

EDSON DIAS COSTA JUNIOR

**REAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO SUBCUTÂNEO DO RATO AO
ÁCIDO LIPOTEICÓICO DE *Streptococcus faecalis***

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do grau de Mestre em
Clínica Odontológica, da área de
Endodontia.

**Piracicaba
1997**

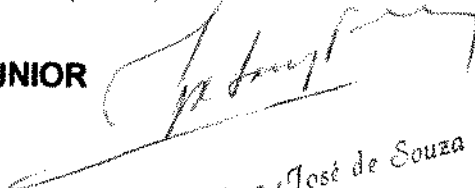
C823r

30563/BC

Este exemplar foi devidamente
corrigido conforme resolução CCEG/036/83

Piracicaba 08/04/97

EDSON DIAS COSTA JUNIOR

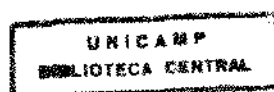

Prof. Dr. Francisco José de Souza F.O.
Área de Endodontia

**REAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO SUBCUTÂNEO DO RATO AO
ÁCIDO LIPOTEICÓICO DE Streptococcus faecalis**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do grau de Mestre em
Clínica Odontológica, da área de
Endodontia.

* Orientador: Prof. Dr. Francisco José de
Souza Filho - FOP - UNICAMP

Piracicaba
1997



92.05867

UNIDADE BC
N.º CHAMADA 77 UNICAMP
C 28/05/97
PREC. 28/11/00
DATA 27/05/97
N.º CPD
Cm. 00098095-1

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

C823r

Costa Jr., Edson Dias.

Reação do tecido subcutâneo do rato ao ácido lipoteicoico de *Streptococcus faecalis* / Edson Dias Costa Jr. - Piracicaba : [s.n.], 1997.

95f. : il.

Orientador : Francisco José de Souza Filho.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. 2. Inflamação. 3. Rato. I. Souza Filho, Francisco José de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

19.CDD - 617.634 2

- 617.22

- 619.93

Índices para o Catálogo Sistemático

1. Endodontia	617.634 2
2. Inflamação	617.22
3. Rato	619.93



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Mestrado**, em sessão pública realizada em 21/02/97, considerou o candidato aprovado.

1. Francisco José de Souza Filho

A handwritten signature in cursive script, likely belonging to Francisco José de Souza Filho.

2. Joélis Pupo

A handwritten signature in cursive script, likely belonging to Joélis Pupo.

3. Sérgio Valmor Barbosa

A handwritten signature in cursive script, likely belonging to Sérgio Valmor Barbosa.

Dedico este trabalho a minha esposa Cristina e meu filho Diogo Alexandre, pelo apoio e sacrifício durante essa fase tão difícil.

Dedico também aos meus pais Edson e Cleide pelo esforço e empenho na minha educação, orientação e exemplo de vida que servem como base as minhas condutas.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao orientador

Prof.Dr. Francisco José de Souza Filho

Atenção ao plano de pesquisa, compreensão as minhas dificuldades e aflições, sugestões inteligentes e sensatas, exemplo de tolerância e humanismo, contribuíram para o êxito deste trabalho.

Minha gratidão pelo Seu esforço, respeito científico e orgulho por tê-lo como amigo.

Ao co-orientador

Prof.Dr.Sérgio Valmor Barbosa

Seu critério científico; Sua capacidade de trabalho; Seu comportamento humano exemplar são verdadeiras escolas de crescimento e desenvolvimento para a vida.

Sua contribuição e dedicação foram importantes durante o processo de execução deste trabalho.

Muito além disso, tenho aprendido, a cada dia, muitas lições sobre ciência, comportamento, técnica, amizade, honestidade e outros, por ter o privilégio de conviver com Você diariamente e há muito tempo.

Muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Luiz Valdrighi**, um dos grandes nomes da Endodontia deste País, pela paciência e orientação dispensadas, principalmente durante uma das fases mais difíceis da minha vida.

Aos **Profs. Drs. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e Alexandre Zaia**, pela atenção dedicada à leitura deste trabalho e pelas sugestões propostas para o enriquecimento do mesmo. Meus profundos sentimentos de amizade e respeito científico.

Aos demais **Professores da Disciplina de Endodontia** da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pelo apoio, amizade e cordialidade.

Aos Técnicos do Laboratório de Histologia da UnB, **Glória e Juliano**, pelo auxílio na produção do material.

Ao Técnico do Laboratório da Biocompatibilidade de materiais da UnB, **Edvaldo Batista Teles**, pelo auxílio nas diversas etapas deste trabalho.

Ao amigo **Cláudio Takao Karia** pela atenção e gentileza na elaboração e análise dos dados estatísticos.

Aos colegas do curso de Pós-graduação, **Carlos Murgel, Carlos Bueno e Alexandre Sigrist**, pela amizade e companheirismo.

"Tenho o hábito de todas as manhãs esfregar os dentes com sal e, então, enxaguar a boca com água (...) após as refeições, limpar os dentes posteriores com palitos, assim como esfregá-los com pano (...). Apesar de tudo, meus dentes não ficam tão limpos, e o material que adere em alguns de meus dentes anteriores e caninos ou entre eles é brancacento, da consistência de manteiga. Examinando este material, concluí (embora não verificasse nada em movimento no mesmo) que lá ainda existiam animalículos vivos".

*trecho da carta enviada à Sociedade Real de Londres, por Anton van Leeuwenhoek (1632-1723), em 17 de setembro de 1683.

"Juntos todos os habitantes dos Países Baixos não chegariam a perfazer o número de animais vivos que transporto diariamente na minha própria boca".

* primeira descrição de bactérias da cavidade oral humana feita por Anton van Leeuwenhoek

SUMÁRIO

Listas	
. Fotografias	i
. Tabelas	ii
. Esquemas	iii
Resumo	iv
Introdução	01
Revisão de Literatura	05
Objetivos	37
Material e Método	38
Resultados	44
Discussão dos Resultados	50
Conclusões	65
Anexos	
. ANEXO I	66
. ANEXO II	75
. ANEXO III	80
Summary	87
Referências Bibliográficas	88

LISTA DE FOTOGRAFIAS

	p.
Figura 1 Reação tissular do subcutâneo do rato ao implante de tubo de teflon com Fibrinol. Grupo Controle - 2 dias.	67
Figura 2 Reação tissular do subcutâneo do rato ao implante de tubo de teflon com Fibrinol. Grupo Controle - 7 dias.	68
Figura 3 Reação tissular do subcutâneo do rato ao implante de tubo de teflon com Fibrinol. Grupo Controle - 14 dias.	69
Figura 4 Reação tissular do subcutâneo do rato ao implante de tubo de teflon com Fibrinol. Grupo Controle - 30 dias.	70
Figura 5 Reação tissular do subcutâneo do rato ao implante de tubo de teflon com Fibrinol embebido em ácido lipoteicóico 150 µg/ml. Grupo Experimental - 2 dias.	71
Figura 6 Reação tissular do subcutâneo do rato ao implante de tubo de teflon com Fibrinol embebido em ácido lipoteicóico 150 µg/ml. Grupo Experimental - 7 dias.	72
Figura 7 Reação tissular do subcutâneo do rato ao implante de tubo de teflon com Fibrinol embebido em ácido lipoteicóico 150 µg/ml. Grupo Experimental - 14 dias.	73
Figura 8 Reação tissular do subcutâneo do rato ao implante de tubo de teflon com Fibrinol embebido em ácido lipoteicóico 150 µg/ml. Grupo Experimental - 30 dias.	74

LISTA DE TABELAS

	p.
Tabela 1 Média dos elementos constituintes da reação inflamatória no tecido subcutâneo de ratos - apresentação por campo. Grupo controle.	76
Tabela 2 Média dos elementos constituintes da reação inflamatória no tecido subcutâneo de ratos - apresentação por campo. Grupo experimental.	77
Tabela 3 Média dos elementos constituintes da reação inflamatória no tecido subcutâneo de ratos durante o período de observação - apresentação por lesão. Comparação entre os grupos controle x experimental.	78
Tabela 4 Média dos elementos constituintes da reação inflamatória no tecido subcutâneo de ratos - apresentação por campo. Comparação entre os grupos controle x experimental.	79

LISTA DE ESQUEMAS

	p.
Esquema 1 Localização do ácido lipoteicóico na estrutura bacteriana.	81
Esquema 2 Parte hidrofílica (polissacarídica) da molécula de ácido lipoteicóico.	82
Esquema 3 Apresentação dos animais conforme os períodos de observação.	83
Esquema 4 Áreas de análise das lesões na extremidades do implante do tubo de teflon.	84
Esquema 5 Definição da área para escolha do campo de contagem das células.	85
Esquema 6 Definição do campo de contagem das células.	86

RESUMO

A infecção polimicrobiana do sistema de canais radiculares tem por característica produzir diversos fatores que contribuem para o início e desenvolvimento das lesões periapicais. O ácido lipoteicóico, molécula presente nas bactérias Gram-positivas, possui características físico-químicas que permitem sua ação como imunógeno.

Neste trabalho, 16 animais (ratos albinus - Wistar) foram utilizados, recebendo dois implantes de teflon na região dorsal. No lado esquerdo o tubo de teflon foi preenchido com Fibrinol (grupo controle) e no lado direito o tubo de teflon foi preenchido com Fibrinol embebido com ácido lipoteicóico (150 µg/ml). Os animais foram sacrificados após 2, 7, 14 e 30 dias, com remoção dos tecidos dorsais que continham os implantes. Após processamento laboratorial das peças fixadas em formol tamponado, foram realizados cortes de 6 µm de espessura, corados com hematoxilina e eosina e analisados em microscopia óptica.

Os resultados obtidos demonstraram que o ácido lipoteicóico, na concentração testada, provoca reação tecidual inflamatória em subcutâneo de ratos.

INTRODUÇÃO

A inflamação, quadro histológico comum nas alterações pulpares e periapicais é um sinal importante, manifestando-se por sintomas espontâneos ou identificada durante o exame clínico.

COTRAN et al.⁹(1991) definem-na como uma reação que ocorre nos tecidos vivos vascularizados, caracterizada pelo envolvimento dos vasos sangüíneos, levando ao acúmulo de líquidos e células sangüíneas, e que ocorre sempre em resposta a uma agressão.

Diversas substâncias químicas, enzimas, proteínas, glicídios, lipídios, assim como células do sistema de defesa, estão envolvidas em um conjunto complexo de interações, ativações e inibições, que dificulta o entendimento sobre o assunto.

TROWBRIDGE & EMLING⁵⁷(1996) afirmam que a inflamação tem por função a destruição do agente agressor, a diluição de substâncias nocivas ao organismo e a limitação da invasão, tudo contribuindo para proteção local e/ou geral do organismo agredido. Além disso, a inflamação também está relacionada ao processo de reparo dos tecidos destruídos. Entretanto, com o decorrer do tempo da agressão ou do potencial de destruição do agente agressor, a resposta inflamatória pode atingir proporções significativas, acarretando maiores prejuízos ainda ao tecido ou organismo.

A inflamação pode ser dividida em aguda e crônica, dependendo do tipo celular, reação tecidual e mediadores envolvidos no processo.

A inflamação aguda geralmente é de curta duração (desde alguns minutos até horas ou 1 ou 2 dias). Caracteriza-se pela presença de exsudação de líquido e proteínas plasmáticas (edema) e emigração de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) para o local, qualquer que seja a natureza do agente agressor.

A inflamação crônica, menos uniforme, possui maior duração, está associada à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos e tecido conjuntivo propriamente dito.

Dentre os fatores causais, encontram-se as infecções microbianas, agentes físicos (calor, traumas mecânicos, irradiação) e agentes químicos (toxinas, substâncias cáusticas).

O agente microbiano é, sem dúvida, o agressor mais importante para os seres humanos, mobilizando grandes esforços da ciência médica e odontológica para combatê-lo, assim como suas conseqüências.

Segundo **HAMMOND¹⁷(1992)**, as bactérias após estabelecerem-se no hospedeiro, provocam seus efeitos nocivos por meio de dois mecanismos: produção de toxinas e invasão dos tecidos.

HAMMOND¹⁷ afirma que as toxinas, quando de natureza protéica, produzidas pelas bactérias e liberadas para o meio extracelular durante sua fase de crescimento, são conhecidas por **exotoxinas** (exemplo: toxina tetânica, toxina botulínica, hemolisinas), sendo encontradas nas bactérias Gram-positivas e em algumas Gram-negativas. Quando de natureza polissacarídica, fazendo parte da membrana celular externa da bactéria e sendo liberadas para o meio extracelular somente após a morte microbiana (por lesão ou destruição da parede celular), são chamadas de **endotoxinas** (exemplo: lipopolissacarídeo - LPS), presentes nas bactérias Gram-negativas.

TOPAZIAN & GOLDBERG⁵³(1994) confirmam as palavras de **HAMMOND¹⁷(1992)** e acrescentam que a molécula de lipopolissacarídeo

(LPS) provoca reação inflamatória no organismo agredido, estimulando células de defesa e moléculas conhecidas como anticorpos.

A invasão bacteriana citada por **HAMMOND¹⁷(1992)** ocorre em consequência de outras substâncias produzidas pelas bactérias, de natureza protéica, porém com ação enzimática e que agem extracelularmente, provocando a destruição dos constituintes dos tecidos (exemplo: collagenase, hialuronidase).

Os microrganismos estão presentes, de maneira significativa, na doença dental, desde o estabelecimento de uma lesão cáriosa, passando pela alteração da polpa dental, até atingirem os tecidos periapicais.

Diversas espécies de bactérias estão envolvidas nesses processos patológicos, sendo que no local ou na fase evolutiva do processo predominam tipos de microrganismos mais específicos.

Nos canais radiculares infectados, a flora microbiana é rica, em que microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos estão presentes de maneira constante, como afirmam os autores **HENRICI & HARTZELL¹⁹(1919)**, **WINKLER & van AMEROGEN⁶³(1959)**, **LANGELAND & BLOCK²⁸(1977)**, **NAIR³⁵(1987)**, **GOLDSTEIN¹⁵(1989)**, **SUNDQVIST et al.⁵⁰(1989)**, **SELTZER & FARBER⁴⁴(1994)**, **STOCK et al.⁴⁹(1996)**. Como consequência, componentes dos microrganismos Gram-negativos (dentre eles as endotoxinas - LPS) e dos microrganismos Gram-positivos (dentre eles o ácido lipoteicóico) devem estar presentes no local.

Muitos estudos têm contribuído para elucidação dos diversos envolvimento dos lipopolissacarídeos bacterianos nas alterações periapicais, como podemos observar nos trabalhos de **DAHLÉN & HOFSTAD¹⁰(1977)**, **PITTS et al.³⁹(1982)**, **SCHONFELD et al.⁴³(1982)**. Porém, existem poucas investigações sobre os componentes das paredes celulares dos microrganismos Gram-positivos, em particular o ácido lipoteicóico, e sua correlação com tais alterações.

A possibilidade da ação desse componente no início e no desenvolvimento das alterações pulpo-periapicais parece existir. Sendo assim, propõe-se o estudo da reação tissular do subcutâneo de rato ao ácido lipoteicóico proveniente de bactérias Gram-positivas (*Streptococcus faecalis*).

REVISÃO DA LITERATURA

A inflamação, segundo **COTRAN et al.⁹(1991)**, é um fenômeno importante na proteção do hospedeiro e define-se como uma resposta do tecido vivo vascularizado a uma agressão local. Caracteriza-se pela reação dos vasos sangüíneos, levando ao acúmulo de líquidos e de células sangüíneas. **TROWBRIDGE & EMLING⁵⁷(1996)** consideram-na como uma resposta fisiológica do organismo.

Historicamente conhecidos, descritos pela primeira vez por Cornelius Celsus no século I D.C., os quatro sinais cardinais da inflamação, rubor, calor, tumor e dor, são conseqüências das alterações no fluxo sangüíneo, no calibre e na permeabilidade vascular e exsudação leucocitária. As alterações no fluxo sangüíneo e no calibre vascular ocorrem no início do processo inflamatório e desenvolvem-se na dependência da gravidade da agressão. Leucócitos participam do processo inflamatório, apreendendo e degradando microrganismos, complexos imunes e detritos de células necróticas, conforme afirmam **COTRAN et al.⁹(1991)** e **TROWBRIDGE & EMLING⁵⁷(1996)**.

São integrantes do processo inflamatório, segundo **BROIDE⁴(1992)**, células como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos, macrófagos, mastócitos, plaquetas, endotélio; e proteínas circulantes, como componentes do complemento, da coagulação, da fibrinólise e das vias da cinase.

A dinâmica do processo possui fases comuns e fases específicas para cada tipo de reação inflamatória, podendo apresentar quadros histológicos e clínicos agudos ou crônicos.

A inflamação aguda, conforme **MONTENEGRO & FECCHIO³³ (1995)**, é uma resposta inespecífica com objetivo de limitar os efeitos da agressão. Morfologicamente e fisiologicamente, caracteriza-se por fenômenos exsudativos com alterações da permeabilidade vascular e conseqüente acúmulo de líquido no local (edema), formação de fibrina, mobilização de leucócitos (neutrófilos) e hemácias.

MONTENEGRO & FECCHIO³³ (1995) citam as células presentes no exsudato inflamatório, originadas dos vasos sangüíneos. Os **neutrófilos** são as primeiras células a migrarem para o local da agressão. A presença de fibrina favorece a movimentação celular. A fagocitose tem início com o reconhecimento das estruturas a serem fagocitadas. Essas estruturas devem estar recobertas por fatores do soro (opsoninas). Dentre as opsoninas, a imunoglobulina G (IgG) e o fragmento C3b do complemento são as mais importantes. Tanto substâncias exógenas quanto endógenas podem atrair os neutrófilos (quimiotaxia), sendo importantes os produtos bacterianos, componentes do complemento (C5a) e produtos da via lipoxigenase do ácido aracdônico (Leucotrieno B4). Além de ativarem a movimentação celular, os agentes quimiotáticos provocam degranulação celular com produção de radicais tóxicos derivados do oxigênio (peróxidos, hipoclorito), ativação de fosfolipases (A2) e liberação de enzimas (lisozima, elastases). Esses produtos participam da morte e/ou destruição da partícula

fagocitada, podendo ser liberados para os tecidos. São predominantes na resposta inflamatória aguda, principalmente nas primeiras 6 a 24 horas após a agressão.

Os **eosinófilos** são células que possuem receptores para imunoglobulina E (IgE) e frações do complemento. Estão relacionados com a destruição do complexo antígeno-anticorpo, sendo encontrados principalmente nas reações de hipersensibilidade relacionadas a anticorpos IgE. Contêm substâncias bloqueadoras da ação da histamina e leucotrienos, desempenhando papel nas fases tardias de algumas reações inflamatórias, colaborando para a recuperação da área lesada.

Polimorfonucleares circulantes, os **basófilos** assemelham-se aos mastócitos teciduais. Pouco se sabe sobre seu papel no processo inflamatório.

Em grandes quantidades nos tecidos, principalmente nos locais de maior interação com o meio exterior (mucosas, pulmões) estão os **mastócitos**. Possuem grânulos citoplasmáticos carregados, onde a histamina é a substância mais importante.

As **plaquetas** desempenham papel importante na coagulação e na inflamação. Possuem grânulos com histamina e serotonina.

Os **macrófagos** originam-se dos monócitos do sangue, sendo transformados nos tecidos. Desempenham papel de fagocitose (semelhante aos neutrófilos) e secretam substâncias importantes na defesa ou na destruição dos tecidos (lisozima, fator de agregação plaquetária, collagenase, elastase, fatores do complemento - C2-C3-C4-C5, interferon).

BROIDE⁴(1992) acrescenta que os macrófagos possuem funções antitumoral, imunorreguladora, na cicatrização e remoção seletiva das células autólogas (células envelhecidas, células defeituosas) e junto com neutrófilos participam da ingestão e morte de microrganismos invasores. Possuem receptores para imunoglobulinas (IgG, IgE), porções do complemento (C3b, C5a), fatores de crescimento hematopoiético, lipoproteínas, peptídeos e polissacarídeos.

COTRAN et al.⁹(1991) dizem que estas células (macrófagos) tornam-se ativadas por vários estímulos, fatores ou substâncias, inclusive endotoxinas; apresentando-se maiores, com citoplasma mais irregular, maior número de mitocôndrias e lisossomas, maior quantidade de enzimas hidrolíticas, maior atividade de membrana (endocitose) e metabolismo aumentado.

Os **linfócitos** desempenham papel importante nas inflamações primariamente relacionadas à resposta imunitária, com seus produtos (linfocinas e imunoglobulinas) e nas reações inflamatórias originariamente não-imunes.

ROITT et al.⁴⁰(1992), MONTENEGRO & FECCHIO³³(1995) e TROWBRIDGE & EMLING⁵⁷(1996) descrevem três linhagens de linfócitos: células B, células T e células conhecidas como "matadoras naturais" (NK).

Das células T são conhecidas três tipos: células T reguladoras (helper), que podem ser auxiliares ou supressoras; células T citotóxicas, que são capazes de matar células carregadas de antígenos por contato direto e

células T efetoras, que produzem proteínas reguladoras ou efetoras conhecidas por citocinas.

Os plasmócitos, células originadas dos linfócitos B, produzem anticorpos contra antígenos persistentes no local ou contra componentes tissulares alterados.

As células B e T são programadas para responder a antígenos específicos.

Células NK, descritas como grandes linfócitos e granulados, não necessitam de serem sensibilizadas previamente para atuarem e podem mediar citotoxicidade celular dependente de anticorpos.

COTRAN et al.⁹(1991) e TROWBRIDGE & EMLING⁵⁷(1996)

afirmam que a inflamação aguda pode ser resolvida completamente quando a agressão for leve e o trauma limitado, pode evoluir para fibrose quando há grande destruição de tecido, pode desenvolver um abscesso quando há infecção ou pode progredir para uma fase crônica se houver persistência do estímulo.

Os autores acima citados, continuam afirmando que a inflamação crônica pode surgir de uma inflamação aguda, pela persistência do estímulo ou por si mesma, a partir de estímulos de baixa intensidade, podendo não passar pela clássica inflamação aguda. Caracteriza-se pela infiltração de células mononucleares (macrófagos, linfócitos e plasmócitos), proliferação de fibroblastos e vasos sanguíneos, aumento do tecido conjuntivo (fibrose) e destruição tissular. Os macrófagos são predominantes nas lesões após três semanas, dependendo do tipo de agente agressor.

TROWBRIDGE⁵⁶(1990) afirma que a causa básica das inflamações crônicas é a persistência de fatores etiológicos que são difíceis de serem eliminados do corpo. Dentre estes agentes, são citados os microrganismos parasitas extracelulares, agentes de baixa toxicidade (*Treponema pallidum*, *Mycobacterium tuberculosis*); alguns parasitas intracelulares resistentes aos mecanismos enzimáticos de defesa e fagocitose; componentes de bactérias (toxinas); remanescentes de microrganismos mortos, tais como paredes celulares de estreptococos; corpos estranhos (talco, fios de algodão) e reações imunes (artrite reumatóide).

Juntamente com as células, participam também do fenômeno inflamatório várias substâncias/moléculas conhecidas como mediadores químicos, que podem ser originados do plasma, das células ou do próprio tecido agredido.

CATANZARO GUIMARÃES⁸(1982), MONTENEGRO & FECCHIO³³(1995) e TROWBRIDGE & EMLING⁵⁷(1996) apresentam esses mediadores da seguinte maneira:

a) aminas vasoativas - causam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, agindo sobre as vênulas. Estão presentes nos mastócitos, basófilos e plaquetas, sendo liberadas a partir de um estímulo agressor. São importantes no início da resposta inflamatória e nas reações de hipersensibilidade mediadas pela IgE. Histamina e serotonina são os representantes deste grupo.

b) proteases plasmáticas - são três sistemas diferentes e inter-relacionados.

b.1) sistema complemento - composto por 20 proteínas, encontradas em maior concentração no plasma. Causam aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia, opsonização, lise de organismos-alvo. Podem ser ativados por duas vias, sendo a via clássica desencadeada a partir da ativação do elemento C1q e a via alternativa desencadeada a partir da ativação do elemento C3, principalmente por estímulos como endotoxinas bacterianas, polissacarídeos complexos e globulinas agregadas (IgA).

b.2) sistema de cinina - diretamente acionado pelo Fator Hageman (Fator XII), resultando na produção e liberação de bradicinina. Causa aumento na permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa, dilatação dos vasos sanguíneos e dor. Não é quimiotática.

b.3) sistema de coagulação - é composto por uma série de proteínas plasmáticas que podem ser ativadas pelo Fator de Hageman (Fator XII). Induz ao aumento na permeabilidade vascular e da atividade quimiotática leucocitária. O produto final desta reação é a formação de fibrina.

O Fator de Hageman (XII) é ativado pelo contato com agentes ativos de superfície, como colágeno, membrana basal e endotoxina.

Fazendo parte do sistema de coagulação, tem-se o sistema fibrinolítico que atua junto com o sistema de cininas e causa a lise dos coágulos de fibrina (ação da plasmina).

c) metabólitos do ácido aracdônico - o ácido aracdônico é originado a partir da conversão do ácido linoléico. Encontra-se esterificado nos fosfolipídeos das membranas celulares. Esses fosfolipídeos devem ser

liberados das membranas para que possam ser utilizados. Isto é feito pelas fosfolipases celulares ativadas por estímulos físicos, químicos, mecânicos ou outros mediadores.

A biossíntese do ácido aracdônico pode ocorrer por duas vias distintas: via cicloxigenase e via lipoxigenase.

A **via cicloxigenase** transforma o ácido aracdônico em endoperóxidos de prostaglandina. Um dos tipos de prostaglandinas (PGH₂) é transformada enzimaticamente em tromboxanas (TXA₂), prostaciclínas (PGI₂) e outras prostaglandinas (PGE₂, PGF₂ α , PGD₂).

As tromboxanas agem como agregantes plaquetários e na vasoconstrição. Têm vida média de segundos e são encontradas nas plaquetas.

As prostaciclínas inibem a agregação plaquetária, produzem vasodilatação e são encontradas nas paredes dos vasos.

As prostaglandinas estão envolvidas nos processos de hemostasia, trombose, agindo sobre o tônus e a permeabilidade vascular.

A **via lipoxigenase** transforma o ácido aracdônico em derivados hidroperóxidos (HPETE) nas plaquetas (12-HPETE) e nos leucócitos (5-HPETE e 15-HPETE).

O 5-HPETE dá origem aos leucotrienos que causam vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular (LTC₄, LTD₄, LTE₄) e quimiotaxia (LTB₄).

d) constituintes lisossômicos - grânulos lisossômicos presentes nos neutrófilos, monócitos e macrófagos são liberados e participam da resposta inflamatória.

Os neutrófilos possuem grânulos menores específicos, contendo lactoferrina, lisozima, fosfatase alcalina, collagenase; e grânulos maiores, azurófilos, contendo mieloperoxidase, lisozima, fatores bactericidas, proteínas catiônicas, hidrolases ácidas, elastase.

Os monócitos/macrófagos possuem grânulos contendo hidrolases ácidas, collagenase, elastase, ativador do plasminogênio entre outras enzimas.

e) radicais livres derivados do oxigênio - são radicais produzidos pelos neutrófilos e macrófagos, podendo ser liberados no meio extracelular. Lesam células e contribuem na ação antimicrobiana.

f) fator de ativação plaquetária (FAP) - produzido pelos basófilos, neutrófilos, monócitos e células endoteliais, causa agregação das plaquetas, vasoconstrição e broncoconstrição. Em concentrações extremamente baixas pode causar vasodilatação e aumento da permeabilidade venular. É de 100 a 10.000 vezes mais potente que a histamina.

g) citocinas - são produtos polipeptídicos de linfócitos e monócitos ativados. Outras células também podem produzir substâncias semelhantes. Dentre as citocinas conhecidas, duas substâncias são extremamente importantes:

1) **Interleucina-1 (IL-1)**, produzida por macrófagos ativados, linfócitos e células endoteliais. A IL-1 pode ser induzida a partir de estímulos como endotoxinas, complexos imunológicos, toxinas, agressão física e processos inflamatórios. **TROWBRIDGE & EMLING⁵⁷(1996)** descrevem diversas ações, tais como indução de febre e sono, ativação osteoclástica,

ativação de fibroblastos com produção de colágeno e controle do crescimento de células endoteliais.

2) **fator de necrose tumoral (FNT)**, descrito como produto de macrófagos estimulados, causa lise de certas linhagens de células tumorais e necrose hemorrágica tumoral.

h) fatores de crescimento e outros mediadores - representados por fragmentos da degradação do colágeno ou fibronectina, juntamente com outros fatores, participam da inflamação crônica e cicatrização das feridas.

"...com todos esses mediadores parece haver um sistema inteligente de controle e equilíbrio. Do contrário, a inflamação tomaria conta do mundo ou levaria ao tumulto!"

COTRAN et al.⁹(1991)

NAIDORF³⁴(1977) relaciona a resposta inflamatória aos eventos imunológicos, mostrando que a presença de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos no local da agressão dependem de fatores quimiotáticos originados dos microrganismos, juntamente com componentes do complemento e imunoglobulinas (opsoninas). Os macrófagos, dentre suas funções, são responsáveis pela apresentação dos antígenos aos linfócitos (células T). Outra classe de linfócitos (células B) diferenciam-se em plasmócitos e produzem anticorpos (Imunoglobulinas) que atuam na neutralização de exotoxinas, reagindo com a superfície de antígenos e

destruindo os microrganismos junto com fragmentos do complemento. Mastócitos têm sua participação mediada pela Imunoglobulina E (IgE), liberando conteúdos de seus grânulos (histamina). A combinação entre antígeno e anticorpo provoca a fixação do complemento, resultando em agregação plaquetária e formação de microtrombos, ativação do sistema de cininas, recrutamento de leucócitos polimorfonucleares e liberação de enzimas proteolíticas no local. Relaciona também as endotoxinas como fatores etiológicos desencadeantes da reação do sistema complemento.

TERR⁵²(1992) relata que células de defesa já sensibilizadas (linfócitos T), ao encontrarem um antígeno, originam uma série de eventos cuja finalidade é limitar e suprimir a agressão e, que a inflamação induzida imunologicamente inicia-se com o reconhecimento específico do antígeno, mas os eventos subsequentes não possuem especificidade imunológica.

TERR⁵²(1992) continua escrevendo que a reação de linfócitos T específicos ou anticorpos contra o agente agressor (antígeno) promove o recrutamento de células inflamatórias e mediadores químicos para o local da injúria.

A inflamação, induzida imunologicamente, pode partir da liberação de substâncias químicas ativas de mastócitos, mediadas por anticorpos IgE (hipersensibilidade tipo I); da formação de fatores derivados do sistema complemento (hipersensibilidade tipo II); ser mediada pela formação do complexo antígeno-anticorpo (hipersensibilidade tipo III) ou da formação de citocinas mediadas pela célula T (hipersensibilidade tipo IV), conforme descritas por **TERR⁵²(1992)** e **TROWBRIDGE & EMLING⁵⁷(1996)**:

A **inflamação mediada pela IgE** é consequência da reação do antígeno com anticorpos IgE que ocupam sítios receptores nos mastócitos. A resposta possui um efeito inicial imediato nos vasos sanguíneos, músculo liso e glândulas secretoras, atingindo o máximo em trinta minutos, seguida por resposta inflamatória celular tardia, atingindo o máximo em seis horas.

Após a ativação celular, uma série de eventos bioquímicos intracelulares acontecem, atingindo o máximo em quinze segundos, quando ocorre a liberação dos mediadores.

Uma resposta imediata, consequência dos efeitos da histamina e leucotrienos dos mastócitos, caracteriza-se microscopicamente por vasodilatação e edema com infiltrado celular discreto, inicialmente de granulócitos seguido por eosinófilos.

A resposta tardia envolve vários mediadores onde o fator de ativação das plaquetas (FAP) é provavelmente o mais importante, juntamente com os leucotrienos e prostaglandinas. Caracteriza-se microscopicamente pela predominância de neutrófilos, edema, mastócitos degranulados e distribuição perivascular de eosinófilos. Não há sinais de deposição de imunoglobulinas ou complemento.

O **sistema complemento** pode ser ativado por anticorpos IgM e IgG (exceto IgG4) pela via clássica e por IgA, ativando a via alternativa.

A inflamação mediada por **complexos imunes** refere-se às respostas celulares inflamatórias que ocorrem após uma reação antígeno-anticorpo, com subsequente ativação do complemento.

Muitas manifestações clínicas dessa classe de reação inflamatória estão representadas pela reação de Arthus, doença do soro e doenças auto-imunes.

A inflamação produzida pela **imunidade mediada por células**, conhecida por hipersensibilidade tardia, refere-se à inflamação gerada pela reação do antígeno com seu correspondente linfócito T específico, após o processamento e apresentação desse antígeno pela célula apresentadora de antígenos. O aspecto microscópico da imunidade mediada por células é característico, apresentando infiltrado celular mononuclear, monócitos e linfócitos, com distribuição perivascular e também granulócitos. Ocorre ainda deposição de fibrina, edema e destruição tissular. Nas lesões avançadas, pode-se observar necrose por liquefação (necrose caseosa).

GOODMAN¹⁶(1992) descreve as características que conferem imunogenicidade às moléculas: a) devem ser estranhas ao organismo; b) devem ter tamanho molecular (imunógenos mais potentes possuem peso molecular superior a 100.000); c) devem possuir complexidade química. Acrescenta ainda que a resposta imune depende da dose da substância, da via de administração e do tipo de veículo utilizado.

Segundo **GOODMAN¹⁶(1992)**, imunogenicidade é a propriedade de uma substância em induzir resposta imune detectável, tanto celular quanto humoral ou ambas, quando introduzida em um animal.

COTRAN et al.⁹(1991) afirmam que o tecido conjuntivo, local onde acontece todo o fenômeno inflamatório, além das células inflamatórias presentes, é composto por fibroblastos, membrana basal e diversos tipos de

colágeno, elastina e proteoglicanas que compõem a substância fundamental, representadas pelo sulfato de heparan, sulfato de condroitina e ácido hialurônico. Os mecanismos de recrutamento e proliferação dos fibroblastos, proliferação vascular e acúmulo de fibras colágenas com fibrose, são semelhantes aqueles que contribuem para a cura da ferida.

TROWBRIDGE⁵⁶(1990) afirma que todos os elementos do reparo estão presentes em uma lesão crônica, mas permanecem sem atividade até que os agentes causadores tenham sido completamente eliminados. Escreve, ainda, que as alterações no tecido associadas com inflamação crônica podem ser reversíveis ou irreversíveis. Se o tecido destruído possuir capacidade de regeneração, este poderá ser restaurado ao seu estado original; porém, isso somente ocorrerá se a estrutura reticular de substituição do tecido for preservada ou pouco comprometida.

A cavidade bucal, área de trabalho do cirurgião-dentista, é riquíssima em quantidade e qualidade de microrganismos que ali se apresentam de uma maneira equilibrada e compõem a flora normal da boca e estruturas anexas. Porém, esses microrganismos são causadores de alterações patológicas quando presentes em um meio favorável à proliferação.

BLECHMAN³(1977) acredita que a cárie dental é responsável pela maioria das alterações pulpares, permitindo que microrganismos, suas toxinas e os produtos de decomposição tissular atuem sobre o complexo dentina-polpa.

INGLE & LANGELAND²³(1989) relacionam as causas da inflamação pulpar, necrose ou distrofias, colocando os microrganismos como os irritantes mais freqüentes.

LANGELAND & BLOCK²⁸(1977) relacionam como causas da inflamação periapical a injúria inespecífica por via direta ao tecido do hospedeiro e/ou produtos de destruição bacteriana, resposta imunológica específica aos antígenos bacterianos ou possíveis antígenos alterados do hospedeiro.

A preocupação com os microrganismos e suas conseqüências sobre o complexo dentina-polpa e região periapical é bastante antiga. Diversos trabalhos têm sido publicados sobre o assunto.

HENRICI & HARTZELL¹⁹(1919) desenvolveram pesquisa com objetivo de determinar se a polpa dental vital possuía ou não bactérias. Avaliaram 115 dentes extraídos, com polpas vivas, sendo divididos em normais (sem cárie e alterações periodontais), com cárie e com alterações periodontais leves (gingivite) ou graves. Observaram que em metade dos dentes invadidos por cáries ou "piorréia", a polpa estava sempre infectada por estreptococos. A invasão da polpa por microrganismos da cárie dava-se por meio dos túbulos dentinários e a partir da alteração do periodonto, "piorréia", por meio da extensão da polpa aos tecidos gengivais.

Sugeriram, também, que os canais linfáticos da polpa poderiam também servir como vias de disseminação de microrganismos para a região periapical.

Afirmaram, ainda, que a presença desses microrganismos na polpa deveria ser acompanhada de alterações inflamatórias crônicas nos tecidos periapicais.

HILL²⁰(1932), trabalhando com cães, observou o desenvolvimento de granulomas apicais em dentes pulpectomizados, comparando os resultados entre dentes com canais vazios e dentes com canais infectados com culturas puras de estreptococos. Os resultados mostraram que os dentes com canais infectados desenvolveram reação tissular inflamatória e degenerativa no resíduo pulpar apical em poucos dias, sendo que a região periapical foi comprometida pouco tempo depois. Nos dentes não infectados, os tecidos pulpares remanescentes dentro de finos canais apicais permaneceram vitais por longo tempo. O autor observou bactérias nos granulomas apicais, tanto dos dentes com ou sem infecção nos canais, sendo, porém, somente notadas quando áreas de necrose eram vistas na lesão.

FISH¹³(1939), preocupado em esclarecer a relação entre microrganismos e suas conseqüências, tanto na região periodontal quanto na região periapical, colocou em evidência vários aspectos dessa relação. Primeiramente, o autor reconhece que o processo de reabsorção óssea é devido à infecção, mas questiona se os microrganismos contaminantes estão ativos no local dessa reabsorção. Segue afirmando que os germes estão confinados nos debris da bolsa periodontal ou no conteúdo necrótico do canal radicular e que, somente seus produtos tóxicos solúveis invadem os tecidos vivos. Justifica sua afirmação citando observações histológicas de

amostras periapicais "estéreis", que mostram a presença de infiltrado inflamatório crônico com predominância de "células redondas", muitas das quais são linfócitos. Se bactérias vivas estivessem presentes no tecido, este mostrar-se-ia com presença de leucócitos polimorfonucleares, encontrados em grande número nas áreas de infecção, englobando ativamente os microrganismos agressores. Esse quadro não é encontrado nas respostas inflamatórias crônicas.

Faz, ainda, restrições à metodologia para obtenção das amostras periapicais, comprovando que bactérias podem ser vistas nos tecidos periapicais, porém como consequência do procedimento cirúrgico e não como infectantes primárias.

O experimento de **FISH**¹³ consistiu na incisão submandibular em cobaias (região de sínfise) e confecção de uma cavidade óssea onde foram introduzidos fios de algodão embebidos com culturas de microrganismos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus haemolyticus* e *Streptococcus viridans*). Os resultados mostraram-se histologicamente similares, independente do microrganismo inoculado. Quatro zonas bem definidas foram observadas conforme a intensidade da agressão. No centro da lesão (**zona de infecção**), microrganismos estavam presentes e rodeados por leucócitos polimorfonucleares. Não foram observadas células redondas nem clastos. Ao redor do centro (**zona de contaminação**), produtos tóxicos, toxinas bacterianas e/ou produtos da degeneração tecidual, encontram-se difundidos. Observa-se destruição das células normais do local e infiltração por células redondas. Mais distante (**zona de irritação**), as células típicas

são histiócitos e osteoclastos. Nessa área, o material tóxico torna-se mais diluído pela difusão no tecido, porém ainda atua como irritante. Células redondas são observadas ativas, em processo de fagocitose (clastos), entre as células normais do local. Na vizinhança (**zona de estimulação**), onde os produtos tóxicos encontram-se ainda mais diluídos, células típicas do tecido e fibroblastos jovens estão presentes. É uma zona de intensa atividade celular com objetivo de reconstruir o local.

A reação da polpa dental à infecção é precisamente semelhante à descrita anteriormente. Numa invasão lenta e gradual, os microrganismos avançam pelo conteúdo necrótico do canal, levando algum tempo para atingirem os tecidos periapicais. Essa progressão lenta permite que os produtos tóxicos cheguem antecipadamente, por difusão nos tecidos, ao periápice. Assim, células redondas absorvem esses produtos tóxicos e um grupo de leucócitos polimorfonucleares acumulam-se na abertura apical do canal radicular com a finalidade de fagocitar os microrganismos quando chegarem no local. Por esse desenvolvimento, surgem os granulomas apicais livres de sintomas dolorosos.

WINKLER & van AMERONGEN⁶³(1959) realizaram extensa pesquisa com 4.000 culturas microbiológicas feitas em mais de 1.000 canais radiculares. Relacionaram a dificuldade na interpretação dos resultados pelo fato de serem utilizados meios de culturas que permitiriam o crescimento de alguns microrganismos e inibiriam o crescimento de outros. Afirmaram ainda que os resultados são mais fidedignos à medida que aumenta a experiência do pesquisador em trabalhar com a técnica asséptica.

Nessa pesquisa, os autores preocuparam-se em fazer incubação em ambientes aeróbicos e anaeróbicos. Os resultados mostraram a riqueza da flora microbiana dos canais radiculares, com predomínio dos estreptococos (63% do microrganismos isolados). Dentre os achados, os *Streptococcus faecalis* foram um dos microrganismos mais freqüentes em culturas de canais após algumas sessões de tratamento, o que evidencia bem sua resistência ao processo de limpeza e desinfecção utilizado. Os bastonetes Gram-negativos foram considerados invasores secundários na opinião dos autores. Reconhecem, ainda, a relação entre a flora microbiana contaminante dos canais e a infecção focal.

KAKEHASHI et al.²⁵(1965), preocupados em esclarecer sobre a manutenção da vitalidade pulpar por procedimentos conservadores a partir de polpas expostas clinicamente, desenvolveram pesquisa utilizando 36 ratos que foram divididos em dois grupos. Num dos grupos, os animais eram "germ-free", isto é, tinham a cavidade bucal e todo o corpo isento totalmente de microrganismos e, noutro grupo, os animais eram normais. Foram feitas exposições pulpares nos primeiros molares superiores direitos e os acessos permaneceram abertos durante todo o período experimental. Os animais foram sacrificados em intervalos de 1 a 42 dias, os quadrantes maxilares direitos foram retirados e preparados para análise histológica. Os resultados mostraram que no grupo experimental ("germ-free") as polpas apresentaram-se vitais durante todo o período, inclusive com formação de barreira mineralizada no local da exposição. Os animais convencionais mostraram polpas com degeneração progressiva, inflamação, necrose completa e

formação de abscesso nas áreas apicais. Poucas espécimes mostraram microrganismos invadindo o tecido periapical.

Com esse trabalho, os autores confirmam a relação direta entre microrganismos dos canais radiculares e o desenvolvimento das alterações patológicas pulpare e periapicais.

LANGELAND & BLOCK²⁸(1977) pesquisaram a existência de bactérias em 35 lesões periapicais obtidas por cirurgia pararendodôntica. Os resultados obtidos das análises histológicas mostraram a presença de bactérias no tecido periapical em apenas 1 caso. Os autores ressaltam que a ausência de bactérias não exclui a possibilidade da presença de componentes destas, tais como paredes celulares, no tecido.

OGUNTEBI et al.³⁶(1982) estudaram 10 pacientes com diagnóstico de abscesso periapical, sem comprometimento periodontal. Colheram amostras do abscesso intra-ósseo por meio de punção da mucosa alveolar com agulha estéril. As amostras foram incubadas em ambiente anaeróbico e aeróbico. As análises foram feitas por microscopia após coloração de Gram e por microscopia de campo escuro. Um total de 25 tipos de bactérias foram isoladas, sendo 10 cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos; 3 cocos Gram-positivos anaeróbios; 9 bastonetes Gram-negativos anaeróbios e 3 bastonetes pleomórficos Gram-positivos anaeróbios facultativos. Espiroquetas, formas móveis e formas com morfologia não identificada foram observadas em microscopia de campo escuro e não identificadas nas culturas. Somente um abscesso continha flora anaeróbia estrita. Sete lesões mostraram anaeróbios facultativos e estritos.

NAIR ³⁵(1987), objetivando dar mais subsídios para a questão da existência de bactérias nas lesões periapicais, estudou 31 lesões originadas de dentes com polpas necróticas e radiolucência periapical ao exame radiográfico. A análise das amostras foi feita por microscopia óptica e eletrônica de transmissão. Os resultados mostraram presença de flora bacteriana mista no interior de todos os canais radiculares. A flora foi constituída por cocos, bastonetes e formas filamentosas. Material extracelular amorfo foi observado, podendo ser constituído de partes insolúveis de bactérias. Em microscopia eletrônica, observou-se que as bactérias formavam placas organizadas na superfície dentinária do interior dos canais. A flora bacteriana sempre foi separada da lesão periapical por barreira de polimorfonucleares ao nível do forame apical. Nos casos de invasão bacteriana dentro da lesão, o quadro histológico foi compatível com abscesso (3 casos). Foi descartada a possibilidade de contaminação da lesão durante o processo cirúrgico pela evidência de anticorpos presentes na lesão, específicos para bactérias contaminantes do canal radicular.

SUNDQVIST et al. ⁵⁰(1989) examinaram a ocorrência de bacteróides pigmentados nas infecções radiculares e possíveis relações com o desenvolvimento de abscessos periapicais. A partir de 72 dentes com necrose pulpar e lesão periapical, colheu-se material para cultura e identificação das bactérias existentes. "Bacteróides pigmentados" foram identificados em 22 dos 72 dentes estudados, porém todos os dentes apresentaram bactérias diversas nos canais radiculares. Dos 22 dentes com "Bacteróides pigmentados", 16 dentes desenvolveram abscessos. Os autores

concluíram que os "*Bacteróides*" de pigmentação negra estão relacionados com o desenvolvimento dos abscessos periapicais. Confirmaram também que a infecção dos canais radiculares é polimicrobiana.

FUKUSHIMA et al.¹⁴(1990) estudaram os tipos de microrganismos presentes nas lesões periapicais clinicamente assintomáticas. Dentes com ausência de dor espontânea e a percussão e, sem exsudato foram analisados. Foram feitas culturas para isolamento e identificação de bacilos Gram-positivos anaeróbios e facultativos, cocos Gram-positivos facultativos e bacilos e cocos Gram-negativos. Ápice radicular e lesão periapical foram observados em microscopia eletrônica de varredura. Dos 21 dentes estudados, bacilos Gram-positivos; cocos Gram-positivos anaeróbios; bacilos Gram-negativos e bactérias facultativas foram isolados. Os microrganismos foram localizados entre a ponta do material obturador e a parte superior do forame apical. Nenhuma bactéria foi encontrada além do forame apical em nenhum dos casos.

BROOK et al.⁵(1991) analisaram a flora microbiana nos abscessos periapicais. O material do interior dos abscessos foi colhido por meio de aspiração com agulha e seringa. Um total de 39 abscessos periapicais foram estudados, pesquisando-se a presença de microrganismos aeróbios e anaeróbios. Os resultados mostraram isolamento de bactérias anaeróbias em 50% dos casos; bactérias aeróbias e facultativas em 6% dos casos e bactérias aeróbias e anaeróbias associadas em 44% dos casos.

WALTON & ARDJMAND⁵⁹(1992) pesquisaram a presença de bactérias nas lesões periapicais inflamatórias granulomatosas, induzidas em

macacos. Os dentes molares inferiores foram abertos, contaminados com saliva e restaurados com amálgama. Após 7 meses, os animais foram sacrificados e os dentes removidos juntamente com o osso de suporte e mucosa de revestimento (em bloco), e analisados em microscopia óptica. Os resultados mostraram massas de bactérias na superfície dental (coroa) e nos canais radiculares, mas não nos tecidos periapicais. A maioria das bactérias foram cocos Gram-positivos. Os autores observaram também a presença de bactérias no interior de células, sugerindo possível fagocitose das mesmas por macrófagos.

Em um estudo sobre a ecologia da flora microbiana do canal radicular, **SUNDQVIST⁵¹(1992)** mostra que as associações microbianas existentes no sistema de canais radiculares são conseqüências da necessidade nutricional, da presença ou não de oxigênio e da produção de substâncias que inibem o crescimento de outras formas microbianas (bacteriocinas). Afirma que o número de espécies bacterianas diferentes nos canais radiculares pode variar de 1 até 12 e a quantidade de células encontradas está entre 10^2 e 10^8 . Sugere uma correlação entre o tamanho da lesão periapical e o número de espécies bacterianas e células presentes no sistema de canais. Relata que em canais infectados por saliva, bactérias anaeróbias facultativas estão presentes em maior quantidade que as anaeróbias estritas e que esta proporção sofre alteração com o decorrer do tempo, predominando as formas anaeróbias estritas.

SELTZER & FARBER⁴⁴(1994), fazendo uma avaliação sobre os fatores microbiológicos relacionados à Endodontia, reforçam os estudos

anteriores, confirmando a presença de flora microbiana mista como infectante dos canais radiculares. Além disso, acreditam que, mesmo após a morte microbiana, componentes biodegradáveis da parede celular de uma variedade de microrganismos podem persistir no interior de macrófagos por períodos prolongados para iniciar seqüelas inflamatórias crônicas. Citam o ácido lipoteicóico como substância capaz de influenciar reações inflamatórias.

KNOX & WICKEN²⁷(1973) informam que o ácido teicóico é conhecido, desde 1959, como componente da camada externa de todas as bactérias Gram-positivas. É considerado como estrutura principal para as ligações covalentes com o peptidoglicano, formando o ácido teicóico da parede celular ou com lipídeos associados à membrana celular, formando o ácido teicóico de membrana ou ácido lipoteicóico. A ocorrência do ácido teicóico de parede é variável entre os diferentes gêneros bacterianos, porém o ácido teicóico de membrana está sempre presente nas bactérias Gram-positivas.

Em um esquema de parede e membrana celular bacteriana de Gram-positivos apresentado por **van DRIEL et al.⁵⁸(1973)** e ainda mantido atualmente, como mostra **JAWETZ et al.²²(1988)** e **MIMS et al.³¹(1995)**, acredita-se que o ácido lipoteicóico tem origem na membrana plasmática, dirigindo-se perpendicularmente através da parede celular até atingir a superfície da célula. (Esquema 1 - ANEXO III)

WICKEN & BADDILEY⁶²(1963), analisaram os ácidos teicóicos de membrana de duas amostras de *Streptococcus faecalis* (NCIB 39 e NCIB

8191), verificando que essas moléculas são polímeros de glicerol-fosfato contendo glicose. Nas duas amostras analisadas, foram encontradas algumas diferenças moleculares. Na amostra NCIB 39, foi identificado um grupamento kojibiosil [α -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O-D-glicose] em ligação α -glicosídica com o glicerol. Na amostra NCIB 8191, foi isolado um grupamento kojitriosil [α -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- α -D-glicopiranosil-O-D-glucose] em ligação α -glicosídica ao glicerol. Ambas amostras continham resíduos éster de D-alanina associados às hidroxilas do açúcar (kojibiosil ou kojitriosil); porém, a amostra 8191 também continha pequenas quantidades de grupos éster de L-lisina. Para as análises foram utilizados métodos de cromatografia. Os autores analisaram a pureza do material testado, eliminando possíveis contaminações com resíduos de RNA ou parede celular comumente encontrados. Puderam estabelecer que o ácido teicóico intracelular da amostra 8191 continha entre 21 a 22 unidades monoméricas. A localização dos resíduos de aminoácidos na molécula é discutível (Esquema 2 - ANEXO III).

KNOX & WICKEN²⁷(1973) relatam que reações imunológicas sensíveis para o ácido lipoteicóico mostram resultados de aglutinação de eritrócitos sensibilizados quando em presença de anticorpos específicos, em uma concentração mínima de 2,5 μ g de purificado de ácido lipoteicóico/ml. Se esse ácido lipoteicóico seria considerado como produto extracelular ou liberado por autólise bacteriana, não está definido. A liberação do ácido lipoteicóico, por qualquer que seja o mecanismo, pode ser importante fator a influenciar as propriedades imunobiológicas do hospedeiro.

KNOX & WICKEN²⁷(1973) classificam o ácido lipoteicóico como molécula anfipática, que possui grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, tendo com isso potencial para desencadear reações biológicas, particularmente aquelas que requerem adsorção às membranas celulares. Lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, provenientes de bactérias Gram-negativas, também são moléculas anfipáticas semelhantes ao ácido lipoteicóico nas suas propriedades físico-químicas.

Nos últimos 20 anos da Endodontia, pesquisadores como **SCHEIN & SCHILDER⁴²(1975)**, **TORABINEJAD & BAKLAND⁵⁴(1978)** preocupam-se com as reações moleculares que possam existir, principalmente, entre os microrganismos da flora microbiana endodôntica e os tecidos do hospedeiro. Dentre esses estudos, os produtos de paredes, membranas celulares e endotoxinas bacterianas recebem atenção especial.

YANAGISAWA⁶⁴(1980) distinguiu diferenças histopatológicas dos granulomas e observou a participação de reações imunológicas nessas lesões. As lesões foram obtidas por remoção cirúrgica, sendo que 70 lesões foram preparadas para análise histológica e 26 lesões para análise imunohistoquímica. O autor classifica os granulomas em quatro tipos: tipo exsudativo, tipo granulomatoso, tipo fibroso e tipo granulofibroso. Observou a presença de IgG, IgA e IgM em todas as amostras. IgE, C3 e fibrinogênio foram identificados em 67%, 50% e 82% das lesões, respectivamente. Os resultados sugerem que diversos tipos de reações imunológicas podem participar do processo inflamatório nos granulomas periapicais. A presença

de imunoglobulina e complemento sugere que complexos antígeno-anticorpo podem estar presentes.

A injeção de LPS em animais causa reações características como febre, choque e morte, conforme afirmam os autores **SMITH & THIER**⁴⁵(1990) e **MIMS et al.**³²(1995), estimulando também reabsorção óssea *in vitro*, como descrito por **KNOX & WICKEN**²⁷(1973).

Muitos dos efeitos dos LPS podem ser imitados pelos produtos das bactérias Gram-positivas e dos fungos, segundo **SMITH & THIER**⁴⁵(1990).

HUNTER et al.²²(1979) testaram fragmentos de paredes celulares de estreptococos encontrados na cavidade bucal, inoculados por injeção na mucosa alveolar de 165 ratos. As lesões foram avaliadas após 24, 48 e 72 horas por método visual e histologicamente. Observaram que não houve diferença significativa entre as preparações utilizadas, sob o aspecto clínico. Histologicamente, foi evidente a presença de neutrófilos e macrófagos, com resposta óssea mais ativa, tanto formativa quanto reabsortiva.

WARFVINGE et al.⁶⁰(1985) compararam a resposta do tecido pulpar frente a colocação de material de parede celular sobre a dentina recém-cortada. Utilizaram paredes celulares provenientes de bactérias Gram-positivas (*Lactobacillus casei*) e de bactérias Gram-negativas ("*Bacteroides oralis*" e *Veillonella parvula*). Após preparo na dentina, as amostras de paredes celulares, em forma de pasta, foram colocadas nas cavidades e seladas. Após 8 e 72 horas, os resultados foram colhidos por

análise microscópica. Os autores demonstraram que complexos de alto peso molecular como paredes celulares, tanto de bactérias Gram-positivas quanto de bactérias Gram-negativas, provocaram migração de células inflamatórias na polpa dental, representadas predominantemente por leucócitos polimorfonucleares. Estudo de **BERGENHOLTZ¹(1977)**, com metodologia semelhante, revelou reações pulpares mais severas quando foram testados componentes menores de desintegração bacteriana de placa dental, tanto de organismos aeróbicos quanto anaeróbicos.

STABHOLZ & SELA⁴⁷(1983) verificaram a reação histológica pulpar e aspecto radiográfico da região periapical dos dentes de gatos contaminados com bactérias íntegras (*Streptococcus mutans*), sonicado precipitado e sonicado sobrenadante das mesmas espécies de microrganismos. O material testado foi colocado em contato com o tecido pulpar após acesso à câmara coronária. Os animais foram sacrificados após 6 meses de observação. Os autores identificaram presença de polpas necrosadas e inflamação crônica na região periapical com células mononucleares e formação de abscesso em algumas áreas. Radiograficamente foram observadas áreas radiolúcidas compatíveis com destruição óssea apical. Esses achados foram constantes para todas as amostras testadas.

MARKHAM et al.³⁰(1973) verificaram a presença de anticorpos anti-ácido lipoteicóico em 53 amostras de sangue humano de estudantes, por meio de reação de hemaglutinação. Os ácidos lipoteicóicos foram obtidos de bactérias (*L. fermenti*, *L. plantarum* e espécies de estreptococos) e

preparados para teste na concentração de 10 µg/10 µl. Reações positivas e semelhantes foram obtidas a partir de ácido lipoteicóico proveniente de todas as amostras bacterianas.

HAUSMANN et al.¹⁸(1975) verificaram o efeito do ácido lipoteicóico (LTA) na reabsorção óssea em cultura de tecido. A molécula de ácido lipoteicóico foi isolada de *Lactobacillus fermenti*. Os autores compararam os efeitos do ácido lipoteicóico (molécula íntegra e livre de ácido graxo) aos do lipopolissacarídeo isolado de *Salmonella minnesota*. Todos os testes foram feitos sobre rádio e ulna de embriões de ratos de 18 dias de gestação. Os resultados obtidos demonstraram que o LPS, na concentração de 0,3 a 30 µg/ml, estimulou a liberação de cálcio num modelo dose-resposta dependente, em período de incubação de 48 horas. Na concentração de 100 µg/ml, a resposta foi menor. O ácido lipoteicóico foi menos potente que o LPS, porém mostrou aumento do cálcio liberado do osso, num intervalo de doses de 10 a 100 µg/ml, num período de 48 horas de incubação. O ácido lipoteicóico desprovido de ácido graxo (deacilado) foi testado em concentrações de 10 a 100 µg/ml e não provocou estimulação na liberação de cálcio. Em incubações de 8 dias, tanto o LPS, quanto o LTA na concentração de 100 µg/ml, mostrou aumento crescente na liberação do cálcio, atingindo estabilidade após o sétimo dia. Após o quarto dia de incubação, o LTA estimulou mais a liberação do cálcio que o LPS.

De VUONO & PANOS¹¹(1978) pesquisaram os efeitos destrutivos do ácido lipoteicóico isolado de *Streptococcus pyogenes*. Compararam esses efeitos aos provocados pelos próprios microrganismos

(*Streptococcus pyogenes*) sobre culturas de células de rim, fígado e coração. Os pesquisadores observaram destruição máxima das células de rim (em cultura), quando colocadas em meio contendo 250 µg/ml de ácido lipoteicóico. Destruições em menor quantidade (50% das células) ocorreram quando a concentração de ácido lipoteicóico foi de 142 µg/ml, em período de incubação de 3 dias. A menor destruição celular identificada foi na concentração de 75 µg/ml de ácido lipoteicóico. O ácido lipoteicóico desprovido de ácido graxo e alanina falhou em alterar a morfologia e o índice de crescimento das células de rim, fígado e coração.

HUMMELL, et al.²¹(1985) pesquisaram se o ácido lipoteicóico isolado de *Streptococcus pneumoniae* é capaz de ativar a via alternativa do complemento quando ligado a eritrócitos de carneiro. Observaram que a adesão do LTA aos eritrócitos aumentou com o aumento da temperatura (foi testado nas temperaturas de 0°, 20° e 37° C) e com o aumento do período de incubação (intervalo de 0 a 6 horas). Eritrócitos expostos a concentrações de 1 mg/ml de LTA não mostraram consumo de C3, indicando que não houve ativação da via alternativa. Porém, na concentração de 10 µg/ml, até 80% das células foram lisadas após 1 hora de incubação a 37° C.

LOOS et al.²⁹(1986) estudaram a capacidade do ácido lipoteicóico (poliglicerolfosfato) isolado de diversos microrganismos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus lactis* e *Streptococcus garvieae*) em ativar a via clássica do complemento no soro, especialmente sua interação com C1 e C1q purificado. Moléculas de LTA livres de D-alanina; LTA, somente o radical N-acetil e LTA livre de D-alanina

e deacilado também foram testados. Os resultados mostraram que todas as formas de LTA testadas ativaram a via clássica do complemento, porém com intensidades diferentes para quantidades equivalentes de LTAs.

WEINREB et al.⁶¹(1986) examinaram o potencial do LTA de duas amostras de bactérias Gram-positivas (*Streptococcus pyogenes* e *Lactobacillus fermentum*) em predispor eritrócitos humanos aos efeitos da ativação de complemento autólogo, causando lise dessas células mediadas pelo complemento. Determinaram também se a ativação do complemento ocorre por via clássica ou alternativa e se é dependente de anticorpo. Utilizaram soro de pacientes com deficiência completa de C2 e de pacientes com agamaglobulinemia (deficiência IgG). Os autores verificaram que eritrócitos pré-incubados com LTA (20 µg/ml) de *Lactobacillus fermentum* e *Streptococcus pyogenes* sofreram aglutinação quando expostos a anticorpos anti-poliglicerolfosfato, o que não ocorreu nos eritrócitos não pré-incubados. Os resultados demonstraram a capacidade dos ácidos lipoteicóicos (LTAs), de diversas estruturas químicas e de diferentes bactérias, de tornarem as células do hospedeiro susceptíveis aos danos ou lises pelo complemento autólogo. Observaram que a via do complemento ativada pode diferir, dependendo da origem bacteriana da molécula de LTA.

KELLER et al.²⁶(1992) analisaram, *in vitro*, a resposta de macrófagos provenientes de medula óssea de ratos à presença de ácidos lipoteicóicos de vários microrganismos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus pyogenes*). Verificaram a produção e secreção de substâncias como fator de necrose

tumoral-alfa (FNT α) e teste de atividade tumoricida. Observaram que o ácido lipoteicóico provoca efeitos variados dependendo do tipo do microrganismo isolado. Porém, o ácido lipoteicóico proveniente do *Streptococcus faecalis* mostrou influenciar a atividade dos macrófagos em todos os parâmetros analisados. Concluíram que o ácido lipoteicóico de muitas espécies de Gram-positivos possuem grande potencial para ativação de macrófagos. Os autores descrevem nesse artigo algumas ações do ácido lipoteicóico, tais como: possuírem propriedades imunoestimulatórias e antineoplásicas; interagirem com as vias clássica e alternativa do complemento como mediadores ou inibidores da lise celular; ligarem-se aos leucócitos polimorfonucleares; estimularem a liberação de enzimas lisossômicas e induzirem atividade tumoricida em macrófagos.

Estudos feitos por **CARD et al.⁷(1994)** comparam as atividades de ácido lipoteicóico (LTA) de 4 bactérias Gram-positivas (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e de lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas (*Salmonella minnesota* e *Salmonella abortus*) sobre a ativação do ácido aracídico de macrófagos de peritônio de rato. Pelos resultados obtidos, as semelhanças no padrão de ativação celular pelo LPS e LTA sugerem que o ácido lipoteicóico pode contribuir para a patogenicidade das bactérias Gram-positivas.

OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivos:

- 1) Verificar se o ácido lipoteicóico estimula resposta inflamatória no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos;
- 2) Avaliar se a concentração de 150 µg/ml de ácido lipoteicóico é suficiente para desencadear resposta inflamatória, de natureza crônica, no tecido conjuntivo subcutâneo do rato;
- 3) Comparar a resposta do tecido conjuntivo subcutâneo do rato frente ao implante de tubos de teflon, contendo Fibrinol embebido em ácido lipoteicóico (material teste), com o implante de tubos de teflon contendo Fibrinol somente (material controle).

MATERIAL E MÉTODO

Dezesseis animais, ratos albinus-Wistar, adultos, pesando entre 250 e 330 gramas foram divididos em quatro grupos (a,b,c,d), com 4 animais em cada grupo, escolhidos aleatoriamente.

Dos 16 animais, cada quatro foram observados por períodos de 2 dias, 7 dias, 14 dias e 30 dias (Esquema 3 - ANEXO III). Durante o período de observação, os mesmos receberam água e ração (RAÇÃO PRODUTOR - TIPO 49 - MOINHO PRIMOR S.A. - São Paulo - S.P.) *ad libitum*.

A substância testada foi o ácido lipoteicóico (Sigma Chemicals Lab.- St.Louis - USA - L.4015 - lote 104H4039) originado de *Streptococcus faecalis*, preparada a partir de amostras liofilizadas na concentração de 150 µg/ml, utilizando água bi-destilada como veículo. A solução preparada foi armazenada em tubos de ensaio com tampa de borracha, autoclavados, em volumes de 1 ml por tubo, de modo que somente um tubo foi utilizado em cada momento cirúrgico. Todo o procedimento foi executado em ambiente livre de contaminação (câmara de fluxo laminar).

Após o acondicionamento da solução teste nos tubos de ensaio, colheu-se com alça de platina, de cada tubo, amostra da solução, sendo inoculada em meio de cultura de tioglicolato (E.MERCK - AG.DARMSTADT - Alemanha). Os meios de cultura foram incubados em estufa a 37°C por 72 horas, para confirmar a natureza estéril do procedimento.

Tubos de teflon medindo 5 mm de comprimento por 1 mm de diâmetro foram utilizados como receptores das substâncias testes.

Para que houvesse retenção da substância teste no interior do tubo e que a mesma ficasse em contato com o tecido a ser observado por mais tempo, foi utilizada espuma de plasma bovino - Fibrinol (LABORATÓRIO BALDACCI S.A. - São Paulo - SP) - a qual foi adaptada no interior do tubo sem que se deixasse excesso.

Tubo e Fibrinol preparados foram acondicionados em frascos de vidro com tampa (8 tubos por frasco) e esterilizados por radiação gama (EMBRARAD - Empresa Brasileira de Radiações - Cotia - SP). Números suficientes de frascos de vidros foram feitos de modo que somente um frasco foi utilizado para cada momento cirúrgico.

O momento cirúrgico tem início com a introdução da solução teste no interior de cada tubo de teflon, feita por meio de seringa descartável estéril tipo insulina com agulha 12,7 X 0,33 (BEKTON & DICKINSON - Curitiba - PR), onde a solução foi depositada lentamente de modo a umedecer totalmente o Fibrinol no interior do tubo. Nesse momento, 4 tubos foram preparados com a solução teste (tubo de teflon com Fibrinol + ácido lipoteicóico 150 µg/ml) e 4 outros tubos (tubo de teflon com Fibrinol) foram separados para servirem de controle. Todo esse procedimento foi executado no interior de uma câmara de fluxo laminar, em ambiente totalmente estéril.

Outro ambiente, próximo da câmara de fluxo onde os tubos foram preparados, foi arrumado para os procedimentos cirúrgicos nos ratos. Toda superfície foi desinfetada com hipoclorito de sódio 1% e álcool 70%.

Os animais, um de cada vez, foram anestesiados por inalação com éter sulfúrico (RIOQUÍMICA LTDA. - São José do Rio Preto - SP) e sofreram anti-sepsia com detergente à base de Clorohexidina (CHLOROHEX 2 - DEGERMANTE - CERAS JOHNSON LTDA. - Rio de Janeiro - RJ - lote 529001) . Após anti-sepsia inicial, em toda superfície dorsal do animal foi executada tricotomia, com remoção total dos pêlos dessa superfície, desde a região anterior até a posterior (caudal), fazendo-se nova anti-sepsia com o mesmo agente.

Duas incisões retilíneas, superficiais, de aproximadamente 10 mm de comprimento foram feitas, uma anterior e outra posterior, seguindo a linha média, sobre a coluna vertebral, com lâmina de bisturi número 15 (BEKTON & DICKINSON - Juiz de Fora - MG). O tecido cutâneo foi delicadamente levantado, sendo o tecido subcutâneo exposto por meio de divulsão, com a preocupação da mesma não ser extensa em lateralidade, mas, sim, em comprimento.

Na incisão anterior, a divulsão foi feita para o lado esquerdo e na posterior, para o lado direito. Dessa maneira, a distância entre os dois tubos foi a maior possível.

Feita a divulsão, um tubo de teflon foi implantado no interior do tecido, levado com uma pinça clínica, a uma distância aproximada de 2 a 3 cm da incisão. Duas suturas com pontos interrompidos coaptaram os bordos da ferida cirúrgica, utilizando fio de seda 3-0 (ETHICON - T 2762, com agulha de 1,7 cm - JOHNSON & JOHNSON - São José dos Campos - SP).

No lado esquerdo e anterior, em todos os animais, foi implantado o tubo controle (teflon com Fibrinol) e no lado direito, posterior, foi implantado o tubo teste (teflon com Fibrinol + ácido lipoteicóico).

Após os respectivos períodos de observação, os animais foram sacrificados por inalação de éter sulfúrico, sendo imediatamente removidas as amostras dos tecidos que continham os tubos implantados. O ato cirúrgico consistiu em uma incisão transversal, na região dorsal, mais posterior possível, até atingir a camada muscular, e rebatimento total do retalho, em sentido anterior, por meio de divulsão acompanhada por incisões laterais longitudinais. Estando o retalho dorsal inteiramente rebatido, localizaram-se os tubos implantados, removendo-os imediatamente através do recorte do retalho com margem de segurança. As peças removidas foram imediatamente colocadas em solução de formol tamponado recém-preparada, permanecendo por 72 horas e encaminhadas para processamento histológico.

Após seguir a histotécnica de rotina para o material, as peças foram incluídas em parafina, cortadas com espessura de 6 μ m e coradas por hematoxilina e eosina.

Os cortes foram feitos no sentido longitudinal do tubo, na região de maior diâmetro, de modo que as duas extremidades pudessem ser observadas.

A observação e fotografias dos cortes corados foi feita em fotomicroscópio (Carl Zeiss - MC 80 - Alemanha), em aumento de 400X.

Para um mesmo tubo (teste ou controle) foram, então, realizados vários cortes. Os mesmos foram analisados e somente aqueles

que apresentaram maior população de células por campo foram selecionados para o detalhamento das características.

Para cada tubo, observaram-se duas reações tissulares localizadas, cada uma, respectivamente, em cada extremidade do implante.

BERGENHOLTZ²(1983) estudou morfometricamente, em microscopia eletrônica, 17 lesões periapicais crônicas, dividindo-as em três zonas, desde o interior do canal radicular até a periferia da lesão. Baseado nesse trabalho, cada reação tissular de cada extremidade do tubo, foi dividida em três áreas de análise, partindo-se do limite da extremidade do tubo (área 1) para a periferia da reação (Esquema 4 - ANEXO III).

Cada área foi definida, no sentido látero-lateral, pelos limites do enquadramento fotográfico de uma ocular (E-PI-10x/20 - CARL ZEISS), estando o corte histológico aumentado 100x, e no sentido longitudinal, pela distância entre o bordo superior do limite do enquadramento fotográfico e a parte central do campo de enquadramento, representado por uma cruz (+). Passando por sobre a cruz central, traçou-se uma linha imaginária que delimitou a área no bordo inferior (Esquema 5 - ANEXO III).

O campo de observação para a contagem das células foi escolhido, levando-se em consideração a maior população celular localizada dentro de cada área. A contagem das células foi feita em aumento de 400x (Esquema 6 - ANEXO III).

Sempre, para cada campo (I, II, III), foram analisados mais de um corte, sendo que as células e estruturas distinguíveis foram contadas e classificadas em leucócitos polimorfonucleares, células mononucleares,

células gigantes, hemorragia ou presença de hemácias no tecido, vasos hiperêmicos e vasos em proliferação. No aspecto células mononucleares, estão incluídos macrófagos, fibroblastos, mastócitos, linfócitos, plasmócitos, histiócitos e células mesenquimais indiferenciadas.

Dos diversos cortes analisados para cada lesão, foram feitas médias das contagens realizadas em cada campo, apresentadas como total de elementos participativos do processo inflamatório (Tabelas 1 e 2 - ANEXO II). Desse valor obtido foram realizados todos os testes estatísticos e análises de significância, apresentados nas Tabelas 3 e 4 - ANEXO II.

RESULTADOS

As observações fotomicroscópicas estão organizadas na seqüência evolutiva dos períodos e expressas nas Figuras 1 a 8 - ANEXO I.

Os dados numéricos obtidos estão apresentados nas Tabelas 1 a 4 - ANEXO II.

Análise de variância entre os grupos controle e experimental foram feitos para cada constituinte do processo inflamatório, em cada campo, em cada período de observação, utilizando-se programa estatístico SAS/STAT, versão 6.04, pelo processamento "PROC/GLM" - SAS INSTITUTE INC.⁴¹(1990).

A) GRUPO CONTROLE

A.1.) PERÍODO DE OBSERVAÇÃO - 2 DIAS

O tecido ao redor da luz do tubo (Campo 1) mostra-se edemaciado, com presença de fibrina e predomínio de células mononucleares dispersas (Figura 1B - ANEXO I). Toda a extensão da reação é uniforme, limitada pelos tecidos normais do animal (Figura 1A - ANEXO I). Células inflamatórias mononucleares e poucos leucócitos polimorfonucleares estão presentes de maneira dispersa. Mais distante da luz do tubo, Campo 2, podem-se observar alguns pontos hemorrágicos, rodeados por células inflamatórias mononucleares e vasos hiperêmicos (Figura 1C - ANEXO I). No Campo 3, observa-se também a presença de fibrina, com células

inflamatórias mononucleares dispersas e edema que toma toda a lesão (Figura 1D - ANEXO I). Vasos hiperêmicos estão presentes.

A.2.) PERÍODO DE OBSERVAÇÃO - 7 DIAS

Nesse período, o tecido apresenta-se freqüentemente invaginado para o interior do tubo, entrando em contato direto com o Fibrinol ali presente (Figura 2A - ANEXO I). No Campo 1, vêem-se células inflamatórias mononucleares dispersas, entremeadas por maior quantidade de fibrilas. Observa-se nessa área a presença de células adiposas (Figura 2B - ANEXO I).

No Campo 2, existem muitas fibrilas, células inflamatórias com predomínio de mononucleares e raros leucócitos polimorfonucleares (Figura 2C - ANEXO I). Em alguns cortes, identificam-se células gigantes do tipo corpo estranho. Alguns vasos em formação podem ser observados.

No Campo 3, chama a atenção a formação de tecido adiposo do animal, com poucas células inflamatórias mononucleares dispersas. Observa-se também vasos em proliferação (Figura 2D - ANEXO I).

A.3.) PERÍODO DE OBSERVAÇÃO - 14 DIAS

A presença de fibras colágenas é marcante, mostrando um arranjo irregular e abrangente nas extremidades do tubo. Observa-se invaginação do tecido para o interior do tubo de teflon. A reação tissular está localizada na entrada do tubo (Figura 3A - ANEXO I). Em contato com a luz do tubo, no Campo 1, observa-se faixa estreita de células inflamatórias com

predomínio de células mononucleares e raros polimorfonucleares. São freqüentes os vasos sangüíneos em proliferação mostrando, no conjunto, tecido organizado e em processo de reparação (Figura 3B - ANEXO I).

O Campo 2 apresenta o mesmo arranjo fibroso, com células mononucleares dispersas e vasos sangüíneos hiperêmicos (Figura 3C - ANEXO I).

O Campo 3 mostra tecido conjuntivo com poucas células mononucleares dispersas e fibrilas colágenas delgadas contornando a reação inflamatória (Figura 3 D - ANEXO I).

Dentro do tubo de teflon, na porção mediana do seu comprimento, nota-se a presença de infiltrado inflamatório com predomínio de leucócitos polimorfonucleares entremeados por resíduos de Fibrinol.

A.4.) PERÍODO DE OBSERVAÇÃO - 30 DIAS

O Campo 1 mostra pequena reação inflamatória, com presença de células mononucleares, fibrilas colágenas e vasos em proliferação. Observam-se, na periferia da reação, aglomerados de células mononucleares semelhantes à linfócitos/plasmócitos e vasos hiperêmicos. Essa área está circundada por tecido colágeno delgado (Figura 4A e 4B - ANEXO I).

Os Campos 2 e 3 mostram tecido conjuntivo frouxo e tecido adiposo, com poucas células mononucleares (Figura 4C e 4D - ANEXO I).

B) GRUPO EXPERIMENTAL

B.1.) PERÍODO DE OBSERVAÇÃO - 2 DIAS

Próximo à luz do tubo (Campo 1), o tecido mostra-se com intenso acúmulo de fibrina e células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares. Em algumas lesões, observam-se nessa área, resíduos de Fibrinol e grupos de leucócitos polimorfonucleares (Figuras 5A e 5B - ANEXO I).

Nos Campos 2 e 3, o tecido apresenta-se com áreas de fibrina, mescladas com áreas de maior edema. Nessa região, encontra-se predomínio de células mononucleares, porém os polimorfonucleares são observados em pontos localizados. Vasos hiperêmicos estão presentes (Figuras 5C e 5D - ANEXO I).

B.2) PERÍODO DE OBSERVAÇÃO - 7 DIAS

Nesse grupo, o tecido reacional mostra-se desorganizado, com áreas hemorrágicas e edema, abrangendo grande área nas extremidades do tubo (Figura 6A - ANEXO I).

No Campo 1, observam-se células agrupadas, com polimorfonucleares localizados e predomínio de mononucleares. Pontos hemorrágicos e vasos sangüíneos dilatados podem ser vistos entre áreas com edema (Figura 6B - ANEXO I).

O Campo 2 apresenta predomínio de edema, mostrando tecido desorganizado fibrinoso, com poucas células inflamatórias mononucleares

dispersas. Vasos hiperêmicos são vistos em maior número (Figura 6C - ANEXO I).

No Campo 3, células inflamatórias mononucleares mostram-se dispersas, em um reticulado fibrinoso. O edema está presente no local (Figura 6D - ANEXO I).

B.3.) PERÍODO DE OBSERVAÇÃO - 14 DIAS

A reação inflamatória nesse período é extensa, sendo limitada na periferia por um tecido colágeno fibroso, sugerindo formação de cápsula (Figura 7A - ANEXO I).

No Campo 1, existe acúmulo de células inflamatórias mononucleares e pontos de hemorragia. As células apresentam-se dispersas, entremeadas por fibrilas de colágeno. Poucos vasos sanguíneos estão presentes (Figura 7B - ANEXO I). Leucócitos polimorfonucleares estão presentes em número pequeno, porém maior quantidade é observada na interface lesão/Fibrinol, na entrada do tubo.

Os Campos 2 e 3 mostram arranjo tissular semelhante à região periférica do Campo 1, mas com acúmulo maior de fibrilas colágenas. Células inflamatórias mononucleares estão presentes. Observa-se maior número de vasos hiperêmicos (Figuras 7C e 7D - ANEXO I).

B.4.) PERÍODO DE OBSERVAÇÃO - 30 DIAS

Presença de reação inflamatória crônica é comum neste grupo. O tecido das extremidades do implante não mostra invaginação para o

interior do tubo. Observa-se ainda resíduos de Fibrinol próximos à entrada do tubo implantado (Figura 8A - ANEXO I).

No Campo 1, podem-se observar vasos em proliferação e fibrilas colágenas. Células mononucleares são predominantes, porém leucócitos polimorfonucleares são encontrados entre o tecido inflamatório crônico e o material no interior do tubo (Figura 8B - ANEXO I).

No Campo 2, são evidentes células semelhantes à macrófagos carregados com material no citoplasma. Em alguns cortes são vistas células gigantes do tipo corpo estranho. Fibras colágenas são mais espessas em alguns pontos (Figura 8C - ANEXO I).

No Campo 3, o tecido colágeno é abundante, com fibras espessas e dispostas irregularmente. Essa formação colágena densa contorna a área inflamada como se fosse cápsula, porém não é observada zona de transição entre o tecido inflamado e o tecido normal do animal. Ao contrário, a formação colágena estende-se por uma grande área além do Campo 3 (Figura 8D - ANEXO I), contendo células mononucleares dispersas e poucos vasos sangüíneos.

DISCUSSÃO

A preocupação com um dos componentes da membrana celular dos estreptococos Gram-positivos, conhecido como ácido lipoteicóico, objetivo deste trabalho, surgiu da evidência polimicrobiana da infecção dos canais radiculares, como demonstrado por **HENRICI & HARTZELL¹⁹(1919)**, **WINKLER & van AMEROGEN⁶³(1959)**, **LANGELAND & BLOCK²⁸(1977)**, **NAIR³⁵(1987)**, **SUNDQVIST et al.⁵⁰(1989)** e **SELTZER & FARBER⁴⁴(1994)**.

Os últimos autores também citam o ácido lipoteicóico como substância capaz de influenciar reações inflamatórias. Os poucos estudos dirigidos para essa particularidade na Endodontia despertaram o interesse pelo assunto.

Streptococcus faecalis foram selecionados para fornecer a amostra de ácido lipoteicóico a ser testada, pois são microorganismos encontrados nos canais radiculares infectados, conforme **GOLDSTEIN¹⁵(1989)** e **STOCK et al.⁴⁹(1996)**, sendo um dos mais resistentes citados por **BURNET et al.⁶(1978)**, permanecendo viáveis mesmo após os procedimentos de limpeza e desinfecção dos canais, segundo **WINKLER & van AMEROGEN⁶³(1959)**.

O ácido lipoteicóico utilizado neste experimento foi produzido pelo laboratório Sigma Chemicals com base no trabalho de **FISCHER et al.¹²(1983)** que descreveu métodos de separação e purificação da estrutura bacteriana originada de diversos microorganismos (*Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*).

KNOX & WICKEN²⁷(1973) afirmam que altas doses de ácido lipoteicóico (entre 100 e 500 µg) são necessárias para obter reações tissulares positivas.

PINERO et al.³⁸(1983) demonstraram, *in vitro*, que diferentes concentrações de endotoxinas (os autores utilizaram LPS proveniente de *Escherichia coli*) produzem diferentes respostas metabólicas sobre fibroblastos de polpas humanas e de bovinos. Os autores demonstraram que concentrações entre 125 µg/ml e 625 µg/ml interferem no metabolismo dessas células.

Baseado nos trabalhos acima descritos, determinou-se a concentração de 150 µg/ml como suficiente para provocar reações inflamatórias, objetivando características crônicas. Os resultados obtidos com material teste confirmaram as expectativas, como podem ser vistos nas Figuras 6, 7, 8 - ANEXO I.

A colocação do material teste no interior de tubos de teflon faz analogia com o canal radicular infectado, onde as toxinas bacterianas e substâncias tóxicas são os principais agressores da região periapical, nos casos de lesões inflamatórias crônicas, conforme os autores **HENRICI & HARTZEL¹⁹(1919)**, **BERGENHOLTZ¹(1977)**, **LANGELAND & BLOCK²⁸(1977)**, **TORABINEJAD & BAKLAND⁵⁴(1978)**, **NAIR³⁵(1987)** e **INGLE & LANGELAND²³(1989)**, **FUKUSHIMA et al.¹⁴(1990)**, **SELTZER & FARBER⁴⁴(1994)**.

Para manter a agressão por tempo prolongado, utilizou-se espuma de plasma bovino (Fibrinol) como retentor da substância teste, pois o material mostrou ser reabsorvível e não desencadeou reações inflamatórias do tipo crônica ou de corpo estranho, conforme mostra o trabalho de **OKAMOTO et al.³⁷(1994)**, que analisou o processo de reparo de alvéolos de ratos, preenchidos parcialmente com Fibrinol.

Os resultados encontrados nos **animais controle**, em que foram implantados tubos de teflon preenchidos com Fibrinol, mostraram resposta tecidual exsudativa, no período de 2 dias, com poucas células inflamatórias mononucleares dispostas de maneira dispersa e seguidas de polimorfonucleares neutrófilos em pequeno número, conforme demonstrado na Figura 1A e 1B - ANEXO I e Tabelas 1 e 3 - ANEXO II. Essa reação está relacionada com a agressão intensa causada pelo trauma cirúrgico nos tecidos. Conforme **COTRAN et al.⁹(1991)**, a agressão intensa provoca grande destruição celular e resposta vascular do tipo imediata e mantida, com produção de mediadores como histamina, bradicinina e prostaglandinas.

TORNECK⁵⁵(1966) pesquisou a influência do comprimento e diâmetro de tubos de teflon implantados em subcutâneo de ratos. O autor observou, após 60 dias, que uma cápsula de tecido conjuntivo formou-se ao redor do implante, com fibras colágenas dispostas paralelamente no longo eixo do tubo. O tecido capsular mostrou ausência de células inflamatórias.

Esse aspecto histológico foi comum em nossas observações, tanto no grupo controle quanto no experimental, a partir do sétimo dia (Figuras 2A, 3A, 4A e 8A - ANEXO I). A variação existente na espessura da

cápsula de tecido conjuntivo é dependente do grau de deslocamento do implante no tecido e/ou do processo de cura do tecido agredido pelo procedimento cirúrgico, segundo **TORNECK⁵⁵(1966)**. A característica desse tecido fibroso ao redor do tubo de teflon demonstra o comportamento inerte do material no tecido subcutâneo do rato.

TORNECK⁵⁵(1966) mostra que nos tubos implantados com uma extremidade aberta e outra fechada não houve crescimento de tecido conjuntivo para o interior do tubo, quando o diâmetro do tubo foi menor que 0,86 mm. Entretanto, uma invaginação em forma de botão foi observada, alcançando 0,25 mm a 0,50 mm dentro do lúmen do tubo. Nos tubos de diâmetro maior (1,14 mm e 1,40 mm), houve invaginação de tecido para o interior do tubo. O tecido invaginado apresentou inflamação de natureza crônica, com predomínio de linfócitos e macrófagos e raros plasmócitos. Quanto maior a profundidade da invaginação, mais intensa foi a inflamação. Não foi observada inflamação aguda em nenhum dos implantes.

Os resultados encontrados, com relação ao grupo controle, são semelhantes aos de **TORNECK⁵⁵(1966)**, mostrando invaginação de tecido para o interior do tubo na maioria dos casos (Figuras 2A e 3A - ANEXO I) e formação de um botão ligeiramente adentrando o lúmen do tubo em outros casos (Figura 4A - ANEXO I). Observou-se que o quadro inflamatório com predomínio de células mononucleares (inflamação do tipo crônica) foi restrito ao tecido invaginado, com pouca extensão para fora do tubo (abrangência do Campo 1 somente) nas áreas correspondentes às extremidades do implante. Essas características podem ser confirmadas com os dados apresentados na

Tabela 1 - ANEXO II, em que o número de células mononucleares é evidentemente menor, no campo 3 dos períodos de 7 e 14 dias e nos campos 2 e 3 no período de 30 dias. No campo 2, nos períodos de 7 e 14 dias, observa-se um menor número de células por campo em relação aos respectivos campos 1.

Células adiposas foram presentes no tecido reacional (Figuras 2A e 3A - ANEXO I).

Esses achados demonstram que a reação inflamatória, limitada basicamente no lúmen do tubo implantado, é proveniente da estagnação de fluidos no interior do implante que atua como irritante local, segundo **TORNECK⁵⁵(1966)**.

A presença de células adiposas no tecido reacional sugere um processo de cura com tendência a reparação dos tecidos circunvizinhos das extremidades do implante.

Os dados da Tabela 3 - ANEXO II ilustram a tendência ao reparo das lesões, pela diminuição da média do número de células inflamatórias mononucleares por lesão, principalmente entre os períodos de 14 e 30 dias. A diminuição do número de vasos hiperêmicos e em proliferação demonstra um tecido mais estável e normal.

Nos resultados numéricos apresentados na Tabela 1 - ANEXO II, vê-se maior número de vasos em proliferação correspondente ao campo 1 (período de 14 dias), demonstrando processo de reparo ativo na extremidade do tubo implantado.

SOUZA FILHO et al.⁴⁶(1996) analisaram a importância do diâmetro do canal radicular e forame apical no processo de cura dos tecidos periapicais. Utilizando cães, 64 canais radiculares foram ampliados no comprimento de trabalho até a lima de número 60 e o forame apical dilatado com limas de números 25 e 40. Os canais foram obturados 1 a 2 mm e 3 a 4 mm aquém do ápice radicular radiográfico. Quatro canais, grupo controle, foram deixados sem a obturação dos canais. A avaliação do processo de cura foi feita após 180 e 360 dias. Os autores verificaram que nos canais não obturados e supostamente não contaminados a inflamação periapical foi evidente, com ausência de invaginação do tecido para o interior do lúmen do canal. No grupo experimental, que sofreu obturação dos canais, foi observada invaginação de tecido para o interior do canal, com características fibrosas, preenchendo o espaço de 1 a 4 mm aquém ápice radicular e livre de inflamação. Formação de cimento apical foi observada após 360 dias.

O trabalho de **SOUZA FILHO et al.⁴⁶(1996)** confirma, com resultados diretamente obtidos de canais radiculares, nossos achados com relação aos tubos de teflon implantados em subcutâneo de ratos. Pode-se dizer então, que a ausência de fatores irritantes no interior dos canais e, no caso, no interior dos tubos de teflon (grupo controle), permite a invaginação de tecido para o interior do lúmen do tubo, com evolução para a cura.

Células gigantes foram ocasionalmente vistas em algumas reações do período de 7 dias de observação (Figuras 2C - ANEXO I e Tabelas 1 e 3 - ANEXO II). **TORNECK⁵⁵(1966)** descreveu esse tipo celular juntamente com linfócitos, macrófagos e polimorfonucleares raros, como

presentes no infiltrado inflamatório do tecido invaginado para o interior do tubo de teflon. Sendo assim, não se pode afirmar que a presença dessas células seja em consequência do Fibrinol no interior do tubo, já que no trabalho de **TORNECK**⁵⁵ os tubos foram implantados com o lúmen vazio.

OKAMOTO et al.³⁷(1994) observaram que o Fibrinol colocado em alvéolos de ratos apresentou-se integrado ao coágulo sangüíneo após 3 dias. O material implantado (Fibrinol) estava ausente do local após 15 dias, ficando em seu lugar um coágulo sangüíneo desorganizado. Aos 21 dias esse coágulo foi substituído por tecido de granulação, apresentando pequenas trabéculas ósseas. Os autores concluem, com base nos resultados, que a absorção completa do Fibrinol diminui a possível reação do tipo corpo estranho; porém, a presença do respectivo material no alvéolo provocou retardo no processo de cura, quando comparado com animais controle.

Nos implantes dos animais com 30 dias de observação, pode-se verificar pequena faixa de tecido reacional correspondente às extremidades do tubo de teflon, não ultrapassando seus limites externos, circundada por tecido conjuntivo normal do animal, sem células inflamatórias (Figuras 4 A, C e D - ANEXO I e Tabela 1 - ANEXO II). Em alguns casos, no limite externo do tecido reacional, observaram-se células semelhantes a plasmócitos agrupados (Figura 4B - ANEXO I). Esses achados apóiam as observações de **TORNECK**⁵⁵.

No **grupo experimental**, a reação inflamatória foi mais intensa quando comparada ao grupo controle. No período de 2 dias, vê-se maior

acúmulo de células inflamatórias com predomínio de mononucleares seguidos por leucócitos polimorfonucleares (Tabelas 2 e 3 - ANEXO II). A reação exsudativa foi intensa, formando grandes espaços negativos nos cortes histológicos, onde as células inflamatórias apresentavam-se agrupadas nos reticulados de fibrina (Figura 5 A, C e D - ANEXO I).

Pode-se observar na Tabela 4 - ANEXO II, maior número de polimorfonucleares correspondentes ao grupo experimental, Campo 1 (período de 2 dias), quando comparado ao grupo controle. Associado ao extenso edema local, a maior concentração dessas células confirma uma reação inflamatória aguda mais intensa. Essa diferença foi significativa no campo 3 ($p < 0,05$).

No período de 7 dias, a reação inflamatória é extensa, avançando sobre os tecidos normais do animal. A característica do arranjo tissular assemelha-se ao encontrado no grupo controle com 2 dias de observação, apresentando porém maior quantidade de vasos sanguíneos hiperêmicos (Figura 6 A, B, C, D - ANEXO I e Tabela 3 - ANEXO II).

Essa característica reacional, após 7 dias, mostra uma resposta exsudativa mais prolongada ou uma dificuldade na absorção do edema formado inicialmente, como visto nos animais controle de 2 dias de observação, em consequência ao trauma cirúrgico. Essa reação exsudativa é evidenciada pelo menor número de células mononucleares por lesão e por Campo, demonstrada nas Tabelas 3 e 4 - campos 1 e 2 - ANEXO II, apesar da diferença não ser significativa. Observa-se também uma diminuição no número de polimorfonucleares, na lesão, evidenciando a cronificação do processo inflamatório, mesmo na presença do edema (Tabela III - ANEXO II).

Seja qual for o motivo, é evidente que existe uma dificuldade na organização do tecido circunvizinho à extremidade do implante de teflon. Além disso, não foi observada invaginação do tecido em direção ao lúmen do tubo, conforme mostrado no grupo controle.

Com 14 dias, a reação nas extremidades do implante de teflon torna-se mais extensa, invadindo os tecidos normais do animal, com células mononucleares dispersas predominantes (Tabela 2 - ANEXO II) e áreas hemorrágicas evidentes (Figura 7 A, B, C, D - ANEXO I). O arranjo estrutural dessa reação assemelha-se aos granulomas apicais. Pode-se observar, inclusive, formação de tecido fibroso circundando a lesão, como uma cápsula (Figura 7 A - ANEXO I). Aspecto interessante é a não invaginação do tecido reacional para o interior do lúmen do tubo (Figura 7 A - ANEXO I) e a presença de resíduos de Fibrinol, preenchendo a extremidade do implante, ainda nesse período.

A presença do Fibrinol embebido em ácido lipoteicóico (150 $\mu\text{g/ml}$) na extremidade do tubo, mostra que o ácido lipoteicóico, na concentração utilizada, impede a sua absorção. Essa característica não foi encontrada nos animais controle, em que a ausência do ácido lipoteicóico permitiu a absorção do Fibrinol e invaginação do tecido reacional para o interior do lúmen do tubo. Pode-se sugerir, então, que o ácido lipoteicóico, na concentração de 150 $\mu\text{g/ml}$, atua como substância tóxica direta, impedindo a proliferação celular e invaginação do tecido reacional para o interior do lúmen do tubo implantado.

A reação extensa, que avança para o tecido conjuntivo do animal, envolvendo os Campos 1, 2 e 3 analisados (Figura 7 B, C, D -

ANEXO I), permite supor que o ácido lipoteicóico (150 µg/ml), presente no interior do tubo implantado, sofra difusão por entre o tecido circunjacente e que o produto difundido e diluído pelos fluidos tissulares possua concentração suficiente para provocar tal resposta inflamatória crônica.

Apesar do grupo controle também possuir um tecido reacional com características crônicas no mesmo período de observação, vê-se que esse tecido está invaginado para o interior do lúmen do tubo, possuindo pouca extensão para o tecido conjuntivo normal do animal [aspecto reacional normal conforme descrito por **TORNECK⁵⁵(1966)**]. Essa diferença na abrangência da reação externa mostra que algum fator difusível (ácido lipoteicóico) é o responsável pela reação exacerbada nas extremidades dos tubos de teflon.

Na Tabela 3 - ANEXO II, vê-se um maior número de polimorfonucleares e mononucleares por lesão no grupo experimental, nos períodos de 14 e 30 dias, estatisticamente significativo ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle. Na Tabela 4 - ANEXO II, pode-se observar, no grupo experimental, reação de células mononucleares significativamente maior ($p < 0,05$) nos campos 2 e 3 (período de 14 dias) e nos campos 1, 2 e 3 (período de 30 dias), demonstrando reação inflamatória crônica mais extensa.

A permanência do ácido lipoteicóico (150 µg/ml) no interior do tubo, durante o período de observação, atua como agressor de baixa intensidade, fator importante, segundo **COTRAN et al.⁹(1991)** e **TROWBRIDGE & EMLING⁵⁷(1996)**, no desenvolvimento do processo

inflamatório crônico, como encontrado nos animais experimentais a partir do 14º dia de observação.

A reação de fibras colágenas presente nas lesões dos animais experimentais, semelhante a uma cápsula, não ocorre nos animais do grupo controle, em que o tecido reacional é circundado pelo próprio tecido conjuntivo do animal, muitas vezes identificado como tecido adiposo ou tecido conjuntivo subcutâneo com células dispersas e não apresentando células inflamatórias (Figura 3A, 4A - ANEXO I). Esse fato sugere que a difusão do ácido lipoteicoico pelo tecido torna-o cada vez mais diluído pelos fluidos tissulares, à medida que se distancia do ponto de origem (interior do tubo de teflon), provocando nessa região, possivelmente, uma reação celular estimulatória da produção de fibras colágenas, fato descrito por **FISH¹³(1939)**. Tal suposição encontra respaldo no trabalho de **PINERO et al.³⁸(1983)**, que analisou o comportamento de culturas de fibroblastos originados de polpas dentais humanas, frente a concentrações diferentes de endotoxina bacteriana isolada de *Escherichia coli*. As culturas de fibroblastos foram incubadas com 5, 125 e 625 µg de lipopolissacarídeo (LPS)/ml e comparadas com um padrão isento de endotoxina, por períodos de 6, 24 e 48 horas. Os resultados obtidos demonstraram que na concentração de 5 µg de LPS/ml houve estímulo ao crescimento de fibroblastos; na concentração de 125 µg de LPS/ml houve pequena estimulação do crescimento, não significativa quando comparada ao padrão e na concentração de 625 µg de LPS/ml, houve inibição do crescimento dos fibroblastos humanos. Além disso, os fibroblastos humanos responderam com aumento na produção de

colágeno proporcionalmente ao aumento da concentração de endotoxina, no intervalo de 5 e 125 µg de LPS/ml. Os autores sugerem que esse tipo de resposta possa estar relacionada às infecções crônicas da polpa em que os fibroblastos provavelmente estão sujeitos às condições semelhantes.

Apesar de **PINERO et al.³⁸(1983)** terem mostrado resultados obtidos a partir da molécula de LPS bacteriano, deve-se ressaltar a afirmação de **KNOX & WICKEN²⁷(1973)**, classificando a molécula de ácido lipoteicóico como anfipática tal qual a molécula de LPS, possuindo, dessa maneira, potencial para desenvolver reações biológicas semelhantes. Relatam que reações imunológicas sensíveis para o ácido lipoteicóico (concentração de 2,5 µg/ml) mostram aglutinação de eritrócitos quando em presença de anticorpos específicos. Afirmam que, independente de como o ácido lipoteicóico (LTA) possa ser liberado para o meio, a molécula de LTA pode ser importante fator a influenciar as propriedades imunobiológicas do hospedeiro.

GOODMAN¹⁶(1992) descreve algumas características para que fatores possam desencadear reações imunogênicas: ser estranho ao organismo, ter peso molecular superior a 100.000 e possuir complexidade química parecem estar relacionados à molécula de ácido lipoteicóico.

WARFVINGE et al.⁶⁰(1985) confirmam as semelhanças nas respostas biológicas, em tecido pulpar de cão, entre paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, quando colocadas sobre dentina recém-cortada. Ambas provocaram migração de células inflamatórias com predomínio do leucócitos polimorfonucleares.

HAUSMANN et al.¹⁸(1975) verificaram respostas semelhantes na reabsorção óssea em cultura de tecido, tanto em incubações feitas com ácido lipoteicóico quanto com lipopolissacarídeo bacteriano. Porém, o ácido lipoteicóico mostrou-se menos potente que o LPS em produzir liberação de cálcio da cultura de tecido.

De VUONO & PANOS¹¹(1978) observaram, em culturas de células de rim, fígado e coração, que concentrações de ácido lipoteicóico diferentes produzem ação citotóxica também diferentes. Mostraram que, na concentração de 250 µg/ml de LTA houve máxima destruição das células; na concentração de 142 µg/ml de LTA a destruição celular foi de 50% e a menor destruição foi observada na concentração de 75 µg/ml de LTA. Esses autores deixam claro que a molécula de ácido lipoteicóico pode influenciar o comportamento celular, atuando em células de órgãos diferentes e que, quanto menor a concentração da substância (LTA), menor é o seu potencial para provocar lise celular.

No modelo testado neste trabalho, os resultados não são diferentes.

Com 30 dias, apesar de menos extensa, a reação inflamatória é evidente, com células mononucleares ainda predominantes (Figura 8A, B, C, D - ANEXO I e Tabela 2 - ANEXO II). A reação de leucócitos polimorfonucleares permanece pequena e localizada na entrada do tubo, onde são observados resíduos de Fibrinol (Figura 8A - ANEXO I e Tabela 2 - período de 30 dias, campo 1 - ANEXO II). Fibras colágenas espessas são vistas mais a distância (Figura 8 D - ANEXO I).

A redução na extensão da reação inflamatória possivelmente está relacionada à diminuição da ação irritante do ácido lipoteicóico presente no interior do tubo de teflon. Essa ocorrência pode ser devida à diluição provocada pelos fluidos tissulares que adentram ao lúmen do tubo implantado. Como não existe produção contínua do ácido lipoteicóico no interior do tubo, a substância torna-se cada vez mais diluída e, em concentrações menores, possivelmente provoca reações tissulares diferentes, como demonstrado por **PINERO et al.³⁸(1983)** com relação ao LPS de *Escherichia coli*. Isso pode ser visto no campo 3 (Figura 8D - ANEXO I) pela reação de fibras colágenas espessas que circunda um tecido inflamatório de natureza crônica. Não existe nesse período de observação, aspecto de cura evidente. Porém, com a diluição cada vez maior do ácido lipoteicóico do interior do tubo de teflon, pode-se esperar uma cura em tempo mais prolongado.

Essas lesões crônicas produzidas possuem, além das células inflamatórias, outros componentes do tecido conjuntivo local, tais como fibroblastos, fibras colágenas, elastina que, mergulhados na substância fundamental "aguardam" um meio favorável para a proliferação, contribuindo para o processo de cura da lesão, segundo **COTRAN et al.⁹(1991)**. Esse meio torna-se favorável à medida que o agente agressor é eliminado, conforme afirma **TROWBRIDGE⁵⁶(1990)**.

No sistema de canais radiculares, pelas características bacterianas existentes e já relatadas, uma possível produção contínua de ácido lipoteicóico pode existir e, juntamente com outros fatores, pode

contribuir com o início e/ou desenvolvimento de reação inflamatória nos tecidos periapicais, com consequências danosas para o paciente.

De fato, o ácido lipoteicóico na concentração de 150 µg/ml, provocou reação inflamatória de natureza crônica no tecido conjuntivo subcutâneo do rato e essa reação foi evidente a partir do 14º dia até o final do período de observação (30 dias).

CONCLUSÕES

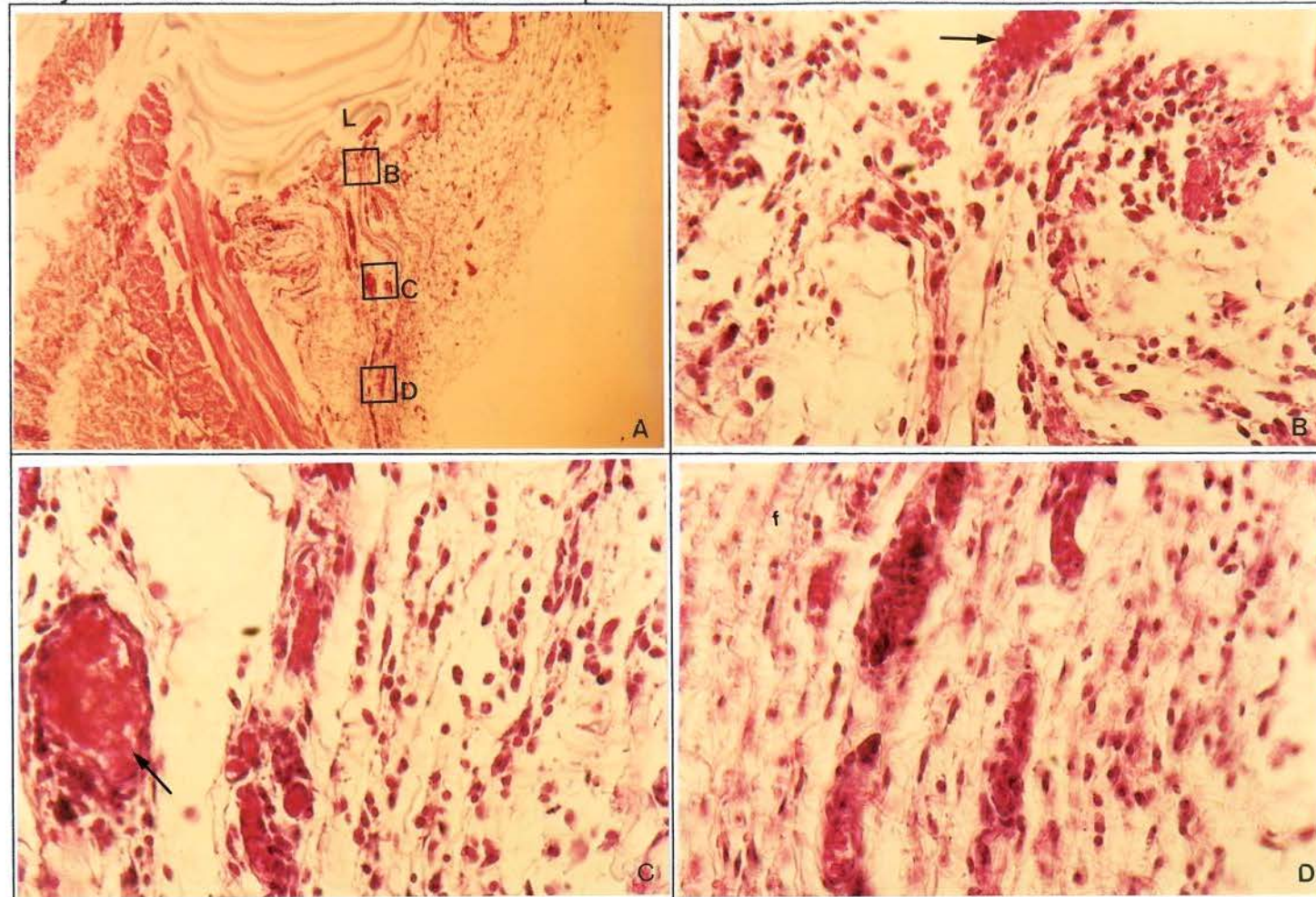
Com base nos resultados encontrados, pode-se concluir que:

- 1 - o ácido lipoteicóico estimula e mantém uma resposta inflamatória no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos.
- 2 - na concentração de 150 $\mu\text{g/ml}$, o ácido lipoteicóico provocou reação inflamatória de natureza crônica no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos.
- 3 - em comparação com o grupo controle (teflon + Fibrinol), a reação do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos ao material teste (teflon + Fibrinol + ácido lipoteicóico 150 $\mu\text{g/ml}$) mostrou-se invasiva aos tecidos normais do animal, provocou formação de tecido semelhante a cápsula, separando a reação inflamatória dos tecidos normais do animal e não permitiu a invasão do tecido conjuntivo para o interior do lúmen do tubo, como ocorreu nos animais controle. Esse tipo de reação encontrada nos animais experimentais foi atribuída à presença do ácido lipoteicóico no interior dos tubos implantados.

ANEXO I

Figura 1 - GRUPO CONTROLE - 2 dias

Reação tissular do subcutâneo do rato ao implante de tubo de teflon com Fibrinol



Quadro A) extremidade do tubo - 40X - HE: observar a presença de edema; L)lúmen do tubo

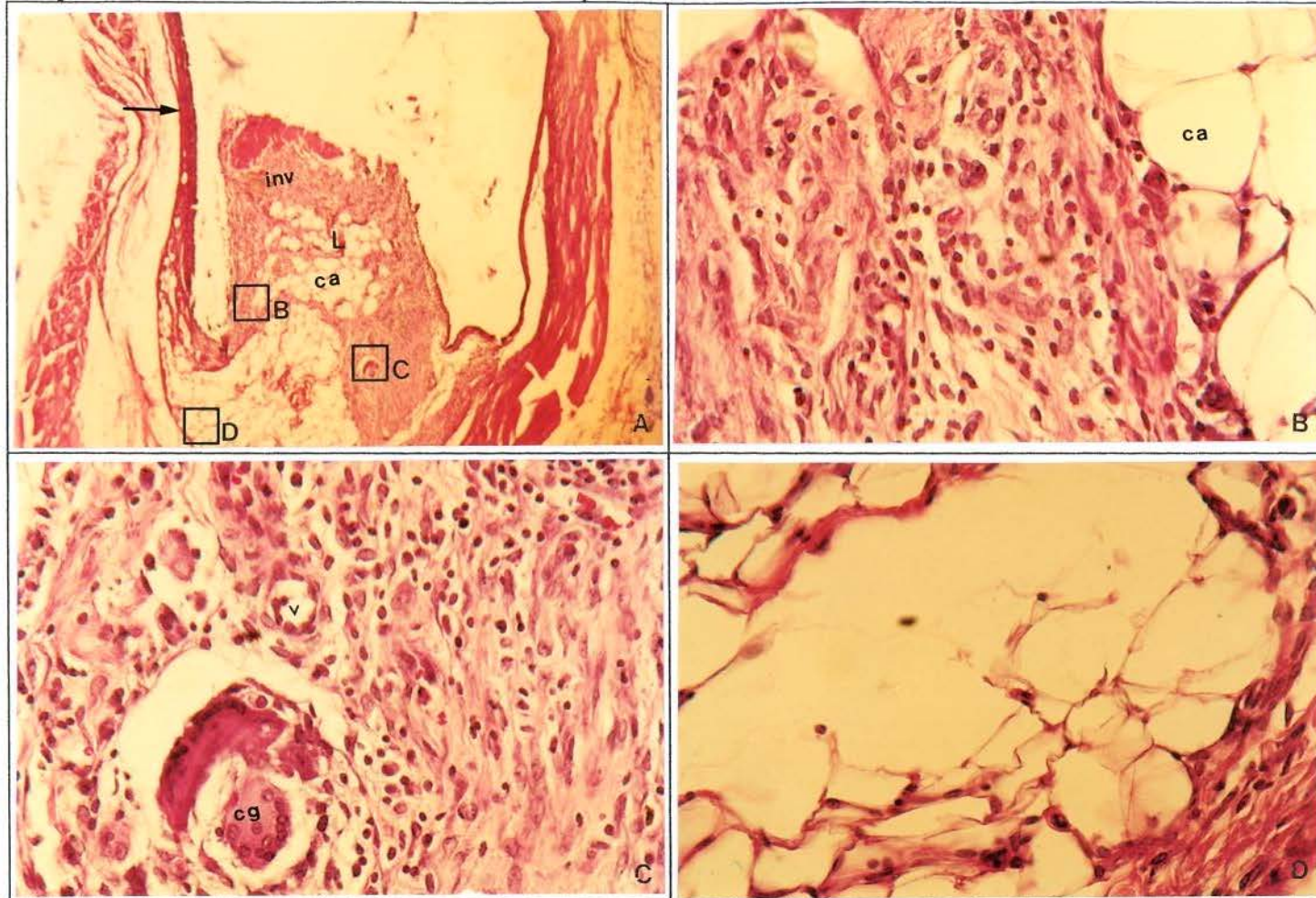
Quadro B) campo 1 - 400X - HE: observar áreas hemorrágicas (seta) e células mononucleares dispersas

Quadro C) campo 2 - 400X - HE: observar a presença de vasos hiperêmicos (seta)

Quadro D) campo 3 - 400X - HE: observar a presença de fibrina (f) e células mononucleares dispersas

Figura 2 - GRUPO CONTROLE - 7 dias

Reação tissular do subcutâneo do rato ao implante de tubo de teflon com Fibrinol



Quadro A) extremidade do tubo - 40X - HE: observar a invaginação do tecido conjuntivo (inv); L) lúmen do tubo; cápsula de tecido fibroso na lateral do tubo de teflon (seta); células adiposas (ca)

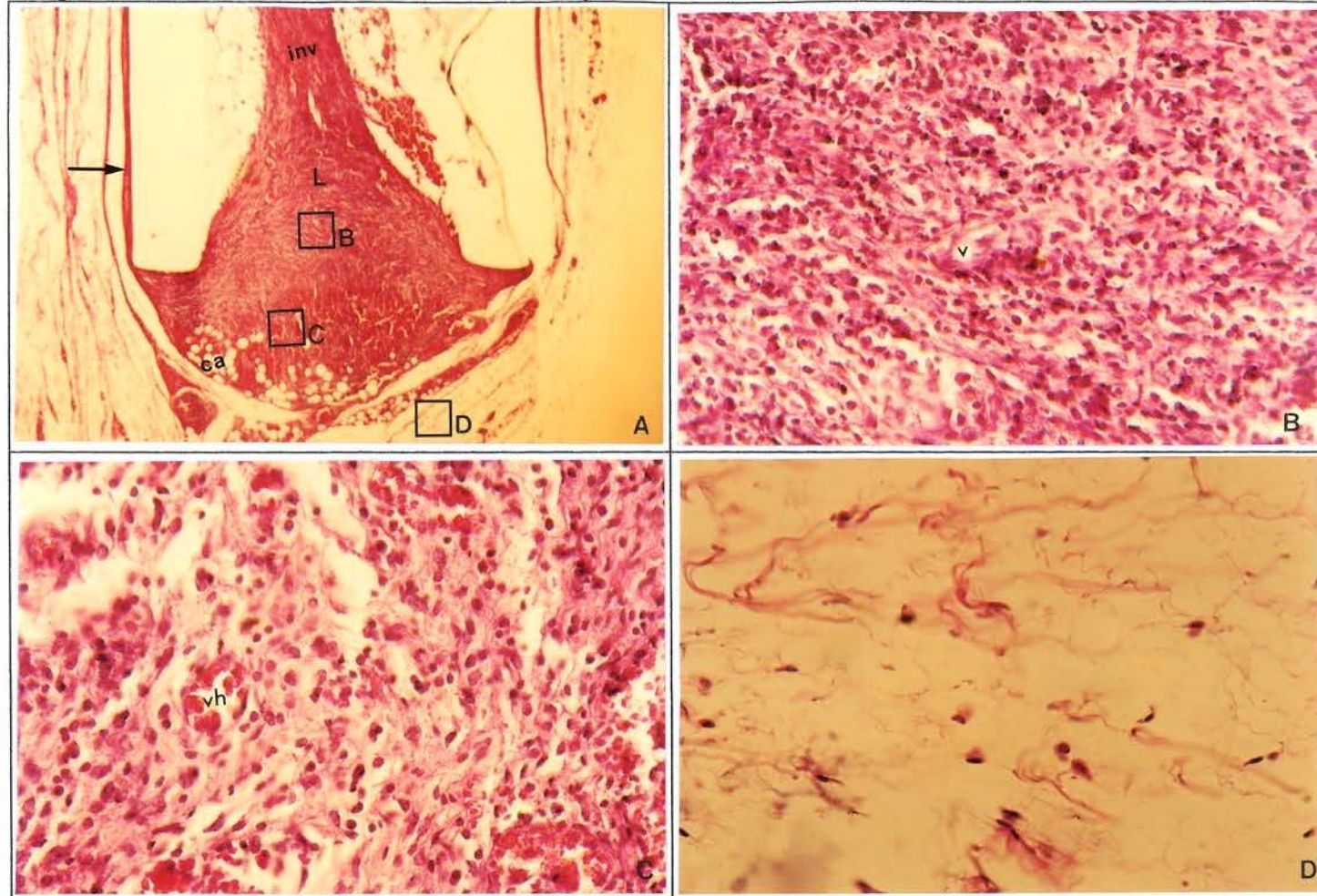
Quadro B) campo 1 - 400X - HE: observar células mononucleares e fibrilas colágenas; células adiposas (ca)

Quadro C) campo 2 - 400X - HE: observar vasos neoformados (v); células gigantes (cg)

Quadro D) campo 3 - 400X - HE: observar tecido adiposo do animal

Figura 3 - GRUPO CONTROLE - 14 dias

Reação tissular do subcutâneo do rato ao implante de tubo de teflon com Fibrinol



Quadro A) extremidade do tubo - 40X - HE: observar invaginação do tecido conjuntivo (inv); L) lúmen do tubo; cápsula de tecido fibroso na lateral do tubo de teflon (seta); células adiposas (ca)

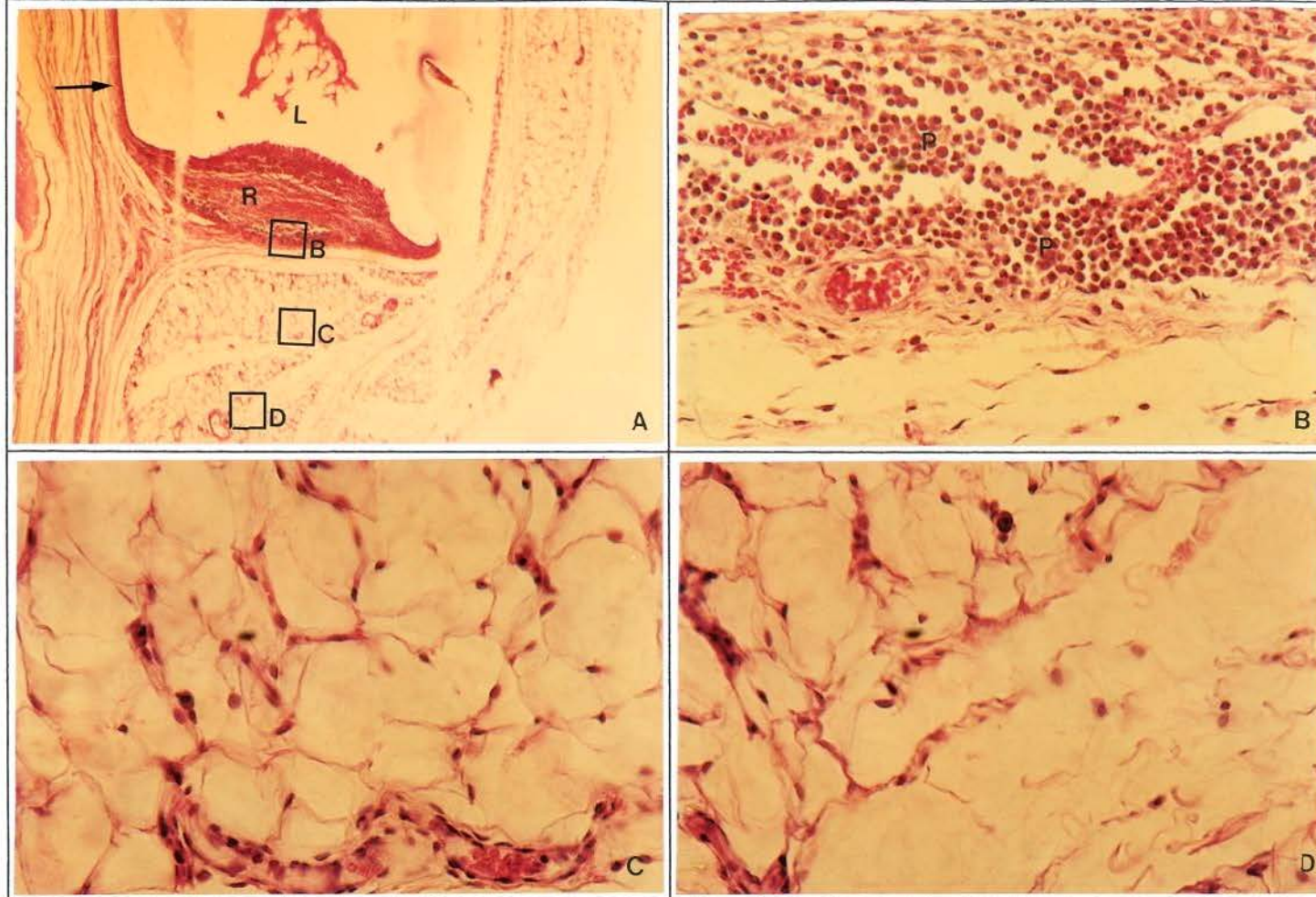
Quadro B) campo 1 - 400X - HE: observar células mononucleares, fibrilas colágenas e vasos neoformados (v)

Quadro C) campo 2 - 400X - HE: observar células mononucleares, fibrilas colágenas e vasos hiperêmicos (vh)

Quadro D) campo 3 - 400X - HE: observar tecido conjuntivo subcutâneo do animal com poucas células dispersas

Figura 4 - GRUPO CONTROLE - 30 dias

Reação tissular do subcutâneo do rato ao implante de tubo de teflon com Fibrinol



Quadro A) extremidade do tubo - 40X - HE: observar pequena reação inflamatória na extremidade do tubo (R); L) lúmen do tubo; cápsula de tecido fibroso na lateral do tubo de teflon (seta)

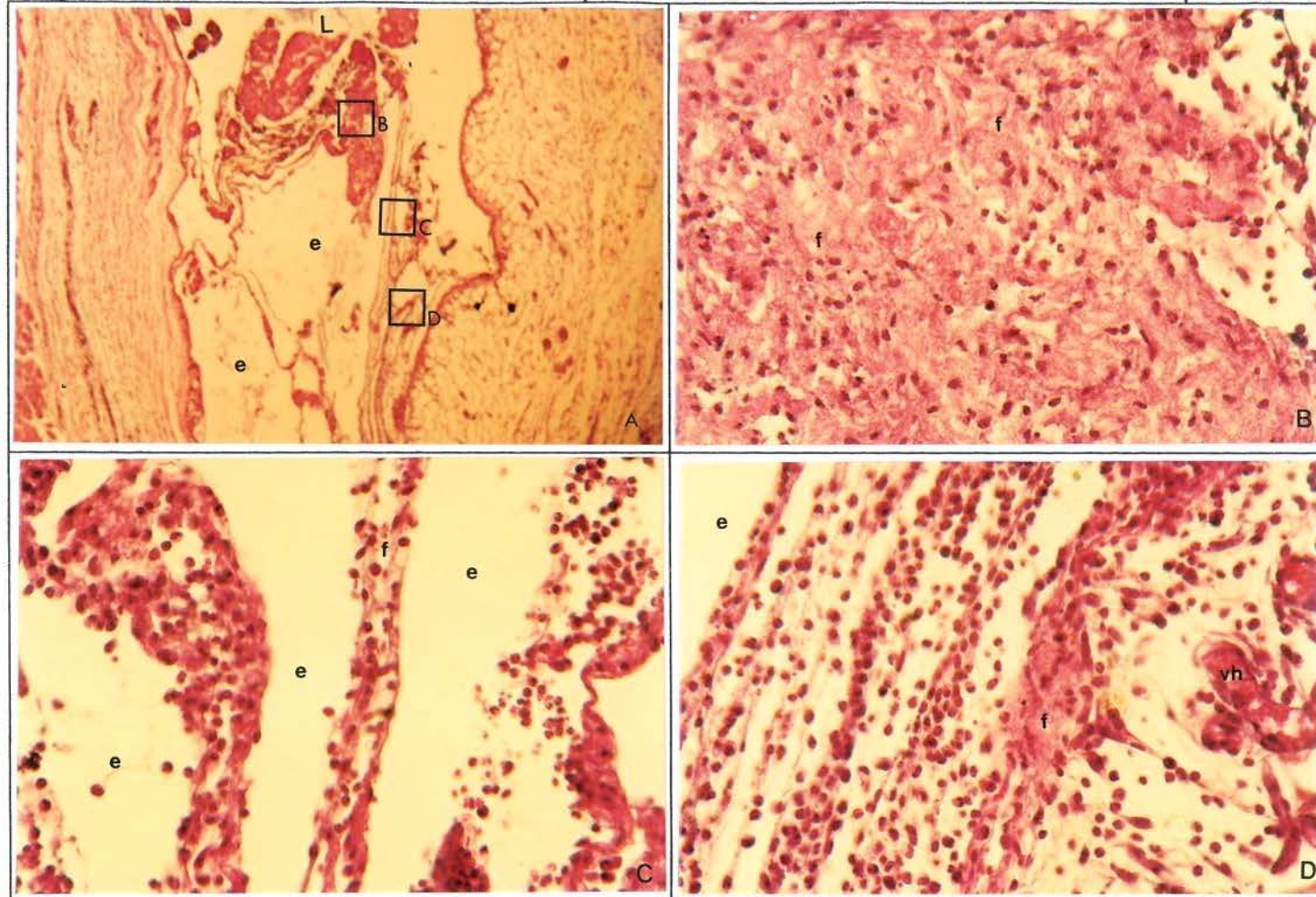
Quadro B) campo 1 - 400X - HE: observar aglomerado de células semelhantes a plasmócitos (P)

Quadro C) campo 2 - 400X - HE: observar tecido conjuntivo subcutâneo normal com células adiposas

Quadro D) campo 3 - 400X - HE: observar tecido conjuntivo subcutâneo normal com células adiposas

Figura 5 - GRUPO EXPERIMENTAL - 2 dias

Reação tissular do subcutâneo do rato ao implante de tubo de teflon com Fibrinol e ácido lipoteicóico 150 µg/ml



Quadro A) extremidade do tubo - 40X - HE: observar edema extenso (e); L) lúmen do tubo

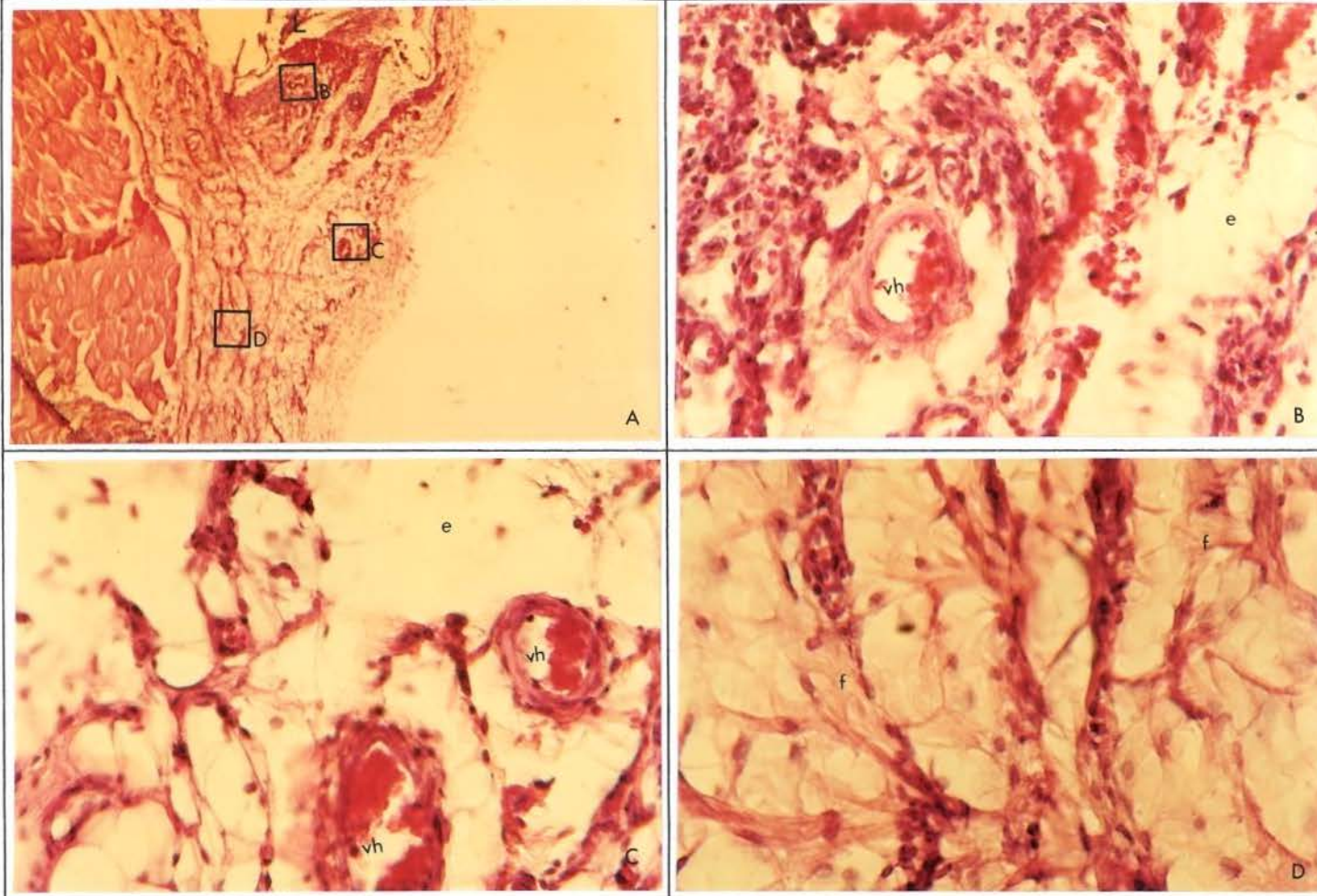
Quadro B) campo 1 - 400X - HE: observar acúmulo de fibrina (f) e células mononucleares dispersas

Quadro C) campo 2 - 400X - HE: observar a presença de edema (e); cordões de fibrina com células mononucleares (f)

Quadro D) campo 3 - 400X - HE: observar a presença de edema (e); fibrina (f) e vasos hiperêmicos (vh)

Figura 6 - GRUPO EXPERIMENTAL - 7 dias

Reação tissular do subcutâneo do rato ao implante de tubo de teflon com Fibrinol e ácido lipoteicóico 150 µg/ml



Quadro A) extremidade do tubo - 40X - HE: observar tecido desorganizado com presença de edema; L) lúmen do tubo

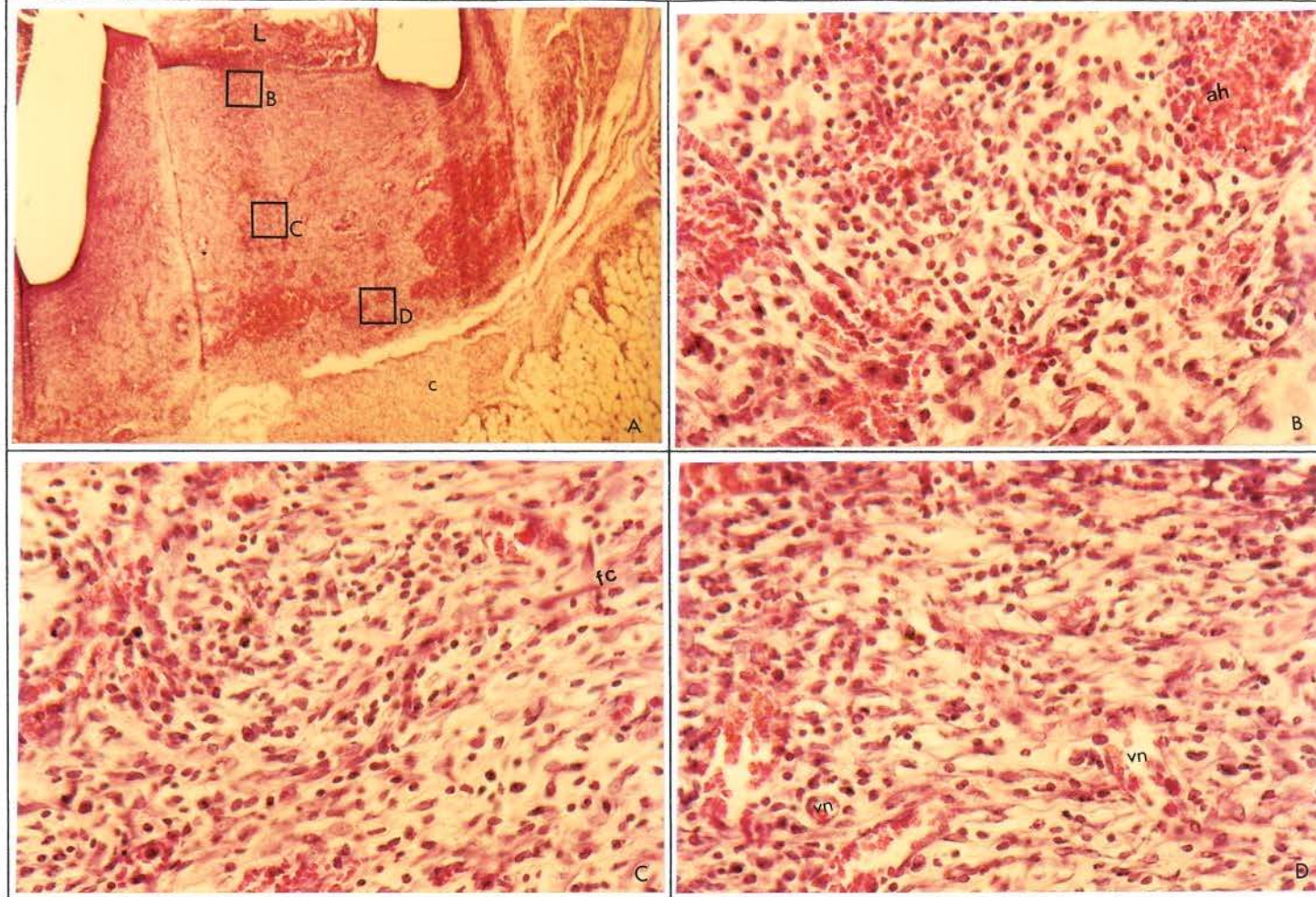
Quadro B) campo 1 - 400X - HE: observar presença de edema (e) e vasos hiperêmicos (vh)

Quadro C) campo 2 - 400X - HE: observar presença de edema (e) e vasos hiperêmicos (vh)

Quadro D) campo 3 - 400X - HE: observar a presença de células mononucleares dispersas e fibrina (f)

Figura 7 - GRUPO EXPERIMENTAL - 14 dias

Reação tissular do subcutâneo do rato ao implante de tubo de teflon com Fibrinol e ácido lipoteicóico 150 µg/ml



Quadro A) extremidade do tubo - 40X - HE: observar reação inflamatória extensa envolvida por cápsula (c); L) lúmen do tubo

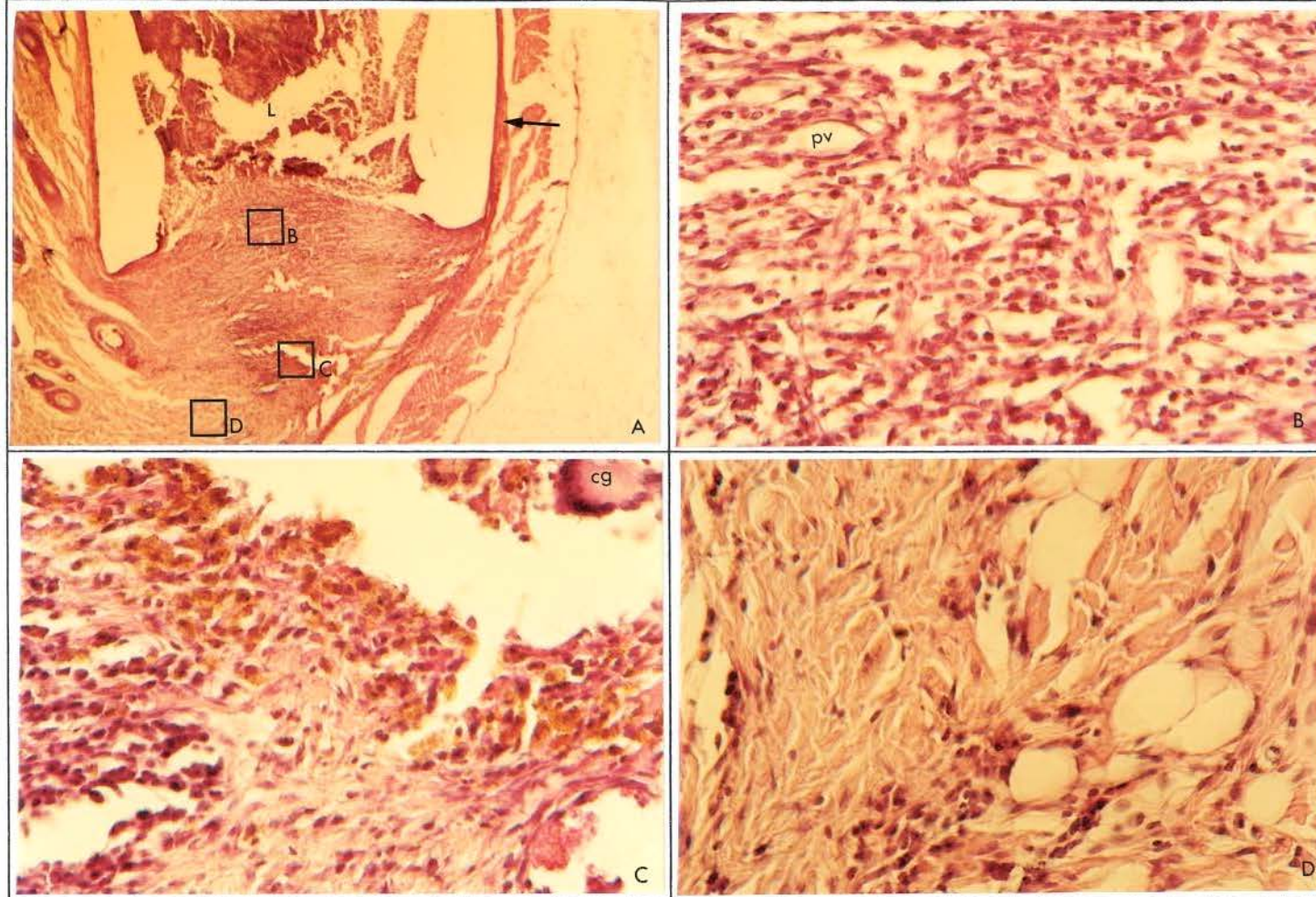
Quadro B) campo 1 - 400X - HE: observar células mononucleares dispersas e áreas hemorrágicas (ah)

Quadro C) campo 2 - 400X - HE: observar células mononucleares dispersas e abundância de fibras colágenas (fc)

Quadro D) campo 3 - 400X - HE: observar vasos neoformados (vn) e células mononucleares dispersas

Figura 8 - GRUPO EXPERIMENTAL - 30 dias

Reação tissular do subcutâneo do rato ao implante de tubo de teflon com Fibrinol e ácido lipoteicóico 150 µg/ml



Quadro A) extremidade do tubo - 40X - HE: observar reação inflamatória na extremidade do tubo; L) lúmen do tubo; cápsula de tecido fibroso na lateral do tubo de teflon (seta)

Quadro B) campo 1 - 400X - HE: observar proliferação vascular (pv) e células mononucleares dispersas

Quadro C) campo 2 - 400X - HE: observar células mononucleares dispersas e abundância de fibras colágenas; célula gigante (cg)

Quadro D) campo 3 - 400X - HE: observar tecido conjuntivo fibroso com poucas células mononucleares

ANEXO II

Tabela 1 - **GRUPO CONTROLE**

Média dos elementos constituintes da reação inflamatória no subcutâneo de ratos - apresentação por campo.

períodos	2 dias			7 dias			14 dias			30 dias		
CAMPOS →	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
POLIMORFONUCLEARES	11,33 (3,51)	5,66 (6,03)	5,00 (5,29)	5,00 (4,36)	0,67 (1,16)	zero	zero	zero	zero	0,67 (1,16)	0,67 (1,16)	zero
MONONUCLEARES	106,67 (23,09)	96,00 (15,09)	100,00 (20,00)	283,33 (28,87)	190,00 (52,92)	63,33 (5,77)	320,00 (zero)	233,33 (41,63)	39,33 (11,02)	230,67 (19,01)	36,00 (5,29)	36,33 (1,53)
CÉLULAS GIGANTES	zero	zero	zero	zero	2,33 (4,04)	zero	zero	zero	zero	zero	zero	zero
VASOS HIPERÊMICOS	zero	1,33 (0,58)	4,00 (2,65)	1,33 (0,58)	0,67 (0,58)	2,33 (0,58)	2,00 (1,00)	2,66 (0,58)	0,67 (1,16)	1,33 (0,58)	0,33 (0,57)	zero
VASOS PROLIFERAÇÃO	zero	zero	zero	6,33 (8,51)	4,33 (3,79)	1,00 (1,73)	6,00 (1,00)	zero	zero	0,33 (0,58)	zero	zero

. números entre parênteses, (), referem-se ao desvio padrão da média, conforme análise ⁴¹

Tabela 2 - **GRUPO EXPERIMENTAL**

Média dos elementos constituintes da reação inflamatória no subcutâneo de ratos - apresentação por campo.

períodos	2 dias			7 dias			14 dias			30 dias		
CAMPOS →	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
POLIMORFONUCLEARES	49,00 (43,84)	14,00 (12,17)	21,00 (5,57)	8,00 (4,36)	1,67 (2,89)	0,33 (0,58)	41,67 (7,64)	5,67 (2,52)	3,33 (3,22)	15,33 (2,52)	0,67 (1,16)	zero
MONONUCLEARES	155,00 (91,92)	113,33 (11,55)	111,67 (20,21)	218,33 (34,03)	146,67 (117,19)	75,00 (25,00)	273,33 (25,17)	323,33 (11,55)	260,00 (70,00)	310,66 (10,07)	280,67 (9,02)	171,67 (22,54)
CÉLULAS GIGANTES	zero	zero	zero	zero	zero	zero	1,00 (1,73)	zero	zero	zero	0,67 (1,16)	zero
VASOS HIPERÊMICOS	1,33 (2,31)	1,67 (1,53)	3,00 (1,00)	3,00 (3,00)	4,33 (4,04)	0,67 (1,16)	3,33 (3,22)	3,67 (0,58)	4,67 (0,58)	1,00 (1,00)	zero	zero
VASOS PROLIFERAÇÃO	zero	zero	zero	zero	zero	zero	3,33 (3,51)	2,33 (2,52)	0,33 (0,58)	13,33 (1,53)	0,67 (1,16)	zero

números entre parênteses, (), referem-se ao desvio padrão da média, conforme análise ⁴¹

Tabela 3 - Médias dos elementos constituintes da reação inflamatória no subcutâneo de ratos - apresentação por lesão
Comparação entre os Grupos Controle x Experimental

períodos	2 dias	7 dias	14 dias	30 dias
	médias	médias	médias	médias
POLIMORFONUCLEARES				
. controle	7,3333	1,8889	zero	0,4445
. experimental	28,0000	3,3333	16,8889	5,3333
MONONUCLEARES				
. controle	100,8889	178,8889	197,5555	101,0000
. experimental	126,6667	146,6667	285,5555	254,3334
CÉLULAS GIGANTES				
. controle	zero	0,7778	zero	zero
. experimental	zero	zero	0,3333	0,2222
VASOS HIPERÊMICOS				
. controle	1,7778	1,4444	1,7778	0,5555
. experimental	2,0000	2,6667	3,8889	0,3333
VASOS PROLIFERAÇÃO				
. controle	zero	3,8889	2,0000	0,1111
. experimental	zero	zero	2,0000	4,6667

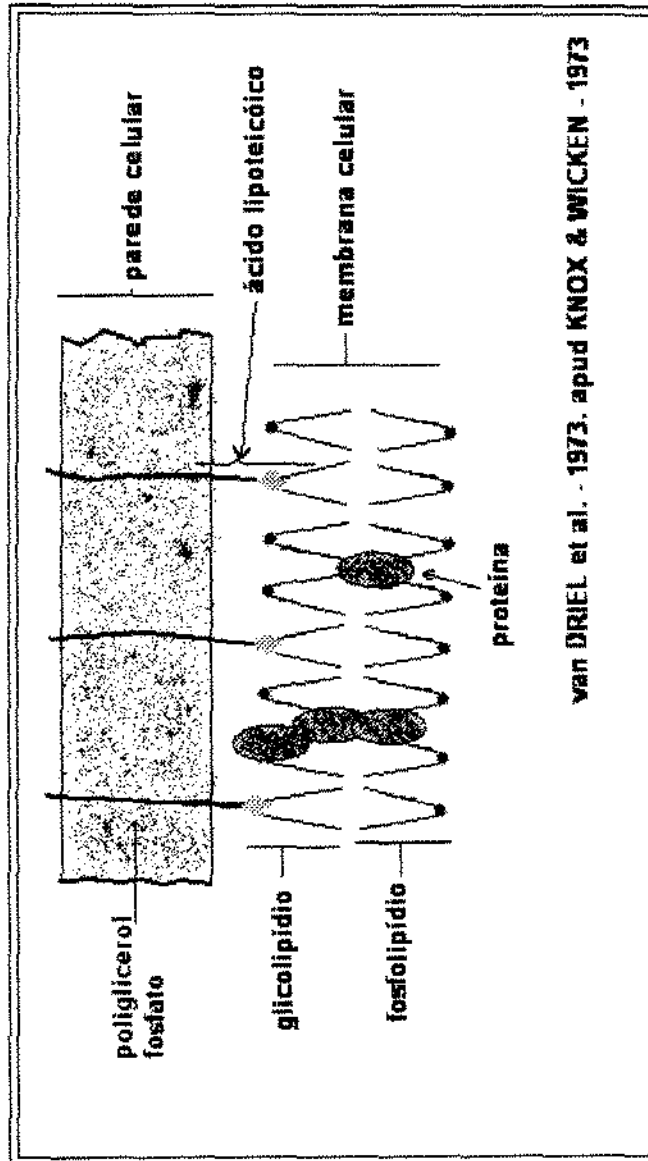
Tabela 4 - Médias dos elementos constituintes da reação inflamatória no subcutâneo de ratos - apresentação por campo
Comparação entre os Grupos Controle x Experimental

períodos	2 dias			7 dias			14 dias			30 dias		
CAMPOS →	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
POLIMORFONUCLEARES			S				S	S		S		
. controle	11,33	5,67	5,00	5,00	0,67	zero	zero	zero	zero	0,67	0,67	zero
. experimental	49,00	14,00	21,00	8,00	1,67	0,33	41,67	5,67	3,33	15,33	0,67	zero
MONONUCLEARES							S	S	S	S	S	S
. controle	106,67	96,00	100,00	283,33	190,00	63,33	320,00	233,33	39,33	230,67	36,00	36,33
. experimental	155,00	113,33	111,67	218,33	146,67	75,00	273,33	323,33	260,00	310,67	280,67	171,67
CÉLULAS GIGANTES												
. controle	zero	zero	zero	zero	2,33	zero	zero	zero	zero	zero	zero	zero
. experimental	zero	zero	zero	zero	zero	zero	1,00	zero	zero	zero	0,67	zero
VASOS HIPERÊMICOS									S			
. controle	zero	1,33	4,00	1,33	0,67	2,33	2,00	2,67	0,67	1,33	0,33	zero
. experimental	1,33	1,67	3,00	3,00	4,33	0,67	3,33	3,67	4,67	1,00	zero	zero
VASOS PROLIFERAÇÃO										S		
. controle	zero	zero	zero	6,33	4,33	1,00	6,00	zero	zero	0,33	zero	zero
. experimental	zero	zero	zero	zero	zero	zero	3,51	2,33	0,33	13,33	0,67	zero

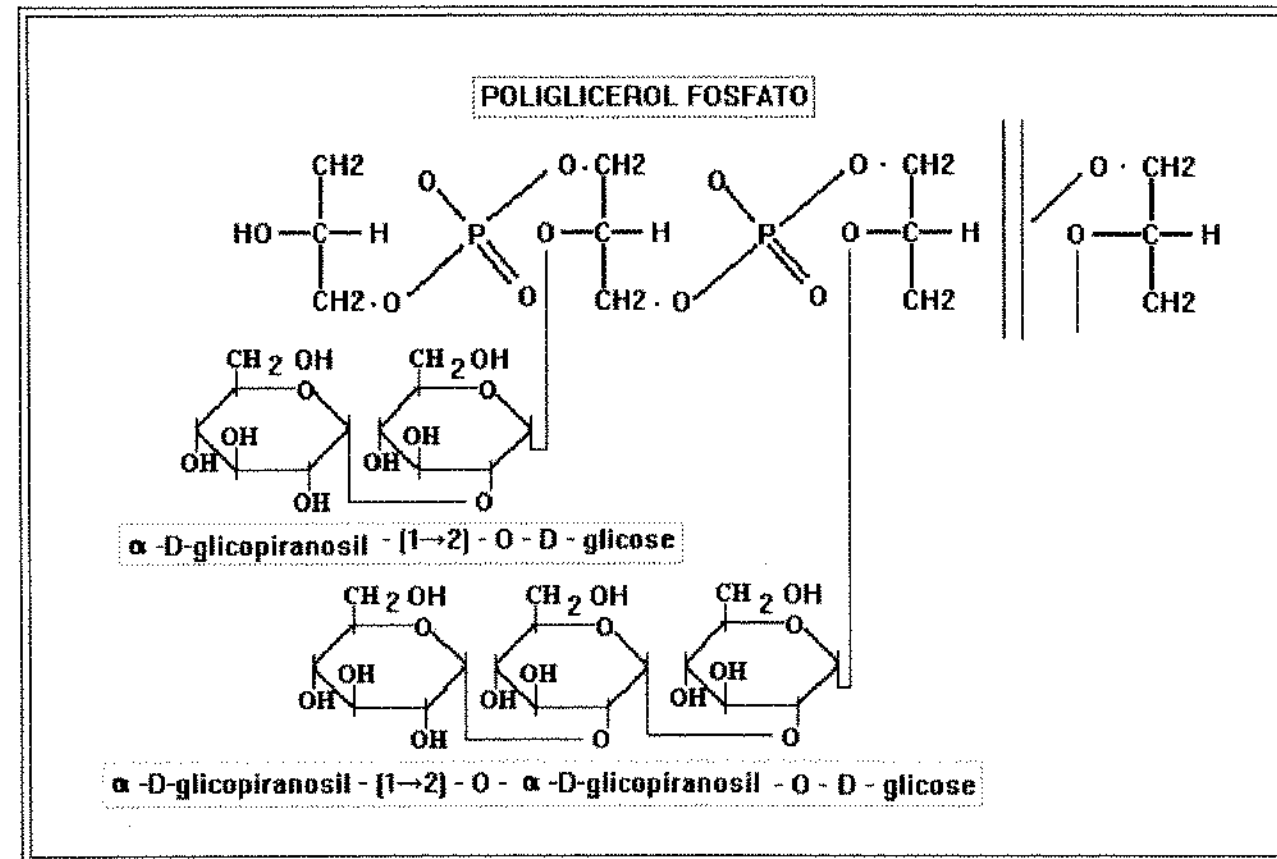
. a letra "S" na parte superior de alguns quadros identifica diferença estatisticamente significativa, ao nível de 5% ($p < 0,05$), entre os dados dos grupos controle x experimental, conforme análise realizada⁴¹.

ANEXO III

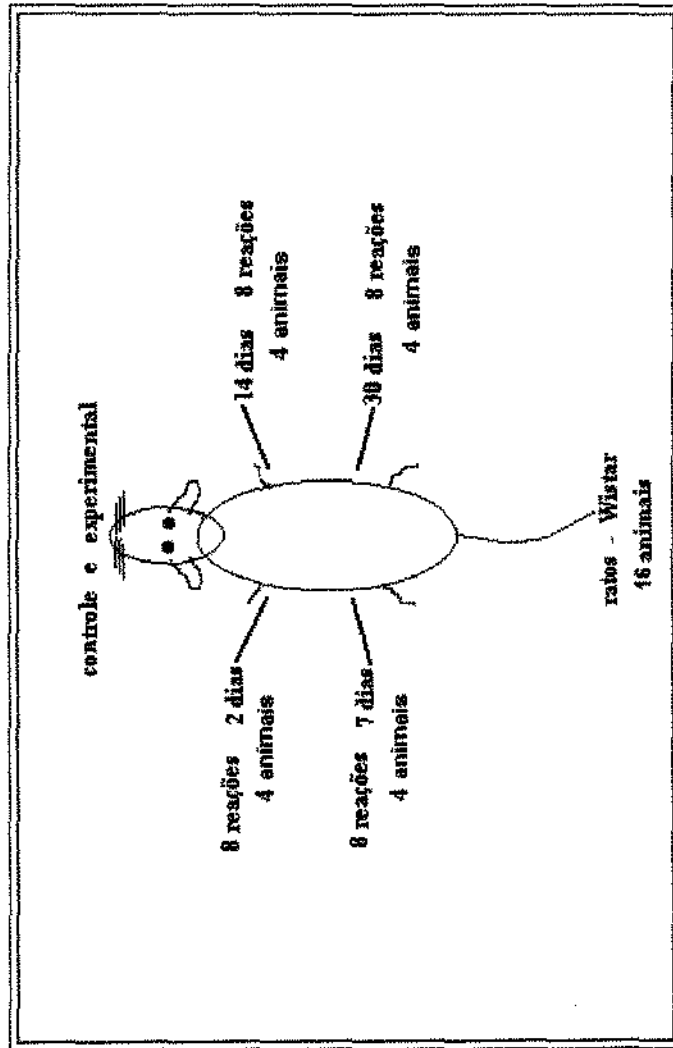
ESQUEMA 1 - Localização do ácido lipoteicoico na estrutura bacteriana



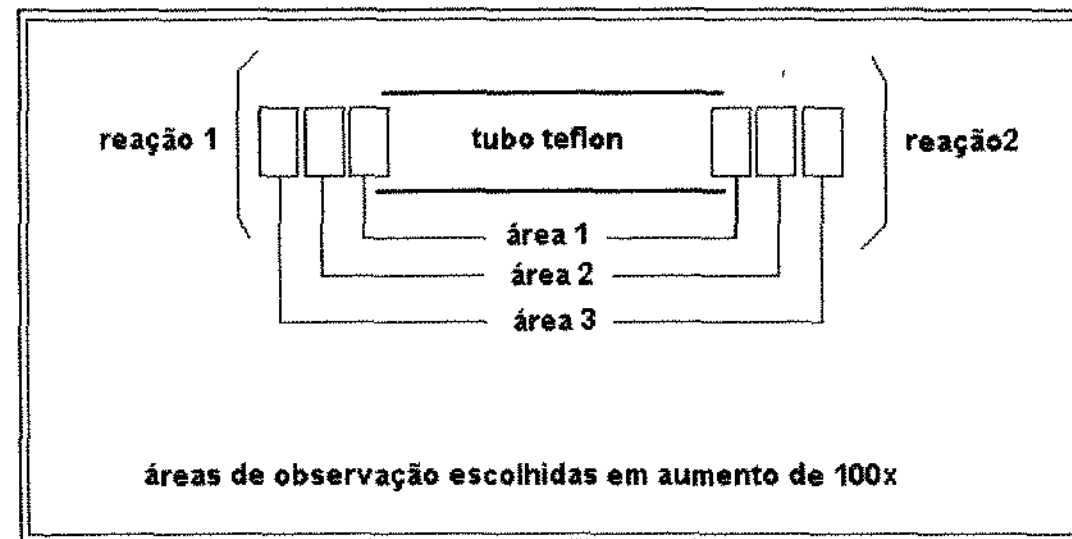
ESQUEMA 2 - Parte hidrofílica (polissacarídica) da molécula de ácido lipoteicoico



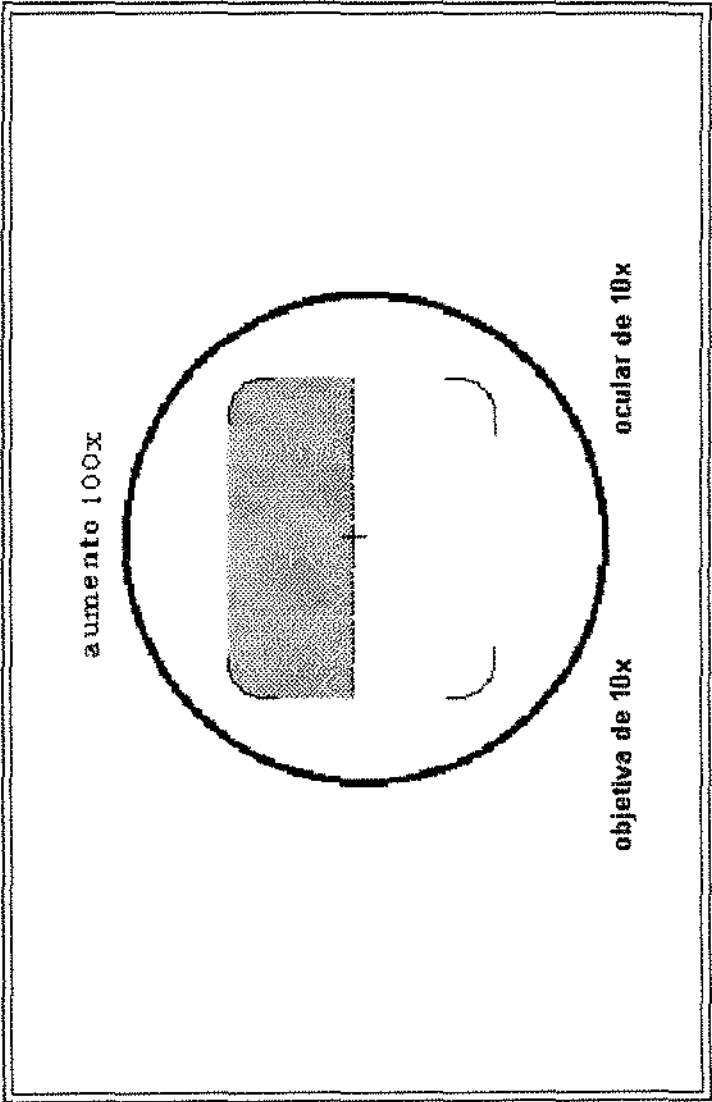
ESQUEMA 3 - Apresentação dos animais conforme os períodos de observação



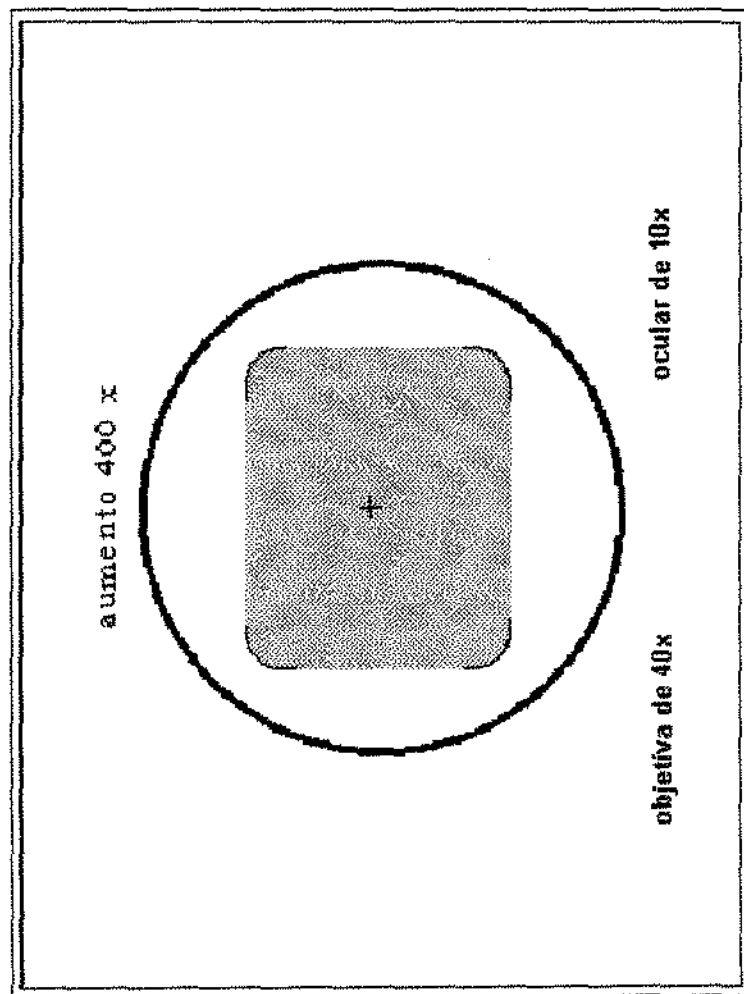
ESQUEMA 4 - Áreas de análise das lesões nas extremidades do implante do tubo de teflon



ESQUEMA 5 - Definição da área para escolha do campo de contagem das células



ESQUEMA 6 - Definição do campo de contagem das células



SUMMARY

The infection of the root canal system is made by several types of microorganisms, being known as polymicrobial infection. Such conditions allows the production of factors, essential for the start and development of the periapical lesions. One of these factors is the lipoteichoic acid. This chemical by product has characteristics that enhances its action as immunogen.

Sixteen rats (albinus - Wistar) were used. Implant of teflon tubes were inserted in the back of the animals. In the left side, the teflon tube was filled with Fibrinol (control group) and in the right side the Fibrinol was wet with lipoteichoic acid (150 µg/ml). The animals were killed after 2, 7, 14 and 30 days, and the tissues with the implants were removed. The laboratorial procedure was done of the specimens fixed with formol buffered. Slides of 6 µm of thickness were made and stained with hematoxilin and eosin.

The results showed that the lipoteichoic acid, in the concentration evaluated, promotes inflammatory reaction in the subcutaneous tissue of the rat.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERGENHOLTZ, G. Effect of bacterial products on inflammatory reactions in the dental pulp. **Scand. J. Dent. Res.**, 85:122-9, 1977.
2. BERGENHOLTZ, G., LEKHOLM, U., LILJENBERG, B., LINDHE, J. Morphometric analysis of chronic inflammatory periapical lesions in root-filled teeth. **Oral Surg.**, 55(3):295-301, março, 1983.
3. BLECHMAN, H. Infections of pulp and periapical tissues. *In*: NOLTE, W. A. **Oral microbiology**. 3 ed. Saint Louis: C.V. Mosby Company, 1977. cap. 20, p. 535-58.
4. BROIDE, D. H. Células inflamatórias. *In*: STITES, D. P. & TERR, A. I. **Imunologia básica**. Rio de Janeiro: Prentice-Hall, 1992. cap.12, p.109-18.
5. BROOK, I., FRAZIER, E. H., GHER, M.E. Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscess. **Oral Microbiol. Immunol.**, 6:123-25, 1991.
6. BURNETT, G. W., SCHERP, H. W., SCHUSTER, G. S. Estreptococos e infecções estreptocócicas. *In*: **Microbiologia oral e doenças infecciosas**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1978. cap.22, p.411-25.
7. CARD, G.L., JASUJA, R.R., GUSTAFSON, G.L. Activation of arachidonic acid metabolism in mouse macrophages by bacterial amphiphiles. **J. Leukoc. Biol.**, 56(6):723-8, dezembro, 1994.

8. CATANZARO GUIMARÃES, S. A. Inflamação. *In: _____*. **Patologia básica da cavidade bucal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. cap. 7, p. 197-281.
9. COTRAN, R. S., KUMAR, V., ROBBINS, S. L. Inflamação e reparo. *In: Robbins Patologia estrutural e funcional*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1991. cap 2, p. 33-59.
10. DAHLÉN, G., HOFSTAD, T. Endotoxic activities of lipopolysaccharides of microorganisms isolated from na infected root canal in *Maccaca cynomolgus*. **Scand. J. Dent. Res.**, 85:272-8, 1977.
11. De VUONO, J., PANOS, C. Effect of L-Form *Streptococcus pyogenes* and of lipoteichoic acid on human cells in tissue culture. **Infect. Immun.**, 22(1):255-65, outubro, 1978.
12. FISCHER, W., KOCH, U.H., HAAS, R. Improved preparation of lipoteichoic acids. **Eur. J. Biochem.**, 133:523-30, 1983.
13. FISH, E.W. Bone infection. **J.Am.Dent.Assoc.**, 26(5):691-712, maio, 1939.
14. FUKUSHIMA, H., YAMAMOTO, K., HIROHATA, K., SAGAWA, H., LEUNG, K-P., WALKER, C.B. Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. **J. Endod.**, 16(11):534-38, novembro, 1990.
15. GOLDSTEIN, J. Microbiologia do endodonto. *In: INGLE, J.I., TAINTOR, J.F. Endodontia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1989. cap.11, p.471-9.

16. GOODMAN, J. W. Imunogenicidade e especificidade antigênica. *In*: STITES, D. P., TERR, A. I. **Imunología Básica**. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil, 1992. cap. 8, p.79-84.
17. HAMMOND, B. S. Major bacterial diseases. *In*: SLOT, J., TAUBMAN, M. A. **Contemporary oral microbiology and immunology**. St.Louis: Mosby Company, 1992. cap.11, p.165-70.
18. HAUSMANN, E., LÜDERITZ, O., KNOX, K., WEINFELD, N. Structural requirements for bone resorption by endotoxin and lipoteichoic acid. **J. Dent. Res.**, 54:B94-B99, 1975. *Special issue B*.
19. HENRICI, A. T., HARTZELL, T. B. The bacteriology of vital pulps. **J. Dent. Res.**, 1: 419, 1919.
20. HILL, T.J. Experimental dental granulomas in dogs. **J.Am.Dent.Assoc.**, 1389-98, agosto, 1932.
21. HUMMELL, D. S., SWIFT, A. J., TOMASZ, A., WINKELSTEIN, J.A. Activation of the alternative complement pathway by pneumococcal lipoteichoic acid. **Infect. Immun.**, 47(2):384-87, fevereiro, 1985.
22. HUNTER, N., SCHWAB, J.H., SIMPSON, D.M. Experimental periodontitis induced in rats by streptococcal cell wall fragments. **J. Periodontal Res.**, 14:453-66, 1979.
23. INGLE, J.I., LANGE LAND, K. Etiologia e prevenção da inflamação pulpar, necrose e distrofia. *In*: INGLE, J.I., TAINTOR, J.F. **Endodontia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1989. cap.6, p.291-330.

24. JAWETZ, E., MELNICK, J. L., ADELBURG, E. A. Estrutura da célula.
In: _____. **Microbiologia médica**. 15 ed. Rio de Janeiro:
Guanabara, 1988. cap.2, p.6-27.
25. KAKEHASHI, S., STANLEY, H.R., FITZGERALD, R.J. The effects of
surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional
laboratory rats. **Oral Surg.**, 20(3):340-9, 1965.
26. KELLER, R., FISCHER, W., KEIST, R., BASSETTI, S. Macrophage
response to bacteria: Induction of marked secretory and cellular
activities by lipoteichoic acids. **Infect. Immun.**, 60(9):3664-72, 1992.
27. KNOX, K.W., WICKEN, A.J. Immunobiological properties of teichoic
acids. **Bacter. Rev.**, 37(2):215-57, janeiro, 1973.
28. LANGELAND, K., BLOCK, R.M. A histologic and histobacteriologic study
of 35 periapical endodontic surgical specimens. **J.Endod.**, 3(1):8-23,
janeiro, 1977.
29. LOOS, M., CLAS, F., FISCHER, W. Interaction of purified lipoteichoic
acid with the classical complement pathway. **Infect. Immun.**,
53(3):595-99, setembro, 1986.
30. MARKHAM, J.L., KNOX, K.W., SCHAMSHULA, R.G., WICKEN, A.J.
Antibodies to teichoic acids in man. **Archs.Oral Biol.**, 18:313-19,
1973.
31. MIMS, C.A., PLAYFAIR, J. H. L., ROITT, I. M., WAKELIN, D., WILLIAMS,
R. Os organismos. In: _____. **Microbiologia médica**. São Paulo:
Manole, 1995. cap 3.

32. _____. Consequências patológicas da infecção. *In*: _____, **Microbiologia médica**. São Paulo: Manole, 1995. cap.16.
33. MONTENEGRO, M. R., FECCHIO, D. Inflamação: Conceitos gerais e inflamação aguda. *In*: _____, FRANCO, M. **Patologia: Processos gerais**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1995. cap.6, p.99-117.
34. NAIDORF, I. J. Correlation of the inflammatory response with immunological and clinical events. **J. Endod.**, 3(6):223-8, junho, 1977.
35. NAIR, P.N. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. **J.Endod.**, 13(1):29-30, janeiro, 1987.
36. OGUNTEBI, B., SLEE, A. M., TANZER, J. M., LANGELAND, K. Predominant microflora associated with human dental periapical abscesses. **J. Clin. Microbiol.**, 15(5):964-66, maio, 1982.
37. OKAMOTO, T., ZARDO, V.A.O.Q., ZARDO, M., ALVES-REZENDE, M.C.R., CALLESTINI, E.A. Implante de esponja de fibrina em alvéolos dentais. **Rev. Gaúcha Odont.**, 42(1):37-43, janeiro/fevereiro, 1994.
38. PINERO, G.J., KIATPONGSAH, S., HUTCHINS, M. O., HOOVER, J. The effect of endotoxin on the synthesis os connective tissue matrix components by pulp fibroblasts in vitro. **J. Endod.**, 9(1):2-7, janeiro, 1983.
39. PITTS, D. L., WILLIAMS, B. L., MORTON, T. H. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. **J.Endod.**, 8(1):10-8, janeiro, 1982.

40. ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Imunologia**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1992. cap. 2.
41. SAS INSTITUTE INC. **User's guide - version 6.04**. 4 ed. Cary, SAS Institute Inc., 1990. 1689p.
42. SCHEIN, B., SCHILDER, H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. **J. Endod.**, 1(1):19-21, janeiro, 1975.
43. SCHONFELD, S. E., GREENING, A. B., GLICK, D. H., FRANK, A. L., SIMON, J. H., HERLES, S. M. Endotoxic activity in periapical lesions. **Oral Surg.**, 53(1):82-7, janeiro, 1982.
44. SELTZER, S., FARBER, P.A. Microbiologic factors in endodontology. **Oral Surg.**, 78:634-45, novembro, 1994.
45. SMITH Jr., L.H., THIER, S.O. Doenças infecciosas: mecanismos patogênicos e respostas do hospedeiro. *In: _____*, **Fisiopatologia: os princípios biológicos da doença**. 2 ed. São Paulo: Panamericana, 1990. cap. 4, p.126-57.
46. SOUZA FILHO, F. J., VALDRIGHI, L., BERNARDINELLI, N. Influência do nível da obturação e do alargamento do forame apical no processo de reparo tecidual. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, 50(2):175-77, março/abril, 1996.
47. STABHOLZ, A., SELA, M. N. The role of oral microorganisms in the pathogenesis of periapical pathosis. I. Effect os *Streptococcus mutans* and its cellular constituents on the dental pulp and periapical tissue of cats. **J. Endod.**, 9(5):171-5, maio, 1983.

48. STERN, M. H., DREIZEN, S., MACKLER, B. F., SELBST, A. G., LEVY, B. M. Quantitative analysis of cellular composition of human periapical granuloma. **J. Endod.**, 7(3):117-22, março, 1981.
49. STOCK, C. J. R., GULABIVALA, K., WALKER, R. T., GOODMAN, J. R. Bases biológicas para Endodontia. *In*: _____. **Atlas colorido e texto de Endodontia**. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1996. cap.1, p.1-38.
50. SUNDQVIST, G., JOHANSSON, E., SJÖGREN, U. Prevalence of black-pigmented Bacteroides species in root canal infections. **J. Endod.**, 15(1):13-19, janeiro, 1989.
51. SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. **J. Endod.**, 18(9):427-30, setembro, 1992.
52. TERR, A I. Mecanismos da Inflamação. *In*: STITES, D.P., _____. **Imunologia Básica**. Rio de Janeiro: Prentice-Hall, 1992. cap.11, p.102-8.
53. TOPAZIAN, R. G., GOLDBERG, M. H. **Oral and maxillofacial infections**. 3 ed. Saunders Company, 1994. cap. 2, p. 59- .
54. TORABINEJAD, M., BAKLAND, L.K. Immunopathogenesis of chronic periapical lesions. **Oral Surg.**, 46(5):685-99, novembro, 1978.
55. TORNECK, C. D. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants: Part I. **Oral Surg.**, 21(3):379-87, março, 1966.
56. TROWBRIDGE, H. O. Immunological aspects of chronic inflammation and repair. **J. Endod.**, 16(2):54-61, fevereiro, 1990.

57. TROWBRIDGE, H.O., EMLING, R.C. **Inflamação: Uma revisão do processo.** 4 ed. São Paulo: Quintessence Publishing, 1996. 172p.
58. van DRIEL, D., WICKEN, A.J., DICKSON, M.R., KNOX, K.W. Cellular location of the lipoteichoic acids of *Lactobacillus fermenti* NCTC 6991 and *Lactobacillus casei* NCTC 6375. **J. Ultrastruct. Res.** 1973. *Apud* KNOX, K.W., WICKEN, A.J. *Op. Cit.* Ref.27.
59. WALTON, R. E., ARDJMAND, K. Histological evaluation of the presence of bacteria induced periapical lesions in monkeys. **J. Endod.**, 18(5):216-21, maio, 1992.
60. WARFVINGE, J., DAHLÉN, G., BERGENHOLTZ, G. Dental pulp response to bacterial cell wall material. **J. Dent. Res.**, 64(8):1046-50, agosto, 1985.
61. WEINREB, B. D., SHOCKMAN, G. D., BEACHEY, E. H., SWIFT, A. J., WINKELSTEIN, J. A. The ability to sensitize host cells for destruction by autologous complement is a general property of lipoteichoic acid. **Infect. Immun.**, 54(2):494-99, novembro, 1986.
62. WICKEN, A. J., BADDILEY, J. Structure of intracellular teichoic acids from Group D Streptococci. **Biochem. J.**, 87:54-62, 1963.
63. WINKLER, K.C., van AMERONGEN, J. Bacteriologic results from 4,000 root canal cultures. **Oral Surg.**, 12(7):857-75, 1959.
64. YANAGISAWA, S. Pathologic study of periapical lesions 1: periapical granulomas: clinical, histopathologic and immunohistopathologic studies. **J. Oral Pathol.**, 9:288-300, 1980.