; ADERHELD et al., 1981). As bactérias anaeróbias desempenham um importante papel nessa infecção, sendo que os cocos anaeróbios Gram positivos são recuperados em, aproximadamente, 87% dos casos e os bastonetes Gram negativos em 10%. Esses últimos parecem ser os mais virulentos, sendo representados, especialmente, pela *Prevotella intermedia* (UMEMOTO, 1995).

A infecção microbiana da cavidade pulpar freqüentemente é resultante da cárie dental e é considerada de natureza polimicrobiana. Qualquer microrganismo da cavidade bucal, nasofaringe ou trato gastrointestinal pode invadir o espaço do SCR e infectá-lo (FARBER & SELTZER, 1988).

Apesar da grande quantidade de estudos sobre a microbiota das infecções endodônticas, consideráveis variações nos resultados são observadas, dependendo do tipo de dente, das precauções tomadas durante a recuperação dos microrganismos e do processamento dos espécimes clínicos (WINKLER & VAN AMEROGEN, 1959; SUNDQVIST, 1976; CARLSON & SUNDQVIST, 1980; ZAVISTOSKI et al., 1980; FARBER & SELTZER, 1988; BAUMGARTNER & FALKLER, 1991; KIRYU et al., 1994; VIGIL et al., 1998; MOREIRA JR. et al., 1999).

Até os anos 70, considerava-se que as espécies microbianas predominantes nos SCR infectados eram os *Streptococcus viridans* (estreptococos α -hemolíticos). Esses microrganismos Gram positivos englobam as espécies *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. sanguis* e *S. mutans*, sendo também freqüentes, o *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *Micrococcus*, *Corynebacteria*, *Lactobacillus*, *Neisseria*, *Cândida albicans*. Tais espécies foram isoladas, utilizando-se técnicas de cultura que favoreciam o crescimento dos anaeróbios facultativos, como os *Streptococcus*, e ignoravam outras bactérias anaeróbias como os *Bacteroides*. Quando o ágar foi acrescentado ao meio de cultura, tornou-se possível detectar algumas espécies microbianas como *Veillonella*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* e vibrio. Contudo, muitos anaeróbios obrigatórios não foram isolados nessas condições (MORSE, 1981).

O “Virginia Polytechnical Institute” tem um papel relevante no desenvolvimento das técnicas de isolamento de microrganismos anaeróbios. A utilização, por exemplo, de meio pré-reduzido, possibilitou melhor detecção desses microrganismos. Inicialmente, tais avanços foram aplicados à microbiologia médica e, posteriormente, adaptados à microbiologia oral (MORSE, 1981).

BERGENHOLTZ (1974), estudando dentes traumatizados e necrosados, observou que as amostras recuperadas do sistema de canais radiculares eram dominadas por bactérias anaeróbias estritas. Espécies de *Bacteroides*, *Corynebacterium*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium* e *Streptococcus* do “grupo viridans” (α -estreptococcus) estavam, comumente, presentes.

WITTGOW & SABISTON (1975), utilizando as técnicas desenvolvidas pelos pesquisadores do “Virginia Polytechnical Institute”, para isolamento e identificação de bactérias, recuperaram 82 espécies bacterianas de canais radiculares de 40 incisivos humanos traumatizados, apresentando coroas íntegras e polpas necróticas. Foram obtidas 32 culturas desses canais radiculares, sendo que, em 31 delas, as bactérias anaeróbias estritas estavam presentes. Os bastonetes anaeróbios Gram negativos foram

recuperados em cerca de 84% de todos os dentes com culturas positivas. A maioria das espécies identificada, neste estudo, fazia parte da microbiota oral residente.

SUNDQVIST (1976) utilizando metodologia apropriada para anaeróbios, realizou um estudo, que é referência a todos os outros que o sucederam: isolou-se 88 variedades bacterianas de dentes traumatizados, com necrose pulpar e coroa íntegra. Cerca de 90% desses isolados eram bactérias anaeróbias, representando a mais alta porcentagem de anaeróbios, até então recuperada, de canais radiculares portadores de polpas necróticas. Os gêneros isolados foram: bastonetes Gram negativos (*Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Selenomonas*, *Campylobacter*), cocos Gram negativos (*Veillonella*), cocos Gram positivos (*Peptostreptococcus*, *Peptococcus*) e bastonetes Gram positivos (*Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Arachnia*, *Lactobacillus* e *Actinomyces*).

Ainda hoje, os pesquisadores procuram aperfeiçoar os métodos de recuperação microbiana de canais radiculares infectados. NODA et al. (1999) investigaram a capacidade de dois métodos de cultura para detectar bactérias do exsudado do SCR. Em um deles, o convencional, as amostras dos canais radiculares infectados foram imediatamente transportadas para o laboratório, introduzidas em câmaras de anaerobiose, para posterior identificação dos microrganismos; no outro, o de pré-cultura, as amostras foram inoculadas diretamente em 2mL de um meio semi-sólido suplementado, incubadas por 24 a 72 horas a 37° C, em anaerobiose e encaminhadas ao laboratório para identificação. Nesse estudo, o método de pré-cultura mostrou-se superior para determinar a presença de bactérias quando comparado ao método convencional.

Outros estudos sobre a microbiota dos SCR, como os realizados por MÖLLER (1966); AKPATA (1974, 1976); GOODMAN (1977); ZAVISTOSKI et al. (1980); FABRICIUS et al. (1982 a,b); BYSTRON & SUNDQVIST (1983); HAAPASALO (1989); MALTOS (1990); FUKUSHIMA, et al. (1990); ANDO & HOSHINO (1990); MOLVEN et al. (1991); TANI-ISHI et al. (1994); VIGIL, et al. (1997);

SUNDQVIST et al. (1998); LANA et al. (2001), também relataram uma preponderância de anaeróbios em relação aos aeróbios.

Em condições normais, os tecidos dos mamíferos apresentam elevado potencial de oxi-redução, o que constitui um mecanismo de proteção contra as infecções por anaeróbios (SILVER, 1980). As condições que, geralmente, predispõem às infecções por anaeróbios estão relacionadas a um suprimento sangüíneo comprometido ou infecção antecedente por bactérias aeróbias, que favorecem o desenvolvimento de um ambiente com baixo potencial de oxi-redução (FARBER & SELTZER, 1988)

FABRICIUS et al. (1982a) observaram, longitudinalmente, a distribuição e predominância de bactérias orais indígenas em canais radiculares de macacos. As câmaras pulpares foram expostas à cavidade oral por uma semana, em seguida realizaram-se as colheitas microbianas e, subsequente, selaram-se as cavidades de acesso. Os períodos de observação ocorreram após 90, 180 e 1060 dias, quando os espécimes foram novamente colhidos do canal principal, da dentina e da região apical. Os resultados demonstraram que a proporção de anaeróbios obrigatórios aumentou com o tempo, enquanto que a proporção de facultativos diminuiu significativamente após 1060 dias. Diante disso, os autores sugeriram que mecanismos seletivos poderiam estar ocorrendo no interior do SCR.

BAUMGARTNER & FALKLER (1991), estudando 54 dentes humanos que apresentavam cáries e lesões perirradiculares, identificaram, "*in vitro*", a presença de bactérias nos 5mm apicais desses dentes. Um total de 50 espécies bacterianas foram isoladas, sendo que 68% eram anaeróbios estritos. As bactérias, mais freqüentemente isoladas, foram: *Actinomyces*, *Lactobacillus*, Bacteroides produtores de Pigmentos Negros (BPN), *Peptostreptococcus*, Bacteroides não produtores de Pigmentos Negros (BNPN), *Veillonella*, *E. faecalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus mutans*, com média de cinco isolados por SCR infectado. Nesse estudo, não houve grande diferença quanto ao número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), entre os

canais radiculares infectados com BPN e os não infectados por essas espécies.

O estudo de SUNDQVIST (1992a) também caracterizou a microbiota do SCR de 65 dentes com lesões periapicais. Ele detectou bactérias em todos os espécimes clínicos avaliados, recuperando 353 variedades. O número médio, recuperado, foi de seis espécies por canal radicular, e a espécie mais freqüentemente isolada foi a *Fusobacterium nucleatum*, (isolada em cerca de 48% dos canais radiculares), seguida pelas: *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium alactolyticum*, *Eubacterium lentum* e *Wolinella recta*.

A microbiota dos Sistemas de Canais Radiculares obturados, que necessitam de um novo tratamento, por persistência de uma infecção perirradicular, quando comparada à de dentes infectados, que necessitam de um primeiro tratamento, difere entre si. Enquanto pressões seletivas operam no SCR infectado que ainda não recebeu tratamento, favorecendo o estabelecimento de um grupo restrito de microrganismos (SUNDQVIST, 1976, 1992b; FABRICIUS et al., 1982a, b), condições especiais diversas devem ocorrer nos SCR que receberam uma obturação prévia e que se reinfetaram (SUNDQVIST et al., 1998). NAIR et al. (1990), utilizando microscopias ótica e eletrônica, verificaram a presença de microrganismos em seis de nove lesões periapicais resistentes à terapia endodôntica. Quatro delas revelaram bactérias e duas organismos semelhantes a leveduras. Esse estudo forneceu evidências da presença de microrganismos intrarradiculares na maioria dos dentes, tratados endodonticamente, com lesões perirradiculares persistentes.

SIREN et al. (1997), estudando a relação entre os procedimentos de tratamento clínico e a ocorrência de bactérias entéricas em infecções endodônticas, observaram que a persistência de uma infecção estava freqüentemente, associada à recuperação de *E. faecalis* e que, nos dentes de onde esses microrganismos foram isolados, os mesmos encontravam-se em monoinfecções. As outras bactérias entéricas facultativas, recuperadas foram: *Enterobacter*

cloacae, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella oxytoga*, *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas aeruginosus*. Outras espécies também recuperadas que se encontravam associadas às bactérias entéricas foram os *Streptococcus* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* e *P. nigrescens*.

MOLANDER et al. (1998) verificaram o estado microbiológico de 100 dentes obturados, com periodontite apical, espessamento periodontal, radiograficamente visível, e de 20 dentes sem sinais de patologia periapical. No primeiro grupo, recuperaram-se 117 linhagens microbianas de 68 dos 100 dentes examinados, sendo que, na maioria dos canais radiculares, uma ou duas espécies bacterianas foram isoladas. Houve um predomínio de cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos, com a maioria dessas espécies pertencendo ao gênero *Enterococcus*. No segundo grupo, apenas 13 linhagens microbianas, tanto Gram-positivas como negativas, foram isoladas de nove dos 20 dentes avaliados. Concluíram que a microbiota do SCR obturado difere, tanto quantitativamente como qualitativamente, da encontrada em canais radiculares portadores de polpas necróticas, que ainda não receberam tratamento convencional.

Avaliando 54 dentes de pacientes que necessitavam de um novo tratamento endodôntico, por apresentarem alterações periapicais radiograficamente visíveis, SUNDQVIST et al. (1998) recuperaram os seguintes microrganismos: *E. faecalis* (9 casos), *Actinomyces israelii* e *Bacteroides gracilis* (3 casos) e *Streptococcus aeruginosus*, *Peptostreptococcus micros* e *Candida albicans* (dois casos). Nesses espécimes clínicos avaliados, detectaram-se um único caso de infecção polimicrobiana, com quatro espécies aí presentes; quatro casos de diassociações e, em 19 casos, detectaram monoinfecções. O *E. faecalis*, quando recuperado, encontrava-se sempre como único isolado. Diante desses resultados, os pesquisadores puderam concluir que a microbiota presente no SCR obturado, previamente, pode ser caracterizada como sendo, em sua maioria, uma monoinfecção. Observaram um predomínio de microrganismos Gram positivos, com proporções iguais de bactérias anaeróbias obrigatórias e facultativas.

NODA et al. (1999) recuperam amostras microbianas do exsudato presente no SCR de dentes de 15 pacientes apresentando quadro de periodontite apical crônica. 14 dentes já haviam sido submetidos a tratamento endodôntico anteriormente. Dos 15 casos estudados, 12 espécies bacterianas foram recuperadas dos SCR, sendo as mais freqüentes os *α-Streptococcus* e os *Enterococcus*.

PECIULIENE et al (2000) investigaram a ocorrência de *E. faecalis* em canais radiculares de dentes que necessitavam de um novo tratamento endodôntico. Dos 25 dentes unirradiculares avaliados, recuperaram-se bactérias de 20 canais radiculares, em uma primeira amostragem, estando os *E. faecalis* presentes em 14 deles: nove associados a outras espécies microbianas e cinco em culturas puras. Numa segunda amostragem, as bactérias foram recuperadas de sete canais radiculares, estando os *E. faecalis* presentes em 5 deles.

Em estudo recente, realizado na Faculdade de Odontologia e Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, LANA et al. (2001) estudaram a composição microbiana de 31 canais radiculares de dentes humanos infectados, antes e depois de terem sido submetidos ao preparo mecânico-químico. Um total de 308 espécies microbianas foram isoladas de 27 dos 31 canais radiculares. Os gêneros isolados, mais freqüentemente, foram: *Prevotella* (20 espécies de 12 canais), *Fusobacterium* (uma espécie de 11 canais), *Lactobacillus* (14 espécies de 10 canais), *Streptococcus* (16 espécies de 10 canais), *Clostridium* (11 espécies de 9 canais) e *Peptostreptococcus* (12 espécies de 7 canais). O número de espécies, isoladas de cada amostra do SCR, variou entre uma e 11, com média de cinco espécies por canal. Foram observadas associações positivas entre *Clostridium* e *Prevotella* e entre *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium*. Verificaram ainda que, mesmo após o uso de um curativo intracanal, dois canais radiculares apresentavam microrganismos anaeróbios facultativos, os *Lactobacillus paracasei* e *Streptococcus anginosus*. Observaram, também, que: considerando-se o grupo dos Bastonetes Produtores de Pigmentos Negros, a *P. intermedia*/*P. nigrescens* foi o mais freqüente.

Os microrganismos podem alcançar a polpa dental e os tecidos perirradiculares por várias vias, como: defeitos periodontais, fraturas verticais, restaurações coronárias com selamento inadequado, comunicação com o seio maxilar ou com a cavidade nasal, selamento inadequado do dente, entre as sessões do tratamento endodôntico, pelos túbulos dentinários infectados sob cavidades cariosas profundas na dentina, bem como pela via anacorética (BERGENHOLTZ, 1974; SUNDQVIST 1976; MOLVEN et al., 1991; SELTZER e FARBER, 1994; SIREN et al., 1997; ABOURASS & BOGEN, 1998).

ZAVISTOSKI et al. (1980) estudaram as infecções humanas de origem endodôntica, utilizando uma metodologia que permitiu avaliar, quantitativamente, os isolados microbianos recuperados de canais radiculares infectados. Os resultados demonstraram a média de seis espécies microbianas distintas por SCR infectado, com os anaeróbios perfazendo cerca de 2/3 dos isolados. A concentração bacteriana média foi de $10^{7,7}$ UFC/mL, comparável à concentração bacteriana verificada em outros sítios anatômicos, na presença de infecção.

Sabe-se que mais de 300 espécies bacterianas são reconhecidas como habitantes indígenas da cavidade oral. Entretanto, no SCR, esse número pode variar entre uma e 12 espécies, e a concentração de células bacterianas recuperadas está entre 10^2 a 10^8 UFC/mL (SUNDQVIST, 1992 a).

Os microrganismos são capazes de sobreviver, tanto no canal principal como nos túbulos dentinários e canais acessórios, bem como aderidos à superfície radicular, invadindo o cimento ou ainda no interior da lesão periapical (AKPATA & BLECHMAN, 1982; BYSTRÖM et al., 1987; NAIR et al. 1990; OGUNTEBI, 1994; LEONARDO et al. 1994; VIGIL, et al. 1997).

THILO et al. (1986) estudaram a microbiota dos SCR de 20 dentes humanos com necrose pulpar, utilizando microscopia de campo escuro. Observaram maior porcentagem de cocos e bastonetes no terço coronário; no terço apical, uma porcentagem ligeiramente mais

alta de bactérias filamentosas e espiroquetas, mas não significativa, e bastonetes móveis tanto no terço coronário como no apical. Segundo os pesquisadores, a hipótese mais provável, para se explicar esse grau de seletividade, pode estar relacionada a fatores ambientais, tais como a concentração de oxigênio e o pH. MOLVEN et al. (1991), em um estudo semelhante, observaram a presença de bastonetes, cocos e espiroquetas nos 2mm apicais de dentes portadores de necrose pulpar e lesão perirradicular.

DOUGHERTY et al. (1998), avaliando a presença de BPN, nos segmentos coronários e apicais do SCR infectado, verificaram que eles se encontravam em 67% dos casos, sendo a *P. nigrescens*, o microrganismo isolado com mais frequência em ambos os segmentos.

FUKUSHIMA, et al. (1990), avaliando, ao microscópio eletrônico de varredura, 21 ápices de dentes humanos, com patologia periapical assintomática, que já haviam sido submetidos previamente à obturação do SCR, verificaram que 60% deles continham bactérias entre o material obturador e a porção superior do forame apical. As bactérias não foram vistas na área do forame apical e nem na superfície do ápice radicular, sugerindo que, nestes casos, houve persistência de bactérias, que já colonizavam o SCR, antes ou durante o tratamento endodôntico. Em um estudo semelhante, utilizando dentes tratados endodonticamente, TRONSTAD et al. (1990) observaram a presença de microrganismos nas superfícies dos ápices radiculares e em todas as lesões periapicais após tratamento cirúrgico.

AKPATA & BLECHMAN (1982), após inocularem, em dentes humanos extraídos, amostras bacterianas recuperadas de canais radiculares humanos infectados (*Bacteroides melaninogenicus*, *Peptococcus asaccharolyticus*, *E. faecalis* e *Streptococcus sanguis*), observaram que a extensão da invasão bacteriana às paredes da dentina foi dependente do tempo e relacionou-se à taxa de crescimento dos microrganismos.

ANDO & HOSHINO et al. (1990) também investigaram a presença de bactérias invadindo as camadas profundas de dentina

infectada, “*in vitro*”. Os resultados mostraram um predomínio de anaeróbios obrigatórios, sendo os isolados mais frequentes, os bastonetes Gram-positivos, principalmente *Lactobacillus* e *Propionibacterium*, cocos Gram-positivos, principalmente os *Streptococcus*. Concluíram que a microbiota das camadas profundas de dentina assemelha-se àquela da dentina cariada.

Revisando a literatura sobre a infecção dos túbulos dentinários, após uma necrose pulpar, OGUNTEBI (1994) sugere que os microambientes, nesses sítios, pareceram favoráveis à seleção de poucos tipos bacterianos, independente da etiologia do processo infeccioso.

Uma das grandes dificuldades para se estudar os microrganismos, no interior de estruturas mineralizadas, refere-se à desmineralização que deve ser realizada. Geralmente, durante o procedimento histológico dos espécimes, utilizam-se soluções ácidas, que afetam a viabilidade e coloração dos microrganismos aí presentes. Esses procedimentos permitem a visualização de apenas uma em cada 15 bactérias Gram-positivas presentes nessas estruturas, causando ainda a completa destruição de bactérias Gram-negativas (WIJNBERGEN & VAN MULLEM, 1987; LEONARDO et al., 1994). MOREIRA JR. et al. (1999), utilizando dentes de camundongos convencionais, compararam a técnica tradicional de desmineralização ácida com a técnica de trituração dos dentes com posterior plaqueamento e incubação aeróbia e anaeróbia dos espécimes. Demonstraram que a utilização dessa última técnica levou à recuperação de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, enquanto a primeira recuperou apenas microrganismos Gram-positivos.

SIQUEIRA JR. et al. (1996) utilizaram em seus experimentos, dentes bovinos, por apresentarem túbulos dentinários semelhantes aos de dentes humanos. Avaliaram, “*in vitro*”, a invasão bacteriana nos túbulos dentinários, através de microscópio eletrônico de varredura. Observaram que as linhagens bacterianas: *Porphyromonas endodontalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces*

israeli, *Porphyromonas gingivalis*, *Propionibacterium acnes* e *E. faecalis*, inoculadas no SCR, foram capazes de penetrar nos túbulos dentinários em diferentes profundidades.

Um outro estudo, “*in vitro*”, realizado para verificar a capacidade invasiva de bactérias, em túbulos dentinários de dentes humanos, foi realizado por BERKITTEN et al. (2000). Os resultados revelaram que o *Streptococcus sanguis* penetrou nos túbulos dentinários em cerca de 382,3 µm, enquanto a *Prevotella intermedia* penetrou em 25,9 µm.

A presença e localização de bactérias, no interior de lesões periapicais, vem sendo objeto de muitos estudos. Entretanto, os resultados apresentados são, algumas vezes, divergentes, o que pode estar relacionado às técnicas utilizadas na recuperação dos microrganismos.

WALTON & ARDJMAND (1992) induziram a formação de lesões perirradiculares em dentes de macacos. Para tal, as polpas foram expostas à cavidade oral e fechadas após uma semana. O desenvolvimento dessas lesões foi avaliado longitudinalmente, pelo exame radiográfico, por um período de sete meses, quando os animais foram sacrificados. Toda a lesão e os tecidos adjacentes foram removidos e avaliados histologicamente. Os resultados demonstraram que as bactérias foram encontradas em regiões, apresentando tecido necrótico, ao longo do canal radicular, mas não na região periapical. Os autores sugeriram que massas bacterianas, presentes no forame apical, poderiam contaminar os tecidos periapicais durante os procedimentos cirúrgicos, dando resultados falso-positivos.

WAYMAN et al. (1992) examinaram 58 lesões periapicais, após remoção cirúrgica, e todos os casos foram submetidos a avaliação histológica e microbiológica. Verificaram crescimento microbiano em 24 de 29 lesões periapicais (83%) que se comunicavam com a cavidade oral e, em 27 de 29 (93%) lesões, em que não havia essa comunicação. Dos 58 casos, 17 apresentaram espécies de *Bacteroides*, em di ou poliassociações.

Estudos mais recentes, como os de VIGIL et al. (1997), revelaram que 79% das amostras de tecidos apicais de dentes que apresentavam alterações perirradiculares refratárias ao tratamento endodôntico continham, em seu interior, microrganismos. Nos casos em que as lesões apresentavam comunicação detectável com a cavidade oral, os microrganismos prevalentes foram: *Wolinella recta*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus intermedius*. Quando não se pôde verificar tal comunicação, as espécies predominantes foram: *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus intermedius*.

ABOU-RASS & BOGEN (1998) também avaliaram a presença de espécies bacterianas em dentes humanos com lesões periapicais, que estavam associadas a tratamentos endodônticos refratários e às calcificações pulpares. Os resultados mostraram que, das 13 lesões periapicais avaliadas, oito apresentaram poliassociações microbianas em seu interior e cinco apresentavam um único isolado microbiano. Dos microrganismos recuperados da região apical, 63,3% foram microrganismos anaeróbios obrigatórios e 36,4% anaeróbios facultativos.

KIRYU et al. (1994) verificaram a ocorrência de espécies microbianas no cimento periapical de dentes portadores de alterações perirradiculares. Demonstraram, também, que os microrganismos foram recuperados de todas as dez lesões estudadas; mas, em apenas dois dentes, estiveram presentes no interior do cimento radicular. Os microrganismos mais comumente isolados do cimento foram os anaeróbios estritos do gênero *Prevotella*, *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium* e os anaeróbios facultativos do gênero *Campylobacter*.

Na cavidade oral, os tecidos são expostos a uma grande variedade de microrganismos, que mantêm uma relação de equilíbrio com o hospedeiro sem causar doença. A natureza anfibiônica da microbiota presente na cavidade oral permite que um indivíduo conviva com esses microrganismos sem que uma patologia se instale.

Contudo, a relação de equilíbrio poderá ser interrompida, dependendo de fatores como: número e virulência dos microrganismos, resistência do hospedeiro, bem como da anatomia da área envolvida, (INGLE & ZELDOW 1963; UMEMOTO, 1995).

O tecido periapical normal consiste de ligamento periodontal, osso alveolar, que são altamente vascularizados, e cemento radicular apical. Como consequência da necrose pulpar, o SCR torna-se propício para abrigar bactérias e suas toxinas. Dependendo da natureza e quantidade desses antígenos, do tempo de exposição dos tecidos periapicais à ação dos mesmos, uma variedade de alterações teciduais pode ocorrer (TORABINEJAD et al., 1985).

As espécies bacterianas presentes nos SCR infectados, incluem um grupo restrito de espécies comparado à microbiota oral (SUNDQVIST, 1992 b; LANA et al., 2001). Isso se deve a mecanismos seletivos que operam no interior do SCR, favorecendo o crescimento de algumas espécies, e limitando o de outras. Essa seleção estabelece uma predominância de bactérias anaeróbias estritas em relação às facultativas, inferindo-se que, muito provavelmente, esses microrganismos desempenham importante papel no desenvolvimento das periodontites apicais (FABRICIUS et al., 1982 a, b).

Os estudos de FABRICIUS et al. (1982 a, b), referentes a dinâmica das infecções endodônticas em SCR, demonstraram que a proporção relativa de linhagens bacterianas anaeróbias estritas, em canais radiculares fechados, aumentou com o tempo, enquanto as bactérias anaeróbias facultativas foram recuperadas em maior número nos períodos iniciais de observação. Esses pesquisadores observaram que os *Bacteroides* foram dominantes nos canais radiculares em que se encontravam associados a outras espécies bacterianas, mas, quando inoculados, separadamente, nos SCR dos animais, foram incapazes de se implantar. Esses experimentos e os de TANI-ISHI et al. (1994) mostraram que o ambiente endodôntico é um habitat seletivo que permite o desenvolvimento de proporções específicas da microbiota anaeróbia.

De acordo com SUNDQVIST (1992 a b), existem fatores que podem influenciar o crescimento bacteriano e sua colonização em um dado SCR. Alguns desses fatores são abióticos, como: a disponibilidade de nutrientes e/ou a baixa tensão de oxigênio presente em canais radiculares com polpas necróticas. Outros são bióticos, como: as interações bacterianas, que podem ser cooperativas (sinergismo) ou competitivas (produção de substâncias antagonistas). Esse pesquisador analisou as associações entre espécies bacterianas isoladas dos SCR de dentes com lesões periapicais, observou, também, que a espécie mais frequentemente isolada foi o *Fusobacterium nucleatum* (48%) estando associado positivamente, com *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas endodontalis*, *Selenomonas sputigena* e *Campylobacter rectus*. A *Prevotella intermedia* estava presente em 34% dos casos e associou-se positivamente com *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius* e espécies de *Eubacterium*. *Eubacterium* associava-se positivamente, com espécies de *Peptostreptococcus*, enquanto *Porphyromonas endodontalis* associou-se, positivamente, com *Fusobacterium nucleatum*.

Os nutrientes disponíveis no interior do SCR são provenientes de fluidos teciduais e da desintegração de células e outros componentes do tecido conjuntivo (SUNDQVIST, 1992 b).

TER STEEG & VAN DER HOEVEN (1989) estudaram a sucessão de espécies microbianas provenientes da placa subgingival. Três etapas puderam ser determinadas: Inicialmente, observaram que a baixa quantidade de carboidratos disponível nos fluidos teciduais foi rapidamente consumida pelas bactérias sacarolíticas produtoras de ácidos láctico e fórmico; em uma segunda fase, intermediária, os carboidratos remanescentes foram utilizados, havendo a hidrólise de proteínas e fermentação de aminoácidos. Nessa fase, o crescimento foi dominado pelas espécies de *Prevotella intermedia*, *Eubacterium* sp, *Fusobacterium nucleatum*. Na fase final, ocorreu extensa degradação de proteínas e fermentação de aminoácidos. As bactérias

predominantes, aí foram: *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum* e *Eubacterium*.

Além desses determinantes ecológicos, outros são, também, de importância, como: pH, temperatura, resistência do hospedeiro e a presença de agentes antimicrobianos e inibidores (GOMES et al., 1996)

RIBEIRO SOBRINHO et al. (1998) utilizando-se camundongos isentos de germes (IG) e convencionais (CV), observaram a capacidade, apresentada por algumas espécies bacterianas, de colonizar os SCR desses animais. Nesse estudo, espécies bacterianas, de referência (ATCC), anaeróbias obrigatórias como: *Porphyromonas endodontalis*, *Eubacterium lentum*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Fusobacterium nucleatum*, e anaeróbias facultativas como: a *Escherichia coli* e o *E. faecalis* foram inoculados nos SCR. Essas espécies foram inoculadas em monoinfecção e diassociação. A implantação de bactérias anaeróbias facultativas e de *Peptostreptococcus anaerobius* ocorreu em ambos os grupos de camundongos (CV e IG) quando inoculadas isoladamente. Entretanto, a espécie *Eubacterium lentum* implantou-se em monoinfecção, apenas nos animais CV. Tanto *Porphyromonas endodontalis* quanto *Fusobacterium nucleatum* não se implantaram em ambos os grupos de animais, quando inoculados isoladamente ou em associação com dois microrganismos anaeróbios facultativos.

Segundo BAUMGARTNER et al. (1992), os isolados clínicos, aparentemente, expressam fatores de virulência diferentes dos observados em linhagens de referência (ATCC). Esses pesquisadores observaram, em um modelo de infecção, utilizando camundongos, que o *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC) não foi patogênico, enquanto que um recente isolado clínico desse microrganismo foi significativamente mais patogênico.

De fundamental importância, no estudo da microbiota do SCR, é o conhecimento da sua taxionomia. Ela possibilita o conhecimento preciso das bactérias ou combinações bacterianas, que desempenham papéis chave na progressão das doenças, das

bactérias resistentes à terapia endodôntica convencional ou bactérias implicadas nos tratamentos mal sucedidos. Muitos microrganismos são, continuamente, descobertos, e algumas espécies, já descritas, foram reclassificadas. Como exemplo, temos os bastonetes anaeróbios Gram-negativos pigmentados de negro: as espécies sacarolíticas foram reclassificadas em um novo gênero *Prevotella*, e as assacarolíticas em *Porphyromonas* (SUNDQVIST, 1994).

A *Prevotella intermedia* foi a bactéria, produtora de pigmentação negra, mais comumente isolada de infecções de origem endodôntica. Entretanto, GHARBIA et al. (1994) mostraram que 11 dos 15 isolados endodônticos, originalmente identificados como *P. intermedia*, eram, na verdade, uma espécie atualmente conhecida como *P. nigrescens*. Sustentando essas observações, BAE et al. (1997) utilizando metodologia sofisticada, relataram que a *P. nigrescens* e não a *P. intermedia* é a bactéria produtora de pigmento negro mais freqüentemente isolada, de infecções de origem endodôntica. DOUGHERTY et al. (1998) identificaram a presença de BPN em 12 de 18 SCR infectados, sendo que, desses 12, 10 continham *P. nigrescens*. BAUMGARTNER et al. (1999), testando a eficácia de dois métodos utilizados para diferenciar *P. intermedia* de *P. nigrescens*, confirmaram que essa última foi a espécie mais comumente isolada de infecções endodônticas.

2.2.2 Patogenicidade da Microbiota do SCR Infectados

Os anaeróbios se encontram em diversos sítios do corpo humano, perfazendo a microbiota residente do indivíduo. Certas condições são necessárias para que eles se tornem patógenos, como: baixo potencial de oxi-redução, sinergismo bacteriano, suplemento nutricional, dentre outros fatores (SILVER, 1980).

A maioria dos constituintes da microbiota oral que infectam o SCR tem capacidade de iniciar uma alteração periapical e, portanto, podem ser considerados como anfíbios. Isso foi bem exemplificado pelos estudos de FABRICIUS et al. (1982 b), ao demonstrarem que bactérias, presentes no SCR infectado, de dentes de macacos, foram capazes de induzir reações periapicais. Verificaram que essas reações eram mais potentes na presença de certas combinações bacterianas quando comparadas às linhagens individuais. O mesmo foi observado por SUNDQVIST et al (1979), quando demonstraram a capacidade de bactérias isoladas, dos SCR, de dentes portadores de lesões periapicais, de induzir abscessos e infecções transmissíveis, ao serem inoculadas em tecidos subcutâneos de cobaias.

Muitos pesquisadores correlacionaram os sinais e sintomas de patologias pulpoperirradiculares à presença de algumas espécies microbianas, dentre elas: *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella oralis*, *Eubacterium lentum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella buccae*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis* (SUNDQVIST, 1976; FABRICIUS et al., 1982 b; VAN WINKELHOFF et al., 1985; HAAPASALO et al., 1989; GOMES et al., 1994, 1996 a,b; SIQUEIRA JR. et al., 1998; BAUMGARTNER et al., 1999; OLIVEIRA et al. 2000).

MÖLLER et al.(1981) utilizaram um protocolo de indução de necrose pulpar em dentes de macacos. Os dentes que sofreram essa indução foram divididos em dois grupos: no primeiro, após a indução

de necrose pulpar, não houve contaminação dos SCR; no segundo, após essa indução, os dentes foram expostos à cavidade oral para que ocorresse a infecção da cavidade endodôntica. Após um período de seis a sete meses, verificaram que nos dentes com tecido pulpar necrótico, não infectado, não havia a presença de reações inflamatórias nos tecidos apicais, enquanto que, nos canais radiculares infectados observaram-se alterações teciduais na região apical, assim como, alterações, radiograficamente, visíveis.

HAAPASALO (1989), estudando a bacteriologia de 62 canais radiculares de dentes unirradiculares infectados, demonstrou que, com exceção de uma monoinfecção por *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, todos os casos eram infecções mistas causadas por bactérias anaeróbias estritas. Os *Bacteroides* spp. (atualmente BPN) foram os isolados mais freqüentes. 78 linhagens de BPN foram encontradas em 45 canais radiculares, sendo que, em 19 houve somente uma espécie de *Bacteroides*, e nos outros 26 canais radiculares, duas a quatro espécies diferentes de microrganismos desse gênero. Uma ou mais espécies de outro gênero estiveram sempre presentes quando os *Bacteroides* foram encontrados. As espécies *Bacteroides buccae*, *Bacteroides gingivalis* e *Bacteroides endodontalis*, foram encontradas quase que, exclusivamente, em infecções agudas. Essas observações sugeriram que a infecção aguda do SCR seria resultante do sinergismo de uma microbiota infectante mista, em que certas espécies poderiam ter um papel chave no desenvolvimento da fase aguda.

SUNDQVIST et al.(1989) recuperaram BPN em 22 SCR (30%) de dentes portadores de necrose pulpar e periodontite apical. O número médio de células bacterianas recuperado do SCR, contendo BPN, foi de $2,8 \times 10^5$ e, nos outros 50 SCR, esse número foi de $3,0 \times 10^3$. As espécies, mais freqüentemente isoladas, foram o *Bacteroides intermedius* (14 linhagens) e o *Bacteroides endodontalis* (cinco linhagens). Nos 22 canais radiculares, em que os BPN estavam presentes, seis (27,2%) não apresentavam sintomas clínicos. Nos demais canais radiculares (16 – 72,7%), observou-se a presença de

abscessos apicais agudos com drenagem via canais radiculares. Desses, 11 (68,7%) apresentaram abscesso apical agudo no início do tratamento e cinco (31,2%) desenvolveram abscesso, seguindo o tratamento. Esses resultados sugeriram que os BPN estavam implicados no desenvolvimento de abscessos apicais agudos, mas não existiu uma absoluta correlação entre os achados. Segundo os pesquisadores, alguns fatores poderiam estar relacionados com o desenvolvimento de abscessos, pós-tratamento, nos dentes portadores de BPN, como: a técnica de instrumentação, o número de células, bem como as demais espécies bacterianas presentes nos SCR.

Os anaeróbios têm um importante papel no desenvolvimento e perpetuação das patologias endodônticas. STASHENKO et al.(1992), utilizando o modelo proposto por KAKEHASHI, de indução de lesões periapicais em ratos, observaram que houve uma rápida expansão da lesão e destruição óssea periapical, entre um e 15 dias após a infecção (fase ativa), com expansão, significativamente, mais lenta após esse período (fase crônica). Esses resultados foram também observados por TANI-ISHII et al. (1994), que estudaram as mudanças que ocorreram na microbiota do SCR na fase ativa do desenvolvimento das lesões periapicais. Até o sétimo dia, antes do desenvolvimento da lesão, houve um predomínio de *Streptococcus*, enquanto os *Bacteroides* predominaram em poucos canais radiculares. No décimo quinto dia a microbiota foi caracterizada por níveis altos de *Streptococcus*, a presença de *Neisseria* e *Peptostreptococcus*, e pela frequência aumentada de *Bacteroides*. Esses dados demonstram que a emergência de uma microbiota anaeróbia e Gram negativa correlacionou-se, longitudinalmente, com o período de expansão rápida da lesão periapical.

YAMASAKI et al. (1994), em um trabalho semelhante aos de STASHENKO et al. (1992) e TANI-ISHII et al. (1994), expuseram polpas de molares de ratos ao ambiente oral, mantendo-as abertas até o momento de sacrificá-los, o que foi realizado nos períodos de 1, 3, 7, 14, 21, 28, 42 e 56 dias após a exposição pulpar. Observaram

que a expansão máxima da lesão periapical ocorreu entre o 7º e o 14º dia. Sugeriram que a invasão de bactérias anaeróbias, a necrose pulpar e a formação de lesões periapicais ocorreram nesse período. Já os estudos de FOUAD et al. (1992) mostraram que as lesões perirradiculares, induzidas em doninhas, foram observadas, radiograficamente, somente após 4 semanas. As bactérias presentes nos SCR necróticos, ocasionalmente penetraram nos túbulos dentinários e, em somente um caso, foram recuperadas da lesão periapical.

Nas últimas décadas, as pesquisas não se limitaram apenas ao papel dos anaeróbios obrigatórios na infecções pulpoperirradiculares, mas também ao de suas enzimas, endotoxinas, substâncias metabólicas e componentes antigênicos (MORSE, 1981; SUNDQVIST et al.1989; STASHENKO et al.1992; GOMES et al., 1994, 1996 c; TAKAHASHI & YAMADA, 2000).

2.2.3 Papel do Preparo Mecânico–Químico na Redução do Número de Microrganismos do SCR

Há um consenso entre os vários pesquisadores, de que as bactérias desempenham um papel relevante no desenvolvimento das lesões periapicais (KAKEHASHI et al., 1975; AKPATA, 1976; MÖLLER et al., 1981; BERGENHOLTZ, 1974; WITTGOW & SABISTON, 1975; SUNDQVIST, 1976; FABRICIUS et al., 1982 (a, b); BYSTRON & SUNDQVIST, 1983; HAAPASALO, 1989; NAIR et al., 1990; TANI-ISHI et al., 1994; SUNDQVIST et al., 1998; LANA et al., 2001). Sendo assim, o objetivo do tratamento endodôntico é a eliminação de infecção presente no SCR e a prevenção de sua reinfecção.

O tratamento endodôntico pode, contudo, falhar, e as causas dos fracassos são ainda grandemente especulativas. Vários fatores locais e sistêmicos contribuem para o insucesso do tratamento endodôntico. Dentre esses, enumeram-se: as infecções persistentes dos SCR, procedimentos endodônticos insatisfatórios, instrumentos fraturados, obturações incompletas ou sobre-obturações; além de certas características morfológicas do dente, que podem dificultar os procedimentos endodônticos. Contudo, o que afeta, mais decisivamente, o resultado, a longo prazo, do tratamento endodôntico é a persistência de infecção no SCR (BYSTRÖM et al., 1987; SJÖGREN et al., 1990; NAIR et al., 1990; SUNDQVIST et al., 1998).

Uma vez constatado que o tecido pulpar necrótico e infectado atua, como irritante contínuo, nos tecidos periapicais, além de ser um importante fator nutricional, na colonização do SCR, torna-se óbvio o seu correto saneamento. (CARLSSON & SUNDQVIST, 1980; PITTFORD, 1982; KLEVANT & EGGINK, 1983; BYSTRÖM & SUNDQVIST, 1983; HAAPASALO, 1989; MALTOS, 1990; SIQUEIRA JR. et al., 1997a).

A importância do preparo mecânico–químico, como principal método empregado na redução de populações bacterianas, nos SCR

infectados, foi constatada em experimentos, “*in vitro*” e “*in vivo*”, que demonstraram sua eficácia (AKPATA, 1976; BYSTRÖM & SUNDQVIST, 1981 e 1983; BARNETT et al. 1985; MALTOS 1990; GOMES et al., 1996 c; SIQUEIRA JR. et al., 1997a, b, 1999; TROPE et al., 1999; LANA, et al., 2001). Segundo AKPATA (1976), apesar de não se alcançar a “esterilidade” do SCR, utilizando-se tais procedimentos, os microrganismos residuais são reduzidos a um pequeno número, tornando-se incapazes de promover a reinfecção.

Muitas técnicas de instrumentação, tipos de soluções anti-sépticas e medicações intracanaais vêm sendo propostas para se conseguir a eliminação dos microrganismos presentes em SCR (BYSTRÖM & SUNDQVIST, 1983; BARNETT et al. 1985; DE DEUS, 1992; SIQUEIRA JR. et al., 1997 a, b, 1999). Entretanto, apesar do preparo mecânico-químico reduzir, significativamente, a microbiota em SCR infectados, nos momentos subseqüentes à instrumentação, se houver condições favoráveis, o crescimento de microrganismos remanescentes poderá ocorrer. Além disso, certos microrganismos são considerados mais difíceis de ser eliminados do SCR. Segundo alguns estudos, o *E. faecalis* é o microrganismo mais freqüentemente implicado em casos de infecções persistentes dos SCR (GOMES et al., 1996 ; SIREN et al., 1997; MOLANDER et al., 1998; SUNDQVIST et al., 1998; NODA, et al. 2000).

Nesse contexto, WINKLER & AMEROGEN (1959) demonstraram a necessidade de se desenvolver um método que permitisse melhor avaliação quantitativa da microbiota presente no SCR de dentes infectados. CARLSSON & SUNDQVIST (1980) relataram que o objetivo de uma investigação bacteriológica dos SCR seria detectar qualquer infecção, mas que, o método ideal deveria, também demonstrar o número e o tipo de bactérias presentes. E, ZAVISTOSKI et al. (1980) atribuíram a escassez desses estudos à pequena quantidade de material, para cultura, que se consegue recuperar do SCR infectado.

2.3 TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

Desde muito cedo, os bacteriologistas almejavam saber se as bactérias indígenas, pertencentes à microbiota do intestino, poderiam atravessar a barreira intestinal, atingindo outros órgãos e se bactérias viáveis poderiam estar presentes em tecidos vivos saudáveis (BERG, 1983).

BERG & GARLINGTON (1979) observaram que a passagem de bactérias do trato gastrointestinal para outros sítios não era comum, ocorrendo somente quando havia alterações na permeabilidade da parede intestinal. O referido fenômeno levou a denominação de translocação bacteriana. Esse termo foi definido, posteriormente, como a passagem de bactérias indígenas viáveis de um dado sítio para outro, sem sugerir os mecanismos envolvidos.

Posteriormente, BERG (1995) identificou três mecanismos primários responsáveis pela translocação de bactérias indígenas do trato gastrointestinal para linfonodos mesentéricos e outros órgãos como, por exemplo, baço, fígado e rins. Esses mecanismos incluem: a) desequilíbrio ecológico microbiano; b) deficiência nas defesas imunológicas do hospedeiro; c) rompimento de barreiras físicas.

Para se reproduzir esse fenômeno e estudar a sua ocorrência, muitos pesquisadores têm utilizado animais gnotobióticos. Os animais IG favorecem a colonização de uma ou mais espécies de bactérias, permitindo interações entre o hospedeiro e uma microbiota simplificada. (BERG, 1996).

Em animais convencionais adultos saudáveis, várias bactérias indígenas translocam do trato gastrointestinal, porém, em concentrações muito baixas, permitindo sua eliminação pelas defesas imunológicas do hospedeiro BERG (1995). A ausência de uma microbiota residente em camundongos isentos de germes permite que, ao se inocular microrganismos específicos nesses animais, os mesmos alcancem altas concentrações no trato gastrointestinal. Esse fenômeno pode ser um dos responsáveis pelas altas incidências de

translocação observada em animais gnotobióticos (STEFFEN & BERG 1983).

RIBEIRO SOBRINHO et al. (2001), em um estudo prévio, avaliaram a capacidade de espécies bacterianas, recuperadas do SCR de dentes humanos infectados, de se implantarem nos SCR de camundongos IG e translocarem para linfonodos submandibulares. Os dois grupos microbianos utilizados foram: Grupo I: *Gemella morbillorum*, inoculada isoladamente, e Grupo II: *Bifidobacterium adolescentis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Clostridium butyricum*, inoculados em tri-associação. Esses dois grupos foram, assim, inoculados nos SCR de camundongos IG. As espécies do Grupo II foram também inoculadas separadamente. Os resultados mostraram que a *Gemella morbillorum*, um anaeróbio aerotolerante, apresentou o mais alto índice de implantação nos SCR e translocação para os LSM, em relação às outras espécies, em todos os períodos de observação. No grupo II, observou-se a implantação apenas das espécies *Fusobacterium nucleatum* e *Clostridium butyricum*. As três espécies do grupo II, quando em monoinfecção, foram capazes de se implantar e translocar para os LSM. Contudo, as três espécies não foram recuperadas do LSM no décimo dia do experimento. Esse estudo demonstrou que microrganismos, originados de infecções endodônticas, são capazes de se implantar nos SCR de camundongos IG, e que o fenômeno da translocação, detectado por BERG, no trato gastrointestinal, também pode ocorrer nessas infecções.

Os procedimentos invasivos aos tecidos orais, como: exodontias, tratamentos periodontal e endodôntico, dentre outros, podem levar à translocação dos microrganismos da cavidade oral para os vasos sanguíneos e vasos linfáticos (BENDER et al., 1963; DEBELIAN et al., 1994; RIBEIRO SOBRINHO et al., 2001).

DEBELIAN et al. (1992) estudaram a ocorrência de bacteremia, após tratamento endodôntico de dentes unirradiculares, com diagnóstico de periodontite apical assintomática. Quatro pacientes foram incluídos nesse estudo; em dois deles, os canais radiculares foram instrumentados a 2mm além do forame apical, e nos

outros dois a 1mm aquém. Verificaram que as bactérias anaeróbias obrigatórias foram recuperadas de três canais radiculares, e as anaeróbias facultativas em somente um. Nos casos de sobre-instrumentação do canal radicular, a espécie *Propionibacterium acnes* foi recuperada tanto do canal radicular quanto das amostras de sangue colhidas durante e após o tratamento.

A probabilidade desses tratamentos induzirem bacteremia depende da concentração e virulência dos microrganismos presentes no biofilme dentário, do estado clínico dos tecidos gengivais, além da presença de abscessos periodontais e/ou periapicais. Se esses microrganismos encontrarem condições que favoreçam a sua adesão, poderão se multiplicar, levando o paciente a sérios riscos (DEBELIAN et al., 1994; DAJANI et al., 1997).

A translocação bacteriana tem sido demonstrada em uma variedade de modelos animais, porém, há pequena evidência em humanos. Sua relevância clínica é motivo de debates, uma vez que pode ser um importante passo na patogênese das infecções oportunistas em pacientes debilitados (BERG, 1995).

3 METODOLOGIA

Este estudo foi dividido em duas etapas: clínica e microbiológica.

3.1 Etapa Clínica

3.1.1 Animais

Neste experimento, utilizaram-se 72 camundongos isentos de germes, com um mês de idade e de ambos os sexos (Swiss/NIH – ICB Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil). Os animais IG estavam acondicionados em isoladores, tipo Trexler (Class Biologically Clean, Madison WI, USA) e, transferidos para microisoladores (UNO Roestvastaal BV, Zevenaar, The Netherlands) no momento do experimento. Foram alimentados com dieta comercial esterilizada para roedores (Nuvital, Curitiba, PR, Brasil) *ad libitum*. Todas as manipulações ocorreram sob condições de esterilidade, em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, SP, Brasil) (FIGURA1).

3.1.2 Anestesia

Antes de qualquer procedimento, os animais foram anestesiados intraperitonealmente utilizando-se 35 mg/Kg de pentobarbital associado a 25 µg/Kg de Fentanil, administrados separadamente, com seringas tipo PPD (RIBEIRO SOBRINHO et al., 2001).

3.1.3 Instrumentação do Sistema de Canais Radiculares

A coroa clínica do incisivo central inferior direito foi removida no nível cervical, utilizando-se uma broca tronco-cônica diamantada acoplada a uma peça de mão de baixa rotação (Driller, São Paulo, Brasil). Posteriormente, uma broca esférica de aço (1/4) foi utilizada para se ter acesso ao canal radicular. O cateterismo foi realizado utilizando-se uma lima tipo K # 10 que, em seguida, foi conectada a um localizador eletrônico de ápice (Morita, OSADA, Japão) para se definir o comprimento do canal radicular (FIGURA 2 e 3).

A instrumentação, propriamente dita, foi realizada utilizando-se instrumentos rotatórios # 1 e # 2 (Sistema Profile) com uma rotação de 300rpm, associada a uma solução salina como irrigante (FIGURA 4).

Concluída essa fase, o canal radicular foi seco com pontas estéreis de papel absorvente e, inoculado com o *E. faecalis* e *P. nigrescens*, como descrito no item 3.2.5. Após esse procedimento, o orifício do canal foi selado com porções de parafina aquecidas e condensadas com o auxílio de um condensador FM, acoplado a uma fonte de calor (System B, Anality Technology – USA), para manter o inóculo no interior do SCR.

Todos os instrumentais foram esterilizados em autoclave, e todos os produtos químicos apresentavam alto grau de pureza.

FIGURA 1 – Fluxo Laminar, Microisolador e Camundongos IG

FIGURA 2 –Incisivos centrais inferiores de camundongos IG

FIGURA 3 – Localização do canal radicular

FIGURA 4 – Instrumentação do Incisivo central

3.2 Etapa Microbiológica

3.2.1 Microrganismos

Os microrganismos inoculados no sistema de canais radiculares dos camundongos IG foram as amostras de referência *P. nigrescens* (ATCC 33563) e *E. faecalis* (ATCC 4083).

3.2.2 Recuperação das amostras bacterianas

As amostras foram mantidas em freezer a -86°C , e sua recuperação foi feita utilizando-se *Brain Heart Infusion* suplementado com extrato de levedura, hemina e menadiona – BHI-S (Difco). Os caldos, contendo as amostras de *P. nigrescens* e *E. faecalis*, foram incubados a 37°C , em câmara de anaerobiose contendo atmosfera de 85% de N_2 , 10% de H_2 e 5% de CO_2 (Forma Scientific, Inc., Marietta, OH, USA) por 48 horas e em estufa bacteriológica, por 24 horas, respectivamente. Decorrido esse tempo de incubação, as amostras foram repicadas em *Brain Heart Infusion Agar*, suplementado com sangue de carneiro, extrato de levedura, hemina e menadiona – BHIA-S (Difco) (HOLDEMAN & MOORE, 1977; SUTTER et al., 1980).

3.2.3 Preservação das amostras recuperadas

Após a confirmação, pelo método de coloração de Gram, da pureza das amostras recuperadas, elas foram mantidas em câmara de anaerobiose, para a *P. nigrescens*, e em estufa bacteriológica, para o *E. faecalis*. A cada 15 dias, novos repiques foram realizados para manutenção da viabilidade bacteriana. Durante toda a fase experimental, as bactérias utilizadas foram, também, mantidas em freezer a -86°C em BHI-S, contendo 10% de glicerol.

3.2.4 Obtenção do inóculo

Os microrganismos, *E. faecalis* e *P. nigrescens*, foram repicados em placas de BHIA-S e incubados a 37°C, em estufa bacteriológica por 24 h e em câmara de anaerobiose por 48 h, respectivamente. Após este período confirmou-se a pureza das amostras pelo método de coloração de Gram quando, então, novos repiques foram realizados em caldo de BHI-S e incubados nas condições ideais para o crescimento dos microrganismos. Confirmado esse crescimento, realizou-se diluições seriadas, 10^{-7} a 10^{-1} , das quais retirou-se 100µl, esgotando este conteúdo sobre placas de agar BHI-S que foram incubadas nas respectivas condições ideais de sobrevivência das amostras. Posteriormente, realizou-se as contagens das UFC. Para o *E. faecalis*, esta contagem foi de $1,44 \times 10^9$ UFC/mL e, para a *P. nigrescens*, $3,36 \times 10^8$ UFC/mL. De posse destes dados, o inóculo foi obtido diluindo-se as amostras crescidas em caldo BHI-S, ajustando a diluição para um volume de 25 µl que foi inoculado no SCR dos animais.

3.2.5 Inoculação bacteriana

Os dois microrganismos selecionados foram inoculados separadamente nos SCR dos animais, em concentrações celulares diferentes. Para o *E. faecalis*, selecionou-se as concentrações 10^1 e 10^2 UFC/25µl e, para a *P. nigrescens*, as concentrações de 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 UFC/25µl (Tabela 1). Para cada concentração microbiana estabelecida, utilizou-se 12 camundongos IG.

Tabela 1 – Concentrações de *E. faecalis* e *P. nigrescens* inoculadas nos SCR de Camundongos Gnotobióticos.

Microrganismo	Concentração do inóculo UFC/25 μ l
<i>E. faecalis</i>	10 ²
<i>E. faecalis</i>	10 ¹
<i>P. nigrescens</i>	10 ⁵
<i>P. nigrescens</i>	10 ⁴
<i>P. nigrescens</i>	10 ³
<i>P. nigrescens</i>	10 ²

3.2.6 Verificação da Implantação e Translocação Microbianas

A implantação e translocação microbianas foram avaliadas longitudinalmente, nos períodos de 2, 3, 6 e 10 dias, após a inoculação dos microrganismos nos SCR dos animais (RIBEIRO SOBRINHO et al. 2001). Para cada período de avaliação, utilizaram-se três animais, que receberam a mesma dose microrganismo/concentração.

Nos períodos definidos, os animais foram sacrificados, os canais radiculares abertos, um cone de papel absorvente foi introduzido em seu interior, permanecendo aí por 60 segundos. Com o auxílio de uma pinça estéril, a semeadura foi realizada com o próprio cone, em meio BHIA-S e incubada nas condições ideais para crescimento das amostras utilizadas.

Posteriormente, o linfonodo submandibular, adjacente ao dente em questão, foi removido, assepticamente, triturado em solução salina fosfato tamponada, plaqueado em meio BHIA-S e incubado nas

condições ideais para crescimento das amostras utilizadas no presente estudo (RIBEIRO SOBRINHO et al. 2001).

Após a obtenção do crescimento bacteriano, os dois tipos morfológicos das bactérias inoculadas, *E. faecalis* e *P. nigrescens*, foram confirmados pelo método de coloração de Gram.

4 RESULTADOS

Como se observa na tabela 2, o *E. faecalis* implantou-se em 83,33% nas duas concentrações utilizadas. Contudo, a translocação foi mais freqüente (58,33%) quando o inóculo utilizado foi de 10^2 UFC, comparado ao inóculo de 10^1 UFC (33,33%).

Analisando-se, longitudinalmente, os dados, pôde-se observar que a implantação do *E. faecalis* apresentou um padrão uniforme, indiferentemente da concentração utilizada. A translocação, entretanto, apresentou resultados discrepantes apenas na fase inicial, quando a concentração foi de 10^1 UFC (Figura 5). Nos dias subsequentes, apresentou padrão semelhante (Figuras 5 e 6).

Tanto na implantação como na translocação do *E. faecalis* o seguinte fenômeno bifásico foi detectado: aumento de implantação nos 2º e 3º dias seguido de declínio nos 6º e 10º dias; aumento de translocação nos 3º e 6º dias com declínio nos 6º e 10º dias (Figuras 5 e 6).

Observou-se no 2º dia de avaliação que a implantação de *E. faecalis* ocorreu em 66% dos casos nas concentrações 10^1 e 10^2 UFC e 100% de translocação para o inóculo de 10^2 UFC e 0% para o inóculo de 10^1 UFC. Nos 3º e 6º dias, nas duas concentrações, houve 100% de implantação. Para as duas concentrações utilizadas, a translocação foi detectada em 33% no 3º dia e 66% no 6º dia. No 10º dia, houve implantação em 66% dos animais e 33% de translocação, para ambas as concentrações (Tabela 3).

A tabela 4 mostra que a *P. nigrescens* apresentou um índice cumulativo de 25% de implantação, quando a concentração utilizada foi de 10^5 UFC. Utilizando-se concentrações menores (10^4 , 10^3 e 10^2

UFC), observou-se que o índice de implantação cumulativo reduziu (16,67%, 8,33% e 0%, respectivamente) (Figura 7).

Ao avaliar implantação da *P. nigrescens* nos diferentes períodos, observou-se que, no 2º dia, a implantação ocorreu em 33% dos casos, para as concentrações de 10^4 e 10^5 UFC. Esta mesma proporção foi observada no 3º dia para a concentração de 10^3 UFC e, no 10º dia, para concentração de 10^4 UFC. A implantação ocorreu em 66% dos casos, no 10º dia, quando se utilizou um inóculo de 10^5 UFC (Tabela 5).

O fenômeno da translocação não foi observado em nenhum dos períodos avaliados (Tabela 5).

Tabela 2 – Porcentagem cumulativa de implantação de *E. faecalis* nos SCR de camundongos gnotobióticos e translocação para os linfonodos submandibulares, em diferentes concentrações de inóculo.

Concentração do inóculo (UFC/25µl)	Implantação/ (n=12) (%)		Translocação/ (n=12) (%)	
	+	–	+	–
10^2	10/12 (83,33)	2/12 (16,67)	7/12 (58,33)	5/12 (41,67)
10^1	10/12 (83,33)	2/12 (16,67)	4/12 (33,33)	8/12 (66,67)

ψ Os sinais positivos (+) ou negativos (-) significam que ocorreu ou não a implantação e/ou translocação

Tabela 3 – Porcentagem de implantação de *E. faecalis* no SCR de camundongos gnotobióticos e translocação para os linfonodos submandibulares, ao longo do tempo de avaliação.

Concentração do inóculo (UFC/25µl)	Animais Inoculados (n _{total} = 12)							
	Implantação/ (n=3) (%)				Translocação/ (n=3) (%)			
	2º D	3º D	6º D	10º D	2º D	3º D	6º D	10º D
10 ²	2/3 (66)	3/3 (100)	3/3 (100)	2/3 (66)	3/3 (100)	1/3 (33)	2/3 (66)	1/3 (33)
10 ¹	2/3 (66)	3/3 (100)	3/3 (100)	2/3 (66)	0/3 (0)	1/3 (33)	2/3 (66)	1/3 (33)

ψ D – Dia

Tabela 4 – Porcentagem cumulativa de Implantação de *P. nigrescens* nos SCR de camundongos gnotobióticos e translocação para os linfonodos submandibulares, em diferentes concentrações do inóculo.

Concentração do inóculo (UFC/25µl)	Implantação/ (n=12) (%)		Translocação(n=12) (%)	
10 ⁵	+	–	+	–
	3/12 (25)	9/12 (75)	0/12 (0)	12/12 (100)
10 ⁴	+	–	+	–
	2/12 (16,67)	10/12 (83,33)	0/12 (0)	12/12 (100)
10 ³	+	–	+	–
	1/12 (8,33)	11/12 (91,67)	0/12 (0)	12/12 (100)
10 ²	+	–	+	–
	0/12 (0)	12 /12 (100)	0/12 (0)	12/12 (100)

ψ Os sinais positivos (+) ou negativos (-) significam que ocorreu ou não a implantação e/ ou translocação

Tabela 5 – Porcentagem de implantação de *P. nigrescens* no SCR de camundongos gnotobióticos e translocação para os linfonodos submandibulares, ao longo do tempo de avaliação.

Concentração do inóculo (UFC/25µl)	Animais Inoculados (n _{total} = 12)							
	Implantação/ (n=3) (%)				Translocação/ (n=3) (%)			
	2º D	3º D	6º D	10º D	2º D	3º D	6º D	10º D
10 ⁵	1/3 (33)	0/3 (0)	0/3 (0)	2/3 (66)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)
10 ⁴	1/3 (33)	0/3 (0)	0/3 (0)	1/3 (33)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)
10 ³	0/3 (0)	1/3 (33)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)
10 ²	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)

ψ D – Dia

FIGURA 5 - Implantação de *Enterococcus faecalis* no SCR de camundongos gnotobióticos inoculados com 10^1 UFC e translocação para linfonodos submandibulares

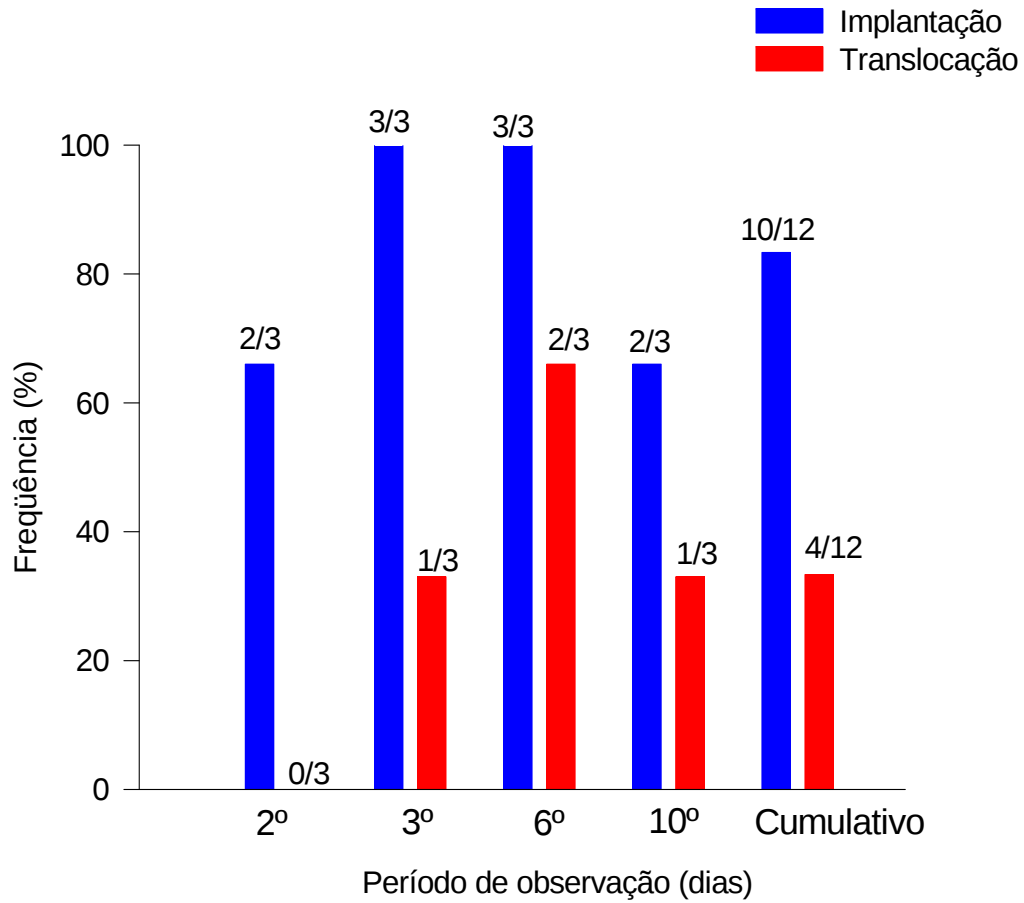


FIGURA 6 - Implantação de *Enterococcus faecalis* no SCR de camundongos gnotobióticos inoculados 10^2 UFC e translocação para linfonodos submandibulares

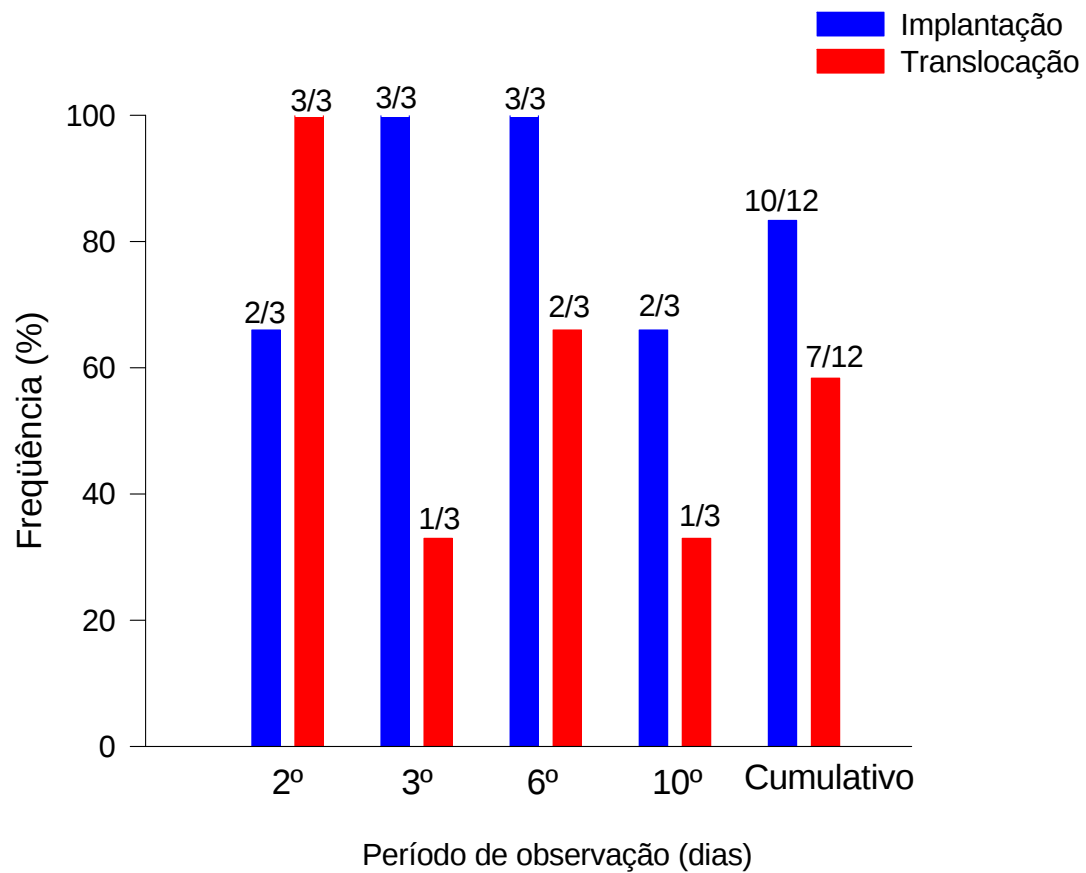
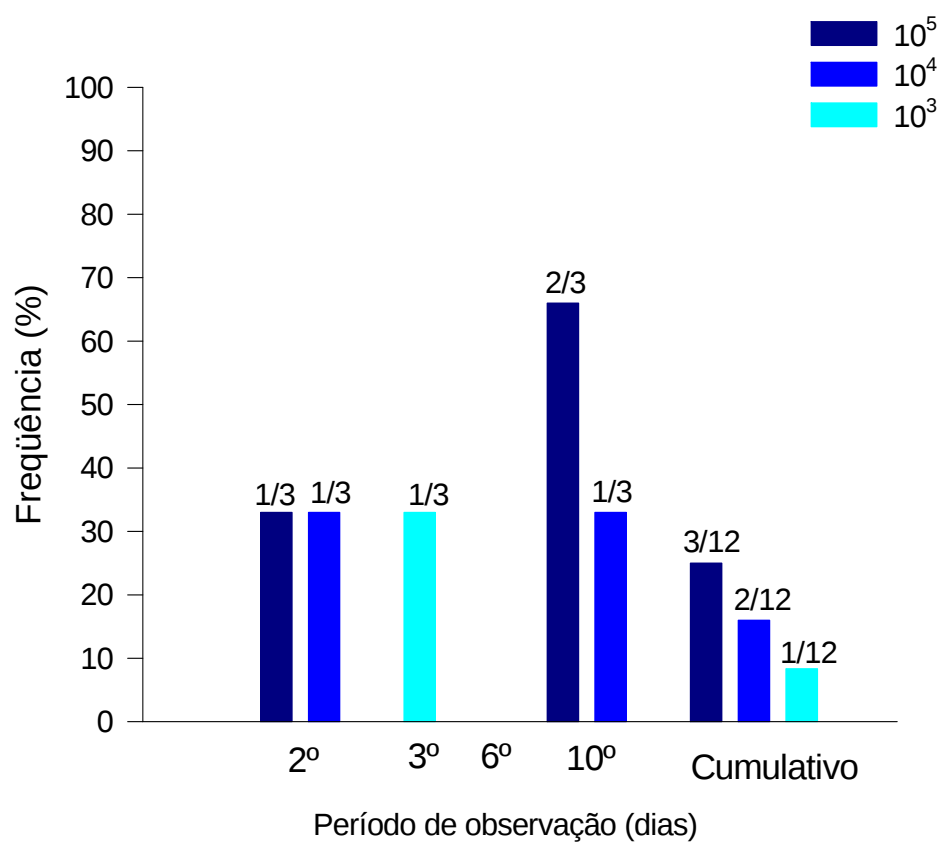


FIGURA 7 - Implantação de *Prevotella nigrescens* no SCR de camundongos gnotobióticos inoculados com 10^3 , 10^4 e 10^5 UFC



5 DISCUSSÃO

Muitos estudos demonstram a importância dos microrganismos nas alterações patológicas da polpa e do periápice. Os anaeróbios obrigatórios são os mais freqüentemente implicados nessas infecções (KAKEHASHI et al., 1965; SUNDQVIST, 1976; FABRICIUS et al., 1982 a, b).

Vários fatores têm influência no crescimento bacteriano e na colonização dos SCR. Dentre esses, o potencial redox, as interações microbianas, substâncias antagonistas e o substrato presente são críticos. (SUNDQVIST, 1992). Se as bactérias são ou não capazes de se implantar, em determinados sítios do organismo, isso dependerá de sua concentração e virulência, além da resistência do hospedeiro. Pouco se tem estudado quanto aos efeitos da dose infectante como um fator de colonização no SCR (WINKLER & VAN AMEROGEN, 1959; ZAVISTOSKI et al., 1980). Diversos pesquisadores utilizaram animais experimentais para avaliar a cinética de colonização microbiana no SCR (FABRICIUS et al., 1982 a,b; STASHENKO et al., 1992; TANIISHII et al., 1994). Roedores, isentos de germes e gnotobióticos, em especial camundongos e ratos, são modelos, que têm sido utilizados, para avaliar a colonização microbiana, sem a interferência de uma microbiota residente (WESCOTT, 1971; FARIAS et al., 1990; RIBEIRO SOBRINHO et al., 1998 e 2001). Em nosso estudo, avaliamos a colonização microbiana nos SCR e a sua translocação para os linfonodos submandibulares, em camundongos gnotobióticos, utilizando um modelo animal desenvolvido pelo nosso grupo (RIBEIRO SOBRINHO et al., 1998 e 2001).

A definição da concentração do inóculo utilizado para o *E. faecalis* baseou-se nos dados disponíveis na literatura: esse microrganismo tem importante papel ecológico, uma vez que, sendo um anaeróbio facultativo, nas fases iniciais de colonização, reduz o potencial de oxi-redução (FABRICIUS et al., 1982); além disso, pode

ser recuperado, em monoinfecção, com certa freqüência e, geralmente, está presente em infecções persistentes dos SCR (SIREN et al., 1997; MOLANDER et al., 1998; SUNDQVIST et al., 1998). Assim, sua maior capacidade, para se instalar em determinado sítio, fez com que se utilizassem doses infectantes com menor número de UFC.

Nossos resultados demonstraram que, indiferentemente das concentrações testadas (10^2 ou 10^1 UFC), bem como dos diferentes momentos de avaliação (2, 3, 6 e 10 dias), o *E. faecalis* implantou-se em proporções relativamente altas (Figuras 5 e 6). Na literatura, encontra-se bem estabelecido que a terapia endodôntica convencional não é capaz de “esterilizar” o SCR, mas sim, de reduzir o número de microrganismos nesses sítios (AKPATA, 1976; BYSTROM & SUNDQVIST, 1983; ANDO & HOSHINO, 1990; SIQUEIRA JR. et al., 1996, 1997, 1999). Assim, os resultados, aqui obtidos, sugerem que, no que diz respeito ao *E. faecalis*, sua alta capacidade de se implantar em baixas concentrações poderia facilitar a recolonização do SCR entre sessões de tratamento, quando o preparo mecânico-químico não conseguir eliminá-lo. Tal fato poderia explicar sua presença nas infecções refratárias ao tratamento endodôntico (SIREN et al., 1997; MOLANDER et al., 1998; SUNDQVIST et al., 1998; NODA et al. 2000).

A capacidade do *E. faecalis* de se implantar no SCR de camundongos gnotobióticos, como foi aqui demonstrado, está de acordo com os resultados obtidos por FABRICIUS et al. (1982) que, utilizando macacos, recuperaram esse microrganismo em monoinfecção nos SCR de tais animais. RIBEIRO SOBRINHO et al. (1998), utilizando camundongos CV e gnotobióticos, observaram, também, que o *E. faecalis* foi capaz de se implantar no SCR desses animais. Cabe ressaltar, contudo, que nesses trabalhos experimentais como nos de STASHENKO et al. (1992), TANI ISHI et al. (1994) e RIBEIRO SOBRINHO, et al. (1998) foram utilizadas doses infectantes elevadas, da ordem de 10^7 UFC, enquanto que a dose utilizada no presente estudo foi mais baixa, variando de 10^1 e 10^2 UFC. Não se

pode esquecer que os diversos trabalhos, que avaliaram a cinética de implantação microbiana nos SCR de animais experimentais, demonstraram que os microrganismos anaeróbios facultativos apresentam maior competência para se implantar nesses sítios, nos períodos iniciais de colonização (FABRICIUS et al., 1982). Nossos resultados estão de acordo com essas observações e, ao mesmo tempo, nos permitem inferir que a dose infectante, pelo menos em relação ao *E. faecalis*, foi um fator menos relevante para sua colonização no SCR desse modelo animal, provavelmente, por suas habilidades e versatilidade metabólicas, comparando-se com os anaeróbios obrigatórios.

Sabendo-se que a *P. nigrescens* geralmente se encontra presente em infecções mistas (BAUMGARTNER et al., 1991 e 1999; SUNDQVIST, 1992; LANA et al., 2001), usualmente sinérgicas, procurou-se avaliar se a dose infectante poderia compensar a ausência de associações, quando de sua implantação em monoinfecção. Para tanto, foram utilizadas concentrações iniciais mais elevadas (10^5 UFC) que as utilizadas para o *E. faecalis* (10^1 e 10^2 UFC) e, posteriormente, doses menores (10^4 , 10^3 e 10^2 UFC). Nossos resultados demonstraram que a implantação ocorreu em uma pequena porcentagem (8,33% a 25%) dos animais ou não ocorreu (tabela 4). Esses dados reforçam a necessidade de interações com outros microrganismos para que haja sua colonização, o que também foi demonstrado por FABRICIUS et al. (1982 b). Eles observaram que os *Bacteroides* spp (BPN) foram dominantes em todos os casos, quando inoculados em poliassociações, mas incapazes de se implantar nos SCR de macacos, quando inoculados separadamente. WAYMAN et al. (1992) observaram, da mesma forma que espécies de *Bacteroides* tinham sido isoladas em todos os casos de lesões periapicais associadas a outros organismos, indo ao encontro dos achados de SUNDQVIST (1989). Ele constatou a necessidade de interações com outras espécies para que esses anaeróbios obrigatórios manifestassem sua patogenicidade.

Seria importante mencionar que a *P. nigrescens*, utilizada neste estudo, foi uma linhagem de referência (ATCC 33563) e, segundo BAUMGARTNER et al. (1992), isolados clínicos recentes podem apresentar comportamento diferente. Este fato foi observado também em nossos laboratórios, quando utilizando-se microrganismos recém-recuperados dos SCR humanos infectados (LANA et al., 2001), foi possível verificar que espécies como *Fusobacterium nucleatum*, recém-isoladas, foram capazes de se implantar nos SCR de camundongos gnotobióticos (RIBEIRO SOBRINHO et al., 2001), contrariando os resultados obtidos anteriormente, quando linhagens de referência, da mesma espécie, tinham sido utilizadas (RIBEIRO SOBRINHO et al., 1998).

Sabe-se que vários fatores interferem na colonização do SCR. Segundo SUNDQVIST (1992), são fatores abióticos, como a disponibilidade de nutrientes ou baixa tensão de oxigênio em canais radiculares com polpas necróticas. Outros são fatores bióticos, como as interações bacterianas, que podem ser cooperativas (sinergismo) ou competitivas (produção de substâncias antagonistas). Os resultados obtidos, utilizando-se a *P. nigrescens*, parecem sugerir que: excluídos os fatores de colonização, relacionados às interações microbianas, o número de células bacterianas viáveis presentes nos SCR influenciou a capacidade de colonização desse microrganismo, nesse modelo animal (tabelas 4 e 5).

Muitos pesquisadores procuraram correlacionar as infecções, detectadas em diversos sítios do organismo, com infecções orais, eventualmente disseminadas pela via hematogênica (DEBELIAN et al., 1994). Poucos foram os estudos que procuraram avaliar a via linfática como um caminho de migração microbiana (RIBEIRO SOBRINHO, et al., 2001).

Teoricamente, os microrganismos que colonizam os SCR seriam capazes de translocar, através do ápice radicular, para os tecidos adjacentes, causando alterações periapicais. De acordo com BERG (1995), esse fenômeno está na dependência de três fatores: alterações de barreiras físicas, desequilíbrio ecológico e deficiências

na defesas imunológicas do hospedeiro. Todos esses mecanismos podem ser observados em um dado modelo de infecção. Neste estudo, avaliou-se, longitudinalmente, se a dose infectante interferiria na colonização e translocação dos microrganismos inoculados nos SCR de animais gnotobióticos para os linfonodos submandibulares.

Ao serem analisados os resultados obtidos, concernentes à translocação do *E. faecalis*, constatou-se que tal fenômeno foi dose dependente, nos períodos iniciais de observação. Utilizando-se doses infectantes de 10^1 UFC, não se observou translocação no segundo dia após a inoculação (Figura 5), enquanto que com uma dose de 10^2 UFC, no segundo dia (Figura 6), a translocação foi detectada. Contudo, nos dias subseqüentes, o perfil da translocação foi semelhante, indiferente da concentração do inóculo. É possível que isso se deva à necessidade dos níveis populacionais microbianos alcançarem um patamar ideal, para que, posteriormente, a translocação possa ocorrer, como sugerido por BERG em estudos que avaliaram tal fenômeno no trato gastrointestinal de camundongos gnotobióticos e livres de patógenos específicos (BERG & CARLINGTON, 1979).

As bactérias anaeróbias facultativas e aerotolerantes, devido a sua afinidade pelo oxigênio, segundo BERG (1995), apresentam, igualmente, maior capacidade de translocar, quando comparadas às anaeróbias obrigatórias. Ao confrontarmos os dados obtidos, também observamos resultados semelhantes, inclusive com a ausência total de translocação da *P. nigrescens*, em todos os períodos avaliados (tabelas 4 e 5). Permite-se pois, acreditar que a dose infectante, além de interferir na colonização da *P. nigrescens*, pode ser fator determinante na translocação desse microrganismo. Contudo, qualquer outra inferência dependerá de informações obtidas, após infecção experimental utilizando-se associações microbianas. Os dados obtidos, com as duas espécies estudadas, fazem com que se acredite que estudos futuros deverão esclarecer melhor o papel do número de células bacterianas viáveis como um fator de colonização microbiana resultante das relações ecológicas, nas infecções de

origem endodôntica. A ocorrência e a importância da translocação, para o linfonodo submandibular, merecem ser mais amplamente estudadas.

6 CONCLUSÕES

Os resultados nos permitem concluir que:

- 1 – Mesmo em concentrações consideradas baixas (10^1 e 10^2 UFC), o *E. faecalis* foi capaz de se implantar nos SCR e translocar para os linfonodos submandibulares de camundongos gnotobióticos.
- 2 – A *P. nigrescens* implantou-se, proporcionalmente à dose, nos SCR em pequena porcentagem dos casos e, não translocou para os linfonodos submandibulares, nesse modelo experimental de infecção endodôntica.
- 3 – A capacidade de implantação e translocação de bactérias patogênicas no SCR de camundongos gnotobióticos ocorre, provavelmente, em função de suas características fisiológicas e estruturais.

7 ABSTRACT

The aim of the endodontic therapy is to reduce the number of viable bacteria present in the infected root canal system (RCS) by means of a chemo-mechanical preparation. It is believed that although complete sterilization is not reached after this procedure, the number of remaining microorganisms is not enough to recolonize the RCS.

The purpose of this study was to establish the concentration of *E. faecalis* (ATCC 4083) and *P. nigrescens* (ATCC 33563) able to implant in the root canal system (RCS) of germ-free (GF) mice and translocate to the submandibular lymph node (SML).

Seventy-two one-month-old germ-free mice, both male and female, whose lower central incisive canal was instrumented and inoculated with *E. faecalis* at 10^2 and 10^1 UFC concentrations or *P. nigrescens* at 10^5 , 10^4 , 10^3 and 10^2 UFC concentrations and sealed.

The results have demonstrated that *E. faecalis* implanted, in 83,33% of the cases, at 10^2 and 10^1 UFC concentrations. Translocation has occurred in 58.33%, for the 10^2 UFC inoculum, and in 33.33% for the 10^1 UFC inoculum. *P. nigrescens* implanted in 25%, 16.67%, 8.33% and 0%, for the 10^5 , 10^4 , 10^3 and 10^2 UFC inocula, respectively. The translocation phenomenon has not been observed at any concentration used for the mentioned species. These results allow us to conclude that *E. faecalis* was able to implant in the RCS and translocate to the SML, even in concentrations considered low, while *P. nigrescens* implanted in small percentages in the RCS, and was not able to translocate to the SML in this experimental model.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABOU-RASS, M., BOGEN, G. Microorganisms in closed periapical lesions. *International Endodontic Journal*, v.31, n. 1, p. 39-47, 1998.
- 2 ADERHELD, L. KNOTHE, H., FRENKEL, G. The bacteriology of dentogenous pyogenic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v.52, s.n., p. 583-587, 1981.
- 3 ANDO, N., HOSHINO, E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentine. *International Endodontic Journal*, v. 23, n.1, p. 20 – 27, 1990.
- 4 AKPATA, E. S. Total viable count of microorganisms in the infected dental pulps. *Journal of Dental Research*, v. 53, n. 6, p. 1330 – 1333, 1974.
- 5 AKPATA, E. S. Effect of endodontic procedures on the population of viable microorganisms in infected root canal. *Journal of Endodontics*, v. 2, n. 12, p. 369 – 373, 1976.
- 6 AKPATA, E. S., BLECHMAN, H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall *in vitro*. *Journal of Dental Research*, v. 61, n 2, p. 435 – 38, 1982.
- 7 BAE, K. S., BAUMGARTNER, J. C., SHEARER, T. R., DAVID, L. L. Occurrence of *P. nigrescens* and *Prevotella intermedia* in infections of endodontic origin. *Journal of Endodontics*, v. 23, n. 10, p.620 – 623, 1997.

- 8 BARNETT, F., TROPE, M., KHOJA, M., TRONSTAD, L.
Bacteriologic status of the root canal after sonic, ultrasonic and
hand instrumentation. *Endodontic Dental Traumatology*, v. 1, s.n.,
p. 228 – 231, 1985.
- 9 BAUMGARTNER, J. C., FALKLER, W. A. Bacteria in the apical 5
mm of infected root canals, *Journal of Endodontics*, v. 17, n. 8, p.
380 – 383, 1991.
- 10 BAUMGARTNER, J. C., FALKLER, W. A. JR., BERCKERMAN, T.
Experimentally induced infection by oral anaerobic microorganisms
in a mouse model. *Oral Microbiology and Immunology*, v.7, n. 4 p.
253 – 256, 1992.
- 11 BAUMGARTNER, J. C., BAE, K-S., XIA, T., WHITT, J., DAVID, L.
L. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis an
Polymerase Chain Reaction for Differentiation of *Prevotella*
intermedia and *P. nigrescens*. *Journal of Endodontics*, v.25, n.5,
p. 324 – 328, 1999.
- 12 BELLIZZI, R., CRUSE, W. P. historic review of endodontic, 1689 –
1963, part 3. *Journal of Endodontics*, v. 6, n. 5, p.576 – 580, 1980.
- 13 BENDER, I. B., SELTZER, S., TASHMAN, S. B. S., MELOFF, G.
Dental procedures in patients with rheumatic heart disease. *Oral*
Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, v. 16, n. 4, p. 466 – 473,
1963.
- 14 BERG, R. D., CARLINGTON, A. W. Translocation of certain
indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the
mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse
model. *Infection and Immunity*, v. 23, s.n., p. 403 – 411, 1979.

- 15 BERG, R. D. Translocation of indigenous bacteria from the intestinal tract. In: HENTGES, D. *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*. 1^a ed. Academic Press, 1983. cap. 15, p. 333 – 352.
- 16 BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends in Microbiology*. v. 3, n. 4, p. 149 – 154, 1995.
- 17 BERG, R. D. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology*, v. 4, n. 11, p. 430 – 435, 1996.
- 18 BERGENHOLTZ, G. Microorganisms from necrotic pulp of traumatized teeth. *Odontology Review*, v. 25, n. 4, p. 347 – 358, 1974.
- 19 BERKITTEN, M., OKAR, I., BERKITTEN, R. In vitro study of the penetration of *Streptococcus sanguis* and *Prevotella intermedia* strains into human dentinal tubules. *Journal of Endodontics*, v. 26, n. 4, p. 236 – 239, 2000.
- 20 BYSTRÖM, A., SUNDQVIST, G. Bacteriological evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scandinavian Journal Dental Research.*, v. 89, n. 4, p. 321 – 28, 1981.
- 21 BYSTROM, A., SUNDQVIST, G. Bacteriological evaluation of the effect of 0,5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 55, n. 3, p. 307 – 312, 1983.
- 22 BYSTRÖM, A.; HAPPONEN, R. P.; SJÖGREN, V., SUNDQVIST, G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic

- treatment with controlled asepsias. *Endodontic Dental Traumatology*, v. 3, n. 2, p. 58 – 63, 1987.
- 23 CARLSSON, J. & SUNDQVIST, G. Evaluation of methods of transport and cultivation of bacterial specimen from infected dental root canals. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 49, n. 5, p.451 – 54, 1980.
- 24 DAJANI, A S., TAUBERT, K. A., WILSON, W., BOLGER, A. F., BAYER A., FERRIERI, P., GEWITZ, M. H., SHULMAN. S. T., NOURI, S., NEWBURGER, J. W., HUTTO, C., PALLASCH, T. J., GAGE, T. W., LEVISON, M. E., PETER. G. ZUCCARO JR. G. Prevention of bacterial endocarditis. *Journal American Medical Association*, v. 277, n. 22, p. 1794 – 1801, 1997.
- 25 DEBELIAN, G., J., OLSEN, I. TRONSTAD, L. Profiling of *Propionibacterium acnes* recovered from root canal and blood during and after endodontic treatment. *Endodontic Dental Traumatology*, v. 8, n. 3, p. 248 – 254, 1992.
- 26 DEBELIAN, G., J., OLSEN, I. TRONSTAD, L. Systemic diseases caused by oral microorganisms. *Endodontic Dental Traumatology*, v.10, n. 2 p. 57 – 65, 1994.
- 27 DE DEUS, Q. D. *Endodontia*. 5º ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. 695 p.
- 28 DOUGHERTY, W. J., BAE, K. S., WATKINS, B. J. BAUMGARTHER, J. C. Black-Pigmented bacteria in coronal and apical segments of infected root canals. *Journal of Endodontic*, v.24, n. 5, p.356 – 58, 1998.
- 29 FABRICIUS, L.; DAHLÉN, G.; HOLM, S. E. & MÖLLER, A. J. R. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root

canals after varied times of closure. *Scandinavian Journal Dental Research*, v. 90, n.2, p. 134 – 144, 1982 a.

- 30 FABRICIUS, L.; DAHLÉN, G.; HOLM, S. E. & MÖLLER, A. J. R. Influence of combination of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scandinavian Journal Dental Research*, v. 90, n.3, p. 200 – 6, 1982 b.
- 31 FARBER, P. A. & SELTZER, S. Endodontic. Microbiology. Etiology. *Journal of Endodontics*. v. 14, n. 7, p. 363 – 371, 1988.
- 32 FARIAS, L. M., AVILA-CAMPOS, M. J., CARVALHO, M. A. R., DAMASCENO C. A V., SILVA, M. E., SILVA, M. E. S.,BAMBIRRA, E. A, VIEIRA, E. C.,CISALPINO. E. O. Experimental infection of germ-free and conventional rats with *Actinobacillus (Haemophilus) actionomycetemcomitans* and black-pigmented *Bacteroides*. *Microecology and Therapy*, v. 20, s.n., p. 419 – 22, 1990.
- 33 FOUAD, A.; WALTON, R.& RITTMAN, B. Induced periapical lesions in ferret canines: histologic and radiographic evaluation. *Endodontic Dental Traumatology*, v.8, n. 2, p. 56 – 62, 1992.
- 34 FUKUSHIMA, H., YAMAMOTO, K., HIROHATA, K., SAGAWA, H., LEUNG, K-P., & WALKER, C. B. Localization and identification of root canal bacteria in clinically assymptomatic periapical pathosis. *Journal of Endodontic*, v.16, n. 11, p. 534 – 538,1990.
- 35 GHARBIA, S. E., HAAPASALO, M., H. N. KOTIRANTA, A., LOUNATMAA, K. PEARCE, M. A., DEVINE, D. A. Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections. *Journal Periodontology*, v.65, n. 1, p. 56-61, 1994.

- 36 GOMES, B. P. F. A., LILLEY, J. D., DRUCKER, D. B. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *International Endodontic Journal*, v.27, n. 6, p. 291 – 298, 1994.
- 37 GOMES, B. P. F. A.; LILLEY, J. D., DRUCKER, D. B. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *International Endodontic Journal*, v.29, n. 2, p. 69 – 75, 1996 a.
- 38 GOMES, B. P. F. A.; LILLEY, J. D., DRUCKER, D. B. Clinical significance of dental root canal microflora. *Journal of Dentistry*, v. 24, n. 1-2, p. 47 – 55, 1996 b.
- 39 GOMES, B. P. F. A., LILLEY, J. D., DRUCKER, D. B. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *International Endodontic Journal*, v.29, n. 4, p. 235 – 241, 1996 c.
- 40 GOODMAN, A. D. Isolation of anaerobic bacteria from the root canal systems of necrotic teeth by the use of a transport solution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 43, n. 5, p.766 – 770, 1977.
- 41 HAAPASALO, M. *Bacteroides spp.* In dental root canal infections. *Endodontic Dental Traumatology*, v. 5, n. 1, p. 1 – 10, 1989.
- 42 HOLDMAN, L. V. & MOORE, W. E. C. Anaerobe Laboratories Manual. Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977.
- 43 JOKLIC, W. K., WILET, H., P., AMOS, D. B., WILFERT, C. M. *Zinsser Microbiología*. 20^a ed. Buenos Aires: Pan Americana, 1995.

- 44 KAKEHASHI, S., STANLEY, H. R., FITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ – free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 20, n. 3, p. 340 – 349, 1965.
- 45 KANNANGARA, D. W., THADEPALLI, H., MCQUIRTER, J. L. Bacteriology and treatment of dental infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 50, n. 1, p. 103-109, 1980.
- 46 KANTZ, W. E., HENRY, C. A. Isolation and classification of anaerobic bacteria from vital pulp chamber of non-vital teeth in man. *Archives Oral Biology*, v.19, n. 1, p. 91 – 96, 1974.
- 47 KIRYU, T.; HOSHINO, E.; IWAKU, M. Bacteria invading periapical cementum. *Journal of Endodontics*, v. 20, n. 4, p. 169 – 72, 1994.
- 48 KLEVANT, F. J. H., EGGINK, C. O. The effect of canal preparation on periapical disease. *International Endodontic Journal*, v. 16, n. 1, p. 68 – 75, 1983.
- 49 LANA, N. A., RIBEIRO SOBRINHO, A. P., STEHLING, R., GARCIA, G. D., SILVA, B. K. C., HAMDAN, J. S., NICOLI, J. R., CARVALHO, M. A. R., FARIAS, L. M. Microorganism isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. *Oral Microbiology and Immunology*, v.16, n. 2, p. 100 – 105, 2001.
- 50 LEONARDO, M. R.; ALMEIDA, W. W.; YOKO ITO, I. & BEZERRA DA SILVA. A radiographic and microbiologic evaluation of post treatment apical and periapical repair of root canals of dog's teeth with experimentally induced chronic lesion. *Oral Surgery. Oral Medicine Oral Pathology*, v. 78, n. 2, p. 232 – 8, 1994.
- 51 MALTOS, K. L. M. *Avaliação da eficácia de duas técnicas endodônticas na redução da microbiota de canais radiculares*

(Estudo clínico em dentes portadores de necrose pulpar). Belo Horizonte: Faculdade de Odontologia da UFMG, 1990. 116 p. (Dissertação, Mestrado em Odontologia, Endodontia).

- 52 MILLER, W. D. An introduction to the study of the bacteriopathology of the dental pulp. *Dental Cosmos*, v. 36, p. 505 – 58, 1894 apud SIQUEIRA JR., J. F., LOPES, H. P. *Endodontia: Biologia e Técnica*. Rio de Janeiro: Medsi, 1999. Cap. 10, p. 185 – 216.
- 53 MOENNING, J. E., NELSON, C. L., KOHLER, R. B. The microbiology and chemotherapy of endodontic infections. *Journal Oral Maxillofacial Surgery*, v. 47, n. 9, p. 976 – 985, 1989.
- 54 MOLANDER, A.; REIT, C.; DAHLÉN, G. & KVIST, T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal*, v.31, n.1, p. 1 – 7, 1998.
- 55 MÖLLER, A. J. R. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontologiska Föreningens Tidskrift*. Stockolm, p. 380, 1966 Spec Issue.
- 56 MÖLLER, A. J. R., FABRICIUS, L., DAHLÉN, G., OHMAN, A. E., HEYDEN, G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scandinavian Journal Dental Research*, v. 89, n. 5, p. 475 – 484, 1981.
- 57 MOLVEN, O., OLSEN, I., KEREBS, K. Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. *Endodontic Dental Traumatology*, v. 7, n. 5, p. 226 – 229, 1991.
- 58 MOORE, W. E. C. Microbiology of periodontal disease. *Journal Periodontal Research*, v. 22, n. 4, p. 335 – 341, 1987.

- 59 MORAES, V. R., CARVALHO, M. A. R., FIGUEIREDO, Y. P., CISALPINO, E. Significado dos testes bacteriológicos imediato e tardio no controle do tratamento dos canais radiculares. *Revista Brasileira de Odontologia*, v. 28, s.n., p. 264 – 266, 1971.
- 60 MOREIRA JR., RIBEIRO SOBRINHO, A. P., NICOLI, J. R., BAMBIRRA, E. A. FARIAS, L. M., CARVALHO, M. A. R. & VIEIRA, E. C. Evaluation of Microbial Infiltration in Restored Cavities – An Alternative Method. *Journal of Endodontics*, v.25, n.9, p. 605 – 608, 1999.
- 61 MORSE, R. D. The endodontic culture technique. Factors leading to false positive and negative results. *New York State Dental Journal*, v. 37, n. 2, p. 88 – 93, 1971.
- 62 MORSE, R. D. Endodontic microbiology in the 1970s'. *International Endodontic Journal*, v. 14, n. 2, p. 69 – 79, 1981
- 63 NAIR, P. N. R., SJÖGREN, U., KREY, G., KAHNBERG, K. E., SUNDQVIST, G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesion. A long-term light and electron microscopic follow-up study. *Journal of Endodontics*, v.16, n. 12, p. 580 – 88, 1990.
- 64 NODA, M., INOUE, S., KOMATSU, H. A comparison of methods for detecting bacteria in root canal exudate. *Journal of Endodontics*, v. 25, n. 03, p. 187 – 189, 1999.
- 65 NODA, M., KOMATSU, H., INOUE, S., SANO, H. Antibiotic susceptibility of bacteria detected from the canal exudate of persistent apical periodontitis. *Journal of Endodontics*, v. 26, n. 4, p. 221 – 224, 2000.

- 66 OGUNTEBI, B. R. Dentine tubule infection and endodontic therapy implications. *International Endodontic Journal*, v.27, n. 4, p. 218 – 222, 1994.
- 67 OLIVEIRA, J. C. M., SIQUEIRA JR., J. F., ALVES, G. B., HIRATA JR., R., ANDRADE, A. F. B. Detection of *Porphyromonas endodontalis* in infected root canals by 16S rRNA gene-directed Polymerase Chain Reaction, *Journal of Endodontics*, v. 26, n. 12, p. 729 – 732, 2000.
- 68 PECIULIENE, V., BALCIUNIENE, I., ERIKSEN, H. M., HAAPASALO, M. Isolation of *E. faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *Journal of Endodontics*, v. 26, n. 10, p. 593 – 595, 2000.
- 69 PITTFORD, T. R. The effects on the periapical tissues of bacterial contamination of the filled root canal. *International Endodontic Journal*, v. 15, s. n., p. 16 – 22, 1982.
- 70 RIBEIRO SOBRINHO, A. P., BARROS, M. H. M., NICOLI, J. R., CARVVALHO, M. A. R., FARIAS, L. M., BAMBIRRA, E. A., BAHIA, M. G. A., VIEIRA, E. C. Experimental root canal infections in convencional and germ-free mice. *Journal of Endodontics*, v. 24, n. 06, p.405 – 8, 1998.
- 71 RIBEIRO SOBRINHO, A. P., LANA, M. A.; FARIAS, L. M.; CARVVALHO, M. A.; NICOLI, J.; UZEDA, M.; & VIEIRA, L. Q. Implantation of bacteria from human pulpal necrosis and translocation from root canal in gnotobiotic mice. *Journal of Endodontics*, v. 27, p. 605 – 609, 2001.
- 72 SELTZER, S. E., FARBE, P. A. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 78, n. 5, p. 634 – 645, 1994.

- 73 SILVER, S. *Anaerobic Bacteriology for the clinical laboratory*. St Louis. Toronto. London, Mosby Company, 1980. 118 p.
- 74 SIQUEIRA JR, J. F., DE UZEDA, M., FONSECA, M. E. F. A scanning electron microscopic evaluation of *in vitro* dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *Journal of Endodontics*, v. 22, n. 6, p. 308 – 310, 1996.
- 75 SIQUEIRA JR, J. F., MACHADO, A. G., SILVEIRA, R. M., LOPES, H. P., UZEDA, M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *E. faecalis* from the root canal, in vitro. *International Endodontic Journal*, v.30, p.279-282, 1997 a.
- 76 SIQUEIRA JR, J. F.; ARAUJO, M. C. P.; GARCIA, P. F.; FRAGA, R. C. & DANTAS, C. J. S. Histological evaluation of the effectiveness of five instrumentation techniques for cleaning the apical third of root canals. *Journal of Endodontics*, v.23, n.8, p. 499 – 502, 1997 b.
- 77 SIQUEIRA JR, J. F., MAGALHÃES, F. A. C., LIMA, K. C, UZEDA, M. pathogenicity of facultative and obligate anaerobic bacteria in monoculture and combined with either *Prevotella intermedia* or *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiology and Immunology*, v.13, s.n., p. 368 – 372, 1998.
- 78 SIQUEIRA JR, J. F.; LIMA, K. C.; MAGALHÃES, F. A. C.; LOPES, H. P.; UZEDA, M. Mechanical Reduction of the Bacterial Population in the Root Canal by Three Instrumentation Techniques. *Journal of Endodontics*, v.25, n.5, p. 332 – 335, 1999.
- 79 SIREN, E. K., HAAPASALO, M. P. P., RANTA, K., SALMI, P. & KEROSUO, E. N. J. Microbiological findings and clinical treatment

procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *International Endodontic Journal*, v.30, n., p. 91 – 95, 1997.

80 SJÖGREN, U, HAGGLUND, B., SUNDQVIST, G. & WING, K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *Journal of Endodontics*, v. 16, n. 10, p. 498 – 504, 1990.

81 STASHENKO, P., MIN YU, S., WANG, C. Y. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *Journal of Endodontics*, v. 18, n. 9, p.422 – 426, 1992.

82 STASHENKO, P.; WANG, C. Y.; TANI-ISHII, YU, S. M. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 78, n. 4, p. 494 – 502, 1994.

83 STEFFEN, E. K., BERG, R. D. Relationship between cecal population levels of indigenous bacteria and translocation to the mesenteric lymph node. *Infections and Immunity*, v. 39, n. 5, p. 1252 – 1259, 1983.

84 SUNDQVIST, G. *Bacteriological studies of necrotic pulps*. Umea: University Odontol, 1976. 94 p. (Dissertation).

85 SUNDQVIST, G., ECKERBOM, M. I., LARSSOM, A. P., SJÖGREN, U. T. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infection and Immunity*, v. 25, n. 2, p. 685 – 693, 1979.

86 SUNDQVIST, G, JOHANSSON, E. SJÖGREN, U. Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. *Journal of Endodontics*, v.15, n. 1, p. 13 –19, 1989

- 87 SUNDQVIST, G. Association between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 7, n. 5, p. 257 – 262, 1992 a.
- 88 SUNDQVIST, G. Ecology of the canal flora. *Journal of Endodontics*, v. 18, n.9, p. 427 – 30, 1992 b.
- 89 SUNDQVIST, G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 78, n. 4, p. 522 – 30, 1994.
- 90 SUNDQVIST, G, FIGDOR, D, PERSON, S. & SJÖGREN, Ulf. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v.85, n.1, p. 86 – 93, 1998.
- 91 SUTTER, V. L., CITRON, D. M., FINEGOLD, S. M. *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*. St. Louis: The C. V. Morby Company, 1980. 131 p.
- 92 TAKAHASHI, N.; YAMADA, T. Glucose metabolism by *Prevotella intermedia* and *P. nigrescens*. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 15, p. 188 – 195, 2000.
- 93 TANI-ISHII, N.; WANG, C. Y.; STASHENKO, A. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 9, p. 129 – 135, 1994.
- 94 TER STEEG, P. F., VAN DER HOEVEN, J. S. Development of periodontal microflora on human serum. *Microbiol Ecol Health Dis* v. 2 p. 1 – 10, 1989 apud SUNDQVIST, G. Ecology of the Root Canal Flora. *Journal of Endodontics*, v. 18, n. 9, p. 427 – 430, 1992.

- 95 THILO, B. E.; BAEHNI, P., HOLZ, J. Dark field observation of the bacterial distribution in the root canals following pulp necrosis *Journal of Endodontics*, v.12, n. 5, p. 202 – 5, 1986.
- 96 TORABINEJAD, M., EBY, W. C., NAIDORF, I. J. Inflammatory and immunological aspects of the pathogenesis of human periapical lesions. *Journal of Endodontics*, v.11, n. 11, p. 479 – 487, 1985.
- 97 TRONSTAD L.; BARNETT F.; CERVONE, F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endodontic Dental Traumatology*, v. 6, n. 2, p. 73 – 77, 1990.
- 98 TROPE, M.; DELANO, E. O.; ORSTAVIK, D. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single vs. multivisit treatment. *Journal of Endodontics*, v. 25, n. 5, p. 345 – 350, 1999.
- 99 UMEMOTO, Toshio. Anaerobic bacteria in odontogenic infections. *Bulletin of Kanagawa Dental College*, v. 23, n. 2, p. 105 – 109, 1995.
- 100 VAN WINKELHOFF, A. J. CARLEE, A. W., DE GRAAFF, J. *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. *Infection and Immunity*, v. 49, n. 3, p. 494 – 497, 1985.
- 101 VIGIL, V. G., WAYMAN, E. B., DAZEY, E. S., FOWLER, B.C.& BRADLEY, JR, V. D. Identification and antibiotic sensitivity of bacteria isolated from periapical lesions. *Journal of Endodontics*, v. 23, n.2, p.110 – 114, 1997.
- 102 WALTON, R. E. & ARDJMAND, K. Histological evaluation of the presence of bacteria in induced periapical lesions in monkeys. *Journal of Endodontics*, v. 18, n. 5, p. 216 – 221, 1992.

- 103 WAYMAN, B. E., MURATA, S. M., ALMEIDA, R. J., CRIG, B. F. A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. *Journal of endodontics*, v. 18, n. 4, p. 152 –155, 1992.
- 104 WESCOTT, R. B. *Presents status e future prospects of the use of germ-free host animals for research in Parasitology. Symposium on Gnotobiotic Research*. Columbus, Ohio, p. 14, 1971.
- 105 WIJNBERGEN, M., VAN MULLEM, P. J. Effect of histological decalcifying agents on number and stainability of Gram-positive bacteria. *Journal Dental Research*, v. 66, n. 5, p. 1029 – 1031, 1987.
- 106 WINKLER, K. C. & VAN AMEROGEN, J. Bacteriologic results from 4000 root canal cultures *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 12, n. 7, p. 857 – 875, 1959.
- 107 WITTGON, W. C. & SABISTON, C. B. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. *Journal of Endodontics*, v. 1, n. 5, 168 – 71, 1975.
- 108 YAMASAKI, M., KUMAZAWA, M., KOHSAKA, T., NAKAMURA, H. KAMEYAMA, Y. Pulpal and periapical tissue reactions after experimental pulpal exposure in rats. *Journal of Endodontics*, v. 20, n. 1, p. 13 – 17, 1994.
- 109 ZAVISTOSKI, J.; DZINK, J.; ONDERDONK, A. & BARTLETT, J. Quantitative bacteriology of endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 49, n. 2, p. 171 – 74, 1980.
- 110 ZELDOW, B. J., INGLE, J. I. Correlation of the positive culture to the prognosis of endodontically treated teeth: a clinical study. *Journal of American Dental Association*, v. 66, n.1, p. 9 –13, 1963.

- 111 ZIELKE, D. R., HEGGERS, J. P. & HARRISON, J. M. A statistical analysis of anaerobic versus aerobic culturing in endodontic therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 42, n. 6, p. 830 – 837, 1976.