KARLA BAUMOTTE DE CARVALHO

**IDENTIFICAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE
CANALIS RADICULARES DE DENTES PERMANENTES JOVENS
PORTADORES DE INFECÇÃO PRIMÁRIA**

São Paulo

2009

Karla Baumotte de Carvalho

**Identificação das características microbiológicas de
canais radiculares de dentes permanentes jovens
portadores de infecção primária**

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

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Bombana

São Paulo

2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carvalho KB. Identificação das características microbiológicas de canais radiculares de dentes permanentes jovens portadores de infecção primária [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo: ____/____/____

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Às vezes, quando amamos alguém muito, mas muito mesmo, ficamos desejando achar um jeito de mostrar quanto nossos sentimentos são grandes. Mas acabamos por descobrir que o amor não é uma coisa assim tão fácil de medir...

ADIVINHA O QUANTO EU TE AMO

“Era hora de ir para cama e o Coelhoinho se agarrou se agarrou firme nas longas orelhas do Coelho Pai.

Ele queria ter certeza que o Coelho Pai estava ouvindo.

- Adivinha quanto eu te amo – disse ele.
- Ah, acho que isso eu não consigo adivinhar – respondeu o Coelho Pai.
- Tudo isto – disse o Coelhoinho, esticando os braços o mais que podia.

Só que o Coelho Pai tinha os braços mais compridos. E disse:

- E *eu* te amo tudo isto!

Hum, isso é um bocado, pensou o Coelhoinho.

- Eu te amo toda a minha altura – disse o Coelhoinho esticando os braços para cima.
- E eu te amo toda a *minha* altura – disse o Coelho Pai.

Puxa, isso é bem alto, pensou o Coelhoinho. Eu queria ter braços compridos assim.

Então o coelho teve uma boa idéia. Ele se virou de ponta-cabeça, apoiando as patinhas na árvore.

- Eu te amo até a ponta dos dedos dos meus pés!
- E *eu* te amo até a ponta dos *teus* pés – disse o Coelho Pai, balançando o

filho no ar.

- Eu te amo a altura do meu pulo! – riu o Coelhoinho, saltando para lá e para cá.

- E *eu* te amo até a altura do *meu* pulo – riu também o Coelho Pai, e saltou tão alto que suas orelhas tocaram os galhos da árvore.

Isso é que é saltar, pensou o Coelhoinho. Bem que eu gostaria de pular assim.

- Eu te amo toda a estradinha daqui até o rio – gritou o Coelhoinho.

- Eu te amo até depois do rio, até as colinas – disse o Coelho Pai.

É uma bela distância, pensou o Coelhoinho. Ele estava sonolento demais para continuar pensando.

Então ele olhou para além das copas das árvores, para a imensa escuridão da noite.

Nada podia ser maior que o céu.

- Eu te amo ATÉ A LUA! – disse ele, e fechou os olhos.

- Puxa, isso é longe – disse o Coelho Pai. – Longe mesmo!

O Coelho Pai deitou o Coelhoinho na sua caminha de folhas.

E então se inclinou para lhe dar um beijo de boa-noite.

Depois, deitou-se ao lado do filho e sussurrou sorrindo:

- Eu te amo até a lua ...

IDA E VOLTA!”

Sam M^cBratney

Aos meus pais Irly e Maria Lúcia, o meu imensurável amor!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Bombana,

Foi uma sorte para mim que os nossos caminhos tenham se cruzado. Somente as pessoas que tem o privilégio de conviver com o senhor são capazes de entender o verdadeiro significado de ser um educador. Somente aquelas que, como eu, tem a honra de ser sua orientada podem usufruir profundamente do convívio de um espírito nobre e apreciar seu brilhantismo. Obrigado por contribuir de forma intensa para o meu crescimento pessoal, profissional e intelectual.

À Prof^a. Dr^a. Silvana Cai

Pela ajuda, incentivo e conhecimentos transmitidos na área de Microbiologia, o que contribuiu de forma imprescindível para a execução deste trabalho e por sua confiança, apoio e amizade por mim demonstrados neste período.

À Prof^a. Dr^a. Adriana Paisano

Por sua disponibilidade em me ensinar e acompanhar durante todos os passos dessa pesquisa, compartilhando seus conhecimentos e enriquecendo amplamente a minha formação. Seu trabalho honesto, sério e preciso faz de você um exemplo de dedicação à pesquisa a ser seguido e admirado.

À Prof^a. Dr^a. Patrícia Helena Pereira Ferrari

Por suas sugestões e orientações que contribuíram de forma significativa para conformação final deste ensaio. Sua incansável dedicação ao ensino e a pesquisa inspiram à busca laboriosa da excelência profissional.

Ao Prof. Dr. Giulio Gavinni

Por seus ensinamentos e pelo constante incentivo. Sua seriedade e competência são admiráveis.

Aos Professores da Disciplina de Endodontia Da FOUSP

Pela troca de experiências e pela acolhida carinhosa.

Ao técnico João

Pela ajuda inestimável nas etapas técnicas executadas nesta pesquisa.

Às bibliotecárias Vânia e Glauci

Pela ajuda na formatação e revisão da redação desse trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Dentística Ana Maria, Selma, Soninha e Sr. Aldo

Pelo auxílio no decorrer de todo o curso, e em especial a **Ana Maria** que, além disso, se tornou uma grande amiga.

Aos colegas da Disciplina de Endodontia da Universidade Gama Filho

Pela confiança e amizade a mim dedicada.

Aos pacientes voluntários nessa pesquisa

Pela contribuição à ciência e por me ceder alguns momentos de suas vidas. A vocês meu carinho e gratidão.

Ao Prof. Dr. Celso Caldeira e colegas do CADE, Carmem, Edson e Wagner,

Pela ajuda na seleção dos pacientes, pelas experiências compartilhadas e pelo jovial convívio.

Aos colegas de pós-graduação Cláudia, Luciano, Leonardo e Cabrales,

"Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, mas quando parte, nunca vai só nem nos deixa a sós. Leva um pouco de nós, deixa um pouco de si mesmo." (Kalil Gibran)

Amigos o tempo que passamos juntos foi e continua sendo de grande valor para mim.

Às minhas queridas amigas Luciana Pacheco, Eliane Figueirinho, Karina Salzano,

"A amizade é o mais perfeito dos sentimentos porque é livre."

(Rousseau e Lacordaire)

Por todos os momentos compartilhados e pela nossa amizade as quais considero especiais.

Aos meus parentes Carlos Eduardo, Nina, Gabriel e Dagmar

Por ter me acolhido de forma tão carinhosa, seu constante apoio tornou mais leve a jornada. Na sua casa me sinto em casa. Com amor, obrigado.

Ao meu marido André

Pelo carinho nas horas difíceis, pelo apoio, companheirismo e paciência, estando sempre ao meu lado, incentivando e efetivamente colaborando para que eu conseguisse realizar um sonho. Obrigado por compreender minhas ausências, essa Tese é nossa.

"Quando te conheci, houve um lugar, um tempo e um sentimento. O tempo ficou marcado. O lugar será sempre lembrado. E o sentimento, jamais acabado."

(Tommaso Veronesi)

À minha irmã Patrícia

Por me incentivar em todas as minhas realizações. Sua determinação, sua força de vontade e seu caráter são, para mim, um exemplo. Sua inteligência e brilhantismo iluminam meus caminhos. Seu amor e amizade são meu maior tesouro.

Aos meus pais Irly e Maria Lúcia

Por todo apoio e dedicação, por me incentivarem e por sempre acreditarem que eu seria capaz. Sua fé em mim me ensinou a ter fé em mim mesma. Sinto-me amada todos os dias. Todos deveriam ter pais como vocês.

A todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para essa realização

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis." (FERNANDO PESSOA)

Carvalho KB. Identificação das características microbiológicas de canais radiculares de dentes permanentes jovens portadores de infecção primária [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

Em condições de normalidade o cemento e o esmalte atuam como barreira protetora da dentina e do tecido pulpar. Entretanto fatores etiológicos mecânicos, químicos e microbianos podem determinar a perda dessa proteção, conseqüentemente expondo a dentina e, eventualmente, o tecido pulpar ao ambiente bucal, viabilizando sua contaminação. O complexo dentino-pulpar pode reagir de diversas formas a presença de microorganismos, entretanto, quando alterações inflamatórias irreversíveis enfim sucedem-se provocam uma desordem tecidual na região periapical denominada de periodontite apical. A terapia das periodontites apicais deriva de um correto diagnóstico, o qual se encontra na dependência do conhecimento da natureza e complexidade das infecções endodônticas. Inúmeras pesquisas delinearam o tipo de microbiota presente em condição de periodontite apical crônica nos dentes completamente formados. Todavia nenhum estudo investigou os tipos de microorganismos presentes em canais radiculares de dentes jovens portadores de periodontite apical crônica, onde diferenças anatômicas, histológicas e morfofuncionais poderiam afetar as características do processo infeccioso. O presente estudo tem por objetivo delinear a característica microbiológica de canais radiculares de dentes permanentes jovens portadores de infecção primária. Foram selecionados 12 pacientes com necessidade de tratamento

endodôntico em um ou mais dentes unirradiculares, portadores de rizogênese incompleta, diagnóstico clínico de necrose pulpar, em decorrência de injúria traumática, e condição de infecção endodôntica primária. Após o acesso, dezenove espécimes microbiológicos foram obtidos do interior dos canais radiculares com auxílio de cones de papel, os quais foram transferidos, imediatamente, para frascos contendo 2 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III. As amostras foram diluídas e semeadas em placas do tipo Petri contendo meios de cultura seletivos para detecção de espécies de enterococos, de espécies de leveduras e para crescimento de bactérias totais. As placas semeadas foram incubadas em tempo e temperatura adequados ao crescimento dos microorganismos alvo. Ao final do período de incubação foi realizada uma análise quantitativa do crescimento microbiano presente segundo a contagem das unidades formadoras de colônias. Microorganismos anaeróbios foram recuperados de todos os canais e o número médio de células por canal foi de $5,7 \times 10^6$. Quatro amostras (21,05%) evidenciaram o crescimento de *Bacteroides* produtores de pigmento negro e número médio de células por canal foi de $6,5 \times 10^5$. Um espécime (5,25%) exibiu o crescimento de espécies de enterococos e o número médio de células neste canal foi de $1,5 \times 10^4$.

Palavras-Chave: microorganismos, infecção primária, dentes jovens

Carvalho KB. Identificação das características microbiológicas de canais radiculares de dentes permanentes jovens portadores de infecção primária [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

Normally cement and enamel act as protective barrier to the dentin and the pulp. However, mechanical, chemical and microbial factors should destroy this protection and display the dentin and, even the pulp, to the oral environment, making possible their contamination. The pulpo-dentin complex reacts in different forms at the presence of microorganisms. However, when irreversible inflammatory alterations are succeeded, they occasion a tecidual clutter on periradicular region. The therapy of periradicular pathosis results from a correct diagnostic, which depends on the knowledge of the nature and complexity of endodontic infections. Several studies have been conducted to disclose microorganisms in the root canal system and/or to investigate the structure of the root canal microbiota in chronic periodontitis in teeth completely formed. However there is no information on the microbiology of primary endodontic infection in young teeth where anatomic, histologic and morfologic differences could affect the characteristics of the infectious process. The aim of the current study was to investigate the microbiological status of the root canals from permanent young teeth with primary endodontic infection. Twelve patients with the need for endodontic treatment participated in the study. The selected teeth (one or more tooth per patient) were uniradicular, containing a single root canal and an incomplete root formation, their pulp chamber was without visual communication with

the oral fluid, they presented with untreated necrotic pulp, and showed radiographic evidence of periapical periodontitis. After the access, nineteen microbiological samples were obtained from the root canals with sterile paper points. Afterwards, the paper points were pooled in a sterile tube containing 2mL of pre-reduced transport fluid (VMGA III). The samples were diluted and spread onto plates with selective medium for *enterococcus* (agar m-*Enterococcus*) and for yeast species (agar Sabouraud-dextrose) and onto plates with nonselective medium (agar Brucella-sangue). A quantitative analysis was performed. The mean number of cultivable bacterial cells in the root canals was $5,7 \times 10^6$. In four samples (21.05%) Black Pigmented Bacteroides species were recovered and the mean number of cells was $6,5 \times 10^5$. One specimen (5.25%) showed the growth of *enterococos* species and the mean number of cells in this case was of $1,5 \times 10^4$.

Keywords: microorganisms, primary endodontic infection, young teeth

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 – Imagem clínica dos casos selecionados para o estudo	75
Figura 4.2 – Imagem radiográfica dos casos selecionados para o estudo	75
Figura 4.3 – Frascos contendo meio de transporte e amostra da superfície	77
Figura 4.4 – Coleta clínica das amostras	78
Figura 4.5 – Amostras coletadas imersas em meio de transporte	78
Figura 4.6 – Câmara de fluxo laminar	80
Figura 4.7 – Placas de ágar m-Enterococcus em período de incubação	82
Figura 4.8 – Placas de ágar Brucella-sangue em período de incubação	82
Figura 4.9 – Crescimento de bacteróides produtores de pigmento negro em placas de ágar Brucella-sangue	83
Figura 4.10 – Crescimento de bacteróides produtores de pigmento negro em placas de ágar Brucella-sangue	83
Figura 4.11 – Crescimento de bactérias totais em placas de ágar Brucella-sangue ..	84

Figura 4.12 – Crescimento microbiano em placas de ágar m-Enterococcus 84

Figura 4.13 – Imagem em maior aumento do crescimento microbiano em placas de
ágar m-Enterococcus..... 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Número de UFC's (unidades formadoras de colônias) obtidas a partir de coletas microbiológicas intrarradiculares.....	85
Tabela 5.2 – Número de UFC's (unidades formadoras de colônias) de bacteróides produtores de pigmento negro.....	86
Tabela 5.3 – Número de UFC's (unidades formadoras de colônias) de espécies de enterococcus.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	marca registrada
µL	microlitro
A.	gênero <i>Actinomyces</i>
ATCC	American Type Culture Collection
C.	gênero <i>Candida</i> ou <i>Campylobacter</i> ou <i>Cardiobacterium</i> ou <i>Clostridium</i>
D.	gênero <i>Dialister</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
E.	gênero <i>Enterococcus</i> ou <i>Escherichia</i> ou <i>Eubacterium</i>
F.	gênero <i>Fusobacterium</i> ou <i>Firmicutes</i>
g	grama
G.	gênero <i>Gemella</i>
K.	gênero <i>Klebsiella</i>
L	litro
L.	gênero <i>Lactobacillus</i> ou <i>Leptotrichia</i>
M	molar
M.	gênero <i>Micromonas</i>
MET	microscopia / microscópio eletrônico de transmissão
MEV	microscopia / microscópio eletrônico de varredura
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro

mM	milimolar
<i>N.</i>	gênero <i>Neisseria</i>
ng	nanograma
<i>O.</i>	gênero <i>Olsenella</i>
°C	graus Celsius ou centígrado
<i>P.</i>	gênero <i>Pseudomonas</i> ou <i>Peptostreptococcus</i> ou <i>Porphyromonas</i> ou <i>Prevotella</i> ou <i>Propionibacterium</i> ou <i>Proteobacteria</i>
PCR	Polimerase Chain Reaction
pH	potencial hidrogeniônico
qPCR	Quantitative Polimerase Chain Reaction
RNA	ácido ribonucléico
<i>S.</i>	gênero <i>Staphylococcus</i> ou <i>Streptococcus</i>
spp.	espécie
<i>T.</i>	gênero <i>Tissierella</i> ou <i>Treponema</i> ou <i>Tannerella</i>
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
U	unidades
ufc	unidade formadora de colônia
<i>V.</i>	gênero <i>Veillonella</i>

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	25
3 PROPOSIÇÃO	68
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	69
4.1 Material	69
4.2 Método.	74
4.2.1 Material clínico – Características	74
4.2.2 Procedimentos clínicos – Obtenção das amostras	76
4.2.3 Processamento microbiológico	79
5 RESULTADOS	85
6 DISCUSSÃO.	88
7 CONCLUSÃO.....	107
REFERÊNCIAS.	108
APÊNDICES.....	116
ANEXOS.....	120
EPÍGRAFE	129

1 INTRODUÇÃO

O termo Endodontia, originário do grego: *endo* (interior) e *odons* (dente), é utilizado para designar uma especialidade odontológica que se ocupa da biologia e patologia da polpa dental e de suas relações com os tecidos periapicais. Em condições normais o órgão pulpar corresponde a um tecido conjuntivo frouxo que contém no seu interior elementos vasculares e celulares, fibras e nervos e encontra-se circundado, em toda sua extensão, por paredes rígidas de dentina. A polpa desempenha funções formadora, nutritiva, de defesa e indutora. Como consequência da forte inter-relação morfofuncional existente entre a dentina e a polpa, esses dois tecidos são considerados uma estrutura integrada denominada complexo dentino-pulpar.

No processo de formação do elemento dental o desenvolvimento coronário e radicular ocorre de forma distinta, isto é, o desenvolvimento da raiz só tem início após a completa formação do esmalte. A rizogênese progride gradativamente e só se completa após a erupção do dente. Durante esse período o elemento dentário é denominado de dente jovem e apresenta como característica uma raiz incompletamente formada, com paredes finas e ampla comunicação com o ligamento periodontal.

A polpa dentária dos dentes recém – erupcionados é composta por um tecido de natureza imatura, caracterizado por um grande número de células e poucas fibras. Nessa fase evidencia-se um elevado número de células indiferenciadas e de fibroblastos. Na medida em que ocorre a maturação e o envelhecimento da polpa

dentária verifica-se uma diminuição no número de células, concomitante a sua substituição por componentes fibrosos.

A dentina é um tecido conjuntivo altamente mineralizado permeada por um sistema de finos túbulos que atravessam toda sua extensão a partir da polpa até a junção amelodentinária ou cementodentinária. A dentina compõe o corpo do elemento dentário, é revestida por esmalte, em sua porção coronária e por cemento em sua porção radicular, e delimita, interiormente, a cavidade pulpar. Processos fisiológicos diminuem gradativamente o espaço ocupado pela polpa e processos patológicos tendem a reduzir o volume da polpa em associação a mudanças no formato da cavidade pulpar. Em ambas as situações isso é devido à formação de dentina que se manifesta de forma fisiológica por uma deposição contínua e proporcional aos estímulos decorrentes do uso normal dos dentes; e, de modo mais exuberante em resposta a agressões mais intensas como, por exemplo, diante do estabelecimento de uma cárie dental.

Em condições de normalidade o cemento e o esmalte atuam como barreira protetora da dentina e do tecido pulpar. Entretanto fatores etiológicos mecânicos, químicos e microbianos podem determinar soluções de continuidade nessa proteção, conseqüentemente expondo a dentina e, eventualmente, o tecido pulpar ao ambiente bucal, viabilizando sua contaminação. As principais vias de acesso dos agentes microbianos são os túbulos dentinários expostos, exposição pulpar direta, doenças periodontais avançadas ou infecção do espaço pulpar por anacorese.

A polpa reage à invasão por microorganismos desde o momento em que esses, ou mesmo suas toxinas, atingem as regiões mais periféricas de túbulos dentinários expostos. Caracteristicamente essa defesa manifesta-se pelo estabelecimento de um processo inflamatório. A intensidade dessa resposta varia de

acordo com o estágio de desenvolvimento evolutivo da infecção, ou seja, tem-se nos primórdios de um processo patológico uma reação de pequena monta que tende a ampliar-se proporcionalmente ao alastramento da invasão microbiana, podendo culminar com a necrose total do tecido pulpar propiciando oportunidade ao desenvolvimento de uma periodontite apical.

O estabelecimento de uma periodontite apical representa, portanto, a forma pela qual o organismo tenta conter a disseminação da infecção sediada no endodonto. Tem oportunidade em razão dos efeitos patogênicos dos microorganismos por serem esses indutores de respostas do sistema de defesa do hospedeiro.

A terapia das periodontites apicais implica correto diagnóstico, o qual é dependente do conhecimento da natureza e complexidade das infecções endodônticas. Sabe-se que inúmeras espécies bacterianas habitam a cavidade oral, entretanto, somente um pequeno e seletivo grupo está envolvido na contaminação do sistema de canais radiculares. Vários estudos demonstram o caráter dinâmico e polimicrobiano do processo infeccioso endodôntico. Enquanto bactérias anaeróbias estritas são dominantes na microflora existente em canais portadores de infecção endodôntica de caráter primário, bactérias de caráter respiratório facultativo mostram íntima associação com fracassos de tratamentos endodônticos traduzindo-se por infecções persistentes ou secundárias.

Essas observações sustentam a idéia de que as interações microbianas e as condições ecológicas existentes no interior dos canais radiculares regulam significativamente a flora pela seleção de espécies bacterianas e possibilitam o crescimento e sobrevivência em um meio ambiente altamente seletivo e especializado.

O canal radicular é considerado um ambiente único onde determinantes ecológicos promovem uma seleção biológica que define o tipo e dirige o curso da infecção. Dentre os fatores que definem a colonização do sistema de canais radiculares destacam-se o suprimento nutricional, o baixo potencial de oxiredução, a relação entre espécies bacterianas, a temperatura, o pH, as defesas do hospedeiro, a presença de agentes anti-microbianos e inibidores e a natureza dos microorganismos (GOMES; LILLEY; DRUCKER, 1996). Microorganismos precursores consomem o O_2 disponível, produzem CO_2 e H e desenvolvem um baixo potencial de oxiredução. Esses fatos facilitam o crescimento de bactérias anaeróbias, capazes de fermentar aminoácidos e peptídeos, e restringem o crescimento de bactérias facultativas que obtém energia primariamente a partir da fermentação de carboidratos. A sucessão de espécies microbianas no decorrer do processo infeccioso resulta, portanto, de mudanças na disponibilidade de nutrientes e do decréscimo de O_2 livre. Dessa forma o tipo e a viabilidade de nutrientes são importantes para estabelecer o crescimento microbiano e determinam o caráter do processo infeccioso. Os nutrientes são provenientes da cavidade oral, do tecido conjuntivo degenerado, de constituintes dos túbulos dentinários e do fluido tecidual periapical.

Inúmeras pesquisas já delinearam a dinâmica da infecção, o papel dos nutrientes na propagação dos microorganismos e o tipo de microbiota presente em condição de periodontite apical crônica nos dentes completamente formados. Todavia nenhum estudo investigou os tipos de microorganismos presentes em canais radiculares de dentes jovens portadores de periodontite apical crônica, nos quais características anatômicas, diferenças na composição tecidual pulpar e outros possíveis fatores poderiam ser determinantes no estabelecimento de um processo

infeccioso diverso daquele já amplamente estudado em dentes completamente formados, portadores de necrose pulpar e periodontite apical crônica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A Microbiologia é o ramo da Biologia que se dedica ao estudo dos microrganismos, requerendo para tal, a disponibilidade de diversas condições e equipamentos específicos. Até o século XVII o avanço da Microbiologia não foi muito significativo dada a falta de meios apropriados para tal. Em 1665, Robert Hooke construiu um microscópio composto, no qual a luz passava através de duas lentes. Apesar de rudimentar, o aparato, usado para observação de fatias finas de cortiça, possibilitou visualizar e descrever a constituição do objeto por cavidades poliédricas, às quais chamou de célula (do latim *cellula* - quarto pequeno). Entretanto, foi Anton van Leeuwenhoek (1670), que após fabricar lentes de melhor qualidade e que não causavam distorções, quem primeiro observou organismos vivos por meio das mesmas. É considerado o criador da microbiologia pois viabilizou a descoberta de um mundo desconhecido até então, ao possibilitar a observação de algas, protozoários, leveduras, fungos e bactérias nas formas esféricas, em bastão e em espiral.

Após um período de estagnação, a Microbiologia como Ciência começa a progredir a partir de meados do século XIX, com o desenvolvimento de microscópios de alta qualidade juntamente com o aperfeiçoamento de técnicas de esterilização, cultivo de microrganismos e técnicas citológicas. Nessa época, estudiosos eminentes como Louis Pasteur e Robert Koch desenvolveram estudos que conduziram ao estabelecimento das bases da Microbiologia como ciência experimental estruturada e especializada. A Microbiologia então, deixa de ser uma ciência meramente descritiva para centrar-se no estudo da complexidade estrutural,

fisiológica, genética e ecológica dos microrganismos, bem como das inúmeras atividades por eles desempenhadas.

Dentre a grande variedade de microrganismos que foram identificados provavelmente as bactérias tenham sido as mais intensamente estudadas. Bactérias são organismos unicelulares, com formato diverso, que estão abundantemente distribuídas na natureza e ocasionalmente causam doenças.

Miller (1894), após análise bacterioscópica do esfregaço proveniente de canais radiculares, mencionou a associação entre bactérias e as patologias da polpa e do periápice. Esse estudo pioneiro consagrou-o como *pai da microbiologia oral* e fundamentou investigações subseqüentes que visaram estabelecer uma relação causal entre microrganismos e as afecções de origem endodôntica.

Anos depois, Kakehashi, Stanley e Fitzgerald (1965) testaram a influência de microrganismos viáveis na destruição de polpas dentais expostas de 36 ratos, sendo 21 *germ-free* e 15 convencionais. Com uma broca esférica 1/2 foram confeccionadas, em primeiros molares inferiores, cavidades oclusais através do esmalte e dentina até a exposição do tecido pulpar. Os animais foram mortos em períodos de 1 a 42 dias e blocos mandibulares foram processados e histologicamente analisados. Nos animais convencionais a situação evoluiu progressivamente de inflamação pulpar severa até completa necrose pulpar com formação de abscessos. Todavia, em animais *germ-free* observaram uma inflamação pulpar mínima e formação de ponte de dentina após 14 dias. Os resultados demonstraram claramente os efeitos da presença de microrganismos sobre a saúde pulpar, isto é, ser a presença de microrganismos o principal fator determinante no estabelecimento de alterações patológicas e derivar da

continuidade de suas ações dificuldades no estabelecimento de mecanismos reparacionais.

No decorrer da década de 1960 o emprego nas pesquisas de microscopia básica, de incubação aeróbia e de reações bioquímicas (SERENE; ANDERSON, 1967; BERGENHOLTZ, 1974) evidenciou hegemonia de microorganismos facultativos, aspecto favorecido em função de limitações técnicas. As espécies mais comumente isoladas eram: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* e enterococos. Outras espécies tais como *Staphylococcus epidermidis*, lactobacilos, pseudomonas e *Candida albicans* também foram descritas com relativa frequência (FABER; SELTZER, 1988; LOPES; SIQUEIRA JR, 2004).

O advento de aperfeiçoadas técnicas anaeróbias de cultivo estabelece um marco divisório nas pesquisas microbiológicas voltadas à Endodontia, gerando um considerável interesse a respeito do papel desempenhado pelos microorganismos no estabelecimento do processo infeccioso, e comprovando, mais recentemente, o caráter polimicrobiano da infecção.

Wittgow Jr e Sabiston (1975) empregaram métodos de anaerobiose para investigar o status bacteriológico de dentes portadores de polpa mortificada por seqüela de traumatismo. Quarenta incisivos, de trinta e três pacientes, foram estudados. O processamento laboratorial das amostras constou de coloração Gram e testes bioquímicos, tendo sido obtidas trinta e duas culturas positivas. Um total de 82 espécies foram isoladas perfazendo uma média de 2,05 espécies por dente. Bastonetes anaeróbios Gram-negativos foram evidenciados em 67% de toda a amostra, em 75% de todos os dentes com polpa necrosada e em 84% de todos os dentes com cultura positiva. Os autores afirmaram que as espécies isoladas são

constituintes da flora oral normal e podem ser descritas como patógenos oportunistas, a saber: Bastonetes anaeróbios Gram-positivos: *Eubacterium alactolyticum*, espécies de *Lactobacillus*, *Arachnia propionica*, *Propionibacterium acnes*, espécies não identificadas; Bastonetes anaeróbios Gram-negativo: *Bacteroides ruminicola* SS *brevis*, *Bacteroides oralis*, espécies de *Bacteroides*, espécies não identificadas; Cocos anaeróbios Gram-positivo: *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus intermedius*, *Peptostreptococcus anaerobius*, espécies não identificadas; Cocos anaeróbios Gram-negativo: *Veillonella Parvula*; organismos facultativos: espécies de *Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces espécies*, estreptococos facultativos.

Na tentativa de encontrar uma correlação convincente entre a presença de bactérias no interior do canal radicular e o desenvolvimento de destruição periapical, Sundqvist (1976), realizou um amplo estudo bacteriológico de dentes não vitais. Os cuidados com a seleção da amostra e as técnicas de coleta e cultivo por ele adotados, proporcionaram resultados que modificaram notavelmente os conceitos vigentes. As amostras foram obtidas de 32 dentes unirradiculares, necrosados, com câmara pulpar intacta, e cultivadas em condições de aerobiose e anaerobiose. Bactérias estavam presentes em 18 dos 19 dentes com sinais radiográficos de alteração periapical, entretanto, nenhuma das amostras provenientes de dentes sem rarefação óssea apresentou cultura positiva. Oitenta e oito cepas bacterianas foram isoladas, sendo cinco facultativas e 94,3% anaeróbia estrita. O número de espécies no interior do canal variou de 1 a 12. Uma correlação positiva foi encontrada entre a presença de sintomas e o número de bactérias presentes, assim como entre o tamanho da lesão, sua densidade e a diversidade bacteriana no interior do canal radicular. Os gêneros bacterianos mais freqüentemente isolados foram:

Fusobacterium, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Campylobacter*. Esse estudo clássico constitui evidência irrefutável do papel de agentes microbianos na etiopatogenia da periodontite apical.

Keudell et al. (1976) realizaram investigação semelhante confirmando os achados prévios. Quarenta e três (78%) exemplares obtidos de 55 dentes apresentaram crescimento positivo. Bactérias foram encontradas em 79% das amostras provenientes de polpas necróticas, sendo 64% anaeróbia, com destaque para as espécies: *Bacteroides* (7), *Propionibacterium acnes* (6) e *Eubacterium alactolyticum*. Entretanto, os autores afirmaram que o gênero *Streptococcus* foi o mais freqüentemente isolado. Uma maior tendência em abrigar microorganismos anaeróbios foi verificada em polpas necrosadas de dentes traumatizados quando comparados a necrose por evolução de processo carioso.

No mesmo ano, Cvek, Nord e Hollender (1976), analisaram amostras obtidas após a remoção do conteúdo necrótico de 108 dentes traumatizados. O estágio de desenvolvimento radicular dos elementos avaliados foi definido por uma avaliação radiológica na qual se mensurava a largura do forame apical. Assim quando o forame media 0,6 mm ou mais as raízes eram consideradas imaturas. Trinta e duas das 46 raízes imaturas aportavam microorganismos. *Alfa-streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Streptococcus faecalis*, espécies de *Corynebacterium* e espécies de *Propionibacterium* dominaram as culturas. Uma associação foi descrita entre a condição radiológica e a presença de microorganismos, ou seja, o crescimento bacteriano foi mais freqüente em dentes com alterações ósseas periapicais.

Para elucidar questões relativas à capacidade de combinações bacterianas específicas, procedentes de tecido pulpar mortificado, induzirem inflamação cutânea

purulenta e transmitirem infecção Sundqvist et al. (1979) desenvolveram um experimento em porcos. Oitenta e oito cepas, sendo 85 anaeróbias, foram selecionadas de dentes humanos assintomáticos (11) e sintomáticos (7), com destruição óssea periapical. O número de cepas por combinação variou de 1 a 12 e as cepas foram utilizadas em suas combinações originais e em novas. O teste de patogenicidade provou que as bactérias oriundas de dentes assintomáticos com inflamação crônica não produziram infecção, contrariamente, combinações bacterianas provenientes de dentes sintomáticos com exsudação purulenta, de amostras obtidas por aspiração do conteúdo de abscessos periapicais, geraram infecção. Todas as combinações que causaram infecção continham cepas de *Bacteroides melaninogenicus* ou *Bacteroides asaccharolyticus*. Esse resultado sugere que a exsudação purulenta apical pode ser induzida por combinações específicas de bactérias do canal radicular sendo a presença de cepas de *Bacteroides melaninogenicus* ou *Bacteroides asaccharolyticus* essencial. Além disso, a presença da espécie *Peptostreptococcus micros*, atuando como suporte adicional às duas espécies anteriormente mencionadas, mostrou-se indispensável. O autor destacou que o preparo-químico-cirúrgico de canais infectados constitui uma importante fase do tratamento, entretanto, pode ocasionar extrusão de microorganismos e induzir exacerbação aguda. Todavia, como a ocorrência desse fenômeno não é freqüente, o autor sugere que exacerbações agudas podem ser causadas por infecções polimicrobianas, nas quais microorganismos ganham patogenicidade por sinergismo entre espécies.

Sabendo que inter-relações ecológicas específicas são necessárias para iniciar e manter uma infecção anaeróbia envolvendo Bacteróides produtores de pigmento negro (BPPN) Sundqvist, Johansson e Sjögren (1989) avaliaram a

prevalência dessa espécie em uma amostra composta por 72 dentes portadores de periodontite apical. Após a coleta clínica em sessenta e três pacientes, os espécimes bacterianos obtidos foram submetidos a um processamento laboratorial de cultivo, isolamento, caracterização e identificação. Todos os canais apresentaram contaminação. Vinte e dois canais continham uma ou mais espécies do microorganismo alvo. O número médio de células por canal foi de $2,8 \times 10^5$ na presença de *Bacteroides* produtores de pigmento negro e de $3,0 \times 10^5$ na ausência, enquanto, o número médio de cepas por canal foi de 7,9 e 3,3 respectivamente. Cento e setenta e três cepas bacterianas foram isoladas, de canais contendo BPPN e cento e trinta e quatro classificadas de acordo com a espécie. Houve um forte predomínio de bactérias anaeróbias (91,4%), principalmente na presença de BPPN (95,4%). As espécies mais freqüentemente recuperadas foram: *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides intermedius*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium lentum*, e *Eubacterium alactolyticum*. Vinte e cinco cepas de BPPN foram identificadas: *Bacteroides intermedius* (14 cepas), *Bacteroides endodontalis* (5 cepas), *Bacteroides loeschi* (3 cepas), *Bacteroides gengivalis* (2 cepas) e *Bacteroides denticola* (1 cepa). Os autores classificaram a infecção como polimicrobiana e atentaram para o elevado número de células e cepas bacterianas presentes em canais que continham BPPN. Dezesesseis dos vinte e dois canais que abrigavam BPPN tinham, ou desenvolveram abscesso apical, entretanto, não houve correlação entre a presença desta espécie e a formação da entidade patológica uma vez que BPPN também foram recuperados de casos assintomáticos. Os autores explicaram que o raro isolamento de BPPN assacarolíticos é resultante de características do microorganismo, que requer condições especiais para o crescimento, o que, sobremaneira, dificulta o seu cultivo.

Baumgartner e Falkler (1991) escreveram que o novo gênero estabelecido como *Porphyromonas* incluía as espécies previamente identificadas como *Bacteroides* produtores de pigmento negro assacarolíticos, *Porphyromonas endodontalis* e *Porphyromonas gingivalis*. Conscientes de que a infecção do sistema de canais radiculares é predominantemente anaeróbia, descreveram algumas condições para sua ocorrência: a presença de tecido necrótico, um suprimento sanguíneo comprometido e uma infecção prévia por microorganismos aeróbios e facultativos que diminuem o potencial de oxiredução no tecido. Afirmaram também, que a sensibilidade da cultura, o sítio de obtenção da amostra, a idade e o estado de saúde do paciente podem alterar a incidência de microorganismos anaeróbios.

Ainda no artigo acima citado, foi apresentado um estudo com o propósito de identificar as bactérias presentes nos cinco mm apicais de dez dentes com lesões cariosas extensas, exposição pulpar e alteração inflamatória periapical associada. Os espécimes recém extraídos foram alocados em uma câmara de anaerobiose após a remoção da lesão. A cultura e a identificação subsequente possibilitaram a recuperação de 50 cepas bacterianas, sendo 34 (68%) anaeróbia estrita. Os microorganismos mais comuns foram: espécies de *Actinomyces*, espécies de *Lactobacillus*, *Bacteroides* produtores de pigmento negro, espécies de *Peptostreptococcus*, *Veillonella parvula*, *Bacteroides buccae*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus mutans*. Todos os canais estavam contaminados e o número médio de unidades formadoras de colônia (UFC's) nos espécimes que continham *Bacteroides* produtores de pigmento negro foi de $4,4 \times 10^5$, todavia, nos espécimes onde esse microorganismo não foi encontrado, a média foi de $3,9 \times 10^5$. O número médio de cepas por canal foi de cinco,

consistente com uma infecção polimicrobiana. Seis cepas de *Bacteroides* produtores de pigmento negro foram isoladas, cinco delas eram *Bacteroides intermedius* e uma *Bacteroides denticola*. Considerando a presença de exposição pulpar por cárie, a porcentagem relativamente alta (68%) de bactéria anaeróbia isolada foi associada a um processo seletivo de anaeróbios da flora oral.

O meio ambiente específico do sistema de canais radiculares pode favorecer relações de comensalismo e antagonismo entre as espécies. Para elucidar essa questão Sundqvist (1992a) analisou amostras provenientes de 65 dentes humanos com periodontite apical quanto à composição, frequência de ocorrência e proporção da microbiota. O material obtido foi diluído, semeado em placas de ágar-sangue e incubado em condições aeróbia e anaeróbia, por 2 e 7 dias, respectivamente. Foram isoladas 353 cepas bacterianas e o número médio de cepas por canal foi 5,4. Destacaram-se em maior frequência: *Fusobacterium nucleatum* (48%), *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium alactolyticum*, *Eubacterium lentum*, *Wolinella recta*. Quarenta e duas cepas foram classificadas somente em nível de gênero, a saber: *Fusobacterium* sp., *Prevotella* (*Bacteroides*) sp. e *Lactobacillus* D2 e D10. Associações positivas foram descritas entre: a) *Fusobacterium nucleatum* e *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas endodontalis*, *Selenomonas sputigena* e *Wolinella* sp.; b) *Prevotella intermedia* e *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas anaerobius* e eubactéria; c) *Porphyromonas endodontalis* e *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium alactolyticum*, *Wolinella* SP., *Lactobacillus* SP. anaeróbio e uma cepa de fusobactéria não identificada; d) *Eubacteria* e *Peptostreptococcus* sp. e *Prevotella intermedia*. Uma interação negativa foi descrita entre *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella intermedia*. As espécies *Streptococcus*, *Propionibacterium propionicus*,

Capnocytophaga ochracea e *Veillonella parvula* mostraram relação negativa ou nula com as demais. O autor comentou que as condições presentes no interior do sistema de canais radiculares, onde há falta de nutrientes disponíveis, possivelmente favorecem o crescimento de bactérias anaeróbias capazes de fermentar aminoácidos e peptídeos, e limitam a proliferação daquelas que obtêm energia primariamente da fermentação de carboidratos. Destacou ainda que o crescimento de uma população bacteriana mista depende da cadeia alimentar onde o metabolismo de uma espécie supre os nutrientes essenciais para o crescimento de outra. Concluiu que, durante o curso da infecção fortes relações se desenvolvem entre diferentes espécies bacterianas e que mudanças na população microbiana são produzidas como resultado dessas interações, das características do ambiente e das pressões seletivas do interior dos canais radiculares.

Brauner e Conrads (1995) examinaram a variedade bacteriana presente em casos de periodontite apical aguda. As amostras foram coletadas de 19 canais radiculares e 24 granulomas de forma distinta e encaminhadas para processamento. Alíquotas de 100µL da suspensão diluída foram semeadas em placas de BAG-anaerobic ágar e Columbia-medium e incubadas por 5-7 dias. O crescimento bacteriano foi quantificado e as bactérias foram diferenciadas segundo os seguintes critérios: coloração Gram, morfologia, pigmentação e reação catalase e, a seguir, por testes bioquímicos. Adicionalmente, sondas de DNA foram utilizadas para diferenciar as espécies *Prevotella intermédia* e *Porphyromonas endodontalis*. Ao final do experimento uma microbiota mista anaeróbia (82%) e facultativa foi identificada, com predomínio das seguintes espécies: *Prevotella intermédia* (76,6%), *Streptococcus sanguis* (69,8%), *Bifidobacterium spp.* (67,4%) e o grupo *Streptococcus milleri* (55,8%). A média de espécies encontradas nas amostras oriundas dos canais atingiu

5,7 e dos granulomas 6,8. Os autores sugeriram que a presença de espécies de *Bacteroides* produtores de pigmento negro aumenta consideravelmente o número de espécies bacterianas encontradas e concluíram que o espectro bacteriano do interior do canal radicular apresenta uma distribuição qualitativa semelhante ao do granuloma, entretanto, difere quantitativamente.

Um estudo foi desenvolvido por Gomes, Lilley e Drucker (1996) para elucidar a associação entre sinais e sintomas clínicos e a presença de bactérias específicas. Setenta canais radiculares foram examinados microbiologicamente e seus respectivos dados clínicos foram coletados para uma investigação minuciosa. À coleta das amostras seguiu-se o processamento microbiológico que resgatou 242 isolados cultiváveis pertencentes a 65 espécies microbianas diferentes. Sessenta e quatro por cento do total de isolados corresponderam a anaeróbios estritos com destaque para as espécies: *Peptostreptococcus micros* (14,2%), *Prevotella melaninogenica* (6,4%), *Prevotella oralis* (5,2%), *Eubacterium aerofaciens* (4,5%), *Fusobacterium nucleatum* (3,9%), *Prevotella buccae* (3,2%) e *Prevotella intermedia* (2,6%). Outros 23,1% constituíam-se de estreptococos. Foram descritas as seguintes associações: a) dor / *Prevotella ssp.* ou *peptostreptococos*; b) edema / *Eubacterium ssp.* e/ou *Prevotella ssp.* ou *Peptostreptococcus micros*; c) exsudato purulento / *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella loescheii*, *Streptococcus constellatus* ou *Bacteroides ssp.*; d) canal úmido / anaeróbios facultativos e quaisquer espécies dos gêneros *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Propionibacterium*. Os autores relataram ser importante a determinação das proporções relativas das espécies identificadas em cada situação clínica, destacaram, entretanto, que essa abordagem tem limitações distintas. Observaram, que os sítios infectados abrigam uma microbiota anaeróbia estrita e facultativa,

derivando um complexo ambiente no interior do sistema de canais radiculares, onde uma espécie pode favorecer ou inibir o crescimento de outra. Sugerem que, conseqüentemente, o mesmo pode ocorrer na conjuntura clínica, isto é, um aumento ou diminuição de determinados sinais e sintomas.

Baumgartner e Watkins (1996), identificaram as bactérias associadas a alterações patológicas da polpa e periápice em 43 dentes hígidos com rarefação óssea periapical. Coloração Gram, reações bioquímicas e perfis de comportamento foram utilizados para identificação das cepas isoladas. No total 348 colônias foram isoladas, sendo 288 (83%) anaeróbias e com número médio de oito cepas por canal. As amostras coletadas de 23 pacientes (54%) apresentaram crescimento positivo de bactérias produtoras de pigmento negro (BPB), a saber: *Prevotella intermedia* (3), *Prevotella nigrescens* (13), *Prevotella melaninogenica* (5), *Porphyromonas gingivalis* (4), *Porphyromonas endodontalis* (1). Outras bactérias também identificadas foram: *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus morbillorum* e *Porphyromonas oralis* não-pigmentada.

Uma pesquisa realizada por Le Goff et al. (1997) investigou a microbiota de dentes hígidos com polpas necrosadas e testou a sensibilidade dos microorganismos encontrados a antibióticos. Amostras microbiológicas foram obtidas de 26 dentes, todavia, seis foram excluídas por contaminação do controle e duas apresentavam-se assépticas. As 18 amostras restantes foram analisadas. O processamento microbiológico de cultura e identificação revelou 84 diferentes cepas, 79 foram identificadas em nível de gênero e espécie. O número de espécies por dente variou de dois a oito. As cepas isoladas abrangeram anaeróbias (81%) e facultativas (19%) e as espécies mais comuns foram: *Bacteroides gracilis*, *Propionibacterium acnes*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella buccae* e

Eubacterium lentum. Para análise da suscetibilidade aos antibióticos amoxicilina, amoxicilina + clavulanato e tetraciclina foram utilizadas o Etest[®] (análise de halos de inibição). Somente 38 ensaios forneceram resultados confiáveis para as 66 cepas anaeróbias identificadas, as quais foram altamente sensíveis a amoxicilina e sensíveis aos demais. Para todas as cepas testadas os valores de concentração inibitória mínima obtidos foram baixos e, substancialmente inferiores as concentrações séricas efetivas para esses antibióticos. Segundo os autores, os dados obtidos permitem o delineamento adequado do tratamento de quadros agudos desenvolvidos a partir de lesões apicais, prevenindo a disseminação da fonte de infecção.

Conrads et al. (1997) realizaram um estudo com o objetivo de detectar e diferenciar bactérias presentes em amostras provenientes de canais radiculares necrosados. Métodos de cultura e métodos moleculares foram utilizados para sintetizar a distribuição quantitativa e qualitativa das bactérias em cada uma das 17 amostras, assim como a existência de taxa bacteriana específica. Quatorze amostras apresentaram crescimento positivo em ambos os métodos. Duas amostras foram classificadas como estéreis. Um espécime com ausência de crescimento em cultura mostrou uma fraca, porém clara, reação positiva ao método molecular. Sete de 14 amostras exibiram, microscopicamente, colônias homogêneas as quais foram classificadas como espécies singulares. Treze diferentes cepas foram diferenciadas e um fungo. O número médio de células por amostra foi de 6×10^3 . OS resultados demonstraram a presença de *Actinomycetales* ssp., *Actinomyces israelii*, *Actinomyces viscosus*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus intermedius*.

Com o propósito de elucidar a patogenicidade das lesões perirradiculares Siqueira Jr. et al. (2000) examinaram a microbiota de 28 dentes adultos, unirradiculares, com polpa necrosada e evidência radiográfica de perda óssea. A avaliação microbiológica constou de: 1- enumeração das espécies bacterianas em cada amostra por meio de hibridização do DNA extraído (*checkerboard DNA-DNA hybridization*) e 2- avaliação da presença de bactéria em amostras clínicas pela amplificação da reação cadeia polimerase (*polymerase chain reaction amplification*). Todas as 28 amostras continham bactérias. Vinte e duas das 42 sondas de DNA testadas reagiram com uma ou mais espécimes. Dezesete das 28 amostras (60,7%) foram positivas para pelo menos uma sonda de DNA. Destacaram-se como espécies mais prevalentes: *Bacteroides forsythus* (39,3% dos casos); *Haemophilus aphrophilus* (25%); *Corynebacterium matruchotii* (21,4%), *Porphyromonas gingivalis* (17,9%) e *Treponema denticola* (17,9%). As espécies *Enterococcus faecalis*, *Capnocytophaga gingivalis* e *Streptococcus intermedius* foram detectadas em 14,3% das amostras dentes infectados. Algumas espécies tidas como habitantes incomuns do ambiente oral, como *Ralstonia sp.* e *Pseudomonas aeruginosa* foram encontradas em alguns casos, entretanto, em baixos níveis. Os autores definiram a lesão perirradicular como uma doença inflamatória de etiologia microbiana e salientaram a importância do método de cultura na identificação de bactérias em amostras clínicas, considerando-o um meio de pesquisa padrão ouro.

Considerando a importância dos microorganismos na etiopatogenia do processo patológico que afeta o sistema de canais radiculares, Lana et al. (2001) pesquisaram as espécies microbianas envolvidas na infecção endodôntica e avaliaram a efetividade da terapêutica instituída. A amostra foi composta por trinta e um dentes unirradiculares com polpa mortificada, dos quais 22 apresentavam

câmara pulpar intacta, e nove, comunicação com a cavidade oral. Os espécimes, clinicamente coletados, foram processados em laboratório microbiológico para isolamento e caracterização das cepas. Adicionalmente calcularam a probabilidade dos relacionamentos existentes entre gêneros bacterianos dentro de cada amostra. Trezentos e oito microorganismos foram isolados de 27 canais (87,1%) e 278 (90,3%) foram identificados em gênero e espécie. O número de espécies por canal variou de um a 11, perfazendo uma média de cinco espécies por canal. Vinte e dois canais (81,5%) exibiram uma infecção polimicrobiana, 24 canais (88,9%) abrigavam anaeróbios estritos, 14 canais (51,8%) hospedavam anaeróbios facultativos, cinco canais (18,5%) acolheram microaerófilos e dois canais (7,4%) alojavam fungos. As cepas mais comumente isoladas e classificadas foram: *Prevotella* (20 cepas / 12 canais), *Fusobacterium* (1/11), *Lactobacillus* (14/10), *Streptococcus* (16/10), *Clostridium* (11/9) e *Peptostreptococcus* (12/7). As espécies mais freqüentemente isoladas, após a abertura coronária, foram *Fusobacterium nucleatum* (35,48%) e *Prevotella intermédia* / *nigrescens* (25,8%). Associações positivas foram descritas entre *Clostridium* e *Prevotella* (odds ratios = 29,17), entre *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium* (odds ratios = 25,00), entre *Streptococcus* e *Prevotella* (odds ratios = 5,35) e entre *Streptococcus* e *Fusobacterium* (odds ratios = 6,00). Contrariamente, *Prevotella* e *Fusobacterium* não foram associadas de forma significativa a *Clostridium* (odds ratios = 4,82) e *Peptostreptococcus* (odds ratios = 3,58). Os autores descreveram a microbiota presente como mista, predominantemente anaeróbia, com destaque para bastonetes anaeróbios Gram-negativos, confirmando a relevância desse grupo microbiano no processo. Afirmaram que as associações microbianas são importantes e regulam a composição da microbiota, assim como as relações de antagonismo e sinergismo entre as espécies desempenham um papel

fundamental na colonização do canal radicular. A análise microbiológica comprovou a eficácia dos procedimentos terapêuticos instituídos na redução da população microbiana presente; fato esse creditado à ação antimicrobiana das substâncias empregadas e às mudanças nas condições ecológicas internas como, exposição ao oxigênio e ruptura de interações microbianas existentes.

Siqueira e Lopes (2001) analisaram a presença de bactérias na superfície radicular de 27 dentes não tratados associados à lesão perirradicular crônica. Os espécimes recém-extraídos foram fixados em formalina neutra 10% por uma semana. A seguir as lesões foram extirpadas e os 5 mm finais das raízes foram secados, desidratados e cobertos com ouro. Usando microscopia eletrônica de varredura os autores descreveram três ápices com lacunas de reabsorção, cavidades de reabsorção com bordos lisos ocupando grande extensão apical em outro espécime e células clásticas dentro de lacunas em outra amostra. Nenhuma célula bacteriana foi identificada dentro de defeitos reabsortivos. Células de defesa foram observadas com frequência nas proximidades do forame apical. Células bacterianas adjacentes ao forame apical foram descritas em alguns espécimes, consistindo, morfológicamente, de cocos e bastonetes. Em uma amostra foi evidenciado um denso agregado bacteriano composto por bastonetes contíguos ao forame e estendendo-se além do mesmo. Externamente, nesse espécime, outros tipos morfológicos foram reconhecidos, incluindo agregações de cocos e filamentos, caracterizando um desenvolvimento em forma de espiga de milho. Os resultados sugeriram que a infecção extra-radicular é incomum em dentes sem tratamento.

A limpeza e o saneamento reduzem o número de bactérias no interior do sistema de canais radiculares. Preocupados com as seqüelas da permanência de microorganismos no interior dos túbulos dentinários Peters et al. (2001) avaliaram 20

dentes com periodontite apical, oriundos de duas localizações geográficas diferentes, Amsterdam (Grupo 1) e Glasgow (Grupo 2). Raspas de dentina foram obtidas de três profundidades distintas, a partir da superfície externa radicular em direção a cavidade pulpar. As amostras de dentina foram pesadas, diluídas, semeadas e incubadas a 37°C por 14 dias em ambiente anaeróbio. Adicionalmente, oito raízes foram histologicamente preparadas, seccionadas em fatias de 7µm e coradas pelo método Brown & Brenn. O processamento microbiológico evidenciou bactérias em 77% das amostras do grupo 1 e 87,5% do grupo 2. Invasão bacteriana foi detectada em 62% (13/21) das amostras das camadas de dentina mais distantes da polpa e em 81% das amostras das camadas mais internas de dentina. Sessenta e dois por cento das amostras de dentina profunda continham mais de 50.000 UFC's. Em camadas mais próximas da polpa foi evidenciado um maior número de espécies bacterianas, de bastonetes Gram-positivo e de bactérias anaeróbias. As espécies mais dominantes foram: *Prevotella intermedia*, *Prevotella prevotii*, *Prevotella buccae*, *Porphyromonas gengivalis*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium necrogenes*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptostreptococcus micros*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Streptococcus sanguis*, *Propionibacterium acnes*, *Bifidobacterium adolescentis* e *Lactobacillus acidophilus*. As secções histológicas mostraram bactérias difundidas no interior dos túbulos dentinários de 5 dos 8 dentes avaliados. Em três dentes as bactérias estavam presentes no espaço do canal radicular, entretanto não foram detectadas nos túbulos dentinários radiculares. Nesses espécimes a contagem de UFC's por mg de dentina foi inferior a 10.000. Os autores concluíram que a maioria das raízes infectadas apresentou bactérias nas camadas mais profundas, isto é, mais próximas

ao cimento. Também apontaram uma superioridade nos resultados obtidos pela cultura microbiológica, afirmando que essa propicia melhores informações quantitativas sobre a extensão da infecção quando comparada aos testes histológicos.

Conhecer a composição da flora patogênica do sistema de canais radiculares possibilita o desenvolvimento de estratégias terapêuticas efetivas. Estima-se que menos de 50% das bactérias da cavidade oral são clinicamente cultiváveis, sugerindo que espécies não-cultiváveis podem estar presentes no canal radicular e contribuir para o processo de doença. Técnicas moleculares desenvolvidas no campo da ecologia microbiana para avaliar membros de diversas comunidades, inclusive microorganismos não-cultiváveis, foram adaptadas para o estudo de diferentes condições clínicas como abscessos dento - alveolares, placa subgengival e periodontite. Assim, Rolph et al. (2001) utilizaram uma técnica de seqüenciamento do gene 16S rRNA para examinar diversidade bacteriana em canais infectados de dentes com periodontite perirradicular. Quarenta e uma amostras, obtidas de 24 pacientes, abrangeram dentes com necrose pulpar e periodontite apical (15) e dentes com infecção persistente (26). Foram realizadas duas coletas em momentos distintos: a primeira logo após a abertura coronária e a segunda, em consulta posterior, após a remoção da medicação intracanal. Todos os espécimes foram analisados por método de cultura e PCR (polymerase chain reaction amplification). Oito amostras (3 com infecção primária e 5 com infecção persistente) foram submetidas a um exame molecular mais detalhado. Após clonagem e seqüenciamento foram identificados os seguintes gêneros: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* e *Streptococcus* em dentes com infecção primária (2); *Lactobacillus*, *Pantoea*, *Prevotella* e *Selenomonas* em dentes com infecção

primária e fístula (1); *Capnocytophaga*, *Cytophaga*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Mogibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Selenomonas*, *Solobacterium*, *Streptococcus* e *Veillonella* em dentes com infecção persistente (5). Quarenta e quatro por cento da amostra total (41) foi positiva para cultura e 68% foi positiva para o PCR, entretanto, a porcentagem de detecção de amostras positivas foi a mesma para ambas as técnicas quando foram avaliadas as amostras da primeira coleta dos casos de infecção primária. O método de cultura convencional revelou a presença das seguintes espécies bacterianas: *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, *Corynebacterium sp*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium sp*, *Lactobacillus fermentum*, *Staphylococcus lentus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus sanguis Tipo I*, *Streptococcus sanguis Tipo II*, *Streptococcus* do grupo viridans, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus oralis*, *Propionibacterium acnes* nos espécimes de infecção primária e *Actinomyces israelii*, *Eubacterium sp.*, *Lactobacillus acidophilus*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus prevotii*, *Porphyromonas endodontalis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Veillonella sp.*, *Propionibacterium acnes* e *Propionibacterium granulosum* em amostras provenientes de infecção persistente. Os autores concluíram que os resultados da clonagem / seqüenciamento refletiram aqueles obtidos em cultura e comprovam o perfil individual da infecção endodôntica na qual cada canal possui uma microbiota distinta e específica.

O propósito da pesquisa realizada por Siqueira, Rôças e Lopes (2002) foi investigar o padrão da infecção microbiana de canais radiculares infectados associados a lesões periapicais crônicas. Quinze dentes unirradiculares com extensas lesões cariosas foram selecionados e extraídos. As coroas foram

removidas e as raízes seccionadas no seu longo eixo com auxílio de um cinzel. Os espécimes foram secados por concentrações crescentes de álcool, desidratados até o ponto crítico e revestidos com ouro sob vácuo. As paredes dentinárias e os túbulos dentinários adjacentes, dos terços médio e apical, foram examinados sob microscópio eletrônico de varredura. Os autores descreveram um padrão de colonização não- uniforme entre os espécimes e, até em um mesmo espécime. Todos os canais examinados estavam infectados, a microbiota continha cocos e/ou bastonetes formando densos agregados contínuos à parede do canal radicular e, eventualmente, penetrando nos túbulos dentinários. Células de levedura foram observadas em um único espécime. Os pesquisadores relataram que colônias bacterianas morfológicamente distintas parecem estar coagregadas e organizadas em comunidades *clímax*, resultando na formação de entidades auto-replicadoras, nas quais as bactérias permanecem em harmonia e equilíbrio com o meio. Destacaram que esse fato permite o estabelecimento e a sobrevivência de determinadas espécies bacterianas que requerem condições específicas e complexas para seu crescimento. Afirmaram, ainda, que o conhecimento do padrão de colonização dos microorganismos patogênicos e sua localização no sistema de canais radiculares favorecem o desenvolvimento de estratégias terapêuticas de controle da infecção.

Subconjuntos da microbiota oral são responsáveis pelas infecções endodônticas. Esse conceito fundamentou a pesquisa realizada por Munson et al. (2002), que utilizaram metodologias combinadas para determinar a diversidade bacteriana associada às infecções. Foram selecionados cinco pacientes com periodontite apical crônica e evidência radiográfica de destruição óssea. Após a cirurgia de acesso e irrigação com solução salina esterilizada, o conteúdo do canal

radicular foi processado por métodos de cultura e moleculares. Os resultados revelaram 261 isolados e 624 genes clonados, seqüenciados e identificados. Aeróbios e facultativos constituíram componentes mínimos. Quanto aos anaeróbios, 17 taxas foram detectadas somente por cultura, 26 somente por análise molecular e 20 por ambos os métodos. Em média 20,2 taxas estavam presentes em cada amostra. Quando a taxa foi delimitada por *phylum* foram encontrados, entre os isolados, membros de *Firmicutes* (39), *Bacteroidetes* (15), *Actinobacteria* (6), *Fusobacteria* (3) e *Proteobacteria* (2). Em ambas as análises componentes do *phylum Firmicutes* foram dominantes e o táxon *Dialister E1* foi o único representante presente em todas as amostras. A presença de espécies de *Porphyromonas*, não foi registrada, fato justificado pelas características clínicas dos dentes estudados. A análise molecular mostrou que a microbiota associada às infecções é altamente diversificada. Os autores salientaram que estudos taxonômicos polifásicos tornam possível a descrição da microbiota oral em sua totalidade, favorecendo a compreensão da inter-relação bactérias/hospedeiro na saúde e na doença.

O propósito da pesquisa realizada por Fouad et al. (2002) foi determinar a presença de 10 supostos microorganismos participantes de infecções endodônticas em amostras coletadas de 24 dentes necrosados com periodontite apical. O DNA bacteriano, extraído do material clínico coletado, foi amplificado por PCR (Polimerase Chain Reaction) e clonado, originando novas seqüências 16S rDNA, as quais foram filogeneticamente analisadas. *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus spp.* e *Prevotella nigrescens* foram as espécies mais comumente identificadas. Sintomas pré-operatórios foram significativamente associados à presença de *Streptococcus spp.*. Uma associação positiva foi descrita entre: edema e a presença de *Streptococcus spp.*,

Porphyromonas gingivalis e *Enterococcus* spp.; e diabetes melitus e *Porphyromonas endodontalis* e *Porphyromonas gingivalis*. A utilização do primer universal identificou DNA bacteriano em 22 espécimes avaliados, as duas amostras restantes foram provenientes de dentes intactos traumatizados seis meses antes do tratamento. Segundo os autores, no momento do tratamento, as bactérias ainda não haviam invadido o tecido pulpar necrótico desse pacientes. Doze amostras apresentavam um ou mais bastonetes, Gram-negativos, produtores de pigmento negro, entre os quais: *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia* e *Prevotella nigrescens*. Todavia, não foi demonstrada associação entre a presença dessas espécies e a manifestação de sintomas. A análise molecular identificou em um espécime a presença de um microorganismo relacionado ao gênero *Olsenella*, sem registros prévios relacionados ao meio ambiente endodôntico.

Baumgartner et al. (2004) realizaram um ensaio para verificar a prevalência de oito patógenos específicos em amostras coletadas de duas diferentes localidades geográficas. Foram aspirados, em condições assépticas, o conteúdo de 47 e 27 abscessos, provenientes, respectivamente, de Portland, Oregon e do Rio de Janeiro, Brasil. Reações em Cadeia Polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction) com primers espécie-específicos do gene 16S r-RNA foram usadas para o reconhecimento bacteriano após a extração do material genético de cada amostra clínica. As espécies mais prevalentes nos espécimes provenientes de Portland foram: *Prevotella intermedia* (85% dos casos); *Fusobacterium nucleatum* (73%) e *Porphyromonas gingivalis* (72%). Todavia, nas amostras obtidas no Rio de Janeiro houve predomínio das espécies: *Porphyromonas endodontalis* (56%); *Prevotella intermedia* (41%) e *Porphyromonas gingivalis* (30%). A análise estatística revelou

uma diferença significativa entre as amostras concernente a sua composição, isto é, a incidência das espécies *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella tannerae*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* foi diferente entre as duas regiões geográficas pesquisadas. Os autores concluíram que diferenças no meio ambiente e determinantes genéticos da colonização microbiana da cavidade oral podem influenciar na composição da microbiota de populações distintas.

O entendimento da natureza da microbiota endodôntica fundamentou a investigação realizada por Gomes et al. em 2004. Na busca da identidade dos microorganismos presentes no sistema de canais radiculares de dentes infectados, amostras microbiológicas foram obtidas de 60 canais radiculares, desses, 41 apresentavam tecido pulpar necrótico e 19 exibiam tratamento endodôntico deficiente. O material clínico coletado foi encaminhado ao laboratório de Microbiologia e processado por técnicas anaeróbias, possibilitando o isolamento e a identificação. Foram recuperados 224 isolados cultiváveis pertencentes a 56 espécies microbianas e 21 gêneros diferentes. Setenta por cento das bactérias isoladas eram anaeróbias estritas ou microaerófilas. Os anaeróbios presentes em maior frequência foram: *Peptostreptococcus micros* (35%), *Fusobacterium necrophorum* (23,3%), *Fusobacterium nucleatum* (11,7%), *Prevotella intermedia* / *Prevotella nigrescens* (16,7%), *Porphyromonas gingivalis* (6,7%), *Porphyromonas endodontalis* (5%). Os gêneros mais representativos foram: *Peptostreptococcus* (58,3%), *Streptococcus* (53,3%), *Fusobacterium* (33,3%), *Prevotella* (31,7%), *Enterococcus* (13,3%), *Gemella* (13,3%), *Staphylococcus* (13,3%), *Actinomyces* (11,7%), *Porphyromonas* (11,7%), *Clostridium* (10%), *Eubacterium* (10%), *Veillonella* (10%), *Lactobacillus* (8,3%), *Propionibacterium* (6,7%), *Bacteroides* (5%), *Cardiobacterium* (3,3%) e *Tissierella* (3,3%). Os canais radiculares portadores de

infecção primária abrigaram uma microflora mista, Gram-positiva e Gram-negativa, predominantemente anaeróbia e apresentaram, em média, três espécies por canal, entre as quais: *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus prevotii*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella intermedia* / *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus sanguis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gemella morbillorum*, *Streptococcus mitis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella loescheii*, *Lactobacillus acidophilus*. Inversamente, a microbiota descrita para os canais com infecção secundária compunha-se, principalmente, de bactérias anaeróbias facultativas Gram-positivas, com 1 a 2 espécies por canal. Os autores sugeriram uma possível relação entre a existência de anaeróbios, especialmente Gram-negativos, e a presença ou história de dor, sensibilidade a percussão e edema. Salientaram que esses achados indicam a existência de complexas interações entre as espécies, originando quadros clínicos característicos que não podem ser aludidos a espécies individuais. Discutiram a importância do conhecimento do número de células presentes na amostra para estabelecer uma correlação positiva entre espécies bacterianas e características clínicas, destacando a necessidade do uso de diferentes metodologias para obtenção de resultados mais fidedignos.

Buscando ampliar as informações referentes à Microbiologia das infecções endodônticas primárias Chu et al. (2005) compararam o conteúdo bacteriano e fúngico de dentes com radiolucidez periapical. Procedimentos clínicos prévios viabilizaram a obtenção das amostras de 45 canais com espaço pulpar aberto e 43 canais com espaço pulpar fechado. O material obtido foi processado em ambiente aeróbio e anaeróbio, e posteriormente identificado. A análise do conteúdo dos canais revelou 211 isolados bacterianos sendo 68,9% anaeróbios estritos. Cinquenta

e cinco espécies bacterianas, pertencentes a 28 gêneros foram identificadas, sendo os mais freqüentes: *Prevotella* (51/211), *Peptostreptococcus* (29/211), *Actinomyces* (20/211) e *Campylobacter* (14/211). O número médio de espécies bacterianas por canal foi de 4,6. Os canais não expostos ao meio ambiente registraram 185 isolados bacterianos, 68,5% desses eram anaeróbios estritos e 31,5% facultativos. Foram identificadas 54 espécies bacterianas, pertencentes a 28 gêneros, e a media de espécies por canal foi de 4,2. Os gêneros mais comuns foram: *Prevotella* (30/185), *Actinomyces* (21/185), *Campylobacter* (19/185) e *Peptostreptococcus* (19/185). O gênero *Prevotella* foi significativamente mais comum em canais expostos ao meio ambiente, enquanto nos canais não expostos houve predomínio dos gêneros *Fusobacterium nucleatum* e *Propionibacterium acnes*. Para os demais gêneros, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus* e *Campylobacter*, não foi verificada diferença quanto à prevalência nos dois grupos. A pesquisa sobre a relação entre a prevalência de espécies bacterianas e sintomas revelou as seguintes associações:

- 1) Canais expostos ao meio ambiente: a) *Fusobacterium varium*, *Gemella morbillorum*, *Porphyromonas gingivalis* / edema; b) *Lactobacillus spp.* e *Actinomyces meyeri* / dor e sensibilidade a percussão;
- 2) Canais não expostos ao meio ambiente: *Porphyromonas gingivalis* e *Eggerthella lenta* (*Eubacterium lentum*) / edema; *Actinomyces spp.* / sensibilidade a percussão.

Esse estudo confirmou a natureza polimicrobiana das infecções endodônticas primárias, bem como o predomínio de bastonetes Gram-negativos. As diferenças observadas entre os grupos podem ser justificadas pela idade do processo necrótico, isto é, estágio de desenvolvimento da doença e pela presença de fatores ecológicos seletivos como tensão de oxigênio, viabilidade de nutrientes e interações bacterianas.

Sedgley et al. (2006) utilizaram *real-time quantitative Polimerase Chain Reaction (qPCR)* e cultura, do mesmo espécime, para avaliar a presença de *Enterococcus faecalis*. O material experimental, oriundo de 81 pacientes, continha 40 amostras provenientes de infecção primária e 48 amostras de retratamento. Bactérias foram detectadas em 48/88 (54,5%) amostras por cultura e em 88/88 (100%) amostras com o método molecular. A cultura recuperou *E. faecalis* de 9/88 (10,2%) espécimes, enquanto qPCR confirmou a presença dessa espécie em 70/88 (79,5%) espécimes. Das nove culturas positivas para enterococos, seis eram puras, e as demais abrigavam também *Streptococcus sanguis*, *Proteus sp.*, bastonetes anaeróbios Gram-positivos e estreptococos não produtores de polissacarídeo. O número total de bactérias foi de $5,2 \times 10^3$ a $1,4 \times 10^7$ células/100µL, perfazendo uma média de $2,0 \times 10^6$, sem diferença estatisticamente significante entre infecção primária e retratamento. *E. faecalis* foi encontrado mais freqüentemente em amostras de retratamento (89,6%) do que em amostras de infecção primária (67,5%). O número de *E. faecalis* foi maior em casos de retratamento, mas o percentual de *E. faecalis* como parte do número total de bactérias da amostra foi maior em casos de infecção primária. Um meio de cultura seletivo evidenciou 9 cepas de enterococos, que uma vez submetidas a testes bioquímicos, apresentaram, algumas vezes, um comportamento semelhante à espécie *Enterococcus faecium*.

Com um objetivo análogo aos autores anteriores, Gomes et al. (2006) desenvolveram modelo de estudo similar. A seleção dos pacientes abrangeu características clínicas de infecção primária (50) e secundária (50), não considerando como motivos de exclusão: presença de cárie, presença de restauração prévia (defeituosa ou não), comunicação direta da cavidade pulpar com

o meio ambiente oral, dor espontânea, sensibilidade a percussão, dor a palpação, mobilidade, presença de fístula, presença de secreção purulenta periodontal, bolsa periodontal e uso de medicação antibiótica prévia e/ou no momento da coleta. O crescimento de microorganismos foi evidenciado em 49 e 45 casos de infecção primária e secundária, respectivamente. A cultura identificou *E. faecalis* em 23/100 amostras e a PCR em 79/100 espécimes avaliados. O método de cultura recuperou *E. faecalis* de 2/50 (4%) canais com infecção primária e de 21/50 (42%) canais com infecção secundária. Na condição primária o microorganismo alvo compôs uma pequena porcentagem do número total de bactérias, constituindo uma infecção polimicrobiana. Entretanto, na infecção secundária, o *E. faecalis* foi isolado, em cultura pura, de 14 das 21 amostras positivas. A PCR recuperou *E. faecalis* de 41/50 (82%) canais com infecção primária e de 38/50 (76%) canais com infecção secundária. Os autores discutiram que a diferença nos resultados obtidos nas duas técnicas pode ser creditada à sensibilidade de ambas, isto é, a cultura somente identifica uma espécie alvo quando seu número é de aproximadamente de 10^4 a 10^5 células por amostra, todavia, a PCR requer somente 10 a 10^2 células da espécie pesquisada. Segundo os pesquisadores esse fato pode explicar porque o *E. faecalis* é raramente isolado por cultura e freqüentemente por métodos moleculares, provavelmente, sua ocorrência em baixos níveis em polpas mortificadas inviabiliza a cultura dessa espécie a partir dessas amostras. A alta prevalência de *E. faecalis* em infecção primária (82%) detectada pela PCR nesse estudo foi associada à técnica molecular empregada e a uma possível infiltração coronária, pois a maioria dos dentes com polpa mortificada (49/50) apresentava restauração coronária deficiente, cárie ou comunicação direta com a cavidade oral.

Supondo que existam diferenças estruturais na composição da microbiota predominante em casos assintomáticos e sintomáticos Sakamoto et al. (2006) utilizaram uma combinação de duas abordagens genéticas moleculares para analisar a diversidade microbiana presente. A seleção dos sujeitos da pesquisa incluiu 16 pacientes adultos com lesões cariosas, necrose pulpar e evidência radiográfica de alteração perirradicular, os quais foram agrupados de acordo com a presença (8) ou não de sintomatologia (8). As amostras dos dentes com lesão periapical assintomática foram obtidas no interior do canal radicular e a coleta, nos dentes sintomáticos, foi realizada por aspiração do exsudado purulento na mucosa edemaciada de cada abscesso. As moléculas de DNA extraídas dos espécimes foram analisadas por polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição terminal (T-RFLP) e por clonagem do gene 16S rRNA. Foram reconhecidos membros do *phyla*: *Actinobacteria*, *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* e *Spirochaetes*. Quarenta e duas taxas diferentes foram identificadas, 23 das quais (55%) somente como *phylotypes*. Uma média de 12 e 18 taxa foi detectada nos casos assintomáticos e sintomáticos, respectivamente. As espécies ou *phylotypes* mais prevalentes foram *Fusobacterium nucleatum* (tipo 1 e 2), *Peptostreptococcus micros* / *Peptostreptococcus* sp. oral clone AJO62/BS044/FG014, *Mogibacterium pumilum*, *Lachnospiraceae* oral clone 55A-34, *Prevotella oralis*, *Prevotella multisaccharivorax*, *Dialister invisus* / *Dialister* sp. GBA27, *Filifactor alocis*, *Megasphaera* sp. oral clone CS025/BS073 e *Veillonella* sp. oral clone BP1-85 / *Veillonella dispar* / *Veillonella parvula*. Algumas espécies foram detectadas somente em dentes assintomáticos: *Bacteroides-like* sp. oral clone X083 / *Bacteroides* oral clone MCE7_20 e *Dialister* sp. oral clone BS016/MCE7_134. Entretanto, outras espécies foram exclusivas nos casos sintomáticos: *Fusobacterium*

nucleatum T-RF tipo 2, *Prevotella intermédia*, *Dialister pneumosintes*, *Prevotella sp.* E8_42 / *Prevotella sp.* oral clone PUS9.180. Os autores concluíram que a diversidade bacteriana das infecções endodônticas é maior do que a previamente descrita pelos métodos de cultura e que a estrutura da microbiota difere significativamente consideradas as condições clínicas avaliadas no presente estudo.

Para superar as limitações dos métodos de identificação baseados no fenótipo bacteriano, Siqueira et al. (2007) estabeleceram a identidade de bactérias cultiváveis, isoladas de canais radiculares portadores de infecção primária, utilizando uma análise do seqüenciamento do gene ribossomal 16S rRNA. Uma vez estabelecido um rigoroso critério de inclusão/exclusão foram selecionados para exame 32 dentes unirradiculares de 29 pacientes. Procedimentos clínicos prévios como aposição do isolamento absoluto e limpeza de todo o campo operatório com peróxido de hidrogênio a 3%, seguido de hipoclorito de sódio a 2,5%, neutralizados por tiosulfato de sódio a 5% viabilizaram a obtenção das amostras. Três cones de papel absorvente esterilizados foram consecutivamente levados até a proximidade do ápice radiográfico e transferidos para tubos contendo fluido de transporte reduzido. Técnicas anaeróbias foram utilizadas para cultura e após 14 dias de incubação obteve-se o número total de UFC's (unidades formadoras de colônias) o que possibilitou o cálculo do número real de bactérias presentes, baseado em fatores de diluição previamente definidos. O DNA genômico de cada colônia isolada foi extraído e a identificação bacteriana foi obtida pela PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Bactérias estavam presentes em todas as amostras, variando de dois a oito o número de taxas por canal, apresentando um número médio de $4,2 \times 10^5$ UFC's por amostra. Oitenta e sete cepas isoladas, pertencentes a 52 taxas bacterianas, foram identificadas. As taxas mais prevalentes foram: *Fusobacterium*

nucleatum (5), *Porphyromonas gingivalis* (4), *Pseudoramibacter alactolyticus* (4), *Micromonas micros* (4), *Streptococcus mitis* biovar 2 (4), *Streptococcus oralis*/*Streptococcus mitis*/*Streptococcus sanguinis* (4). Em escala filogenética ampla a microbiota endodôntica foi dominada por membros do *phylum*: *Firmicutes* (22 taxas, 46% dos isolados identificados), *Actinobacteria* (14 taxas, 25,3%), *Bacteroidetes* (oito taxas, 13,8%), *Fusobacteria* (três taxas, 9,2%) e *Proteobacteria* (cinco taxas, 5,7%). Segundo os autores, esses resultados confirmam achados prévios obtidos pelo método de cultura que caracterizam a infecção endodôntica primária como um consórcio misto dominado por bactérias anaeróbias.

Sassone et al. (2007) avaliaram a composição da microbiota de infecções endodônticas primárias. As amostras utilizadas foram obtidas de 111 sujeitos de pesquisa selecionados em diferentes sítios clínicos, os quais apresentavam, pelo menos, um dente unirradicular com polpa necrótica, evidência radiográfica de perda óssea e ausência de tratamento endodôntico anterior. As coletas foram realizadas, sob condições estritamente assépticas, com auxílio de uma lima tipo K de número 15 e duas pontas de papel absorvente esterilizadas, as quais foram introduzidas 1,0 mm aquém do forame apical. O número, a prevalência e a proporção de 40 espécies bacterianas diferentes foram determinados usando sondas de DNA e técnica de hibridização de DNA. Os resultados registraram uma média de 22 espécies por amostra, destacando-se como mais prevalentes (70%) as seguintes: *Enterococcus faecalis* (89,3%), *Campylobacter gracilis* (89,3%), *Leptotrichia bucalis* (89,3%), *Neisseria mucosa* (87,5%), *Prevotella melaninogenica* (86,6%), *Fusobacterium nucleatum* ssp. *vincentii* (85,7%), *Eubacterium saburreum* (75,9%), *Streptococcus anginosus* (75%) e *Veillonella parvula* (74,1%). As espécies encontradas em maior proporção foram: *Fusobacterium nucleatum* ssp. *Vincentii* ($13,14 \times 10^5$), *Eubacterium*

saburreum ($5,67 \times 10^5$), *Enterococcus faecalis* ($5,38 \times 10^5$), *Neisseria mucosa* ($4,19 \times 10^5$), *Veillonella parvula* ($3,63 \times 10^5$), *Campylobacter gracilis* ($3,46 \times 10^5$), *Treponema socranskii* ($3,34 \times 10^5$), *Porphyromonas endodontalis* ($2,96 \times 10^5$), *Porphyromonas gingivalis* ($2,85 \times 10^5$), *Micromonas micros* ($2,81 \times 10^5$), *Prevotella nigrescens* ($2,68 \times 10^5$) e *Fusobacterium nucleatum ssp. nucleatum* ($2,64 \times 10^5$). Os autores discutiram a alta prevalência e proporção da espécie *Enterococcus faecalis* presente nas amostras, enfatizando ser esse resultado inesperado, pois normalmente essa espécie está associada a infecções persistentes. Observaram também que as espécies mais prevalentes também foram encontradas em maior número e proporção.

Identificar quarenta espécies bacterianas e quantificar o número total de bactérias em amostras provenientes de canais radiculares infectados foi o objetivo da investigação realizada por Viana et al. (2008). Vinte e quatro pacientes foram selecionados. As amostras foram retiradas de dentes unirradiculares, com tecido pulpar necrosado, ausência de comunicação visível da câmara pulpar com o meio oral e evidência radiográfica de periodontite apical. As amostras microbiológicas foram obtidas em três momentos distintos: S1 – imediatamente após a abertura coronária; S2 – após o preparo químico-cirúrgico e S3 – sete dias após o uso de medicação intracanal. O preparo químico-cirúrgico realizado com limas rotatórias GT, brocas do tipo Gates-Glidden e limas manuais de aço inoxidável, teve como substância química auxiliar o gel de clorexidina a 2%. Os canais foram preenchidos com diferentes propostas medicamentosas: M1 – pasta de hidróxido de cálcio; M2 – gel de clorexidina a 2% ou M3 – uma combinação de pasta de hidróxido de cálcio e gel de clorexidina a 2%. A avaliação microbiológica incluiu uma técnica molecular (*Checkerboard DNA-DNA hybridization*) para detectar as espécies bacterianas

presentes e técnicas de cultura aeróbia e anaeróbia para determinar a comunidade bacteriana pela contagem de UFC's. O método molecular identificou microorganismos em 20/24 (83,3%) amostras da coleta inicial e o número de espécies presentes variou de 1 a 35. Três bactérias estavam ausentes: *Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces israelii* e *Actinomyces naeslundii* 1. Após o preparo químico-cirúrgico (S2) e após sete dias (S3) quatro casos (16,6%) revelaram microorganismos. Antes do tratamento foram detectadas as seguintes taxa: *Fusobacterium nucleatum ssp. polymorphum*, 12/20 (60% dos casos positivos), *Treponema socranskii ssp. socranskii*, *Parvimonas micra*, *Enterococcus faecalis*, (cada um presente em 11/20 casos – 55%), *Eubacterium nodatum* (nove casos - 45%), *Streptococcus oralis* (oito casos - 45%), *Prevotella melaninogenica* (oito casos - 45%), *Prevotella intermedia* (oito casos - 45%), *Porphyromonas gingivalis* (oito casos - 45%), *Capnocytophaga sputigena* (oito casos - 45%), *Tannerella forsythia* (oito casos - 45%), *Streptococcus gordonii* (sete casos - 35%), *Prevotella nigrescens* (sete casos - 35%), *Leptotrichia buccalis* (sete casos - 35%), *Gemella morbillorum* (sete casos - 35%), *Capnocytophaga gingivalis* (sete casos - 35%), *Capnocytophaga ochracea* (sete casos - 35%), *Treponema denticola* (sete casos - 35%), *Streptococcus intermedius* (seis casos - 30%), *Selenomonas noxia* (seis casos - 30%), *Fusobacterium nucleatum ssp. nucleatum* (seis casos - 30%), *Campylobacter showae* (seis casos - 30%) e *Campylobacter gracilis* (seis casos - 30%). Em S2 os táxons mais encontrados foram: *Capnocytophaga ochracea* (presente em 50% dos casos positivos - encontrado em 2 de 4 casos), *Treponema socranskii ssp. socranskii* (encontrado em 1 de 4 casos positivos – 1/4, 25%), *Fusobacterium nucleatum ssp. polymorphum* (1/4, 25%), *Enterococcus faecalis* (1/4, 25%), e *Campylobacter showae* (1/4, 25%). E em S3 as mais frequentes foram: *Gemella*

morbillorum (encontrado em dois dos quatro casos positivos – 2/4, 50%), *Leptotrichia buccalis* (encontrado em um dos quatro casos positivos – 1/4, 25%), *Fusobacterium nucleatum ssp. polymorphum* (1/4, 25%), *Enterococcus faecalis* (1/4, 25%), e *Capnocytophaga sputigena* (1/4, 25%). O método de cultura recuperou microorganismos de todas as amostras iniciais (S1), quando a quantidade de bactérias cultiváveis abrangeu de $1,9 \times 10^5$ UFC's/mL a $3,0 \times 10^6$ /mL atingindo em média $2,0 \times 10^5$ UFC's/mL. Após o preparo químico-cirúrgico somente oito casos exibiram crescimento bacteriano, com uma média de $1,0 \times 10^2$ UFC's/mL, demonstrando uma redução de 99,96% na contaminação. Após sete dias bactérias foram isoladas de 13 amostras, com uma média de $6,0 \times 10^2$ UFC's/mL, representaram uma redução de 99,79% da amostra inicial. O número de casos positivos em S2 e S3 foi maior quando o método de cultura foi utilizado. Os autores concluíram que a infecção primária é caracterizada por uma ampla variedade de espécies bacterianas e que o objetivo principal da terapia endodôntica deve ser a remoção do maior número possível de microorganismos do sistema de canais radiculares, criando um ambiente pouco propício para sobrevivência de espécies remanescentes.

A infecção endodôntica primária pode estar associada a sintomas os quais são resultantes de uma inflamação aguda do ligamento periodontal ou uma resposta a presença duradoura de irritantes bacterianos. Na busca de elucidar tal questionamento, foi objetivo do estudo realizado por Sassone et al. (2008), avaliar a composição da microbiota da infecção endodôntica primária associada a dentes sintomáticos. A população estudada, composta por 60 pacientes, apresentava no mínimo um dente unirradicular com necrose pulpar e evidência radiográfica de perda óssea, com ou sem sintomatologia dolorosa associada. Uma vez obtidas as

amostras, a presença de 40 espécies bacterianas foi determinada por um método molecular de hibridização do DNA – *Checkerboard DNA-DNA hybridization method*. Cada uma das quarenta espécies pesquisadas estava presente em pelo menos quatro amostras. O número médio de espécies por amostra foi de 24, variando de sete a 38 espécies por amostra. O número médio de células encontrado nos casos assintomáticos, 86×10^5 , mostrou uma diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo de casos sintomáticos, 29×10^5 . As espécies bacterianas encontradas em maiores níveis nos casos sintomáticos foram: *Fusobacterium nucleatum ssp. vincentii*, *Veillonella parvula*, *Treponema socranskii*, *Enterococcus faecalis*, *Campylobacter gracilis*, *Neisseria mucosa*, e *Eubacterium saburreum*. Nos casos assintomáticos houve maior prevalência das espécies *Fusobacterium nucleatum ssp. vincentii*, *Fusobacterium nucleatum ssp. nucleatum*, *Enterococcus faecalis*, *Eubacterium saburreum*, *Neisseria mucosa*, e *Peptostreptococcus micros*. A espécie *Tannerella forsythia* foi encontrada em níveis significativamente altos em amostras de dentes sintomáticos e a espécie *Propionibacterium acnes* em dentes assintomáticos. Isoladamente todas as espécies foram detectadas em altos níveis nos casos sintomáticos, com exceção de *Propionibacterium acnes*, *Capnocytophaga sputigena*, *Eikenella corrodens* e *Eubacterium notadum*. Os gêneros mais prevalentes nos casos sintomáticos foram: *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Capnocytophaga*, *Campylobacter* e *Actinomyces*. Os achados sugerem que o grau de patogenicidade da infecção está relacionado não somente com a presença do patógeno, mas também com o número de microorganismos no sítio da infecção. No presente estudo a composição microbiana nas duas situações clínicas avaliadas não apresentou grandes divergências, entretanto, diferenças importantes foram observadas entre os

respectivos perfis de colonização, permitindo aos autores afirmarem que a estrutura da comunidade bacteriana desempenha um papel importante no desenvolvimento dos sintomas. Os pesquisadores supõem que os altos níveis de *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema socranskii* detectados em dentes sintomáticos podem contribuir para manutenção da sintomatologia dolorosa e sugerem uma associação positiva entre os altos níveis de bactérias totais encontrados, a presença de *Tannerella forsythia* e a presença de dor.

A composição bacteriana da infecção endodôntica foi o foco da pesquisa de Blome et al. (2008). Quarenta pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com o diagnóstico clínico de infecção primária (20) e secundária (20). Após isolamento absoluto do elemento dentário selecionado foi realizada desinfecção do campo operatório pela aplicação sucessiva de: peróxido de hidrogênio a 30%, tintura de iodo a 5% e tiosulfato de sódio a 5%. Imediatamente após o acesso à câmara pulpar foi obtida a primeira amostra bacteriana com pontas de papel absorvente. A instrumentação foi realizada com limas rotatórias e a para a irrigação foram empregadas, como substâncias auxiliares, a solução de hipoclorito de sódio a 2% e a solução de clorexidina a 0,1%. A esse procedimento seguiu-se: a segunda coleta, a aplicação de medicação intracanal por 14 dias e, nessa ocasião, a obtenção da terceira coleta. O sistema *meridol® Perio Diagnostics* detectou e quantificou seis espécies bacterianas e a carga bacteriana total. A infecção primária abrigou mais bactérias do que a infecção secundária, isto é, o número médio de bactérias foi de $1,5 \times 10^7$ e de $2,6 \times 10^5$, respectivamente. Uma redução de 97,3% no número de bactérias detectáveis foi observada no grupo com infecção secundária e de 99,9% no grupo com infecção primária, entretanto, o uso de hidróxido de cálcio como medicação entre sessões, não contribuiu para uma maior desinfecção dos canais

radiculares. *Peptostreptococcus micros* e *Porphyromonas endodontalis* foram as espécies mais freqüentes em ambos os tipos de infecção. Nos casos de infecção primária a espécie *Peptostreptococcus micros* estava presente em 13 amostras iniciais (65%), *Porphyromonas endodontalis* em 10 (50%), *Tannerella forsythia* em 8 (40%), *Treponema denticola* e *Fusobacterium nucleatum* em 7 (35%), *Enterococcus faecalis* em 3 (15%), *Porphyromonas gingivalis* em 2 (10%) e *Prevotella intermédia* em 1 (5%). Nos espécimes provenientes de dentes com infecção secundária foi observada a presença das espécies: *Peptostreptococcus micros* em 9 amostras iniciais (45%), *Porphyromonas endodontalis*, *Tannerella forsythia* e *Fusobacterium nucleatum* em 4 (20%), *Porphyromonas gingivalis* em 3 (15%), *Treponema denticola* e *Enterococcus faecalis* em 2 (10%) e *Prevotella intermédia* em 2 (10%). A espécie *Actinobacillus actinomycetemcomitans* não foi detectada em nenhuma amostra pesquisada. Avaliando a freqüência da presença simultânea de espécies bacterianas nas amostras da primeira coleta foram desenhadas algumas associações positivas: *Peptostreptococcus micros* / *Porphyromonas endodontalis* / *Porphyromonas gingivalis* / *Fusobacterium nucleatum* e *Tannerella forsythia*; *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*; *Tannerella forsythia* e *Fusobacterium nucleatum*. Uma associação significativa também foi apontada entre as espécies *Porphyromonas endodontalis* e *Porphyromonas gingivalis*, e entre *Porphyromonas endodontalis* e *Fusobacterium nucleatum*. Os autores concluíram que uma maior diversidade de espécies bacterianas foi rastreada de canais com infecção primária e confirmaram a suposição de que a espécie *Tannerella forsythia* desempenha um papel importante na patogenicidade da infecção primária, uma vez que estava presente em 40% dos casos.

Investigar a presença de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares acometidos por infecção endodôntica primária ou secundária foi o objetivo da apreciação realizada por Pirani et al. (2008). Um ensaio valendo-se da PCR (*polimerase chain reaction*) avaliou espécimes microbiológicos de 102 pacientes. *E. faecalis* foi detectado em seis de 79 (7,6%) amostras oriundas de canais portadores de infecção primária, e em nove de 23 (29,1%) amostras oriundas de canais portadores de infecção secundária. Uma análise estatística descritiva apontou uma relação positiva entre a presença de *E. faecalis* e a ocorrência de infecção endodôntica secundária. De forma análoga a expressão de *E. faecalis* foi associada a um maior número de casos de periodontite apical primária assintomática.

Para elucidar fatores relacionados à patogenicidade das infecções endodônticas primárias, Siqueira Jr., Rôças e Silva (2008) utilizaram um ensaio genético para investigar a prevalência de *Porphyromonas gingivalis* em 62 dentes. As amostras foram obtidas de 28 casos assintomáticos, diagnosticados como periodontite apical crônica; de 13 casos sintomáticos, diagnosticados como periodontite apical aguda e de 21 casos com tumefação, diagnosticados como abscesso apical agudo. A metodologia incluiu uma análise da prevalência (*Species-specific Nested PCR*) e uma análise clonal (*AP-PCR*). Todas as amostras extraídas registraram a presença de bactérias. A espécie bacteriana *P. gingivalis* foi detectada em 30 das 62 (48%) amostras submetidas ao teste. Foi detectada a presença do microorganismo alvo em 10 de 28 (36%) canais de dentes com periodontite apical crônica; em seis de 13 (46%) canais de dentes com periodontite apical aguda e em 14 de 21 (67%) amostras de exsudado purulento aspirado de abscessos periapicais agudos. Não foi descrita uma relação entre a presença de *P. gingivalis* e a ocorrência de sintomas, entretanto, os resultados evidenciaram uma maior frequência de tal

microorganismo em abscessos quando comparado à periodontite apical crônica. Os autores destacaram que esse estudo revelou uma das maiores taxas de prevalência de *P. gingivalis* até então descritas para infecções endodônticas primárias, sugerindo ser essa uma das mais patogênicas espécies presentes na cavidade oral. Segundo os autores, o amplo esquadro de fatores de virulência proporciona a *P. gingivalis* um variado repertório de efeitos biológicos implicados na patogenidade da doença. A estratégia usada nesse estudo para investigar a diversidade genética permitiu a observação de dois tipos clonais de *P. gingivalis* presentes por indivíduo. Esse resultado reafirma a baixa heterogeneidade intra-individual entre espécies de *P. gingivalis* e a relativa heterogeneidade inter-individual dos seus clones.

O objetivo da pesquisa realizada por Kakoli et al. (2009) foi determinar os efeitos da idade do paciente na prevalência e na profundidade de penetração de bactérias na dentina radicular. Cinquenta e seis dentes humanos unirradiculares extraídos foram igualmente divididos em dois grupos de acordo com a idade: jovens (entre 18-24 anos) e adultos (entre 60-77 anos). Após esterilização dos espécimes, foi realizada abertura coronária e instrumentação até a lima ProFile 40/.06. Cinquenta e dois espécimes foram inoculados com *Enterococcus faecalis* em cultura fluida de Tioglicolato e incubados por 20 dias a 37°C. As amostras foram submetidas a processamento histológico. As secções obtidas foram coradas pelo método Brown & Brenn e avaliadas sob microscopia óptica. Um número significativamente maior de túbulos invadidos por bactéria foi observado no grupo jovem. Do mesmo modo, as bactérias penetraram na dentina radicular jovem a uma profundidade significativamente maior do que na dentina adulta. Os autores afirmaram que os resultados revelaram claramente a influência da idade na infecção tubular.

O relatado nesta Revisão da Literatura evidencia claramente a grande preocupação existente em melhor se conhecer a infecção endodôntica. Desse melhor conhecer já derivaram diferentes propostas terapêuticas e outras poderão advir. Por ser totalmente inexplorado o aspecto da infecção endodôntica em dentes permanentes jovens e por apresentarem essas condições morfológicas diferentes de dentes completamente formados justifica-se o desenvolver deste estudo voltado que foi ao desenvolvimento do conhecer do conteúdo microbiológico de dentes incompletamente formados, portadores de polpa necrótica em condições de infecção primária.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo tem por objetivo delinear a característica microbiológica do sistema de canais radiculares de dentes permanentes jovens com rizogênese incompleta e portadores de polpa necrótica e periodontite apical radiograficamente discernível.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

- ✎ agitador mecânico de tubos (Fisher Vortex Genie 2, cat. nº 12-812, Fisher Scientific Inc., USA).
- ✎ água peptonada (Anexo C)
- ✎ alça Drigalsky (Didática SP Artigos e Equipamentos para Laboratórios, São Paulo, Brasil)
- ✎ álcool absoluto (Merck. Darmstadt, Germany).
- ✎ solução anestésica injetável local (Lidocaína 2% com epinefrina 1:100:000 - Alphacaine, DFL Indústria e Comercio S.A, Rio de Janeiro, Brasil)
- ✎ anestésico tópico com 20% de Benzocaína (Benzotop, DFL Indústria e Comercio S.A., Rio de Janeiro, Brasil)
- ✎ arco de plástico, modelo Ostby (Jon Comércio de Produtos Odontológicos, São Paulo, Brasil)
- ✎ autoclave vertical MOD 103 (Fabbe, Brasil).
- ✎ brocas carbide nºs FG2 , FG3, FG4 (KG Sorensen, São Paulo, Brasil)
- ✎ brocas carbide de haste longa nºs 2 e 4
- ✎ cabo para espelho (SS White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro).
- ✎ câmara de fluxo de ar laminar (Fabbe - Primar, mod. 216).
- ✎ caneta de alta rotação (Kavo do Brasil, Joinvile, Paraná).
- ✎ caneta de baixa rotação (Kavo do Brasil, Joinvile, Paraná).

- ☞ cones de papel absorvente esterilizados calibres 15-40 e 45-80 (TANARI[®], Tanariman Industrial LTDA, Amazonas, Brasil).
- ☞ conjunto de curetas periodontais n^{os} 17 e 18 (SS White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro).
- ☞ conjunto de grampos para isolamento absoluto (SS White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro).
- ☞ contador de colônias QUIMIS (QUIMIS aparelhos científicos Ltda., Diadema, São Paulo)
- ☞ destilador de água (Marconi Equipamentos para Laboratório[®], mod. MA 078/2. Piracicaba, São Paulo).
- ☞ espectrômetro (BioArt Equipamentos Odontológicos Ltda., São Carlos, São Paulo).
- ☞ envelopes auto-selantes para esterilização à vapor nos tamanhos 90 mm x 260 mm e 190 mm x 330 mm (Medstéril[®], Investmar de Intercâmbio Comercial Ltda., São Paulo, Brasil)
- ☞ espátula n^o1 (SS White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro).
- ☞ espátula n^o24 (SS White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro).
- ☞ espelho n^o5 (SS White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro).
- ☞ estantes para tubos de polipropileno (Sigma-Aldrich Corporation – S^t. Louis, Missouri, USA).
- ☞ estufa microbiológica (Fabbe – Primar, mod. 216).
- ☞ filmes radiográficos periapicais (Ektaspeed-Eastman Kodak Company, New York, USA).
- ☞ frascos contendo meio de transporte pré-reduzido VMGA III e pérolas de vidro (Difco Laboratories, USA) (Anexo B).

- ☞ intermediário para aspiração, cânulas de aspiração 40:20 e agulhas de irrigação 4:10.
- ☞ kit coloração de Gram (Newprov Produtos para Laboratório Ltda., Pinhais, Paraná).
- ☞ lâminas de vidro para microscopia 26 x 76 mm (Glasstécnica Comércio de Vidros Ltda., São Paulo).
- ☞ lençol de borracha (Madeitex Ind. e Com. de Art. Látex Ltda., Brasil)
- ☞ limas tipo K (Maillefer Ballaigues, Swiss: Cosa Dental Importação Ltda., São Paulo).
- ☞ limitadores de silicone (Maillefer Ballaigues, Swiss: Cosa Dental Importação Ltda., São Paulo).
- ☞ luvas cirúrgicas esterilizadas (Madeitex Ind. e Com. de Art. Látex Ltda., Brasil).
- ☞ meio de cultura Ágar brucella sangue – hemina – menadione (Difco Laboratories, USA) (Anexos D, E, F).
- ☞ meio de cultura Ágar m-Enterococcus (Difco Laboratories, USA) (Anexo G).
- ☞ meio de cultura Ágar sabouraud-dextrose / cloranfenicol (Difco Laboratories, USA) (Anexo H).
- ☞ micropipetas P1000µL, P200µL, P40µL, P10µL (Pipetman – Gilson, França).
- ☞ microscópio ótico de luz (Micronal, Indústria Brasileira).
- ☞ óleo de imersão para microscopia (Niles Biological, Inc., Sacramento, Califórnia, USA).
- ☞ peróxido de Hidrogênio a 30% (Alquimia Farmácia de Manipulação, São Paulo, Brasil).
- ☞ pinça perfuradora (SS White Artigos Dentários Ltda. Rio de Janeiro, Brasil).
- ☞ pinça porta-grampo (SS White Artigos Dentários Ltda. Rio de Janeiro, Brasil).

- ✎ pinças de procedimento de aço inoxidável (SS White Artigos Dentários Ltda. Rio de Janeiro, Brasil).
- ✎ pipeta Pasteur (Sigma-Aldrich Corporation – S^t. Louis, Missouri, USA).
- ✎ placas do tipo Petri esterilizadas (Prolab Comércio de Produtos para Laboratório Ltda. Curitiba, Paraná, Brasil).
- ✎ pontas esféricas diamantadas para alta rotação n^{os} 1012, 1012 HL, 1014, 1014 HL (KG Sorensen, São Paulo, Brasil)
- ✎ ponteiras apirogênicas para micropipetas – MLA :100\Le 1000µL (Sigma-Aldrich Corporation – S^t. Louis, Missouri, USA).
- ✎ régua milimetrada metálica (Maillefer Ballaigues, Swiss: Cosa Dental Importação Ltda., São Paulo).
- ✎ seringa carpule (SS White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro).
- ✎ seringas descartáveis de 10 mL (BD Industrias Cirúrgicas Ltda., Brasil).
- ✎ solução de Gluconato de Clorexidina a 0,12% (PerioGard, Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil).
- ✎ solução fisiológica esterilizada (Laboratório Tayuyna Ltda., São Paulo, Brasil).
- ✎ solução reveladora e fixadora GBX (Kodak Brasileira Comércio e Indústria Ltda.).
- ✎ sonda exploradora n^o5 (SS White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro).
- ✎ sonda modificada n^o47 (SS White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro).
- ✎ tintura de Iodo a 1% (Alquimia Farmácia de Manipulação, São Paulo, Brasil).
- ✎ tiosulfato de Sódio a 5% (Alquimia Farmácia de Manipulação, São Paulo, Brasil).
- ✎ tubos de polipropileno MCT-200C de 1000 µL e de 500 µL (Axygen. Union City, Califórnia, USA).

4.2 Métodos

4.2.1 Material Clínico – características

Foram selecionados 12 pacientes matriculados para atendimento na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo pelo Serviço CADE-Trauma, os quais assinaram um termo de concordância consciente (Anexo A). O projeto de pesquisa com a descrição detalhada de todos os procedimentos experimentais foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP e por esse aprovado conforme protocolo 160/08 (Anexo B).

Os pacientes selecionados, com idade entre 7 e 22 anos, apresentavam necessidade de tratamento endodôntico em um ou mais dentes unirradiculares, portadores de rizogênese incompleta, necrose pulpar e periodontite apical radiograficamente discernível. Os dentes selecionados tinham coroas totalmente híginas ou eram portadores de restaurações.

Uma anamnese minuciosa abrangeu a história médica e dental de cada paciente (Apêndice B) e constituindo fator de exclusão pacientes que tivessem feito uso de antibiótico nos três meses anteriores à avaliação inicial.

Clinicamente foi constatada ausência de comunicação direta da cavidade pulpar com o meio bucal e presença de saúde periodontal. O exame clínico compreendeu ainda o registro de sinais e sintomas e a avaliação do estado clínico pulpar valendo-se de testes de sensibilidade (Apêndice C).

O exame radiográfico comprovou a presença de anormalidade óssea periapical e permitiu definir o estágio de desenvolvimento radicular dos dentes selecionados pela medida da largura do forame apical às expensas de um especímetro. Assim, quando o forame media 0,6 mm ou mais, as raízes eram consideradas imaturas. (CVEK; NORD; HOLLENDER, 1976).

Os dentes selecionados apresentavam diagnóstico clínico de necrose pulpar, em decorrência de injúria traumática, e condição de infecção endodôntica primária.

Figuras 4.1 e 4.2 - Imagem clínica e radiográfica dos casos selecionados para o estudo

4.2.2 Procedimento clínico – obtenção das amostras

Dezenove espécimes microbiológicos foram obtidos de dentes traumatizados com ápices abertos, portadores de periodontite apical crônica sem exposição direta da cavidade pulpar ao meio bucal.

A conduta de atendimento seguiu o protocolo de Biossegurança da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Os procedimentos foram realizados em ambiente clínico, por um único operador, que atendeu apenas um paciente por vez.

Inicialmente, o paciente realizou bochecho anti-séptico com 2 mL de solução de digluconato de clorexidina a 0,12% durante um minuto. Uma raspagem supra-gengival removeu a placa bacteriana do dente selecionado, e a limpeza foi completa por polimento com pedra-pomes.

Uma infiltração anestésica vestibular e palatina com Lidocaína 2% com epinefrina 1:100:000 (Alphacaine, DFL Indústria e Comercio S.A) foi realizada, para viabilizar a etapa ulterior, em decorrência da pouca idade dos pacientes atendidos e das características clínicas dos elementos dentários selecionados, por vezes muito expulsivos devido a erupção incompleta.

A seguir foi posicionado o isolamento absoluto, no único dente a ser avaliado, o qual foi vedado por uma amarra cervical com fio dental. A descontaminação do campo operatório e do elemento a ser tratado foi obtida pela aplicação sucessiva de três soluções, durante 1 minuto cada: 1ª) solução de peróxido de hidrogênio a 30%; 2ª) tintura de iodo a 1,0%; 3ª) tiosulfato de sódio a 5,0% (MÖLLER, 1966). Uma amostra da superfície coronária foi coletada, nesse momento, com bolinha de algodão esterilizada visando avaliação microbiológica dessa superfície. O material coletado foi transferido para um frasco contendo 2 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III (Viability Medium Goteborg Anaerobically) (Anexo B).

Figura 4.3 - Frasco contendo meio de transporte pré-reduzido VMGA III, pérolas de vidro e amostra da superfície

Posteriormente foi providenciado acesso à câmara pulpar e ao canal radicular com brocas esféricas de tamanho compatível, em alta rotação, sob refrigeração de água destilada. Ao final desse tempo operatório as amostras foram coletadas como descrito: com auxílio de três pinças esterilizadas, três cones de papel esterilizados, de calibre compatível com o diâmetro do canal, foram introduzidos consecutivamente no canal radicular. Os cones atingiram a extensão total do canal principal, calculada a partir da tomada radiográfica pré-operatória, e permaneceram em posição por 30 segundos (LE GOFF et al., 1997). Nos casos onde o canal estava seco foi inserida uma pequena quantidade de soro fisiológico esterilizado no interior do canal radicular. Os cones de papel foram transferidos imediatamente para frascos

contendo 2 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III (Anexo B) com pérolas de vidro.

Figura 4.4 - Coleta clínica das amostras

Figura 4.5 - Amostras coletadas imersas em meio de transporte

Após a realização da coleta das amostras microbiológicas concluíam-se o acesso à câmara pulpar e procedia-se ao preparo químico-cirúrgico dos canais em conformidade com a técnica preconizada pelo Protocolo de Atendimento de Dentes Traumatizados do Serviço CADE-Trauma da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

As amostras colhidas (superficial e intra-radicular) foram de imediato conduzidas para o Laboratório de Microbiologia Oral do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo local em que se desenvolveu o processamento do material coletado e efetivou-se a obtenção dos resultados.

4.2.3 Processamento microbiológico – avaliação dos espécimes / contagem de UFC's

Os frascos contendo as amostras, imersas em VMGA III, foram mantidos em estufa microbiológica a 37 °C por um período suficiente que possibilitasse a liquefação da gelatina do meio, sendo, a seguir, submetidos à ação de um agitador mecânico (Fisher Vortex Genie 2) – por 30 segundos (SIQUEIRA et al., 2007). As pérolas de vidro no interior dos frascos de meio de transporte facilitaram a mistura e homogeneização da amostra previamente à diluição.

Figura 4.6 - Câmara de Fluxo Laminar

Em etapa subsequente, em câmara de fluxo laminar, foram realizadas diluições seriadas das amostras. Com auxílio de uma micropipeta digital, 100 µL de meio de transporte foram retirados dos frascos contendo as amostras e dispensados em um frasco do tipo Eppendorf contendo 900 µL de água peptonada (Anexo C), efetuando a diluição 1:10. A partir desse frasco 100 µL da diluição 1:10 foram

retirados e dispensados em outro frasco tipo Eppendorf contendo 900 µL de água peptonada efetuando-se dessa forma a diluição $1:10^2$. De modo análogo foram realizadas mais duas diluições alcançando-se as concentrações de $1:10^3$, $1:10^4$.

A seguir 100 µL de cada diluição foram semeados em placas do tipo Petri contendo meios de cultura seletivos para detecção de espécies de enterococos – ágar m-Enterococcus (Anexo G); para detecção de espécies de leveduras – ágar Sabouraud dextrose acrescido de 0,1% de cloranfenicol (Anexo H) e para crescimento de bactérias totais – ágar Brucella (Anexo D) acrescido de solução de hemina (10 µg/mL) (Anexo E), menadione (1µg/mL) (Anexo F) e sangue desfibrinado de carneiro 5%. A semeadura foi realizada pelo método de espalhamento em placa, no qual a amostra diluída é inicialmente colocada no centro de um meio de ágar sólido e esfriado, e em seguida é espalhada homogeneamente na superfície do meio com auxílio de uma alça de vidro (alça de Drigalsky) esterilizada, viabilizando o desenvolvimento das colônias na superfície do meio após a incubação.

Posteriormente as placas semeadas foram incubadas em tempo e temperatura adequados ao crescimento dos microorganismos alvo.

- Placas de ágar m-Enterococcus foram incubadas a 37 °C por 24 a 48 horas.
- Placas de ágar Sabouraud dextrose foram incubadas à temperatura ambiente por 4 a 7 dias.
- Placas de ágar Brucella-sangue foram incubadas a 37 °C, em ambiente anaeróbio, por 7 a 14 dias.

Figuras 4.7 e 4.8 - Placas semeadas em período de incubação

Ao final do período de incubação foi realizada uma análise quantitativa do crescimento microbiano presente em cada placa. Para tal, foi utilizado um contador de colônias viabilizando a contagem de unidades formadoras de colônias.

Figura 4.9 - Crescimento microbiano em placas de ágar-sangue

Figura 4.10- Crescimento microbiano em placas de ágar-sangue

Figura 4.11- Crescimento microbiano em placas de ágar-sangue

Figuras 4.12 e 4.13 - Crescimento microbiano em placas de ágar m-Enterococcus

Os dados obtidos foram transcritos para formulários de laboratório (Apêndice D) e posteriormente avaliados.

5 RESULTADOS

Considerando os critérios de inclusão e de exclusão aplicados nesta pesquisa dos 16 pacientes inicialmente avaliados quatro tiveram que ser excluídos. Dos doze remanescentes foram avaliados, conforme método e objetivos propostos para esta pesquisa, 19 dentes. Todos esses revelaram a presença de microrganismos.

Em condições de anaerobiose o número médio de células por canal foi de $5,7 \times 10^6$ variando de $1,8 \times 10^3$ a $1,15 \times 10^7$. Os resultados, expressos em UFC's estão expostos na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Número de UFC's (unidades formadoras de colônias) obtidas a partir de 19 coletas microbiológicas efetivadas em dentes com rizogênese incompleta, portadores de necrose pulpar e com periodontite apical radiograficamente discernível

Amostras	Sem diluição	1/10	1/100	1/1000	1/10000	UFC's/ml
1	-	-	119	-	-	$1,19 \times 10^5$
2	-	-	-	125	-	$1,25 \times 10^6$
3	-	-	-	190	-	$1,90 \times 10^6$
4	-	-	-	201	-	$2,01 \times 10^6$
5	-	-	-	135	-	$1,35 \times 10^6$
6	-	-	53	-	-	$5,3 \times 10^4$
7	-	-	-	41	-	$4,1 \times 10^5$
8	-	295	-	-	-	$2,95 \times 10^4$
9	-	-	-	238	-	$2,38 \times 10^6$
10	-	-	-	78	-	$7,8 \times 10^5$
11	-	-	-	-	115	$1,15 \times 10^7$
12	-	-	-	38	-	$3,8 \times 10^5$
13	-	-	223	-	-	$2,23 \times 10^5$
14	189	-	-	-	-	$1,89 \times 10^3$
15	-	-	-	208	-	$2,08 \times 10^6$
16	-	-	273	-	-	$2,73 \times 10^5$
17	-	-	-	37	-	$3,7 \times 10^5$
18	-	-	-	154	-	$1,54 \times 10^6$
19	-	-	-	186	-	$1,86 \times 10^6$

Bacteróides produtores de pigmento negro foram identificados em quatro das dezenove amostras pesquisadas (21,05%). O número médio de células de Bacteroides produtores de pigmento negro por canal foi de $6,5 \times 10^5$ variando de $1,1 \times 10^5$ a $1,2 \times 10^6$, conforme dados constantes da Tabela 2.

Tabela 5.2 – Número de UFC's (unidades formadoras de colônias) de bacteróides produtores de pigmento negro encontrado em 4 das 19 coletas microbiológicas efetivadas em dentes com rizogênese incompleta, portadores de necrose pulpar e com periodontite apical radiograficamente discernível

Amostras	Sem diluição	1/10	1/100	1/1000	1/10000	UFC's/ml
9	-	-	-	85	-	$8,5 \times 10^5$
10	-	-	-	53	-	$5,3 \times 10^5$
11	-	-	-	127	-	$1,2 \times 10^6$
14	-	-	118	-	-	$1,1 \times 10^5$

O número médio de células bacterianas observadas em canais radiculares que continham bacteroides produtores de pigmento negro foi de $5,75 \times 10^6$, variando de $1,89 \times 10^3$ a $1,15 \times 10^7$. Nas amostras onde esses microorganismos não foram detectados o número de células variou de $2,95 \times 10^4$ a $2,08 \times 10^6$ gerando uma média de $9,2 \times 10^6$ células por canal.

Espécies de Enterococcus foram recuperadas de um espécime (1/19) correspondendo a 5,25% do total de canais avaliados.

Tabela 5.3 – Número de UFC's (unidades formadoras de colônias) de espécies de enterococcus encontrado em 1 das 19 coletas microbiológicas efetivadas em dentes com rizogênese incompleta, portadores de necrose pulpar e com periodontite apical radiograficamente discernível

Amostras	Sem diluição	1/10	1/100	1/1000	1/10000	UFC's/ml
11	-	150	-	-	-	$1,5 \times 10^4$

Nenhuma das amostras avaliadas apresentou crescimento de espécies de Leveduras.

Em caráter ilustrativo distintas colônias com diferentes características foram isoladas das placas de Ágar brucella-sangue e submetidas à coloração Gram. A seguir as lâminas foram avaliadas sob microscopia ótica de imersão constatou-se a presença de espécies de cocos, bacilos e filamentosos, todos Gram – negativos.

6 DISCUSSÃO

A polpa dental constitui-se de tecidos conjuntivos e fica protegida do meio ambiente bucal por tecidos mineralizados que a circundam. Estruturalmente a dentina, maior porção componente dos dentes, organiza-se em um sistema tubular que, enquanto a polpa estiver vital, fica preenchido pelos prolongamentos odontoblásticos. Ocorrendo a necrose pulpar o espaço anteriormente ocupado pela polpa torna-se suscetível de infecção a qual, em um primeiro momento, coloniza a superfície dentinária intra-radicular e, se não debelada em tempo, progride para o interior de canais laterais e acessórios e para o próprio interior dos túbulos dentinários.

Uma vez estabelecidos no interior do sistema de canais radiculares os microrganismos encontram condições ideais para sobrevivência e multiplicação, podendo expressar fatores de virulência, isto é, desencadear mecanismos de agressão que causam efeitos diretos e indiretos no hospedeiro. O dano tecidual resultante da invasão microbiana, no mais das vezes, traduz-se pelo estabelecimento de uma periodontite apical.

A evidência incontestável do caráter infeccioso das alterações patológicas periapicais foi obtida pela investigação de Kakehashi, Stanley e Fitzgerald (1965). Diversas pesquisas seguiram-se (WITTGOW JR; SABISTON JR, 1975; SUNDQVIST, 1976; KEUDELL et al., 1976; MÖLLER et al., 1981; BRAUNER; CONRADS, 1995) corroborando os estudos prévios a respeito da gênese microbiológica do processo.

A microbiota do canal radicular infectado tornou-se alvo de diversas pesquisas. A evolução das metodologias empregadas para coleta, cultura,

isolamento e identificação dos microorganismos alterou, ao longo do tempo, o cenário microbiológico das infecções. Nos anos 60 os pesquisadores utilizavam microscopia, técnicas de cultura aeróbia e reações bioquímicas (BAUMGARTNER, 2004) de modo que os microorganismos recuperados de canais radiculares infectados eram facultativos ou aerotolerantes. Dentre os principais isolados destacavam-se: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Enterococcus spp*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp* e leveduras (*Candida albicans*) (JORGE, 2007). Em meados dos anos 70 o desenvolvimento de técnicas laboratoriais anaeróbias tornou possível o isolamento e cultivo de outras espécies de microorganismos. Quando essas técnicas foram aplicadas a amostras resgatadas de canais radiculares, ficou evidente o predomínio das bactérias anaeróbias estritas em canais radiculares infectados, representando até 90% da microbiota presente (SUNDQVIST, 1994). O conhecimento vigente sobre microbiologia endodôntica é baseado em resultados obtidos após o emprego de diferentes metodologias como histologia convencional, microscopia óptica, microscopia eletrônica, microscopia confocal a laser, cultura microbiológica e técnicas bioquímicas e moleculares. Todos esses métodos têm vários níveis de limitações no que diz respeito à sensibilidade e a relevância etiológica (NAIR, 2007)

A diversidade polimicrobiana das infecções endodônticas está bem estabelecida. O ecossistema da cavidade oral possui uma população microbiana autóctone constituída de uma grande variedade de tipos bacterianos. Até algum tempo o número de espécies detectadas contabilizava mais de 300 (SUNDQVIST, 1994), contudo, estudos mais recentes narram o isolamento de mais de 500 (BAUMGARTNER, 2004) e até mais de 700 espécies (TRONSTAD; SUNDE, 2003).

Todavia, a ampla extensão da microbiota residente na cavidade bucal não se reflete na contaminação do sistema de canais radiculares, onde um restrito número de microorganismos responde pelas alterações patológicas pulpare e periapicais. Esse fato foi comprovado por estudos que delinearam a estrutura da microbiota endodôntica, e reportaram que o número de espécies por canal variou de um a 17 (SIQUEIRA JR et al., 2000), de um a 11 (LANA et al., 2001), de quatro a sete (SIQUEIRA JR; RÔÇAS; LOPES, 2002), de três a 12 (BAUMGARTNER, 2004), de um a oito (SIQUEIRA JR et al., 2007), de um a 35 (VIANNA et al., 2008) e de sete a 38 (SASSONE et al., 2008). A disparidade entre o número de espécies que tem potencial para invadir o sistema de canais radiculares e aquelas que realmente o fazem, se deve a pressões seletivas do meio, como a tensão de oxigênio, a disponibilidade de nutrientes e a interação microbiana entre espécies que compartilham características fisiológicas e bioquímicas (NAIR, 2007; SUNDQVIST; FIGDOR, 2003; LANA et al., 2001).

Entender a composição da microbiota presente nas infecções endodônticas é necessário para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes (ROLPH et al., 2001).

As infecções de longo tempo e as grandes lesões normalmente abrigam uma maior diversidade de espécies microbianas assim como uma maior densidade de células bacterianas (SUNDQVIST; FIGDOR, 2003). Não somente a presença da bactéria é importante para o desenvolvimento e manutenção da doença, mas também o tamanho de sua população (BRAUNER; CONRADS, 1995; VIANA et al., 2008), sugerindo que o nível de espécies bacterianas presentes pode ser indicativo do grau de patogenicidade da infecção (SASSONE et al., 2007).

A exposição da cavidade pulpar ao meio ambiente oral origina diferenças qualitativas e quantitativas no desenho final da infecção, uma vez que as condições ambientais presentes são radicalmente diversas daquelas apresentadas em dentes com câmara pulpar fechada (FABER; SELTZER, 1988; PECIULIENE et al., 2008). Entretanto, uma similaridade entre as espécies bacterianas presentes foi relatada para ambas as situações clínicas descritas (CHU et al., 2005).

A característica de permeabilidade do tecido dentinário determina o espalhamento da infecção para o interior dos túbulos dentinários em toda a extensão da raiz. A frequência da invasão bacteriana no terço apical é menor em decorrência da maior quantidade de dentina esclerosada presente nessa área, o que, conseqüentemente, resulta em um menor grau de permeabilidade (MATSUO et al., 2003). Outro fator relacionado se refere ao número de túbulos dentinários, que, em qualquer idade, nos terços cervical, médio e apical, é semelhante, porém, existem muito menos túbulos dentinários por área de dentina na porção apical (CARRIGAN et al., 1984).

O processo inflamatório, decorrente da degeneração tecidual ocasionada por agressores microbianos, promove a liberação de mediadores químicos que provocam uma estimulação nociva das terminações nervosas do tecido pulpar (COHEN; BURNS, 2000). A correlação entre a presença de espécies bacterianas específicas e a ocorrência de sinais e sintomas foi investigada (GOMES; LILEY; DRUCKER, 1996; FOUAD et al., 2002; GOMES et al., 2004; SAKAMOTO et al., 2006; SASSONE et al., 2008) e certas analogias foram descritas. As espécies *Prevotella melaninogenica*, *Peptostreptococcus micros* (GOMES, LILEY, DRUCKER, 1996), *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus spp.* (FOUAD et al., 2002), *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia* /

nigrescens, *Eubacterium* spp. (GOMES et al., 2004), *Prevotella bucae*, *Prevotella dentalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium yurii*, *Eubacterium* spp, *Peptostreptococcus magnus* (ØRSTAVIK; PITT FORD, 2004), *Tannerella forsythia* (SASSONE et al., 2008) foram associadas à presença de dor. *Porphyromonas* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium* spp. e *Enterococcus* spp. foram descritas na presença de sensibilidade à percussão, edema, secreção e exsudado purulento (GOMES et al., 2004). A espécie *Propionibacterium acnes* foi encontrada em níveis maiores em dentes assintomáticos (SASSONE et al., 2008). A estrutura da microbiota em infecções sintomáticas e assintomáticas difere significativamente (SAKAMOTO et al., 2006), e as complexas interações existentes entre as espécies resultam em situações clínicas características as quais não podem ser ocasionadas por espécies individuais isoladamente (GOMES et al., 2004).

Reconhecidamente em alguns casos os procedimentos terapêuticos instituídos são ineficientes no controle e eliminação do conteúdo microbiano primário resultando em infecção secundária. A biodiversidade bacteriana associada as diferentes condições das infecções endodônticas foi apurada (ROLPH et al., 2001; ØRSTAVIK; PITT FORD, 2004; GOMES et al., 2004, 2006; SIQUEIRA JR et al., 2007; BLOME et al., 2008; PECULIENE et al., 2008). A infecção primária é mista compreendendo uma alta diversidade de microorganismos gram-negativos, gram-positivos, em sua maioria anaeróbios (GOMES et al., 2004), com predomínio de espécies pertencentes aos gêneros *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Treponema*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* e *Compylobacter* (SIQUEIRA JR, 2002). Os canais abrigam significativamente mais bactérias (BLOME et al., 2008) e o número de espécies encontradas pode variar de dois a oito

(ØRSTAVIK; PITT FORD, 2004; GOMES et al., 2004; SIQUEIRA JR et al., 2007). Em infecções de natureza secundária há uma superioridade de bactérias anaeróbias facultativas gram-positivas (GOMES et al., 2004). Entre os gêneros recuperados desses canais evidenciam-se *Capnocytophaga*, *Cytophaga*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Mogibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Selenomonas*, *Solobacterium*, *Streptococcus* e *Veillonella* (ROLPH et al., 2001). Entre as espécies mais prevalentes figuram *Enterococcus faecalis* (GOMES et al., 2004, 2006; SIQUEIRA JR et al., 2004; SEDGLEY et al., 2006), *Streptococcus spp.*, *Peptostreptococcus micros* e *Fusobacterium necrophorum* (GOMES et al., 2004), *enterococcus*, *lactobacillus*, *Actinomyces*, *peptostreptococcus*, *Candida*, *Eubacterium alactolyticus*, *Propionibacterium propionicum*, *Dialister pneumosintes*, *Filifactor alocis* (SIQUEIRA JR et al., 2004), *Peptostreptococcus micros* e *Porphyromonas endodontalis* (BLOME et al., 2008). O número de espécies presentes em cada canal pode variar de um a dois (GOMES et al., 2004).

As doenças orais mais comuns, cárie, periododntite marginal e periodontite apical, são processos dinâmicos que tem estágios patogênicos distintos, nos quais as espécies presentes nos estágios tardios não estão necessariamente presentes no início do processo (SIQUEIRA JR; RÔÇAS; SILVA, 2008). O canal radicular é um ambiente único onde a seleção biológica define o tipo e o curso da infecção, (SUNDQVIST; FIGDOR, 2003).

A condição de anaerobiose no interior do sistema de canais radiculares, restringe e altera o tipo de nutriente disponível. Esta característica ambiental é resultante da presença de colonizadores prévios, normalmente bactéria anaeróbia facultativa (FARBER; SELTZER, 1988) que consomem o oxigênio e produzem CO₂

e H (SUNDQVIST; FIGDOR, 2003). O estabelecimento desta condição promove um decréscimo de carboidratos disponíveis que limita a oportunidade de crescimento de anaeróbias facultativas (PECIULIENE et al., 2008). Simultaneamente, há um aumento na disponibilidade de aminoácidos e peptídeos, principal fonte energética de bactérias anaeróbias. Assim, bactérias anaeróbias, presentes na flora normal, superam as facultativas no curso da infecção e são considerados invasores secundários (SUNDQVIST; FIGDOR, 2003).

O crescimento do consórcio bacteriano depende de interações entre as espécies, onde o metabolismo de algumas espécies fornece os nutrientes essenciais para o crescimento de outros membros da população. Esse fato define outra característica da infecção que é o aumento do número de células bacterianas e de microorganismos anaeróbios com a evolução do processo (SUNDQVIST; FIGDOR, 2003).

O objetivo da terapia clínica é romper e destruir o ecossistema microbiano associado com o processo de doença (BAUMGARTNER, 2004). Nenhum outro fator, de forma singular, foi tão importante para o aumento no índice de sucesso documentado quanto o reconhecimento e a incorporação de princípios antimicrobianos à prática (SPANGBERG, 2000). Para tal se faz necessário um amplo conhecimento do perfil da infecção (ROLPH et al., 2001; SIQUEIRA JR; RÔÇAS; LOPES, 2002; GOMES et al., 2004; SAKAMOTO et al., 2006; SASSONE et al., 2007; BLOME et al., 2008) e das características comportamentais do agente causal propriamente dito (FARBER; SELTZER, 1988; SUNDQVIST, 1994; LANA et al., 2001; SIQUEIRA JR; LOPES, 2001; SIQUEIRA JR, 2002; SUNDQVIST; FIGDOR, 2003; LOVE, 2004).

O conhecimento resultante de pesquisas que empregaram avançadas técnicas microbiológicas (BLOME et al., 2008; SASSONE et al., 2008; VIANNA et al., 2008) contribuiu para um melhor entendimento da biologia das alterações pulpare e perirradiculares. Entretanto algumas questões ainda permanecem obscuras e necessitam ser elucidadas, como por exemplo a característica microbiológica de canais radiculares de dentes permanentes jovens portadores de periodontite apical primária, proposta no presente estudo.

Os estudos clínicos descritivos em humanos embasam os procedimentos da prática diária e podem sugerir explicações sobre elementos pouco conhecidos na etiologia e evolução das doenças (ESTRELA, 2001).

A avaliação microbiológica desenvolvida nesta pesquisa teve por objetivo realizar uma amostragem da infecção presente em canais radiculares de dentes com rizogênese incompleta, polpa necrótica, periodontite apical estabelecida e caracteristicamente sob condições de infecção primária em cavidade fechada. Investigações outras também tiveram oportunidade, porém, aludindo a circunstâncias clínicas diversas da proposta neste trabalho (WITTGOW JR; SABISTON, 1975; KEUDELL et al., 1976; SUNDQVIST; JOHANSSON; SJÖGREN, 1989; SUNDQVIST, 1992; CHU et al., 2005; SAKAMOTO et al., 2006).

O elemento dentário é considerado jovem enquanto sua rizogênese não se completa, isto é, no tempo em que exibe um ápice ainda em formação e um forame amplo. A formação da raiz compreende uma mineralização da dentina na qual a matriz orgânica é substituída por um entrelaçado de cristais de hidroxiapatita (CARRIGAN et al., 1984). Muitos estudos mencionaram alterações nesse tecido em função do processo evolutivo. Nalbadian, Gonzáles e Sognnaes (1960) destacaram que a dentina de indivíduos jovens apresenta aparência semelhante à dentina de

adultos e que a transparência da dentina esclerosada aumenta e expande em direção coronária com a maturidade do dente. Carrigan et al. (1984) afirmaram que a mineralização da dentina é contínua durante toda a vida; que o número de túbulos dentinários diminui com o aumento da idade; e que a média de túbulos dentinários por área de dentina é menor na região apical. Love e Jenkinson (2002) relataram que o menor número de túbulos dentinários patentes na porção apical em decorrência da maior quantidade de dentina esclerosada depositada determina uma menor profundidade e extensão do processo infeccioso.

O tecido pulpar de um dente jovem sofre modificações com a idade. A distribuição e a quantidade dos componentes da polpa variam segundo o período de desenvolvimento e o estado funcional tecidual. O processo de envelhecimento causa uma redução gradual no número de células, assim como um aumento simultâneo no número e na espessura das fibras colágenas, particularmente na polpa radicular (COHEN; BURNS, 2000). Com a idade o número de nervos e vasos sanguíneos reduz progressivamente (BERNICK; NEDELMAN, 1975)

As variações morfofuncionais que sobrevêm ao complexo dentino-pulpar resultante ao processo evolutivo, poderiam influenciar as características do processo infeccioso. Essa dúvida fundamentou a presente investigação na qual a amostra compreendeu pacientes, com idade entre 7 e 22 anos, com necessidade de tratamento endodôntico em um ou mais dentes unirradiculares, portadores de rizogênese incompleta. Para comprovar o estágio de desenvolvimento radicular dos elementos selecionados foi realizada uma radiografia que permitiu obter a medida da largura do forame apical. Assim quando o forame media 0,6 mm ou mais, as raízes eram consideradas imaturas. (CVEK; NORD; HOLLENDER, 1976).

Os procedimentos experimentais em Microbiologia requerem notável rigor no controle asséptico da técnica (ESTRELA, 2001). Quando a amostra microbiológica é obtida por meio de coleta clínica, extremo cuidado se faz necessário para evitar uma contaminação externa dos espécimes (BAUMGARTNER, 2004).

Para alcançar esse objetivo e obter amostras de qualidade foram realizados os seguintes procedimentos prévios: 1) preparo do campo operatório que incluiu bochecho anti-séptico com solução de digluconato de clorexidina a 0,12%, raspagem supra-gengival e polimento com pedra-pomes e posicionamento de isolamento absoluto; 2) desinfecção do campo operatório pela aplicação sucessiva de solução de peróxido de hidrogênio a 30%; tintura de iodo a 1,0% e tiosulfato de sódio a 5,0% e 3) controle da assepsia do campo operatório na qual uma amostra da superfície coronária foi coletada com bolinha de algodão esterilizada e transferida para um frasco contendo de meio de transporte (Möller, 1966). A comprovada eficácia desses procedimentos manifesta-se na ampla quantidade de trabalhos que fizeram uso dos mesmos. (SUDQVIST; JOHANSSON; SJÖGREN, 1989; SUNDQVIST, 1992b; LE GOFF et al., 1997; BAUMGARTNER et al., 1999; LANA et al., 2000; FERRARI; CAI; BOMBANA, 2005; CHU et al., 2005)

Para obtenção dos espécimes microbiológicos utilizaram-se três pontas de papel absorventes esterilizadas (LE GOFF et al., 1997, FERRARI; CAI; BOMBANA, 2005; CHU et al., 2005; SIQUEIRA JR et al., 2007) que permaneceram em posição próxima ao ápice por 30 segundos (LE GOFF et al., 1997; FERRARI; CAI; BOMBANA, 2005; CHU et al., 2005). Outras pesquisas empregaram uma única ponta de papel absorvente (GOMES; LILEY; DRUCKER, 1996; GOMES et al., 2004; 2006), cinco pontas de papel absorvente (VIANNA et al., 2008) ou obtiveram a amostra por aspiração (MUNSON et al., 2002). De forma análoga o tempo de

permanência no interior do canal variou de 15 a vinte segundos (CHU et al., 2005), estendendo-se, em alguns casos, por até sessenta segundos (GOMES; LILEY; DRUCKER, 1996; LANA et al., 2001; GOMES et al., 2004; 2006). Essas diferenças presentes na metodologia aplicada podem influenciar os resultados e dificultar uma possível correlação entre os mesmos.

As amostras foram transportadas para o laboratório de Microbiologia no menor período de tempo possível após a coleta, não excedendo o prazo de duas horas até o início do seu processamento. Os espécimes foram dispostos em meio de transporte pré-reduzido durante esse período para manter a viabilidade dos microrganismos (BAUMGARTNER, 2004). Esses cuidados visaram diminuir a influência de fatores externos, proteger as bactérias anaeróbias da exposição ao oxigênio e compunham parte integrante do planejamento experimental.

O crescimento bacteriano é medido por meio de uma estimativa do número de células que foram geradas por divisão binária durante uma fase do crescimento. Essa medida é expressa como o número de organismos viáveis por mililitro de cultura. Um método para medir o crescimento bacteriano é a contagem padrão em placa (BLACK, 2002). Entretanto, o elevado número de células bacterianas nas amostras originais de canais radiculares infectados, marca a termo uma necessidade de diluir a cultura bacteriana original antes de se plaquear um volume conhecido de cultura para a placa sólida (SUNDQVIST; FIGDOR, 2003). Nesta pesquisa a amostra sofreu uma diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-4} , de acordo com outras publicações (BAUMGARTNER; FALKLER, 1991; BAUMGARTNER et al., 1999; GOMES et al., 2004; FERRARI; CAI; BOMBANA, 2005) e 100µL de cada diluição foi semeado em distintos meios de cultura. A não realização de transferência em

triplicata proposta por Black (2002) e realizada por Munson et al. (2002), não influenciou no resultado, todavia, sua execução poderia torná-lo mais acurado.

A escolha dos microorganismos a serem pesquisados neste trabalho resultou do entendimento da dinâmica do processo infeccioso e do reconhecimento do papel dessas bactérias no desenvolvimento e manutenção das patologias periapicais (BRAUNER; CONRADS, 1995; FABRICIUS et al., 1982; LANA et al., 2001; SEDGLEY et al.; 2006; SASSONE et al., 2007). Em virtude da característica polimicrobiana do processo infeccioso selecionou-se meios de cultura seletivos (ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e ágar m-Enterococcus) e não-seletivos enriquecidos (ágar Brucella-sangue acrescido de hemina e menadione) capazes de favorecer o crescimento desses microorganismos (FARBER; SELTZER, 1988; BAUMGARTNER, 2004), respectivamente, *enterococcus*, *Candida albicans* e bactérias totais em anaerobiose (FERRARI; CAI; BOMBANA, 2005).

As condições ambientais necessárias para o crescimento dos microorganismos alvo foram igualmente respeitadas. As placas de ágar Sabouraud dextrose foram incubadas em temperatura ambiente por 4 a 7 dias e as placas de ágar m-Enterococcus permaneceram de 24 a 48 horas em estufa microbiológica com temperatura constante de 37°C (FERRARI; CAI; BOMBANA, 2005). A incubação das placas de ágar Brucella-sangue foi realizada em jarra de anaerobiose com uma atmosfera de 85% de N₂, 5% de CO₂ e 10% de H₂ e prolongou-se por 14 dias. Neste caso optou-se por um prazo estendido de incubação em decorrência da característica fastigiosa dos microorganismos pesquisados. Na literatura consultada diferentes tempos de incubação em anaerobiose foram utilizados, 5 a 10 dias (CHU et al., 2005), 7 dias (MUNSON et al., 2002; FERRARI; CAI; BOMBANA, 2005; VIANNA et al., 2008) e 14 dias (GOMES; LILEY; DRUCKER, 1996; LANA et al.,

2001; GOMES et al., 2004, 2006; SIQUEIRA JR et al., 2007). Abordagens especiais como o uso de meio ágar acrescido de nutrientes e um longo período de incubação foram propostos para viabilizar o crescimento de tipos bacterianos até então não-cultiváveis. (BREZNACK, 2002; SIQUEIRA JR et al., 2007). Sundqvist e Figdor (2003) destacaram também que a sobrevivência celular durante a cultura depende da disponibilidade de nutrientes no meio, da proteção da amostra à exposição de oxigênio e do tempo de incubação.

A despeito do advento das técnicas moleculares para investigação microbiológica, no presente trabalho fez-se uso do método de cultura em placa. A cultura e o isolamento de microorganismos ainda são de grande importância para o estudo das desordens microbianas. O crescimento de um organismo em cultura pura permite o uso de microscopia, estudos imunológicos, análises metabólicas, testes de susceptibilidade antibiótica e o uso de modelos experimentais. Assim como as técnicas moleculares são poderosas em detectar a presença de microorganismos específicos, a microscopia, o isolamento/cultivo, os estudos imunológicos e os testes bioquímicos ainda são de grande importância nas pesquisas endodônticas (BAUMGARTNER, 2004). A literatura revisada demonstra uma grande variedade de modalidades investigativas utilizadas na pesquisa microbiológica em Endodontia (TROPE; TRONSTAD; ROSENBERG, 1992; BAUMGARTNER; WALKINS; BAE, 1996; LANA, et al., 2001; SIQUEIRA JR; RÔÇAS; LOPES, 2002; SEDGLEY et al., 2006).

Ambos os métodos, cultura e molecular, apresentam deficiências. Não obstante a elevada sensibilidade dos métodos moleculares, não é possível estudar o fenótipo bacteriano, determinar a patogenicidade de cepas individualmente (SEDGLEY et al., 2006) e estudar a eficácia antimicrobiana de uma terapia instituída

(BLOME et al., 2008). Algumas técnicas genéticas podem gerar falso-positivo, enquanto outras fornecem resultados não-quantitativos (SIQUEIRA JR; RÔÇAS; LOPES, 2002). A cultura microbiológica revela o amplo espectro microbiano presente no interior do sistema de canais radiculares, detecta células microbianas viáveis e viabiliza a utilização desses microorganismos em testes e pesquisas futuras (PECIULIENE et al., 2008). Entretanto, algumas espécies requerem condições ambientais e nutricionais especiais, o que impede sua cultura em meio sólido e podem apresentar crescimento longo e demorado. Além disso, o limite mínimo detectável de células em cultura é de 10 a 10^2 . As duas metodologias são passíveis de contaminação (SUNDQVIST; FIGDOR, 2003), entretanto, identificar uma contaminação da amostra durante a manipulação laboratorial é mais fácil quando o método de cultura é utilizado (SUNDQVIST; FIGDOR, 2003; PECIULIENE et al., 2008). Uma combinação de tecnologias (SEDGLEY et al., 2006; SIQUEIRA JR et al., 2007) e um maior número de casos avaliados poderiam fornecer informações mais abrangentes sobre a biodiversidade bacteriana presente em dentes jovens portadores de infecção endodôntica primária.

Os resultados foram obtidos, após a incubação, pela contagem de colônias em cada placa. Em qualquer lugar onde uma bactéria viva isolada for depositada em uma placa de ágar, ela se dividirá e formará uma colônia. Cada bactéria representa uma unidade formadora de colônia (UFC), portanto, o número de colônias contadas representa o número de organismos vivos presentes. O cálculo do número de bactérias por mililitro presente na cultura original é feito com base no fator de diluição utilizado (BLACK, 2002).

Microorganismos foram isolados de todos os canais. Esse dado estabelece que a periodontite apical primária em dentes jovens possui uma etiologia microbiana,

de forma análoga aos dentes com rizogênese completa, como foi previamente descrito por Kakaehashi, Stanley e Fitzgerald (1965) e Möller et al. (1981).

O número total de bactérias por canal variou de $1,8 \times 10^3$ a $1,15 \times 10^7$, perfazendo uma média de $5,7 \times 10^6$ UFC's/mL. Achados semelhantes foram descritos para dentes adultos nos estudos de Sedgley et al. (2006) - $2,0 \times 10^6$ UFC's/mL, Blome et al. (2008) - $1,5 \times 10^7$ UFC's/mL e Vianna et al. (2008) - $2,0 \times 10^5$ UFC's/mL.

Espécies de bacteroides produtores de pigmento negro foram identificadas em 21,05% (4/19) do total de amostras analisadas. Esse resultado diverge da maioria das investigações semelhantes que narram um percentual em torno de 50 a 90 % para ocorrência dessas espécies (BAUMGARTNER; FALKLER, 1991; BAUMGARTNER; WALKINS; BAE, 1996; BAUMGARTNER et al., 1999; SUNDQVIST; JOHANSSON; SJÖGREN, 1989). A ocorrência desse resultado pode ser relacionada à dificuldade de cultivo e isolamento desses microorganismos uma vez que são considerados fastidiosos pois apresentam crescimento lento, requerendo, mesmo em meio enriquecido, um tempo de incubação de 7 dias ou mais. Interessante comentar que a baixa faixa etária dos indivíduos participantes pode constituir um fator complicador durante a obtenção clínica das amostras, pois dificulta a rápida coleta, e expõe demasiadamente as amostras ao oxigênio ambiente.

Quando o número total de células foi correlacionado com a presença de espécies de bacteroides produtores de pigmento negro, os dados do presente estudo foram semelhantes aos obtidos por Baumgartner e Falkler (1991) e não demonstraram grande diferença na média do número de UFC's/mL entre canais infectados por bacteroides produtores de pigmento negro ($5,75 \times 10^6$) e canais não

infectados por bacteroides produtores de pigmento negro ($9,2 \times 10^6$). Resultados incompatíveis foram descritos por Sundqvist, Johansson e Sjögren (1989) os quais relataram diferença expressiva no volume de células presentes quando da presença e ausência de microorganismos dessas espécies.

O gênero *enterococcus* foi isolado de uma amostra correspondendo a 5,25% do total de canais avaliados e o número de UFC's/mL foi de $1,5 \times 10^4$. Esse dado deixa entrever a presença desse gênero em canais portadores de infecção primária. Algumas pesquisas recentes relataram alta recuperação da espécie *Enterococcus faecalis* de canais com infecção endodôntica primária (GOMES et al., 2006; SEDGLEY et al., 2006; SASSONE et al., 2007). A baixa ocorrência evidenciada no presente trabalho pode estar relacionada ao tipo de metodologia utilizada. Achados semelhantes foram descritos por Gomes et al. (2006) quando comparou os métodos de cultura e molecular para identificação de *Enterococcus faecalis*, e delineou sua presença em 23/100 e 79/100 casos, respectivamente. Nos casos portadores de infecção primária a cultura identificou *Enterococcus faecalis* em 4% (2/50) das amostras enquanto a PCR recuperou os mesmos microorganismos em 82% (41/50) dos espécimes.

A relação de causa e efeito existente entre a presença de infecção e o desenvolvimento das patologias periapicais constitui um dogma da microbiologia endodôntica. Essa realidade decorre de exaustivas pesquisas as quais proporcionaram um melhor entendimento biológico das alterações patológicas da polpa e do periápice. Nesse contexto um dos fatores que merece destaque seria a conexão necessária entre o conhecimento obtido por meio de pesquisas e os princípios de tratamento que regem a prática clínica, haja vista, que nós tratamos uma doença e não um canal radicular.

O desenvolvimento de estratégias terapêuticas efetivas é, conseqüentemente, baseado nas informações procedentes de estudos que delinearam o padrão de colonização microbiana de canais radiculares infectados. Até o presente momento o tratamento de dentes jovens portadores de infecção endodôntica de caráter primário era fundamentado em investigações nas quais os espécimes pesquisados possuíam rizogênese completa. O presente estudo buscou contribuir para o enriquecimento científico sobre as características microbiológicas de dentes jovens com infecção endodôntica primária e, por conseguinte, estabelecer bases mais sólidas, com substancial conhecimento teórico, para terapêutica a ser instituída. Pesquisas subseqüentes poderão fazer uso de metodologias diversas a fim de proporcionar um maior detalhamento desta situação clínica.

7 CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos e as limitações do presente estudo pode-se afirmar ser a microbiota de dentes permanentes com rizogênese incompleta, portadores de necrose pulpar, com periodontite apical radiograficamente discernível e portadores de infecção primária semelhante àquela encontrada nas infecções endodônticas de dentes completamente formados.

REFERÊNCIAS¹

Baumgartner JC, Falkler WA. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. J Endod 1991;17(8):380-3.

Baumgartner JC, Siqueira Jr. JF, Xia T, Rôças IN. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. J Endod 2004;30(3):141-4.

Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. J Endod 1999;25(6):413-5.

Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS. Identification of bacterial species in root canal infections. J Endod 1996;22(4):200.

Baumgartner JC. Microbiological and molecular analysis of endodontic infections. Endod Topics 2004;7:35-51.

Bergenholtz G. Micro-organisms from necrotic pulp of traumatized teeth. Odontol Revy. 1974;25(4):347-58

Bergenholtz G. Micro-organisms from necrotic pulp of traumatized teeth. Odontol Revy. 1974;25(4):347-58

Bernick S, Nedelman C. Effect of aging on the human pulp. J Endod. 1975;1(3):88-94.

Black JG. Microbiologia. Fundamentos e perspectivas. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol 2008;23(5):384-90.

¹De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE..

Brauner AW, Conrads G. Studies into the microbial spectrum of apical periodontitis. *Int Endod J* 1995;28(5):244-8.

Breznak JA. A need to retrieve the not-yet-cultured majority. *Environ Microbiol*. 2002;4(1):4-5.

Carrigan PJ, Morse DR, Furst ML, Sinai IH. A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. *J Endod*. 1984;10(8):359-63.

Chu FCS, Tsang CSP, Chow TW, Samaranayake LP. Identification of cultivable microorganisms from primary endodontic infections with exposed and unexposed pulp space. *J Endod* 2005;31(6):424-9.

Cohen S, Burns RC. *Caminhos da polpa*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Conrads G, Gharbia SE, Gulabivala K, Lampert F, Shah HN. The use of a 16S rDNA PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. *J Endod* 1997;23(7):433-7.

Cvek M, Nord C-E, Hollender L. Antimicrobial effect of root canal débridement in teeth with immature root. *Odont Revy* 1976;27(1):1-10.

Estrela C. *Metodologia científica. Ensino e pesquisa em odontologia*. São Paulo: Artes Médicas; 2001.

Fabricius L, Dahlén G, Holm SE, Möller AJ. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* 1982;90(3):200-6.

Farber PA, Seltzer S. Endodontic microbiology. I. Etiology. *J Endod* 1988;14(7):363-71.

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

Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R et al. PCR-Based identification of bacteria associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2002;40(9):3223-31.

Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Clinical significance of dental root canal microflora. J Dent 1996;24(1-2):47-55.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Souza ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. Oral Microbiol Immunol 2004;19 (2):71-6.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and polymerase chain reaction analysis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;102(2):247-53.

Jorge AOC. Microbiologia Bucal. 3. ed. São Paulo: Santos Editora; 2007.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1965;20(3):340-9.

Kakoli P, Nandakumar R, Romberg E, Arola D, Fouad AF. The effect of age on bacterial penetration of radicular dentin. J Endod 2009;35(1):78-81.

Keudell K, Conte M, Fujimoto L, Ernest M, Berry HG. Microorganisms isolated from pulp chambers. J Endod 1976;2(5):146-8.

Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stheling R, Garcia GD, Silva BKC, Hamdan S, et al. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drugs susceptibility *in vitro*. Oral Microbiol Immunol 2001;16(2):100-5.

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

Lopes HP, Siqueira Jr JF. Endodontia. Biologia e técnica. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI; 2004.

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

Love RM. Invasion of dentinal tubules by root canal bacteria. *Endod Topics* 2004;9:52-65.

Machado MEL. *Endodontia. Da biologia à técnica*. 1. ed. São Paulo: Santos Editora; 2007.

Matsuo T, Shirakami, T, Ozaki, K, Nakanishi T, Yumoto H, Ebisu S. An immunohistological study of the localization of bacteria invading root pulpal walls of teeth with periapical lesions. *J Endod* 2003;29(3):194-200.

Miller WD. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. *Dent Cosmos* 1894;36(7):505-28.

Möller AJR. Microbiological examination of root canal and periapical tissues of human teeth. *Odontol Tidskr* 1966;74:1-380

Möller AJR, Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scan J Dent Res* 1981;89(2):475-484.

Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res* 2002;81(11):761-6.

Nair PNR. Abusing technology? Culture-difficult microbes and microbial remnants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104(4):569-70.

Nalbandian J, Gonzales F, Sognnaes RF. Sclerotic age changes in root dentin of human teeth as observed by optical, electron, and x-ray microscopy. *J Dent Res* 1960;39:598-607

Ørstavik D, PittFord TR. *Fundamentos da endodontia. Prevenção e tratamento da periodontite apical*. São Paulo: Santos Editora; 2004.

Peciuliene V, Maneliene R, Balcikonyte E, Drukteinis S, Rutkunas V. Microorganisms in root canal infections: a review. *Stomatologija* 2008;10(1):4-9.

Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, vanWinkelhoff AJ. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2001;27(2):76-81.

Pirani C, Bertacci A, Cavrini F, Foschi F, Acquaviva GL, Prati C et al. Recovery of *Enterococcus faecalis* in root canal lumen of patients with primary and secondary endodontic lesions. *New Microbiol* 2008;31(2):235-40.

Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L et al.. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2001;39(9):3282-9.

Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira Jr. JF, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21(2):112-22.

Sassone L, Fidel R, Figueiredo L, Fidel S, Faveri M, Feres M. Evaluation of the microbiota of primary endodontic infections using checkerboard DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22(6):390-7.

Sassone IM, Fidel RA, Faveri M, Guerra R, Figueiredo L, Fidel SR et al. A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infections. *J Endod* 2008;34(5):541-5.

Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod* 2006;32(3):173-7.

Serene TP, Anderson DL. Isolation of mycoplasma from human root canals. *J Dent Res*. 1967;46(2):395-9.

Siqueira Jr JF, Rôças IN, Alves FRF, Santos KRN. Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: a molecular investigation. *J Endod* 2004;30(9):638-43.

Siqueira Jr. JF, Lopes HP. Bacteria on the apical root surfaces of untreated teeth with periradicular lesions: a scanning electron microscopy study. *Int Endod J* 2001;34(3):216-20.

Siqueira Jr. JF, Rôças IN, Lopes HP. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93(2):174-8.

Siqueira Jr. JF, Rôças IN, Paiva SSM, Magalhães KM, Guimarães-Pinto T. Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22 (4):266-71.

Siqueira Jr. JF, Rôças IN, Silva MG. Prevalence and clonal analysis of *Porphyromonas gingivalis* in primary endodontic infections. *J Endod* 2008;34(11):1332-6.

Siqueira Jr. JF, Rôças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;89(6):744-8.

Siqueira Jr. JF, Rôças IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J Dent* 2003;31(5):333-9.

Siqueira Jr. JF. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2002;94(3):281-93.

Spangberg LSW. Endodontics today – A turn-of-the-century reflection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2000;89(6):659.

Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen. *Endod Topics* 2003;6:3-28.

Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental Pulps [Dissertation Department of Oral Microbiology]. Sweden: University of Umea, Sweden; 1976.

Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78:522-30.

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

Sundqvist GK, Johansson E, Sjögren U. Prevalence of lack-pigmented bacteroides species in root canal infections. *J Endod* 1989;15(1):13-9.

Sundqvist GK. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992a;7(5):257-62.

Sundqvist GK. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992b;18(9):427-30.

Tronstad L, Sunde PT. The evolving new understanding of endodontic infections. *Endod Topics* 2003;6:57-77.

Trope M, Rosenberg E, Tronstad L. Darkfield microscopic spirochete count in the differentiation of endodontic and periodontal abscesses. *J Endod*. 1992;18(2):82-6.

Vianna ME, Horz H-P, Conrads G, Feres M, Gomes BPFA. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23(4):282-90.

Wittgow Jr WC, Sabiston Jr CB. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. *J Endod* 1975;1(5):168-71.

APÊNDICE A - Termo de consentimento esclarecido para pesquisa clínica

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nome do Paciente: _____ Data: ____/____/____

Eu, _____, após ter sido esclarecido, concordo com a necessidade do tratamento endodôntico (de canal) neste(s) dente(s) e aceito ser atendido pela cirurgiã-dentista e pesquisadora Karla Baumotte de Carvalho. Autorizo a utilização deste(s) dente(s) para estudo que tem por finalidade detectar a presença de microrganismos presentes nos canais portadores de periodontite apical crônica (doença da ponta da raiz do dente) e avaliar o grau de eficiência da técnica instituída. Tenho consciência de que esses procedimentos não trarão nenhum prejuízo a mim e que tenho liberdade de retirar tal consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma. Sou sabedor de que todas as informações pessoais prestadas serão confidenciais guardadas por força do sigilo profissional. Os resultados dos exames serão publicados em trabalho de tese de doutoramento da FOUSP, sem a identificação da minha pessoa.

Obs: Após o tratamento o paciente será acompanhado clínica e radiograficamente pelo pesquisador responsável por, no mínimo, 4 meses.

Ass. do Paciente ou Responsável: _____

R.G. nº _____

Nome e assinatura do pesquisador: _____

Karla Baumotte de Carvalho

Fone: (0xx21) 8875 1453

APÊNDICE B – Ficha de Anamnese

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FACULDADE DE ODONTOLOGIA
CENTRO DE ATENDIMENTO DE DENTÍSTICA E ENDODONTIA
DIVISÃO DE TRAUMATISMOS DENTAIS

R.G./CADE-_____

O presente questionário, que atende às exigências legais e terapêuticas, tem a finalidade de ajudar o cirurgião-dentista a conhecer os aspectos de sua saúde geral que podem influir no seu tratamento odontológico ou na medicação a ser receitada. O que você declarar neste questionário torna-se informação **CONFIDENCIAL** guardada por força do Sigilo Profissional (Artigo 9º do Código de Ética Odontológica).

NOME: _____

Questionário de Anamnese

Responda às perguntas com **SIM**, **NÃO** ou **NÃO SEI**, marcados com um **X**

	SIM	NÃO	NÃO SEI
No momento você está sob tratamento médico?			
Você ou alguém de sua família teve ou tem:			
HEPATITE			
SIFILIS			
HEMOFILIA			
DIABETES			
PROBLEMAS DE CORAÇÃO			
PROBLEMAS DE PRESSÃO (ALTA OU BAIXA)			
PROBLEMAS DE SANGRAMENTO AO SE FERIR			
ALERGIA A ALIMENTOS OU A MEDICAMENTOS			
ALGUMA VEZ VOCE NECESSITOU TRANSFUSAO DE SANGUE?			
ALGUMA VEZ VOCE NECESSITOU TOMAR ANTIBIOTICOS?			
VOCÊ ESTÁ OU PODE ESTAR GRÁVIDA?			
VOCE DESEJARIA RECEBER INFORMACOES SOBRE AIDS OU QUALQUER OUTRA DOENÇA INFECTO-CONTAGIOSA?			

VOCÊ TEM ALGUMA OUTRA INFORMAÇÃO QUE JULGA IMPORTANTE

CITAR: _____

Eu, _____ assinado, autorizo a utilização de fotografias, radiografias, resultados de exames, bem com demais informações contidas em meu prontuário, como material didático ou de pesquisa diante da preservação de minha identidade e declaro que o acima respondido é verdadeiro.

São Paulo, _____ de _____ de 20 _____

Assinatura do paciente ou de seu responsável

APÊNDICE C – Ficha Clínica

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FACULDADE DE ODONTOLOGIA
CENTRO DE ATENDIMENTO DE DENTÍSTICA E ENDODONTIA
DIVISÃO DE TRAUMATISMOS DENTAIS

R.G./CADE-t _____

NOME: _____

RESPONSÁVEL: _____

ENDEREÇO: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____ CEP: _____ - _____

FONE (Res.) _____ FONE (com.) _____ Recados com: _____

NASCIMENTO: ____/____/____ NATURALIDADE: _____ OCUPAÇÃO: _____

DATA DO TRAUMA: ____/____/____ HISTÓRICO DO TRAUMA: _____

DATA DO EXAME: ____/____/____ EXAMINADO POR: _____

ENCAMINHADO POR: _____

DENTE:							
TIPO DE TRAUMA (VIDE ABAIXO)							
TRATAMENTO PRÉVIO (SIM/NÃO)							
TRAUMAS ANTERIORES (SIM/NÃO)							
MOBILIDADE DENTAL (0-1-2-3)							
SENSIBILIDADE A PERCUSSÃO (SIM/NÃO)							
SENSIBILIDADE A PALPAÇÃO							
LESÃO DE MUCOSA C: CONTUSÃO - L: LACERAÇÃO - A: ABRASÃO							
FORAME APICAL C: COMPLETO - I: INCOMPLETO							
REABSORÇÃO RADICULAR N: NÃO - P: PARCIAL - C: COMPLETA							
LESÃO PERIAPICAL (SIM/NAO)							
TESTE DE VITALIDADE POSITIVO = P NEGATIVO = N	DATA						
	DATA						
	DATA						
	DATA						
	DATA						
CRT							
REFERÊNCIA							
LIMA INICIAL / LIMA FINAL (N°)							
PREPARO APICAL (N° DA LIMA)							
CONE N°							

Exames

complementares:

DO - fratura de esmalte; D - fratura de esmalte e dentina sem exposição pulpar; D2 - fratura de esmalte e dentina com exposição pulpar; D3 - fratura coronário radicular sem exposição pulpar; D4 - fratura coronário radicular com exposição pulpar; D5 - fratura radicular; p - fratura do processo alveolar; SO - concussão; Si - subluxação; S2 - luxação lateral; S3; luxação intrusiva; S4 - luxação extrusiva; S5 - avulsão

APÊNDICE D – Ficha de Contole Laboratorial

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Laboratório de Microbiologia Oral – ICB

Ficha de Processamento Microbiológico

Paciente: _____
Coleta: ____/____/____

Meio :	Diluições	UFC' s
semeado : ____/____/____ leitura: ____/____/____ resultado:	1/10	
	1/100	
	1/1.000	
	1/10.000	

Meio :	Diluições	UFC' s
semeado : ____/____/____ leitura: ____/____/____ resultado:	1/10	
	1/100	
	1/1.000	
	1/10.000	

Meio :	Diluições	UFC' s
semeado : ____/____/____ leitura: ____/____/____ resultado:	1/10	
	1/100	
	1/1.000	
	1/10.000	

Meio :	Diluições	UFC' s
semeado : ____/____/____ leitura: ____/____/____ resultado:	1/10	
	1/100	
	1/1.000	
	1/10.000	

Meio :	Diluições	UFC' s
semeado : ____/____/____ leitura: ____/____/____ resultado:	1/10	
	1/100	
	1/1.000	
	1/10.000	

ANEXO A – Carta Resposta do Comitê de Ética em Pesquisa

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

PARECER DE APROVAÇÃO
FR – 222014
Protocolo 160/08

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa **"IDENTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO MICROBIOLÓGICO DE CANAIS RADICULARES DE DENTES PERMANENTES JOVENS PORTADORES DE INFECÇÃO PRIMÁRIA"**, de responsabilidade da Pesquisadora Karla Baumotte de Carvalho, sob orientação do Professor Doutor Antonio Carlos Bombana.

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

São Paulo, 17 de fevereiro de 2009.

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

ANEXO B - Meio VMGA III (*Viability Medium Göteborg Anaerobically prepared*)

Solução A:

Tryptose (Difco Laboratories, USA)0,5 g

Thiotone (BBL, EUA)0,5 g

Água destilada540 mL

Dissolver com agitação e aquecimento

Solução B:

Bacto ágar 4% (Difco Laboratories, USA)2 g

Água destilada50 mL

Dissolver em fervura

Solução C:

Gelatina (Difco Laboratories, USA)50 g

Água destilada300 mL

Dissolver com agitação e aquecimento até a homogeneização

Solução D:

Ácido tioglicólico (Difco Laboratories, USA)0,5 mL

Solução E:

Solução de sais de estoque (posteriormente descrita)100 mL

Solução F:

L-cisteína HCL (Merck, USA)0,5 g

Água destilada10 mL

Dissolver com suave aquecimento.

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

Solução de sais de estoque:

1- Acetato de fenil mercúrio-cromo (Merck, USA).....0,005 g

Água destilada300 mL

Dissolver por aquecimento e incubar a 50 °C durante uma noite

2 - Glicerofosfato de sódio hidratado (Merck, USA)100 g

Água destilada200 mL

Dissolver aquecendo lentamente

3 - Cloreto de cálcio hidratado	1,6 g
Cloreto de potássio	4,2 g
Cloreto de sódio	10,0 g
Sulfato de magnésio hidratado	1,0 g
Água destilada	300 mL
Dissolver sob agitação	

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

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

ANEXO C - Água peptonada

Água destilada	1000 mL
Tryptone (Difco Laboratories, USA)	2,5 g
Thiotone E-peptone (BBL, USA)	2,5 g
Cloreto de sódio (Synth, Brasil)	5,0 g

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

ANEXO D - Ágar brucella sangue – hemina – menadione

Ágar Brucella¹

Fórmula (g/L), pH final = 7,5 +/- 0,2 a 25⁰ C

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

Em balança analítica², são pesados 43,0 g de ágar Brucella, 3,0 g de ágar, 2,0 g de extrato de levedura, que são colocados em Erlenmeyer acrescido de 1000 mL de água destilada, e deixado hidratar por 10 a 15 minutos. Com o auxílio de um bastão de vidro o pó é dissolvido completamente. O frasco é, então, fechado e esterilizado em autoclave a 121 °C, por 15 minutos. Logo após, esse será esfriado até uma temperatura aproximada de 45-50 °C e acrescido de solução de hemina³ (1,0 mL), de solução de menadione⁴ (0,1 mL), sangue de carneiro desfibrinado⁵ (30 mL). Em seguida, o meio é distribuído em placas do tipo Petri.

Esse meio foi utilizado para semear as várias diluições da amostra a fim de estimarmos as unidades formadoras de colônias.

ANEXO E – Solução de hemina

¹ Difco Laboratories, USA, cod. 0964-17-5

² Denver Instruments, XL-610, Max 610g, d=0.01g

³ Sigma, Chemical, USA Anexo E

⁴ Sigma, Chemical, USA Anexo F

⁵ Sangue desfibrinado de carneiro de Soerensen Laboratórios do Brasil Ltda

Hemina.....	0,5 g
Solução de NaOH a 1N.....	10 g
Água destilada.....	90 mL

ANEXO F – Solução de menadione

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

ANEXO G - Ágar m-Enterococcus

Ágar m-Enterococcus⁶:

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

Bactotryptose.....	20 g
Bactoyeast extract.....	5 g
Bacto dextrose.....	2 g
Dipotassium phosphate.....	4 g
Sodium azide.....	0,4 g
Bacto agar.....	10 g
2,3,5 – Triphenyl tetrazolium chloride.....	0,1 g

Em balança analítica, são pesados 42,0 g de ágar m-Enterococcus, que serão colocados em Erlenmeyer acrescido de 1000 mL de água destilada, e deixado hidratar por 10 a 15 minutos. Com o auxílio de um bastão de vidro o pó é dissolvido completamente. O frasco é fechado e fundido em autoclave a 121 °C, neste momento a autoclave será desligada. Esse meio não pode ser esterilizado. Em seguida, o meio é distribuído em placas do tipo Petri.

Esse meio foi utilizado para semear as várias diluições da amostra a fim de estimarmos as unidades formadoras de colônias de espécies de enterococos.

⁶ Difco Laboratories, USA, cod. 0746-17

ANEXO H – Ágar sabouraud-dextrose / cloranfenicol

Ágar Sabouraud Dextrose⁷

Fórmula (g/L), pH final = 5,6 a 25 °C

Neopeptone.....10 g

Bacto – dextrose.....40 g

Bacto – agar.....15 g

Em balança analítica, são pesados 65,0 g de ágar Sabouraud dextrose, que serão colocados em Erlenmeyer acrescido de 1000 mL de água destilada, e deixado hidratar por 10 a 15 minutos. Com o auxílio de um bastão de vidro o pó é dissolvido completamente. O frasco é fechado e esterilizado em autoclave a 121 °C, por 15 minutos. Após o resfriamento, são acrescidos 0,1% de cloranfenicol levógeno. Em seguida, o meio é distribuído em placas do tipo Petri.

Esse meio foi utilizado para semear as várias diluições da amostra a fim de estimarmos as unidades formadoras de colônias de leveduras.

⁷ Difco Laboratories, USA, cod. 0109-17

"Existem apenas duas maneiras de ver a vida. Uma é pensar que não existem milagres e a outra é que tudo é um milagre." Albert Einstein