UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

HELENA ROSA CAMPOS RABANG

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE CANAIS RADICULARES E RADIOGRÁFICA DE DENTES DE CÃES COM LESÃO PERIAPICAL INDUZIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Clínica Odontológica – Área de Endodontia

PIRACICABA

2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

HELENA ROSA CAMPOS RABANG

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE CANAIS RADICULARES E RADIOGRÁFICA DE DENTES DE CÃES COM LESÃO PERIAPICAL INDUZIDA

Este exemplar foi devidamente corrigido, de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 17/6/03
Assinatura do Orientador

30033093

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Clínica Odontológica – Área de Endodontia

Orientador: **PROF. DR. FRANCISCO JOSÉ DE SOUZA FILHO**

Banca Examinadora:

PROF. DR. FRANCISCO JOSÉ DE SOUZA FILHO

PROFª. DRª BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

PROF. DR. MILTON DE UZEDA

PIRACICABA

2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE FOC
Nº CHAMADA T/Unicamp
R 112a
V EX
TOMBO BC/ 57771
PROC. 16/124/03
C D
PREÇO R$ 11,00
DATA
Nº CPD

CM00189204-3

Bib id 301164

Ficha Catalográfica

R112a

Rabang, Helena Rosa Campos.
Análise microbiológica de canais radiculares e radiográfica de dentes de cães com lesão periapical induzida. / Helena Rosa Campos Rabang. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2003.
xxxiii, 153p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. 2. Cão como animal de laboratório. 3. Bactérias. I. Souza Filho, Francisco José de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8–6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

UNICAMP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 11 de Março de 2003, considerou a candidata HELENA ROSA CAMPOS RABANG aprovada.

1. Prof. Dr. FRANCISCO JOSE DE SOUZA FILHO

2. Prof. Dr. MILTON DE UZEDA

3. Profa. Dra. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

290330428

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Senhor,

tu chegas ao mais profundo
de mim e me conheces por dentro.
Sabes quando me detenho ou quando não sei
o que fazer;
entendes minhas ilusões e meus desejos como se
fossem teus;
em meu caminho puseste uma trilha,
em meu descanso te sentaste a meu lado;
tocaste todos os meus projetos palmo a palmo.

Salmo 139

A Ti, Senhor,
agradeço por Tudo, e
dedico, em louvor, este trabalho.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

*A **família** continua a ser a fonte primeira e principal*
de nossa personalidade e de nossa educação,
o lugar onde recebemos esse "pão de carinho"
que nos vai fazendo crescer e viver.

Manuel Madueño

Aos meus amados pais, Gilberto e Irene,

que por amor me tiveram,
sustentando-me infinitamente desde minha concepção e sempre.

Dorme, ***filha minha.***

Olha: entre os ramos adormeceu o vento... Dorme.
Se ao despertar não me encontrares, eu te falarei ao longe;
uma aurora sem sol virá a deixar-te
meu invisível beijo;
dorme; me chamam, concilia o sono.

Juan Zorrilla de San Martín

A minha querida filha Stephanie,

who will always be my litlle BABY,
for giving me the strentgh when I needed it and overcoming my physical abcense. You are my blessed sunshine!

Time is

Too slow for those who wait,

Too short for those who rejoice;

But for those who ***Love*** *... time is not.*

Henry van Dyke

To my beloved husband Peter,
to whon I gave my vow of a sharing life,
for the many storms we have weathered,
may the Lord keep our blessed marriage, which was meant to be.

Ser Mestre é um ato de fé.
Fé na possibilidade de mudar o mundo educando,
fé no indivíduo, fé na supremacia da riqueza intelectual.
Ser mestre é um ato de amor.
Porque a entrega de si está implícita na tarefa, porque se dá com as mãos cheias sem esperar retribuição.
Ser mestre é ser um sonhador.
Crer, mais além desta época frívola e céptica,
no espírito do homem. E crer que algum dia,
ao final do caminho, poderemos transferir esta tocha a um discípulo, outro sonhador.

Lídia Maria Riba

Ao meu estimado orientador,

Profº. Dr. Francisco de Souza Filho,
por ter incentivado a concretização de meu antigo sonho de ser mestre,
pela honra e oportunidade ímpar de ser sua discípula e admiradora.

Agradeço, especialmente...

À Profª Drª Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes,
admirada por sua completa dedicação a pesquisa e ao ensino,
sendo ainda exemplo de Mãe e Esposa.

Ao Profº. Dr. Luiz Valdrighi,
estimado por sua capacidade, conhecimento científico,
e receptividade ao intercâmbio de ensino com a Marinha.

A todos os diletos professores que participaram e incentivaram minha formação,
em especial, e como símbolo maior de amizade,
ao meu querido Profº George Antonio Fonseca.

Meu amigo *é um porto onde passo as tempestades.*
Um oásis verde em meio aos meus desertos.
Meu amigo é um vale repleto de flores
onde busco a cor e o aroma da vida.
Meu amigo é às vezes um silêncio insondável
que devo aprender a respeitar.
Meu amigo é um cume de onde posso olhar sem cair.
Meu amigo é o poço almofadado onde caio sem me ferir.

Tato Ortega

Agradeço...

A todos os meus Amigos, do passado e do presente,
principalmente aqueles que tornaram este momento ainda mais enriquecido
e possível.

Agradeço,

À FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, nas pessoas de seu Diretor, Profº. Dr. THALES ROCHA DE MATTOS FILHO, e de seu Diretor Associado, Profº. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA, pela receptividade, profissionalismo e espírito científico com que nos formaram.

À COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA FOP-UNICAMP, na pessoa do Profº. Dr. LOURENÇO CORRER SOBRINHO, pela seriedade com que conduz o seu trabalho.

À COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CLÍNICA ODONTOLÓGICA, na pessoa da Profª. Drª. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES, pelo empenho e dedicação em suas atividades.

Ao Chefe do DEPARTAMENTO DE DENTÍSTICA RESTAURADORA e Responsável pela DISCIPLINA DE ENDODONTIA da FOP-UNICAMP, Profº. Dr. FRANCISCO JOSÉ DE SOUZA FILHO, pela profunda confiança que nos tem depositado, e pela inestimável oportunidade que nos proporcionou de realizar este curso.

Aos Membros da BANCA DE QUALIFICAÇÃO desta dissertação: Profº. Dr. LUIZ VALDRIGHI, Profª. Drª. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES, e Profº. Dr. ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA, pela avaliação detalhada e profunda contribuição no enriquecimento deste trabalho.

Aos professores da área de ENDODONTIA da FOP-UNICAMP, Profº. Dr. FRANCISCO JOSÉ DE SOUZA FILHO, Profº. Dr. ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA, Profª. Drª. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES, Profº. Dr. FABRÍCIO BATISTA TEIXEIRA, e Profº. Dr. CAIO RANDI FERRAZ, pelo apoio durante nossa instalação na cidade, incentivo, e espírito de amizade com que nos conduziram ao longo do curso.

Aos professores do CURSO DE APERFEIÇOAMENTO EM MICROBIOLOGIA da FOP-UNICAMP, Profº. Dr. JOSÉ FRANCISCO HÖFLING e Profº. Dr. REGINALDO BRUNO GONÇALVES, assim como ao técnico de laboratório ANDERSON LAERTE TEIXEIRA, por todo apoio, ensinamento e estima que nos dispensaram.

Aos Srs. Ex-Diretor da FOP-UNICAMP, Profº. Dr. ANTÔNIO WILSON SALLUM; Ex-Diretor-Associado da FOP-UNICAMP, Profº. Dr. FRAB NORBERTO BÓSCOLO; e Ex-Coordenadora de PÓS-GRADUAÇÃO da FOP-UNICAMP, Profª. Drª. ALTAIR DEL BEL CURY, pelo dedicado trabalho que desenvolveram durante suas atividades.

Aos meus estimados colegas e amigos do Curso de Mestrado: DANIEL PINTO DE OLIVEIRA, DOUGLAS GIORDANI CORTEZ, FÁBIO ROBERTO DAMETTO, IADASA DE QUADROS, MORGANA ELI VIANNA, NILTON VIVACQUA GOMES, e ROGÉRIO DE CASTILHO JACINTO, pelo alegre convívio, pela força e carinho constantes, e ainda pela oportunidade de crescer pessoal e profissionalmente.

Aos meus estimados companheiros e amigos do Curso de Doutorado, ADELMO MORAES DE SOUZA FILHO, ALEXANDRE ROBERTO HECK, CÍCERO ROMÃO GADÊ NETO, EDUARDO DIOGO GURGEL FILHO, EGAS MONIZ DE ARAGÃO, ERICKA TAVARES PINHEIRO, EUDES GONDIM JUNIOR, EZILMARA LEONOR ROLIM DE SOUSA, JÚLIO CESAR BENTO DOS SANTOS, e RONALDO ROGÉRIO RODRIGUES, pela constante demonstração de companheirismo e colaboração, e oportunidade de enriquecimento técnico e científico.

Aos demais colegas dos cursos de pós-graduação da FOP-UNICAMP, em especial a MARLISE INÊZ KLEIN, ANA CLÁUDIA BRAGA AMORAS ALVES e JANAÍNA APARECIDA OLIVEIRA RODRIGUES, da MICROBIOLOGIA, e ROGÉRIO HELÁDIO LOPES MOTTA da FARMACOLOGIA, pelo apoio e ensinamento; ao FÁBIO HIROYUKI OGATA MITSUI e ALESSANDRA REZENDE PERIS, da DENTÌSTICA, pela parceria em trabalho clínico; a MARIA CAROLINA GUILHERME ERHARDT, da DENTÍSTICA, pelo carinhoso convívio; ao GUSTAVO JACOBUCCI FARAH, da CIRURGIA, pela parceria em trabalho clínico; e a ANGELA GUIMARÃES MARTINS, ANTONIETA DE QUEIROZ CORTÊS e SUZANA PERES PIMENTEL, da PERIODONTIA, pela parceria e amizade.

A todos os alunos da graduação da FOP-UNICAMP, pela alegria do convívio e amizade que desenvolvemos ao longo destes dois anos, em especial a REINALDO CORRÊA DE MELLO, LUIZ GUSTAVO PINHEIRO DA SILVA, FREDERICO MARQUES LIMA DOS SANTOS, e MAURÍCIO DOS SANTOS LEMOS, pela parceria em desenvolvimento e apresentação de trabalhos.

Às estagiárias da Endodontia, NEYLLA TEIXEIRA SENA e MARAISA DELBONI; e aos alunos de Iniciação Científica, FERNANDA SIGNORETTI, DÉBORA DE ALMEIDA, PATRICK WILSON QUELLIS BALTIERE, e DANILA MOLINA ZILO, pelo convívio alegre e saudável, e constante oportunidade de aprendizado.

Aos funcionários da ENDODONTIA, DENIZE LUMENA DE PINHO, MARIA APARECIDA BUSCARIOL, RUBENS MARQUES PAYÃO, ADAILTON DOS SANTOS LIMA e MARIA APARECIDA RIVA ROVAY, pelo carinho e auxílio sempre presentes.

Às secretárias da COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA FOP-UNICAMP, SÔNIA MARIA LORDELLO ARTHUR e ÉRICA ALESSANDRA PINHO, pelo constante e atencioso atendimento.

À secretária da PÓS-GRADUAÇÃO em CLÍNICA ODONTOLÓGICA DA FOP-UNICAMP, MÔNICA APARECIDA BARNABÉ, por sempre nos atender com carinho.

Aos demais funcionários da FOP-UNICAMP, por toda atenção prestada, pela alegria do convívio em experiência ímpar de trabalho. Desde os técnicos até o pessoal que cuida da limpeza, todos sempre alegres, e eficientes na condução de suas tarefas; especialmente LÍDIA, ROSA, JANAÍNA, CECÍLIA, FERNANDO e MAURINHO, na CLÍNICA DE GRADUAÇÃO, e a também querida CIDA, na TELEFONIA.

Aos pacientes da FOP-UNICAMP, pela oportunidade de evoluir profissional e pessoalmente com o seu convívio e atendimento.

Às bibliotecárias MARILENE GIRELLO e HELOÍSA MARIA CECCOTI, e funcionários da BIBLIOTECA da FOP-UNICAMP, LUCIANE APARECIDA DUARTE SATTOLO, DORALICE NASCIMENTO LEAL ROMANO (DORINHA), LOURDES FERNANDES MARIN, APARECIDA CASSIERI DA CRUZ, e ELISEO APARECIDO BERTTI, pela atenção, amizade e carinho sempre presentes em todos os momentos.

Aos funcionários do BIOTERIO, WANDERLEI FRANCISCO VIEIRA e ZULEICA PAES, pelo empenho no desenvolvimento diário da árdua tarefa de manter as instalações e os animais em perfeitas condições, e por toda atenção e cuidados que sempre nos dispensaram.

Aos colegas CC (CD) BOTELHO e CT (CD) PIRES, companheiros da MARINHA, que conosco cursaram, pelo brilhante desempenho da missão que lhes foi confiada.

Aos meus parceiros de orientação aos oficiais-alunos do CURSO DE APERFEIÇOAMENTO EM ENDODONTIA da ODONTOCLÍNICA CENTRAL DA MARINHA, FÁBIO ROBERTO DAMETTO, IADASA DE QUADROS, e ROGÉRIO DE CASTILHO JACINTO, pela valiosa colaboração e apoio irrestrito aos nossos projetos.

Aos meus colaboradores, CÍCERO ROMÃO GADÊ NETO, ERICKA TAVARES PINHEIRO, IADASA DE QUADROS, FLAVIANA BOMBARDA DE ANDRADE FERREIRA e ROGÉRIO DE CASTILHO JACINTO, por tudo!

Aos estimados professores de ENDODONTIA, que acreditaram no meu potencial de ensino e sempre me apoiaram, em especial ao PROFº. DR. HÉLIO PEREIRA LOPES, PROFº DR. MARCOS CESAR DE ARAÚJO e PROFº. DR. JOSÉ FREITAS DE SIQUEIRA JUNIOR.

Aos Membros da BANCA DE DEFESA desta dissertação, Profº. Dr. FRANCISCO JOSÉ DE SOUZA FILHO, Profª. Drª. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES, e Profº. Dr. MILTON DE UZEDA, pela deferência da participação, honrando-me com seu questionamento e irrefutável contribuição no enriquecimento deste trabalho.

Agradeço,

Ao Exmo Sr. VA (MD) JOSÉ CARLOS MONTEIRO DE MELO, Diretor de SAÚDE DA MARINHA, pela amizade e pelo imprescindível apoio para que pudéssemos realizar este curso.

Ao Exmº Sr. Diretor do CENTRO MÉDICO ASSISTENCIAL DA MARINHA, CA (MD) CARLOS EDSON MARTINS DA SILVA, pela amizade e confiança pessoal e profissional que nos tem depositado.

Ao Exmº Sr. CA (MD) HELTON JOSÉ BASTOS SETTA, Diretor do HOSPITAL NAVAL MARCÍLIO DIAS, por todo crédito que nos tem dispensado e pelo incentivo durante o desenvolvimento deste curso.

Ao Ilmº Sr. CMG (CD) RONALDO JOSÉ JACONIANO MARTINS, Vice-Diretor da DIRETORIA DE SAÚDE DA MARINHA, pela amizade, constante direcionamento e expressivo empenho para que realizássemos este curso.

Ao Ilmº Sr. CMG (EN) ILSON SOARES, Diretor do CENTRO DE ESTUDOS DA MARINHA EM SÃO PAULO, e toda sua tripulação, pelo constante apoio ao longo de nossa comissão; e especialmente por sua marcante presença na defesa desta dissertação.

Ao Ilmº Sr. CMG (CD) LUÍS AUGUSTO LOPES SCHETTINI, Diretor da ODONTOCLÍNICA CENTRAL DA MARINHA, pela deferência e incentivo que nos tem dispensado, e pelo empenho na condução de nossa querida OCM.

Ao Ilmº Sr. CMG (CD-RRM) LUIZ FAVORITO FILHO, ex-diretor da ODONTOCLÍNICA CENTRAL DA MARINHA, pelo apoio que sempre nos dispensou, e pelo esforço desprendido para que o QUADRO DE CIRURGIÕES-DENTISTAS da MARINHA DO BRASIL conseguisse acesso aos cursos da FOP-UNICAMP.

Ao Ilmº Sr. CMG (CD-RRM) MARIO FERREIRA DA COSTA JUNIOR, Ex-Vice-Diretor da ODONTOCLÍNICA CENTRAL DA MARINHA, pelo estímulo, confiança e forte amizade que perdura ao longo de vários anos.

Ao Ilmº Sr. CMG (CD-RRM) PAULO SÉRGIO ASSUNÇÃO, Ex-Diretor da ODONTOCLÍNICA CENTRAL DA MARINHA, pela confiança e força; minha admiração pelo incentivo e empreendimento na concretização não só deste curso, como de todos os outros que foram realizados por CIRURGIÕES-DENTISTAS da MARINHA DO BRASIL neste último biênio; e pela profunda e antiga amizade.

Ao Ilmº Sr. CMG (CD-RRM) EDSON ANTÔNIO DE ALMEIDA, prezado pela extrema confiança em nós depositada, incentivo no desempenho de nossas funções na DIVISÂO DE ENSINO da OCM, e vigoroso empenho para que este curso nos fosse possível.

Ao Ilmº Sr. CMG (CD-RRM) ISMAEL OLÍMPIO BATISTA DE OLIVEIRA, Presidente da ACADEMIA BRASILEIRA DE ODONTOLOGIA MILITAR (ABOMI), pela confiança e amizade; pelo incansável estímulo ao aprimoramento do Cirurgião -Dentista militar.

Ao CF (CD) PAULO AFONSO DIMAS CIRUFFO, filho extremado, companheiro de caminhada militar, exemplo de conquista de enriquecimento profissional, e pela abertura para a FOP-UNICAMP.

À CF (CD) SANDRA HELENA JACQUES DE LA VEGA, oficial exemplar, amiga e conselheira, simbolizando todas as minhas companheiras de vida militar.

A toda tripulação da ODONTOCLÍNICA CENTRAL DA MARINHA, do passado e do presente, que ao longo destes nossos 21 anos de carreira, perfilaram-se conosco na batalha diária e real que é o diuturno atendimento e ensino em nossa querida casa.

Aos que já não se encontram entre nós, com carinhosa lembrança e profunda saudade.

À CLÍNICA DE ENDODONTIA da ODONTOCLÍNICA CENTRAL DA MARINHA, seus funcionários civis, praças e oficiais, de ontem e de hoje. Especialmente, aos CMG (CD) NADAB, CF (CD) DALTRO, CF (CD) KRAUS, CF (CD) MANTOVANELI, CF(CD) AMORELLI, CF (CD) LEITE PINTO, CF (CD) CLÁUDIO, CC (CD) OLEINISCKI, CC (CD) MARCOS, CC (CD) VILHENA, CC (CD) CHAVES, CC (CD) ANDRADE, CC (CD) RENATA BEATRIZ e 1º TEN (CD) GHETTI.

À DIVISÃO DE ENSINO da ODONTOCLÍNICA CENTRAL DA MARINHA, o reconhecimento aos praças com quem trabalhei, SG MÍRIA, MN GILBERTO, MN MAURÍCIO e MN LOVATO; CT (CD) RENATA, e CT (CD) DE LIMA, querido como filho.

A todos os meus sempre estimados e inesquecíveis ALUNOS, civis e militares, por me proporcionarem a oportunidade de dividir conhecimentos e enriquecer minha vida como um todo; por suas demonstrações de amizade, respeito e carinho.

À MULHER MILITAR da MARINHA DO BRASIL, pioneira, incansável batalhadora, mãe, esposa, profissional, que graciosamente, soma e engrandece nosso querido PAÍS.

Aos meus queridos PACIENTES, com carinho e estima, pela verdadeira paciência, apoio ao meu desenvolvimento técnico-profissional, e incontestável fidelidade.

Ao meu especial e dileto amigo CC (CD) NELSON CAETANO DE ARAÚJO FILHO, fiel companheiro de sonhos e realizações, que durante estes dois anos partilhou conosco de Piracicaba, fazendo novos amigos e acompanhando nossos trabalhos.

De todos os animais que conhecemos, o ***Cão*** *é o que mais se uniu a nós. Sejam príncipes que lhe dão farta comida e leito de plumas, ou mendigos que dormem ao relento e só podem oferecer-lhe uma pequena parte de suas migalhas: idêntica é a sua afeição e dedicação, e com igual amor lambe a mão ornada de jóias e os dedos trêmulos, consumidos de doença e de fome.*

Theo Gygas

Agradeço,

Ao ***Cão de Raça Indefinida****,, que proporciou a realização desta pesquisa.*

À Encantadora ***Cidade de Piracicaba****, que com seu Povo hospitaleiro, seu histórico Rio e belíssimo pôr do sol, me conquistou para sempre.*

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	1
RESUMO	3
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
3. PROPOSIÇÃO	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
5. RESULTADOS	63
6. DISCUSSÃO	73
7. CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEXOS	105
ANEXO I	105
ANEXO II	109
ANEXO III	147
ANEXO IV	153

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		PÁGINA
FIGURA 4.1-A	Aspecto clínico antes da profilaxia com ultrasom	44
FIGURA 4.1-B	Aspecto clínico após a profilaxia com ultra-som	44
FIGURA 4.2	Aspectos clínicos de indução de reação periapical com o auxílio do microscópio clínico odontológico.	45
FIGURA 4.3-A	Acesso: Ponto de eleição	46
FIGURA 4.3-B	Acesso: Forma de contorno	46
FIGURA 4.3-C	Acesso: Aspecto final	46
FIGURA 4.4-A	Radiografia inicial	47
FIGURA 4.4-B	Radiografia de confirmação de odontometria	47
FIGURA 4.5	Mensuração das imagens radiográficas das lesões periapicais utilizando o software Imagelab.	49
FIGURA 4.6-A	Aspectos clínicos dos dentes antes da limpeza e descontaminação coronária	52
FIGURA 4.6-B	Remoção de detritos da câmara pulpar	52
FIGURA 4.7-A	Descontaminação da câmara pulpar	54
FIGURA 4.7-B	Coleta das amostras microbiológicas	54
FIGURA 4.8-A	Processamento microbiológico das amostras: Diluição seriada da amostra	56
FIGURA 4.8-B	Processamento microbiológico das amostras: Inoculação em placas de agar-sangue	56
FIGURA 4.8-C	Processamento microbiológico das amostras: Incubação em câmara de anaerobiose	56

PÁGINA

FIGURA 4.9-A Fases da Identificação Microbiana: Cultura primária 57

FIGURA 4.9-B Fases da Identificação Microbiana: Lupa estereoscópica 57

FIGURA 4.9-C Fases da Identificação Microbiana: Estufa de O_2; 57

FIGURA 4.9-D Fases da Identificação Microbiana: Câmara de anaerobiose 57

FIGURA 4.9-E Fases da Identificação Microbiana: Cultura pura 57

FIGURA 4.9-F Fases da Identificação Microbiana: Gram 57

FIGURA 4.9-G Fases da Identificação Microbiana: Catalase 57

FIGURA 4.9-H Fases da Identificação Microbiana: Kits de identificação bioquímica 57

FIGURA 5.1 Média do Comprimento Real de Trabalho (mm) 67

FIGURA 5.2 Média da Área das lesões periapicais (cm^2) 67

FIGURA 5.3 Média do Perímetro das lesões periapicais (mm) 67

FIGURA 5.4 Média do Número de Microrganismos. 67

TABELA 5.1 Microrganismos isolados de 26 canais de dentes de cães com lesão periapical induzida 68

FIGURA 5.5 Distribuição de espécies microbianas em 26 canais de dentes de cães com lesão periapical induzida 69

FIGURA 5.6 Freqüência de bactérias anaeróbias estritas, anaeróbias facultativas, Gram-positivas e Gram-negativas 70

FIGURA 5.7 Prevalência dos gêneros bacterianos isolados de 26 canais de dentes de cães com lesão periapical induzida 71

RESUMO

O valor do cão na pesquisa em Endodontia é reconhecido pela freqüência com que é utilizado. Várias investigações são conduzidas visando observar alterações e reparo na região periapical deste modelo. Sendo os microrganismos os principais agentes etiológicos das alterações pulpo-periapicais, o conhecimento da microbiota presente em canais radiculares de cães se faz importante. O objetivo deste trabalho foi analisar microbiologicamente canais radiculares, e radiograficamente lesões periapicais induzidas em dentes de cães por um método. De um total de 5 animais, foram utilizados 26 pré-molares inferiores. Após os acessos coronários as polpas foram removidas e os dentes permaneceram expostos ao meio oral por um período de 120 dias. Controles clínico-radiográficos foram procedidos e as imagens das reações periapicais induzidas foram avaliadas pelo software Imagelab 2.4, mensurando área e perímetro. Coletas das amostras dos canais radiculares foram realizadas após 120 dias. Foram utilizados meios de transporte, cultura e incubação que propiciam o crescimento de bactérias anaeróbias estritas. Foram isoladas 70 bactérias cultiváveis, que pertenciam a 34 diferentes espécies, variando de 0 a 9 por canal. Anaeróbios facultativos corresponderam a 77,14%, anaeróbios estritos a 22,8% do total de bactérias isoladas, com uma microbiota predominantemente Gram-positiva. Os gêneros bacterianos mais freqüentemente isolados nos canais foram: *Streptococcus, Staphylococcus, Neisseria, Propionibacterium, Actinomyces* e *Prevotella*. As médias das áreas das imagens radiográficas das lesões foram de 0,06 cm^2, para os segundos pré-molares, 0,12 cm^2 para os terceiros pré-molares e 0,17 cm^2 para os quartos pré-molares. Concluímos que a microbiota de canais radiculares de dentes de cães com lesão periapical induzida, por exposição ao meio oral, após 120 dias, é predominantemente anaeróbia facultativa e Gram-positiva, representada pelos gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus*. Os resultados sugerem existência de relação positiva entre comprimento de dente e tamanho de lesão periapical.

Palavras-chave: microbiota, canal radicular, lesão periapical induzida, cão.

ABSTRACT

The value of dogs in endodontic research is well known by the regularity of their use. Many investigations are conducted in order to observe periapical response and repair on the periapical tissues of this experimental model. Microorganisms are the main etiological agents in pulpal and periapical disorders, therefore comprehension of the dog root canal microflora is important. The objective of this study was to analyse microbiological canal roots and radiograph induced periapical lesions in dog's teeth. Twenty six lower premolars of five mongrel dogs were used. Their chambers were accessed and their pulps removed and left open to the oral environment for the total period of 120 days. Clinical and radiographic controls were used. The radiographs were evaluated by Imagelab 2.4 software to measure the area and perimeter images of the induced periapical lesions. Samples from the root canals were collected after 120 days. Methodology for handling, culture and incubation for growth of strict anaerobe species was used. A total of 70 cultivable isolates were recovered from 34 different species, ranging from 0 to 9 per canal. Facultative anaerobe species comprised 77.14% of the samples and 22.8% were strict anaerobic species with one microbiota predominantly Gram-positive. The most frequent genera recovered from the canals were: *Streptococcus, Staphylococcus, Neisseria, Propionibacterium, Actinomyces and Prevotella.* Measurements of the radiographic image data of the lesions were 0.06 cm^2 for the second premolars, 0.12 cm^2 for the third premolars and 0.17 cm^2 for the fourth premolars. In conclusion, the root canal microbiota of dog teeth with induced periapical lesion, by exposure to the oral environment, is predominantly composed by facultative anaerobes and Gram-positive bacteria, represented by *Streptococcus and Staphylococcus* genera. The results suggest a positive relationship between the tooth length and size of the periapical lesion.

Key words: microbiota, root canal, induced periapical lesion, dog.

1. INTRODUÇÃO

O valor do modelo experimental animal no estudo de doenças que ocorrem em humanos é bem conhecido, a despeito das limitações em extrapolarem-se os achados obtidos em animais para humanos **(GENCO *et al.*, 1969)**. Na pesquisa com drogas ou fármacos **(LEE, 1995)**, na área cirúrgica e de novos equipamentos, a experimentação em humanos precisa ser precedida de provas laboratoriais e da experimentação em animais **(VIEIRA & HOSSNE, 1998)**.

Sendo assim, é necessário suplementar as limitadas informações disponíveis de fontes humanas com aquelas da experimentação animal **(BARKER & LOCKETT, 1971)**.

Não sendo é demais lembrar, que os danos provocados pelo uso da talidomida por gestantes teriam sido evitados se tivessem sido conduzidos experimentos adequados em animais **(VIEIRA & HOSSNE, 1998)**.

Claramente, a pesquisa embasada em animais tem um papel importante no avanço dos conhecimentos da etiologia, prevenção e tratamento de doenças orais. Muitas das pesquisas clínicas apresentadas surgem, como resultado direto de dados anteriores derivados de pesquisa em animais **(BOWEN, 1994)**.

Para ser usado como modelo experimental em pesquisa médica e odontológica, um animal deve preencher necessidades experimentais, e informações na composição e variação de sua microbiota oral devem estar disponibilizadas (**MISIRLIGIL & TUNCER, 1990**).

Cães são considerados excelentes animais de experimento por possuírem seus tecidos orais, especialmente o periodonto, e o tamanho de seus dentes bem similares aos do homem, embora existam diferenças anatômicas, topográficas e fisiológicas evidentes (**PAGE & SCHOROEDER, 1982**); além de possuírem uma taxa de crescimento rápida, o suficiente para permitir a obtenção dos resultados em períodos de tempo menores (**ROWE, 1980**). Os autores têm encontrado estreita similaridade nos processos de reparo dos dentes e estruturas de suporte entre humanos e cães em diversas situações clínicas (**CITROME *et al.*, 1979**).

Na Periodontia, o modelo animal cão tem sido investigado como modelo para estudo da etiologia e evolução da doença periodontal (**JANSEN & PILOT, 1981**; **JANSEN, 1982**; **GROISMAN & KLINGE, 1990**). A microbiota oral e das doenças periodontais em dentes de cães tem sido também investigada (**SAPHIR & CARTER, 1976, KORNMAN *et al.*, 1981**; **LALIBERTÉ & MAYRAND, 1983**; **GOLDSTEIN *et al.*, 1984**; **BROOK, 1989**; **ALLAKER *et al.*, 1992**; **RENVERT *et al.*, 1996**; **ALLAKER *et al.*, 1997a, b**; **NIEVES *et al.*, 1997**; **GADÊ-NETO, 2000**; **STEPANOVIC *et al.*, 2001**).

Em Endodontia, o cão tem sido utilizado nas investigações de reações periapicais **(HILL, 1932)** e estudos de toxicidade de diferentes tipos de medicações e materiais obturadores endodônticos **(MASSON *et al.*, 1992)**. As respostas periapicais também têm sido avaliadas frente a diversos procedimentos operatórios, variando técnicas e limites de instrumentação e obturação, além de substâncias químicas auxiliares **(ORBÁN, 1932; DIXON & RICKERT, 1938; ÖSTBY, 1961; MATSUMIYA & KITAMURA, 1960; SELTZER *et al.*, 1964; BENDER, 1966; SNYDER *et al.*, 1966; STRÖMBERG, 1969; DAVIS *et al.*, 1971; HOLLAND, 1975; HOLLAND *et al.*, 1979a, b; WEST *et al.*, 1979; ALLARD *et al.*, 1987; SOUZA FILHO *et al.*, 1987; SOARES *et al.*, 1990a, b ; ESBERARD, 1992; LEONARDO, 1992; LEONARDO *et al.*, 1994, 1995; SOUZA FILHO *et al.*, 1996; SILVEIRA, 1997; BERBERT, 1999; OTOBONI FILHO, 2000; BERBERT *et al.*, 2002)**.

Na realização desses estudos, os autores descreveram diferentes métodos para promover a infecção intra-radicular e induzir lesão periapical em dentes de cães. Alguns sugerem a abertura dos dentes para promover uma infecção natural **(SOUZA FILHO *et al.*, 1987)**. Outros preconizam contaminação ao meio oral por 5-7 dias e posterior selamento coronário (**BERBERT *et al.*, 2002)**. E há ainda outros que realizam um arrombamento periapical, precedendo os procedimentos anteriores **(SOARES, 1999)**. Porém, a identificação da microbiota presente nesses canais radiculares infectados somente está registrada por **FERREIRA *et al.*, (2002)**.

Os microrganismos são os principais agentes etiológicos das infecções pulpo-periapicais **(KETTERING & TORABINEJAD, 1994; BAUMGARTNER, 1997)**, sendo importante conhecê-los, para direcionar as formas de combate à infecção durante o tratamento endodôntico. A máxima eliminação de bactérias do sistema de canais radiculares propicia um ambiente favorável ao reparo das lesões periapicais **(SJÖGREN *et al.*, 1997)**. Por esta razão, a Endodontia é considerada, em essência, a disciplina clínica voltada para prevenção e tratamento das infecções pulpares perirradiculares **(SIQUEIRA JUNIOR & LOPES 1999)**.

Portanto, para que haja reprodução clínica de resultados, o conhecimento da fisiologia e microbiota presente em canais radiculares de cães é de grande importância, já que este modelo animal é bastante utilizado no amplo espectro da pesquisa endodôntica. Este conhecimento é ainda mais expressivo para aqueles estudos que investigam a eficácia de soluções irrigadoras e medicamentos na desinfecção de canais radiculares, em dentes de cães com lesão periapical induzida.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. IMPORTÂNCIA DO MODELO DE ESTUDO ANIMAL CÃO NA ENDODONTIA

Em muitas situações de experimentação, principalmente quando se propõe uma nova terapêutica, resultados contrários aos que seriam o objetivo daquele experimento podem ocorrer, promovendo danos indesejáveis. Mormente na pesquisa com drogas ou fármacos, na área cirúrgica e de novos equipamentos, a experimentação em humanos precisa ser precedida de provas laboratoriais e da experimentação em animais. Experimentar tratamentos novos em animais serve, então, não apenas para adestrar o pesquisador e aperfeiçoar a técnica, mas também para avaliar os riscos envolvidos na experimentação **(VIEIRA & HOSSNE, 1998).**

Portanto, embora as evidências mais valiosas sejam aquelas obtidas de experimentos em humanos, estes não podem ser considerados como métodos de acesso biológico rotineiros, e testes *in vivo* devem ser conduzidos em animais **(ROWE, 1980).**

WEAVER *et al,* em **1962**, listaram aqueles que seriam os atributos desejados em um animal de experimento:

1. Um padrão de crescimento similar ao homem.

2. Uma relação de crescimento adequada para estudos analíticos ou experimentais que seja rápida o suficiente para permitir resultados em períodos razoáveis de tempo, e ainda assim permitir diferenciação de passos sucessivos, e a aplicação de variáveis controladas a níveis de crescimento críticos.

3. Fisiologicamente similar ao homem, incluindo mastigação, movimentos mandibulares, adaptabilidade a mudanças de ambiente, solidez e resistência a infecções endêmicas.

4. Tamanho dos dentes e arcadas adequados para permitir intervenções cirúrgicas ou dentais, e medidas de crescimento com margem de erro experimental relativamente pequena.

5. Acesso aos dentes e glândulas orais para procedimentos clínicos.

6. Baixo custo de aquisição e manutenção.

Pode-se discutir que as conclusões tiradas de experimentos em animais não possam ser diretamente relacionadas para o tratamento em dentes humanos, todavia, uma comparação dos efeitos de vários materiais em tecidos animais nos dará uma indicação do provável efeito em humanos **(ROWE, 1967)**.

Vários tipos de animais de laboratório têm sido usados ao longo da história da pesquisa odontológica. Para o estudo da cárie, ratos, hamsters e macacos têm sido utilizados, enquanto que para o estudo da doença periodontal, além destes, incluem-se cães, gatos e ovelhas **(LEVY, 1980)**.

A escolha do modelo depende de aspectos inerentes ao animal, que sejam apropriados ao objetivo da pesquisa. Assim, em Endodontia, quando o estudo é conduzido em dentes e estruturas adjacentes, macacos, cães, gatos, porcos em "miniatura" e ratos têm sido usados, mas todos apresentam problemas **(ROWE, 1980)**.

Diferentes espécies de macacos têm sido utilizadas como modelo experimental em odontologia: *Macaca mulatta* **(VIDAIR & BUTCHER, 1955; SINAI *et al.*, 1967)**; *Macaca irus* **(TORNECK & SMITH, 1970)**; *Macaca fascicularis* **(FABRICIUS *et al.*, 1982)**; *Cebus apella* **(ARAÚJO-FILHO, 2001)**. Como modelo experimental apresentam muitas vantagens, sendo sua íntima relação com o homem a mais importante delas. Principalmente os de pequeno porte têm sido utilizados, porém são animais de alto custo, difíceis de serem criados e domesticados **(BERBERT, 1999)**. Não são ideais para tratamento endodôntico, pois são difíceis de anestesiar por longos períodos de procedimento, seus dentes são pequenos, com canais estreitos, e os dentes anteriores possuem raízes curvas **(SINAI *et al.*, 1967; TORNECK & SMITH, 1970; KOENIGS *et al.*, 1975)**. Além disto, possuem resistência distintamente superior à do homem, sendo seu tecido pulpar altamente resistente aos efeitos da contaminação bucal **(TORNECK *et al.*, 1973)**.

Gatos apresentam problemas de anestesia similares aqueles dos macacos de pequeno porte, além disto, o tamanho e a morfologia de seus dentes, com

exceção dos caninos, em muito limita a viabilidade de sua utilização, já que em cada animal somente quatro dentes podem ser utilizados **(ROWE, 1967)**.

O desenvolvimento embriológico do porco tem sido há muito reconhecido como bem similar ao do homem. Por esta similaridade e disponibilidade, embriões de porcos têm sido usados para estudos comparativos e até mesmo para complementação de série embriológica em livros textos de embriologia humana. Para controlar o crescimento deste animal, que por razões comerciais é rápido e de grande porte, foi desenvolvido laboratorialmente o porco em "miniatura", com finalidade de emprego em programas de pesquisas laboratoriais **(WEAVER *et al.*, 1962)**. Este modelo animal é provavelmente adequado para pesquisa no campo da odontologia, possuindo dentição decídua e permanente, movimentos mandibulares de mordida e trituração, porém, poucos registros de sua utilização são encontrados na literatura **(SU, 1992; XU *et al.*, 1997; NAKAMURA *et al.*, 2002)**.

YANKELL (1985), afirmou que ratos são os animais mais freqüentemente usados em experimentos odontológicos. O estudo que indicou ser de fato a cárie uma doença bacteriana transmissível, foi conduzido em ratos "germ-free" **(FITZGERALD, 1968)**. O papel desempenhado pelas bactérias e seus produtos na indução das infecções pulpares e perirradiculares foi esclarecido em estudo em que este modelo, "germ-free" e convencional, foi utilizado **(KAKEHASHI *et al.*, 1965)**. Embora a espessura de esmalte na superfície oclusal dos molares de rato seja menor, existe similaridade de forma com os molares humanos. A raiz mesial

do primeiro molar de rato tem sido usada, porém, embora estes animais tenham a vantagem de baixo custo, com criação simples, o procedimento operatório é difícil **(ROWE, 1980)**.

Hamsters são outro modelo utilizado **(KEYES *et al.*, 1962; JORDAN & KEYES, 1964)**, tendo vantagens similares às dos ratos, além de ter abertura de boca maior que estes. Sua maior desvantagem, principalmente nas pesquisas de fissuras e cáries, é não possuírem anatomia oclusal extensiva em seus molares **(YANKELL, 1985)**.

FOUAD *et al.,* em **1992**, na Universidade de Iowa, nos EUA, utilizaram caninos de furões (*Mustela putorius furo L.)* em avaliação radiográfica e histológica de lesões periapicais induzidas. Ressaltaram a vantagem do baixo custo deste modelo animal, tanto para compra quanto para manutenção; o que propicia aos pesquisadores o uso de maior número de animais, quando comparados aos gatos, cães ou macacos. Por serem passíveis de criação específica para pesquisa, grande número de furões estandardizados podem estar disponibilizados.

O cão é um mamífero onívoro e biologicamente similar ao homem, como demonstrado pelo caráter de reações inflamatórias em secções histológicas **(HILL, 1932; DIXON & RICKERT, 1938)**. Há concordância corrente de que o cão seja um excelente animal de experimento. Cães são relativamente pequenos, de fácil manuseio e extremamente cooperativos durante a experimentação. Seus tecidos orais, especialmente a junção dento-gengival, o periodonto, e o tamanho de seus

dentes são bem similares aos do homem, embora existam diferenças anatômicas, topográficas e fisiológicas evidentes **(PAGE & SCHOROEDER, 1982)**. São animais de fácil obtenção e manutenção, portanto economicamente viáveis.

A literatura registra vários trabalhos com a utilização do modelo animal cão, machos ou fêmeas, de diferentes espécies, incluindo: beagles **(ROWE & BINNIE, 1977; ISERMANN & KAMINSKI, 1979; PITT FORD, 1984; KOLBERG, 1992; FRIEDMAN *et al.*, 1997, 2000)**, perdigueiros alemães **(PAGE & SCHROEDER, 1982)**, collies **(ORBÁN, 1933; SYNDER *et al.*, 1966; SHOJI *et al.*, 1985)**, labradores **(SALMAN *et al.*, 1999)**, settler irlandês **(KOLBERG, 1992; NIEVES *et al.*, 1997)**, e de raça indefinida **(BHASKAR & RAPPAPORT, 1971; DAVIS *et al.*, 1971; VALDRIGHI, 1976; WEST *et al.*, 1979; HOLLAND *et al.*, 1979b; SHOJI *et al.*, 1985; TAKAHASHI, 1985; ALLARD *et al.*, 1987; SOARES *et al.*, 1990; LEONARDO, 1992; BERBERT *et al.*, 2002)**.

Os autores têm encontrado estreita similaridade nos processos de reparo dos dentes e estruturas de suporte entre humanos e cães em diversas situações clínicas **(CITROME *et al.*, 1979)**.

Para avaliação da resposta do tecido pulpar, **ORBÁN,** em **1933,** investigou a ação do paraformoldeído, usando cães. **BLOCK *et al.*,** em **1979**, avaliaram a antigenicidade de tecido pulpar de cães experimentais, antes e após incubação com cimento AH-26. **SHOJI *et al.,*** em **1985,** conduziram estudo dos efeitos da

irradiação do laser de CO_2 na polpa dental de cães de raça indefinida, num relato preliminar sobre o laser na pulpotomia.

Vários estudos avaliaram a resposta dos tecidos periapicais de cães frente a diferentes materiais obturadores e técnicas de obturação. **SNYDER *et al.*, em 1966**, utilizando collies, avaliaram os efeitos do cimento N_2. **STRÖMBERG, em 1969**, num estudo comparativo entre diferentes materiais obturadores, observou o reparo periapical após pulpectomia total em cães. **DAVIS *et al.*, em 1971**, estudaram o reparo periapical e intra-canal em cães de raça indefinida, com canais radiculares incompletamente obturados. **HOLLAND, em 1975**, avaliou o reparo do coto pulpar e dos tecidos periapicais de cães de raça indefinida, após biopulpectomia e obturação de canal com duas diferentes substâncias. **VALDRIGHI, em 1976**, avaliou radiográfica e histopatologicamente, em cães de raça indefinida, a influência dos "espaços vazios" nos resultados dos tratamentos de canais radiculares. **WEST *et al.*, em 1979**, também utilizando cães de raça indefinida, conduziram estudo piloto em cães, sugerindo o recobrimento de cones de prata com Teflon de carga negativa. **SOARES *et al.* (1990a)** avaliaram a influência do cimento obturador no comportamento dos tecidos periapicais de dentes de oito cães, após o tratamento endodôntico em uma ou em duas sessões. Em outro estudo, **SOARES *et al.* (1990b)**, utilizaram 120 raízes de dentes de cães para observar a resposta dos tecidos periapicais a cimentos endodônticos contendo hidróxido de cálcio.

Utilizando diferentes técnicas operatórias, **LEONARDO *et al.* (1994)** avaliaram radiograficamente e bacteriologicamente reparo apical e periapical em dentes de cães com lesão periapical crônica induzida.

A resposta dos tecidos periapicais também foi avaliada por **BENATTI *et al.***, em **1985**, em cães de raça indefinida, após o efeito do alargamento foraminal da porção apical do canal radicular. Em **1987**, **SOUZA FILHO *et al.***, avaliaram a influência do alargamento do forame apical no reparo de dentes de cães contaminados. Ainda **SOUZA FILHO *et al.***, em **1996**, avaliaram a influência do nível da obturação e do alargamento do forame apical no processo de reparo tecidual, em cães de raça indefinida.

Utilizando cães labradores, **SALMAN *et al.***, em **1999**, conduziram avaliação de reparo após perfuração de furca com a utilização de membrana reabsorvível abaixo de ionômero de vidro resinoso modificado. **RODRIGUES (2000),** também avaliou, radiograficamente, reparo de lesões de furca após diferentes procedimentos de descontaminação e selamento coronário em cães de raça indefinida.

O modelo cão também tem sido utilizado para o estudo de microinfiltração coronária. **FRIEDMAN *et al.***, em **1997,** investigaram a penetração de bactérias intraorais, e a eficácia de cimentos endodônticos na prevenção de inflamação perirradicular, em dentes de beagles endodonticamente tratados. Para tal estudo, inocularam placa dental nas câmaras pulpares após duas semanas de

preenchimento dos canais com material obturador. **FRIEDMAN *et al.***, em **2000**, avaliaram resistência à infiltração bacteriana coronária, de um cimento obturador endodôntico experimental de ionômero de vidro, utilizando cães beagle. **GADÊ-NETO *et al.,*** em **2002**, avaliaram *in vitro e in vivo,* a microinfiltração coronária utilizando dois materiais seladores provisórios e um definitivo, em pré-molares de cão de raça indefinida.

ORBÁN, em **1932**, bem sumarizou porque os cães são modelos ideais, quando afirmou que os dentes dos cães são mais sensíveis que os dos humanos, a qualquer tipo de injúria. Fazendo correlação deste fato com a maior permeabilidade da dentina e cemento no cão que nos humanos, conjecturou que, se o tratamento no muito mais sensível cão se prova satisfatório, o mesmo tipo de resultado pode ser esperado em humanos.

2.1.1. ASPECTOS ANATÔMICOS E FUNCIONAIS DA DENTIÇÃO DO CÃO

Os cães possuem uma dentição decídua e outra permanente. A decídua é composta de 3 incisivos superiores (I^1, I^2, I^3), 3 incisivos inferiores (I_1, I_2, I_3), 1 canino superior (C^1), 1 canino inferior (C_1), 3 molares superiores (M^1, M^2, M^3) e 3 molares inferiores (M_1, M_2, M_3). Na dentição permanente encontram-se 3 incisivos superiores (I^1, I^2, I^3), 3 incisivos inferiores (I_1, I_2, I_3), 1 canino superior (C^1), 1 canino inferior (C_1), 4 pré-molares superiores (P^1, P^2, P^3, P^4), 4 pré-molares inferiores (P_1, P_2 , P_3 , P_4), 2 molares superiores (M^1, M^2) e 3 molares inferiores (M_1, M_2, M_3) **(SHABESTARI *et al.,* 1967)**.

Os dentes decíduos iniciam sua erupção por volta de três semanas após o nascimento, que se completa pelo final da quinta semana, na seqüência de caninos, incisivos e molares. A esfoliação destes temporários inicia-se por volta dos 110 dias de idade. Os primeiros pré-molares, primeiros dentes permanentes a aparecer, erupcionam sem a presença de um precursor decíduo, por volta dos 106 dias na maxila e 130 dias na mandíbula. Seguem-se os incisivos, os primeiros molares, os caninos e os pré-molares restantes. Os segundos e terceiros molares, últimos permanentes a aparecer, erupcionam por volta dos 150 e 175 dias, respectivamente. Portanto, ao final dos 6 meses, a dentição permanente está completa e pronta para função **(SHABESTARI *et al.*, 1967)**.

Os segundos, terceiros e quartos pré-molares inferiores são recomendados para pesquisa em capeamento pulpar e procedimentos endodônticos. O segundo pré-molar é usualmente unirradicular, mas pode ocasionalmente, ser similar aos segundos e terceiros pré-molares, que possuem uma raiz mesial e outra distal, com canais amplos o suficiente para permitir instrumentação da região apical com equipamento convencional. As coroas possuem forma de lâmina e a câmara pulpar evolui de um corno central proeminente para um pequeno corno mesial e outro distal, antes de adentrar aos canais radiculares **(BARKER & LOCKETT, 1971)**.

A cavidade pulpar é muito mais ampla e a dentina mais delgada em cães em crescimento; no entanto, quando o cão está completamente maduro, a dentina

ganha espessura, de modo que a cavidade pulpar de um cão adulto tem aproximadamente um quarto do diâmetro do dente **(LAWSON *et al.*, 1967)**.

Pela freqüência com que o cão tem sido utilizado nas investigações de reações periapicais e estudos de toxicidade de diferentes tipos de medicações endodônticas, **MASSON *et al.* (1992)** conduziram estudo da anatomia do ápice radicular em 240 dentes permanentes de oito diferentes cães, com distintas faixas etárias. Observaram que um canal único principal estava sempre presente em cada raiz, mesmo nos dentes multirradiculados, e que havia uma redução no volume da polpa radicular com o aumento da idade, ratificando os achados de **HARVEY *et al.* (1985).** Um forame apical único não foi observado. Em cada um dos dentes observou-se que, a alguns milímetros do término da raiz, o canal dividia-se em números pequenas ramificações, irradiando-se perifericamente através da dentina e do cemento e terminando em diversas foraminas na superfície externa do cemento. A existência deste complexo delta apical, em todos os dentes de cães estudados, foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura. Estes achados confirmaram os de **TAKAHASHI *et al.* (1982), TAKAHASHI (1985)**, e **ROUSH *et al.* (1989),** em seus estudos prévios a respeito da arquitetura vascular apical em dentes de cão. **BALTIERI *et al.* (2002),** estudando a anatomia interna de 42 dentes de cães de raça indefinida, através do método de diafanização, encontraram deltas apicais em 78,2% dos dentes estudados, enquanto canais laterais foram encontrados em 7,2% dos casos, principalmente nos terços cervical e médio. A porcentagem de canais laterais encontrada em pré-molares e molares foi de 12,5% e 10%, respectivamente.

Em dentes humanos esta complexidade não é observada, porém, **DE DEUS (1975)** relatou que as foraminas que formam o delta ou deltas, são as ramificações mais comumente encontradas nas raízes dentárias (37,2% em média geral dos dentes), sendo mais frequentes nos molares e pré-molares superiores. Segundo **HESS & KELLER (1988)** as ramificações apicais estão presentes, em média, em 42 % dos casos, e o canal principal com frequência possui um trajeto tortuoso em sua terminação. A impossibilidade de limpeza mecânica desta região é aceita, pois a limpeza e a dilatação proporcionadas pelo preparo químico-mecânico atingem apenas o canal principal **(PANZARINI, 1996)**.

O número de foraminas em dentes de cães é maior que em humanos, e as ramificações na câmara pulpar ocorrem com maior freqüência do que no dente humano. Estas características anatômicas devem contar pelo fato de que granulomas dentários são mais rapidamente produzidos em cães do que em seres humanos **(HILL, 1932)**.

Portanto, a marcada complexidade do ápice radicular do cão é considerada como um fator morfológico vantajoso quando se está empenhado em erradicar bactérias desta região. O ápice dental do cão, quando infectado, proporciona um rigoroso teste para métodos de eliminação de bactérias nesta região **(BARKER & LOCKETT, 1971)**.

2.2. MÉTODOS DE INDUÇÃO DE LESÃO PERIAPICAL NO MODELO ANIMAL CÃO

A literatura descreve diferentes métodos que promovem a infecção intra-radicular, induzindo lesão periapical em dentes de cães.

MATSUMIYA & KITAMURA, em **1960**, promoveram a exposição dos canais radiculares de 17 cães e os deixaram abertos, expostos ao meio oral por 20-83 dias, para promover situação em que haveria infecção natural. Estes autores relataram ter comprovado, radiograficamente, que quase todos estes espécimes infectados apresentaram um processo inflamatório em sua região apical. Outros autores têm utilizado este método de indução de lesão periapical, com variações de período de exposição: **SOUZA FILHO *et al.*, 1987**, 45 dias; **HOLLAND *et al.*, 1979a**, 2 a 3 meses; **ESBERARD, 1992**, 90 dias; **SNYDER *et al.*, 1966**, 4 meses; **HOLLAND *et al.*, 1992**, **PANZARINI, 1996,** e **OTOBONI FILHO, 2000**, 6 meses. Todos observando radiograficamente, presença da área radiolúcida junto ao ápice dos dentes estudados.

Em um segundo método relatado na literatura, os canais permanecem expostos para contaminação ao meio oral por apenas 5-7 dias, sendo depois então selados. Após o período de 30 dias, controles radiográficos quinzenais são procedidos. Em geral, após 45 dias as imagens radiolúcidas sugestivas de reação periapical são constatadas, radiograficamente, **(LEONARDO *et al.*, 1994**;

LEONARDO *et al*, 1995; TANOMARU FILHO, 1996; SILVEIRA, 1997; BERBERT, 1999).

Em dentes de cães com ápices incompletamente formados, **LEONARDO *et al.*, (1993)** utilizaram método em que o tecido pulpar foi cuidadosamente removido, e os canais permaneceram expostos ao meio oral por 5 dias para contaminação. Após este período, as cavidades foram seladas com óxido de zinco por período que variou entre 10 a 15 dias, tempo que se mostrou suficiente para a formação de lesões periapicais.

Um terceiro método é descrito, em que se realiza o arrombamento do forame apical, após o acesso e remoção da polpa radicular, permanecendo os canais expostos por 7 dias ao meio bucal, quando se promove o selamento da câmara pulpar. Controles radiográficos quinzenais são efetuados e, normalmente após 45 dias, observam-se imagens radiolúcidas sugestivas de reação periapical **(SOARES, 1999).**

Outra variação de metodologia para indução de lesão periapical no modelo animal cão descrita é a em que, após a remoção da polpa radicular, os canais são inoculados com cultura de *Streptococcus,* hemolíticos ou não hemolíticos, **(HILL, 1932),** e após 2-3 meses a reação periapical pode ser detectada radiograficamente **(BARKER & LOCKETT, 1971). McCORMICK *et al.***, em **1983**, inoculando *Streptococcus* gama hemolíticos em canais radiculares de cães beagle de 6 meses de idade, observaram extensiva destruição tecidual após 6 meses do

início do experimento. Os autores ressaltaram a extrema virulência da cepa de microrganismos por eles utilizada para induzir infecção periapical. **ALLARD *et al.* (1987)** induziram inflamação perirradicular em 44 canais radiculares de cães de raça indefinida, inoculando *Streptococcus faecalis,* e mantendo selamento coronário por 6 meses.

2.3. AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DAS LESÕES PERIAPICAIS

Em **1929**, **GOTTLIEB *et al.*** afirmaram que os raios-x não nos dizem se um material obturador endodôntico é irritante, ou nos dão conhecimento quanto ao comportamento do tecido periapical. Os raios-x são de valor para mostrar o crescimento de novo tecido ósseo. Mas, em hipótese alguma, podem os raios-x ser tomados como prova científica fidedigna.

DIXON & RICKERT (1938) também registraram sua atenção quanto às limitações da avaliação radiográfica, particularmente no diagnóstico de patologias periapicais.

SELTZER *et al.* (1964), correlacionaram lesões induzidas em cães, histológica e radiograficamente. Concluíram que o tamanho da lesão observada histologicamente, freqüentemente não correspondia aquele observado na

radiografia. Usualmente era maior. Observaram que esta diferença foi provavelmente devido a diversos fatores, entre eles: diferenças de angulação entre tomadas radiográficas, já que é difícil segurar a película na cavidade oral do cão; anatomicamente as cristas ósseas mandibulares do cão superpõem-se aos ápices dos dentes, tornando a visualização da lesão difícil ou impossível; e lesões inflamatórias envolvendo estrutura óssea trabeculada com freqüência não foram visualizadas na radiografia.

SNYDER *et al.* (1966), em estudo comparativo em dentes de collies com lesão induzida, não encontraram correlação entre o tamanho aparente da lesão, radiograficamente, e a atual extensão da lesão, histologicamente. A ausência de área radiolúcida na radiografia não descartou a presença de área patológica histologicamente.

ROWE & BINNIE, em **1977,** em dentes de cães com ápices incompletamente formados, correlacionaram a aparência radiográfica com as mudanças histológicas examinando 192 canais radiculares obturados endodonticamente, em pré-molares de cães. Não houve evidência de perda óssea em 129 ápices, mas inflamação periapical foi observada ao redor de 57 deles. Um espessamento periodontal foi observado em 32 dos ápices radiculares, porém ao redor de oito destes os tecidos periapicais estavam normais.

PITT FORD, em **1984,** também investigou a correlação entre exames radiográficos e histológicos de lesões periapicais em dentes de cães beagles. No

geral, quando a extensão da inflamação aumentava o mesmo ocorria com o tamanho das lesões radiográficas. Por causa do formato da mandíbula dos cães beagles, não foi possível, durante a vida dos animais, tomar radiografias que dispusessem os dentes e os tecidos adjacentes claramente. Portanto concluiu o autor que radiografias são um substituto insatisfatório para o exame histológico na detecção de presença ou ausência de doença periapical em cães.

ALLARD *et al.* (1987) encontraram boa correlação entre seus achados radiográficos e microscópicos, em pesquisa de reparo de dentes cães com lesão periapical induzida tratados endodônticamente.

LEONARDO *et al.* (1994) também observaram correlação entre seus achados radiográficos e microscópicos em termos de sucesso de tratamento endodôntico.

2.4. MICROBIOTA ORAL DO CÃO

DILLON, em **1986,** descrevendo a microbiologia canina, relatou que a cavidade oral abriga uma população microbiológica concentrada e variada, que é distinta das áreas próximas, como narinas, nasofaringe e orofaringe. No início da vida, o principal foco das bactérias é o dorso da língua. Com a erupção dos dentes, distintas microbiotas começam a colonizar suas superfícies coronárias e

acerca do sulco gengival, formando placa dental. Nos primeiros dias de vida, uma microflora predominantemente formada (90%) por *Streptococcus* é estabelecida. Outras bactérias desenvolvem-se à medida que o animal vai amadurecendo. Algumas espécies, como espiroquetas e *Bacteroides*, cujo habitat é o sulco gengival, não estão presentes até a erupção dos dentes. Alguns organismos Gram-positivos podem precipitar a formação de cáries dentais, embora esta ocorrência não seja consistentemente relatada em cães **(SCHNECK, 1967)** Bactérias podem invadir os tecidos moles, porém infecção é raramente estabelecida porque há uma resistência local. Contudo, a microbiota oral do cão tem grande potencial de virulência quando introduzida em outros tecidos **(GOLDSTEIN *et al.*, 1984; DILLON, 1986)**.

SAPHIR & CARTER, em **1976**, isolando e identificando a microbiota aeróbica encontrada em esfregaço gengival de cães, descreveram-na como sendo composta de: *Streptococcus* (82%), *Staphylococcus* (60%), *Actinomyces* (14%), *Escherichia coli (*22%), *Corynebacterium* (26%), *Pasteurella* (22%), *Caryophanon* (20%), *Mycoplasma* (83%), *Acinetobacter* (10%), *Moraxella* (40%), *Neisseria* (20%), *Enterobacter (*2%), *e Bacillus (*12%).

MISIRLIGIL & TUNCER, em **1990,** afirmaram que os dados disponíveis sobre a microflora bacteriana oral de cães eram limitados. Em sua pesquisa, identificaram 100 espécimes isolados da cavidade oral desses animais. Apenas 17 diferentes espécies foram isoladas, aeróbicas e anaeróbicas: houve predominância de *Staphylococcus* (coagulase + e -), e *Escherichia coli*, levando os

autores a concluírem que a predominância destas bactérias em seus achados ocorreu pelo hábito que o cão tem de lamber.

GOLDSTEIN (1992), BROOK (1992) e **ALLAKER *et al.* (1992)**, estudando a microbiota oral nativa dos cães, relataram que *Streptococcus* spp., *Staphylococcus intermedius, Haemophilus* spp., *Eikenella corrodens, Pasteurella multicocida* e *Neisseria* spp. são espécies freqüentemente isoladas da boca do cão.

NIEVES *et al.* (1997) identificaram as bactérias de amostras de placa dental em dentes de cão e verificaram que a maioria das espécies isolada era Gram-negativas, representadas em 90% por *Pasteurella* spp, e *Pseudomonas* spp. Os 10% restantes eram *Actinobacillus* ssp, *Aeromonas* ssp, *Branhamella* ssp, e *Escherichia coli.* Cinqüenta e oito por cento das bactérias Gram-positivas isoladas eram *Streptococcus* spp. Os 42% Gram-positivos restantes eram *Actinomyces* ssp (26%) e *Corynebacterium* spp (16%). Dentre os anaeróbios estritos 39% eram *Bacteroides* spp. Os 61% anaeróbios restantes eram *Prevotella* spp (13%), *Clostridium* spp (8.7%), *Fusubacterium* spp (8.7%), *Porphyromonas* spp (8.7%), e *Propionibacterium* spp (8,7%); seguidos de *Lactobacillus* spp (4.4%), *Peptostreptococcus* spp (4.4%), e *Streptococcus morbilorum* (4,4%).

ALLAKER *et al.* (1997), estudando a prevalência de espécies de *Porphyromona* e *Prevotella* em placas dentais de 34 cães, encontraram que *Porphyromonas gingivalis* estavam presentes em 68% dos cães e em 47% das

amostras das placas. A contagem de *P. gingivalis* aumentou com a quantidade de placa e com o grau de gengivite. *Prevotella intermedia*, também relacionada com a quantidade de placa e grau de gengivite, estava presente em 44% dos cães e em 23% das placas dentais. Esses autores também encontraram uma correlação significante entre a quantidade de placa, a extensão de gengivites e a idade do cão.

Estudo realizado por **LALIBERTÉ & MAYRAND (1983)** mostrou que espécies de *Porphyromonas gingivalis* isoladas de cães eram semelhantes às isoladas de amostras humanas, com exceção de algumas espécies caninas que podem ser catalase-positiva.

Segundo **DILLON (1986)**, a exposição pulpar e conseqüente necrose só ocorre em 10% dos cães. Entretanto, a microbiota desses canais infectados é pouco conhecida. Da mesma forma, a microbiota de dentes com polpas expostas ao meio oral, intencionalmente, para efeito de pesquisa, somente foi descrita pó **FERREIRA *et al.* (2002)**.

2.5. MICROBIOTA ENDODÔNTICA HUMANA

A Microbiologia Oral foi introduzida como ciência com a invenção do microscópio no século XVII por **ANTONIE VAN LEEUWENHOEK** (1632-1723),

que descreveu as formas microbianas observadas no material que estava aderente em seus dentes. Deste modo, as bactérias da cavidade oral humana tornaram-se os primeiros microorganismos que foram descritos a uma sociedade científica **(UZEDA, 2002)**.

No final do século passado, **MILLER (1894)**, através da análise bacteriológica de esfregaços obtidos de canais radiculares com polpas necróticas, comprovou a presença de bactéria, e salientou a importância dos mesmos na etiologia das alterações pulpo-periapicais.

Somente muitos anos mais tarde, em 1965, é que se tornou esclarecido o papel desempenhado pelas bactérias e seus produtos na indução das infecções pulpares e perirradiculares **(KAKEHASHI *et al.*, 1965).** Os autores expuseram polpas dentais de ratos convencionais e *germ-free* ao meio bucal e demonstraram que nos animais convencionais ocorreu o desenvolvimento de inflamação crônica ou necrose, sempre associadas a lesões perirradiculares, enquanto que nos animais *germ-free* a resposta pulpar foi caracterizada pela presença mínima de inflamação e por deposição de dentina neoformada na área exposta, demonstrando a excelente capacidade reparadora da polpa na ausência de infecção.

Até então, devido o desconhecimento das técnicas de anaerobiose, os microrganismos predominantemente isolados dos canais radiculares com polpas necrosadas, eram as bactérias anaeróbias facultativas do grupo dos estreptococos, os enterococos, micrococos, difteróides, estafilococos, lactobacilos, bactérias entéricas e as espécies *Candida, Neisseria* e *Veillonella* **(MORSE,1987)**.

Impulsionada pelo desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de transporte, isolamento e cultivo de anaeróbios estritos, na década de 70 a Endodontia, como ciência, obteve um grande avanço. Considerável interesse foi gerado quanto ao papel desses microrganismos na patogênese das doenças endodônticas **(SIQUEIRA JUNIOR & LOPES, 1999)**.

SUNDQVIST, em **1976**, avaliou as condições bacteriológicas de 32 canais de dentes unirradiculares com coroas hígidas e com polpas necrosadas em decorrência de trauma dentário, constatando que mais de 90% das cepas bacterianas isoladas eram anaeróbias estritas. As bactérias mais freqüentemente isoladas foram: *Bacteroides melaninogenicus*, fusobactérias, eubactérias e peptostreptococos. O número de espécies no interior dos canais variou de 1 a 12. Houve uma correlação positiva entre o tamanho da lesão perirradicular e a densidade e o número de espécies bacterianas presentes no canal.

faecalis, *Pseudomona aeruginosa* e *Candida* spp. **(ERGSTRÖM & FROSTELL, 1964**; **RANTA *et al.*, 1988**; **SUNDQVIST *et al.*, 1998)**. O *Enterococcus faecalis* tem sido um dos poucos microrganismos anaeróbios facultativos associados à periodontite apical persistente **(ERGSTRÖM & FROSTELL, 1964; HAAPASALO *et al.*, 1983)**, aos casos de *flare-ups* **(MATUSOW, 1995)**, às infecções secundárias e aos casos de retratamento com lesões perirradiculares refratárias **(SUNDQVIST *et al.*, 1998)**. À propósito, **SUNDQVIST (1992)**, enfatizou que os *Enterococcus faecalis* são capazes de causar e manter infecções de difícil tratamento porque são microrganismos resistentes a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos.

LOMÇALI *et al.* (1996) estudaram na microscopia eletrônica de varredura os ápices de dentes com lesões periapicais crônicas. Zonas de reabsorção, bactérias e leveduras foram freqüentemente observadas nas superfícies radiculares. Placa bacteriana periapical e uma estrutura polida estavam presentes principalmente ao redor do forame apical maior. Depósitos de um tecido semelhante a cemento indicativo de reparo foram vistos próximos a algumas áreas de reabsorção. Observaram ainda células clásticas fortemente aderidas a depressões semelhantes a crateras. Os autores sugeriram que microrganismos de um canal radicular infectado podem com sucesso invadir os tecidos periapicais, podendo ser um significante fator etiológico na patologia periapical.

Esses achados foram confirmados posteriormente por **BYSTRÖM & SUNDQVIST (1983)**; **SUNDQVIST (1992)**; **SUNDQVIST (1994)**; **GOMES *et al.* (1994 a,b**; **1996a,b,c)** pela constatação da prevalência de bactérias anaeróbias estritas nos canais radiculares infectados. **BAUMGARTNER & FALKLER JR (1991)** isolaram e identificaram bactérias presentes nos 5.0 mm apicais do canal radicular de dentes com exposições pulpares por cárie e lesão periapical, e relataram que 68% dos microrganismos isolados foram anaeróbios estritos.

A literatura endodôntica é incisiva em afirmar que as infecções por microorganismos anaeróbios estritos ocorrem na presença de tecido necrótico, suprimento sanguíneo tecidual comprometido ou após infecção por aeróbios e anaeróbios facultativos capazes de diminuir o potencial de oxirredução nos tecidos e promover interações positivas e antagônicas entre as bactérias **(BERGENHOLTZ & CRAWFORD, 1989; MARSH & MARTIN, 1992; SUNDQVIST, 1992; SUNDQVIST, 1994; GOMES *et al.*, 1994 a,b; 1996a,b,c)**.

Enquanto que certas espécies bacterianas anaeróbias estritas parecem estar envolvidas com o desenvolvimento de alguns aspectos clínicos de origem endodôntica (**SUNDQVIST, 1976**; **YOSHIDA *et al.*, 1987**; **GOMES *et al.*, 1994a, 1996a**), algumas espécies aeróbias ou anaeróbias facultativas estão associadas a infecções persistentes do canal radicular podendo comprometer o sucesso da terapia endodôntica. Dentre estas se destacam os estreptococos, o *Enterococcus*

MOLANDER *et al.* (1998) examinaram microbiologicamente 100 dentes tratados endodonticamente com lesão periapical radiograficamente evidenciadas e 20 dentes sem sinais de patologia periapical, cujo retratamento foi indicado por razões técnicas. Cento e dezessete cepas bacterianas foram isoladas em 68 dentes do grupo com patologia apical. Na maioria dos casos uma ou duas cepas foram encontradas em cada dente. As espécies anaeróbias facultativas predominaram entre todas as isoladas (69%). *Enterococcus* foi o gênero mais frequentementemente isolado. Em 11 dentes do grupo sem patologia apical, nenhuma bactéria foi isolada, enquanto nos nove dentes remanescentes foram isoladas 13 espécies bacterians. Concluíram que a microbiota dos canais obturados difere tanto qualitativamente como quantitativamente daquela encontrada nos dentes com polpa necrótica sem tratamento endodôntico. Os autores alertaram que por terem sido isolados microrganismos de dentes sem sinais de patologia periapical, do ponto de vista clínico, pode ser sugerido que todo dente tratado endodonticamente deve ser considerado como potencialmente infectado.

Está comprovado que as bactérias predominantes em infecções periapicais são as anaeróbias estritas, como por exemplo, os bacilos Gram-negativos *Porphyromonas, Prevotella* e *Fusobacterium* spp. Esses microrganismos estão associados ao desenvolvimento de lesões periapicais **(TANI-ISHII *et al.*, 1994)**, bem como ao desenvolvimento de alguns aspectos clínicos de origem endodôntica **(SUNDQVIST, 1976; YOSHIDA *et al.*, 1987; NISENGARD, *et al.*, 1997; GOMES *et al.*, 1994,1996a)**.

3. PROPOSIÇÃO

1. Analisar, radiograficamente, o crescimento de lesões periapicais induzidas em dentes de cães pelo método experimental em que as cavidades pulpares permanecem expostas ao meio oral por um período de 120 dias.

2. Identificar a composição da microbiota dos canais radiculares de dentes de cães com lesão periapical induzida.

3. Investigar a existência de relação entre o tamanho da lesão periapical induzida, o comprimento do dente e a microbiota identificada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS CÃES E AMOSTRAS

Para o desenvolvimento desta pesquisa foram utilizados cinco cães, fêmeas, sem raça definida, pesando de 10 a 14 Kg, com aproximadamente 12 a 18 meses de idade, de aparência sadia. Provenientes do Canil Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), a partir de doação pela Prefeitura local, os cães haviam sido vacinados (anti-rábica - Defensor, Pfizer Animal Health, New York, U.S.A.), vermifugados (Canex - SESPO, Paulínia, SP) e submetidos à quarentena. Durante o período do experimento os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, em baias limpas e arejadas, tratados com ração canina balanceada e água "ad libitum". Seu manuseio seguiu normas previstas pela Lei Federal nº 6.638, de 8 de maio de 1979 **(VIEIRA & HOSSNE, 1998)**

Foram selecionados segundos (P_2), terceiros (P_3) e quartos (P_4) pré-molares, da arcada inferior, totalizando 26 dentes, intactos, livres de cárie e doença periodontal, apresentando então boas condições clínicas e ausência de lesão periapical. As mesmas manobras e técnicas operatórias foram seguidas em todos eles.

4.2 ANESTESIA

Previamente a cada intervenção, os animais estiveram em jejum por 12-24 horas, mas acesso a água foi irrestrito. Isto foi importante não apenas para reduzir o risco de vômito, mas também o risco de intussuscepção **(GREEN, 1979)**.

A conduta anestésica utilizada, descrita por **(MASSONE, 1999)**, é reconhecidamente mais prática e segura.

Para cada intervenção, os animais foram pré-anestesiados, recebendo uma injeção subcutânea de sulfato de atropina (Atropina 1% Fraga - FARMAGRíCOLA S. A. IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO – Mairiporã - SP), no intuito de diminuir a salivação e neutralizar as arritmias que pudessem ocorrer **(FISCHER & KLINGE, 1994)**, na dosagem de 0,044 mg/Kg de peso do animal, utilizando-se seringa de 1 mL (insulina). Após um período de 15 minutos, procedeu-se a anestesia com uma associação de xilasina (Rompun - BAYER S.A. Saúde Animal, São Paulo – SP) e ketamina (Francotar - VIRBAC DO BRASIL IND. E COM. LTDA, Roseira - SP) **(MORELAND & GLASER, 1985; FISCHER & KLINGE, 1994; GADÊ-NETO, 2000)**, nas dosagens de 1 mg/Kg e 15 mg/Kg respectivamente, injetada por via intramuscular.

Este protocolo produziu boa anestesia e relaxamento, proporcionando um considerável tempo de trabalho, entre 30-40 minutos **(MORELAND & GLASER, 1985; FISCHER & KLINGE, 1994)**. No decorrer da intervenção, foi necessário manter o procedimento anestésico com aplicação de doses complementares, constituídas de metade da dosagem inicial da associação xilasina/ketamina, via intramuscular.

Na realização dos procedimentos intra-orais, o animal foi colocado em posição decúbito dorsal, com manutenção da abertura bucal através da interposição de um abridor de boca entre os caninos.

4.3 FASE INICIAL DO EXPERIMENTO

Previamente às intervenções, foram feitas radiografias periapicais para diagnóstico dos dentes selecionados, com a finalidade de observação das condições de normalidade radicular. Nas tomadas radiográficas, utilizou-se aparelho de Raios-X (Modelo Time-X 66 – GNATUS EQUIPAMENTOS MÉDICO-ODONTOLÓGICOS LTDA, Ribeirão Preto, SP) e tempo de exposição padronizado em 0,6 segundos. A técnica foi a do paralelismo **(FREITAS *et al.*, 2000)**, com posicionador radiográfico infantil (PRISMA INSTRUMENTOS ODONTOLÓGICOS LTDA, São Paulo - SP). Utilizou-se filme Ultra-speed (Eastman Kodak, Rochester, USA) e as radiografias foram realizadas em duplicata, sendo uma revelada

manualmente pelo método tempo/temperatura e outra processada automaticamente (Dent-X 9000 - AFP Imaging Corporation, Elmsford, USA).

Visando o início do experimento em condição de saúde oral semelhante para todos os cães, os dentes selecionados foram submetidos à raspagem coronária e profilaxia com ultra-som, na primeira intervenção **(Fig. 4.1-A e 4.1-B)**.

4.4 INDUÇÃO DA LESÃO PERIAPICAL

Todos os procedimentos clínicos foram feitos por um único operador. Para melhor visualização do campo operatório **(SOUZA FILHO & TEIXEIRA, 1999)**, estes foram realizados com a utilização de microscópio clínico odontológico (Modelo M900, DF VASCONCELLOS – SP) **(Fig. 4.2)**.

Todo o instrumental e material utilizados nos procedimentos operatórios foram esterilizados em autoclave (Autoclave Cristófoli H 3000 – CRISTÓFOLI EQUIPAMENTOS DE BIOSSEGURANÇA LTDA, Campo Mourão, PR) a 135 ° C, por 20 minutos.

Depois da tomada radiográfica inicial, raspagem e profilaxia coronária, foi realizada a anestesia terminal infiltrativa à base de cloridrato de lidocaína com adrenalina 1:100. 000 (Lidocaína 100 – DFL INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA, Rio de Janeiro, RJ). A seguir, nos dentes selecionados, foram procedidas as

aberturas coronárias com pontas esféricas diamantadas nº 1011 (KG Sorensen - KG SORENSEN IND. COM. LTDA, Barueri, SP), montadas em turbina de alta rotação, refrigeradas a ar e água. O ponto de eleição para o início do acesso à câmara pulpar foi em direção ao corno pulpar mais proeminente, localizado abaixo da maior cúspide do dente **(Fig. 4.3A)**. As aberturas oclusais foram complementadas com pontas diamantadas tronco-cônicas de extremidade inativa nº 3082 (KG Sorensen - KG SORENSEN IND. COM. LTDA, Barueri, SP), dando a conformação apropriada à cavidade, de acordo com a anatomia interna do dente, removendo-se todo o teto da câmara pulpar **(Fig. 4.3-B)**. Desgaste compensatório, para proporcionar um acesso livre e reto aos canais radiculares **(Fig. 4.3-C)**, foi realizado com a utilização de brocas de Largo nº 2 (Maillefer - Baillagues, Suíça).

Removida a polpa coronária, realizou-se irrigação da câmara pulpar com soro fisiológico. A seguir, com base nas radiografias para diagnóstico **(Fig. 4.4-A)**, efetuou-se a exploração dos canais radiculares com lima tipo K nº 15 (Maillefer - Baillagues, Suíça) até que fosse atingida a parada ou platô apical, estrutura anatômica que se situa aproximadamente de 1,5 a 2 mm do ápice dentário **(SOARES, 1999)**, e que serviu-nos como referencial. Confirmado este nível para a determinação do Comprimento Real de Trabalho (CRT), através de tomada radiográfica periapical **(Fig. 4.4-B)**, procedeu-se o acesso aos canais radiculares para extirpação pulpar. Utilizaram-se, seqüencialmente, brocas de Gates-Glidden (Maillefer - Baillagues, Suíça) de números 2 e 1, seguidas por limas tipo Hedströen de números 20 a 30 (Hedströen File Colorinox Maillefer – Baillagues, Suíça), com o auxílio de irrigação copiosa com soro fisiológico e aspiração.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

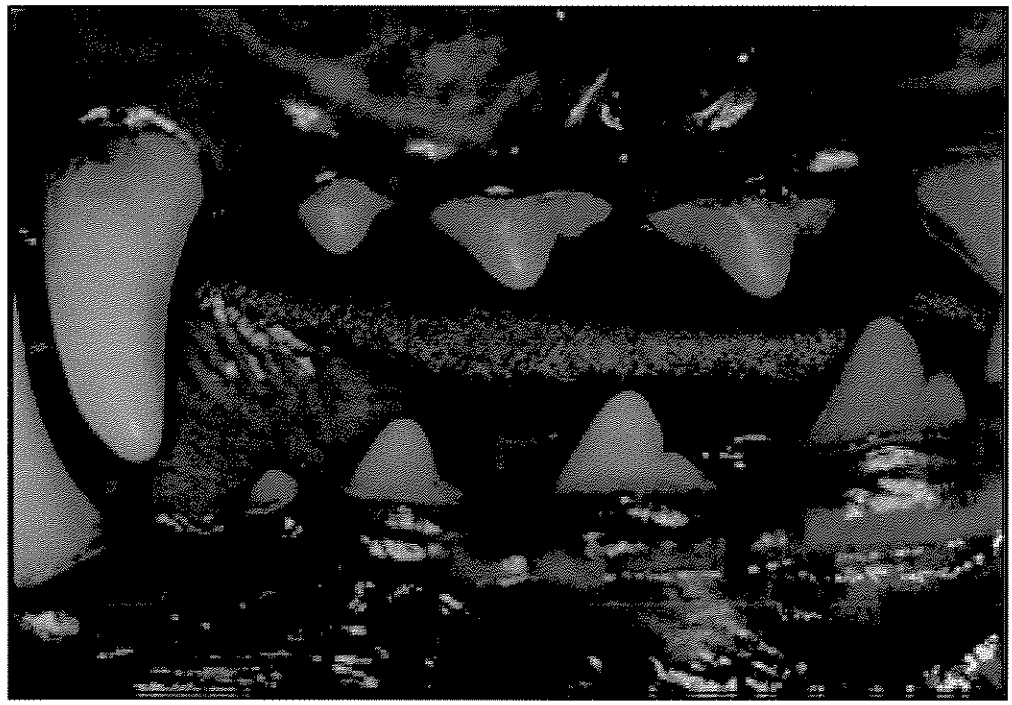

Figura 4.1-A. Aspecto clínico antes da profilaxia com ultra-som.

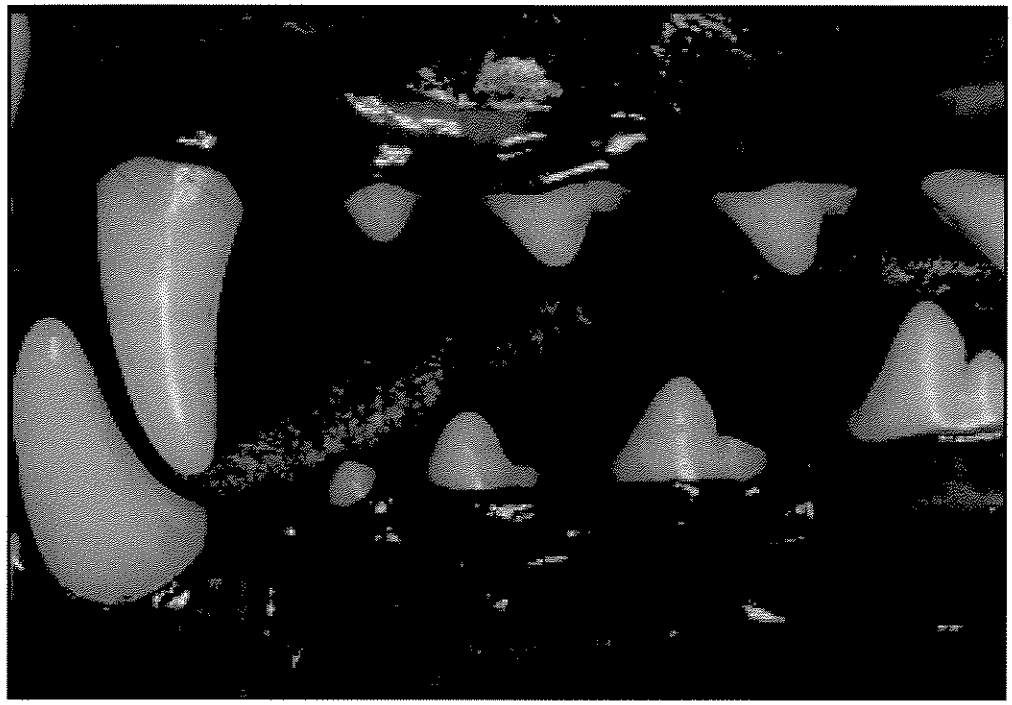

Figura 4.1-B. Aspecto clínico após a profilaxia com ultra-som.

Figura 4.2. Aspectos clínicos de indução de reação periapical, com o auxílio do microscópio clínico odontológico.

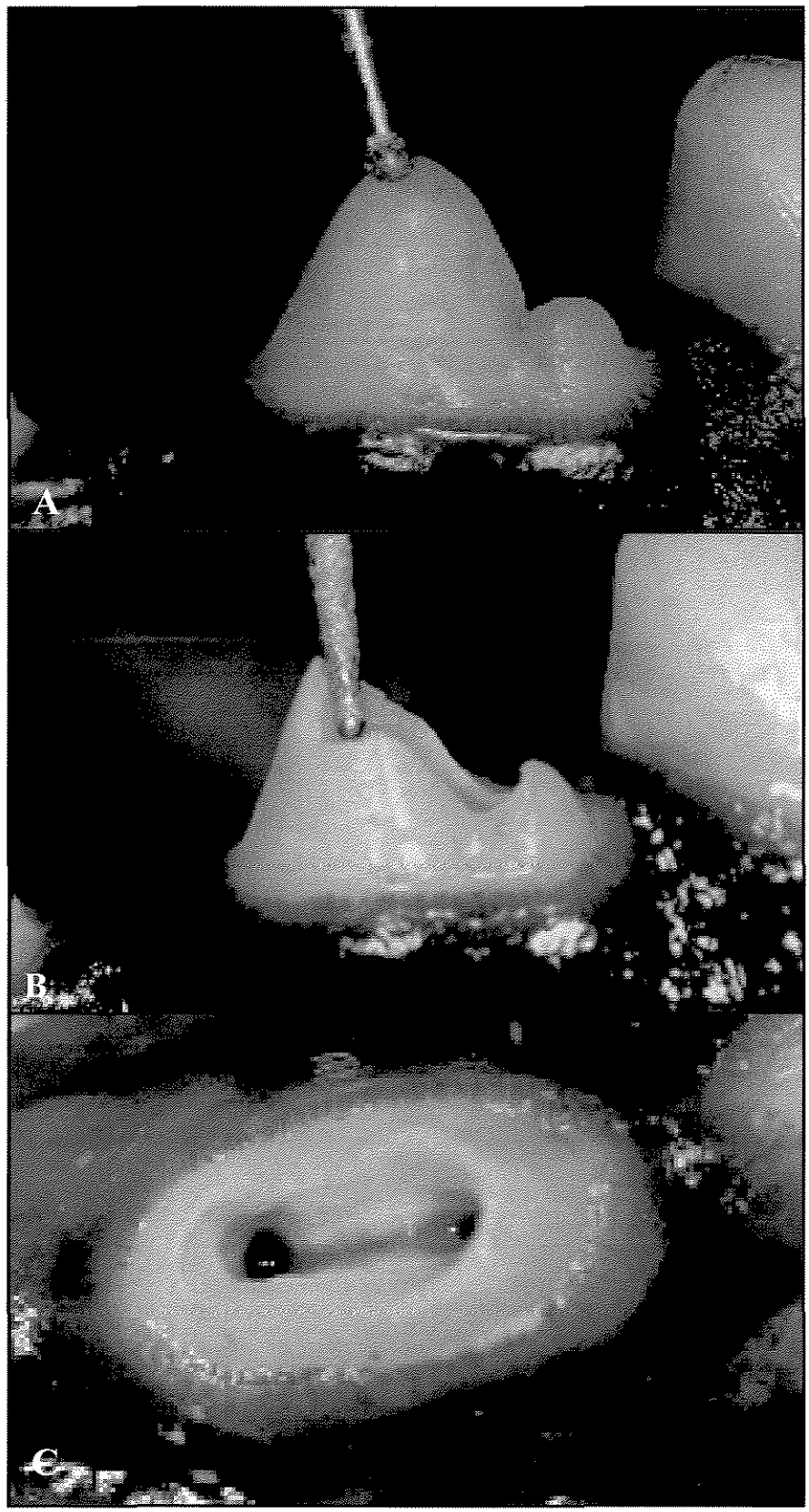

Figura 4.3 – Acesso: **A-** Ponto de eleição; **B-** Forma de contorno; **C-** Aspecto final.

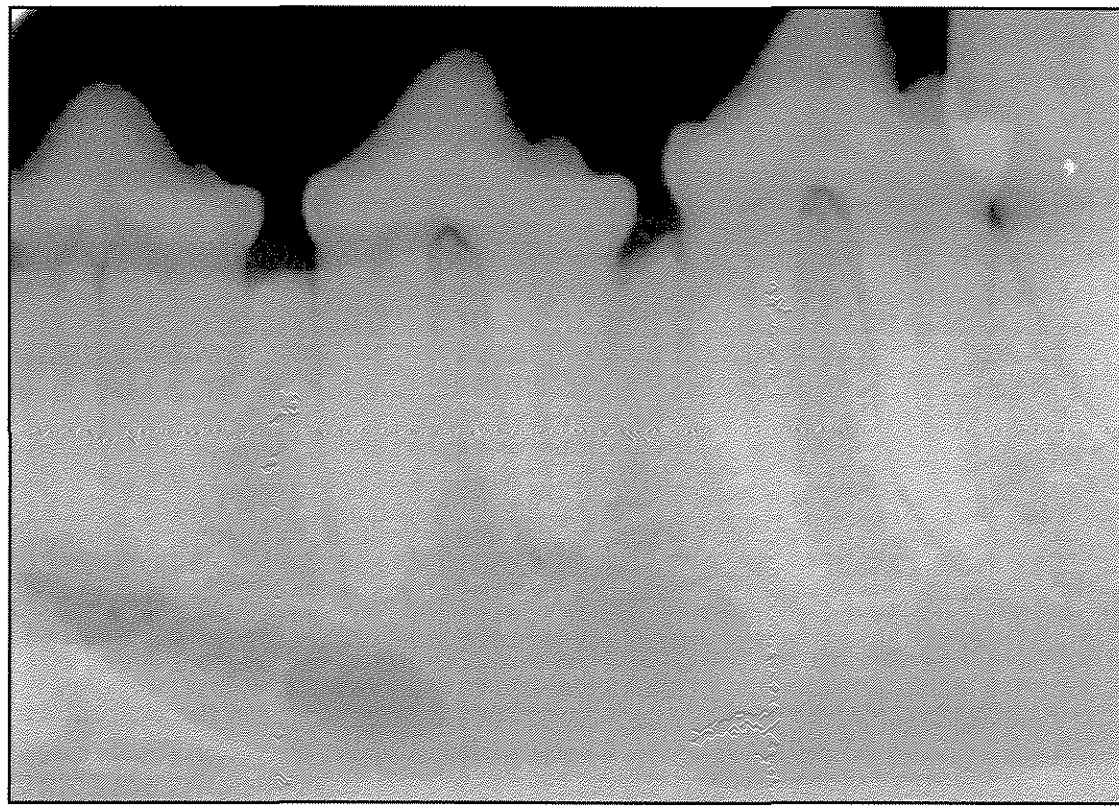

Figura 4.4-A. Radiografia inicial.

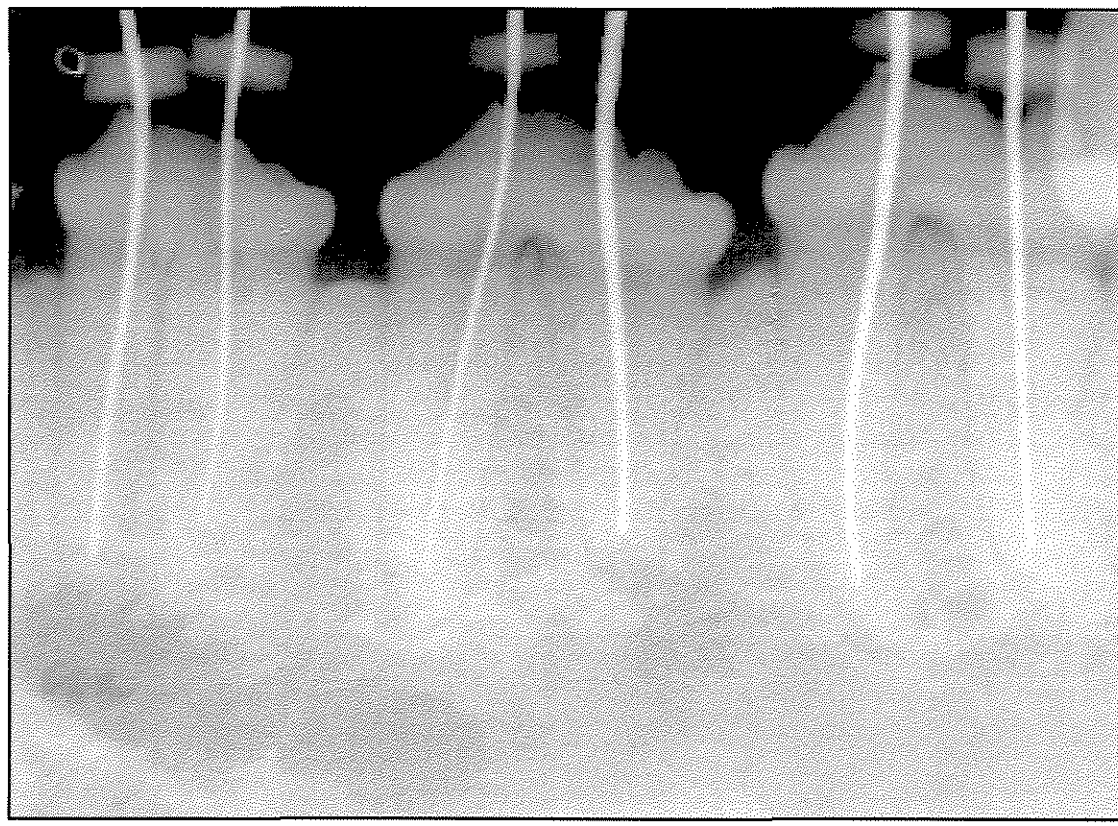

Figura 4.4-B. Radiografia de confirmação de odontometria.

Os dentes permaneceram abertos, com exposição da cavidade pulpar ao meio oral, por aproximadamente 120 dias **(SNYDER *et al.*, 1966)**, para que houvesse a contaminação microbiana, e se instalassem lesões periapicais detectáveis radiograficamente.

Ao término de todas as intervenções, os animais foram acomodados em local isolado, com ventilação e temperatura adequadas, para a reanimação pós-anestésica.

4.5 ANÁLISE RADIOGRÁFICA DAS LESÕES PERIAPICAIS INDUZIDAS

Controles clínicos e radiográficos foram efetuados mensalmente, até observação de imagens radiolúcidas, sugestivas de lesão periapical crônica, o que ocorreu após aproximadamente 120 dias, quando os cães sofreram nova intervenção. Neste momento, foram repetidos os procedimentos anestésicos, o exame clínico intra-oral foi conduzido para observação de possíveis condições de anormalidade, como fraturas ou fístulas.

Em seguida, foram feitas tomadas radiográficas, segundo os mesmos parâmetros descritos na fase inicial do experimento, para constatação da presença de lesão periapical crônica.

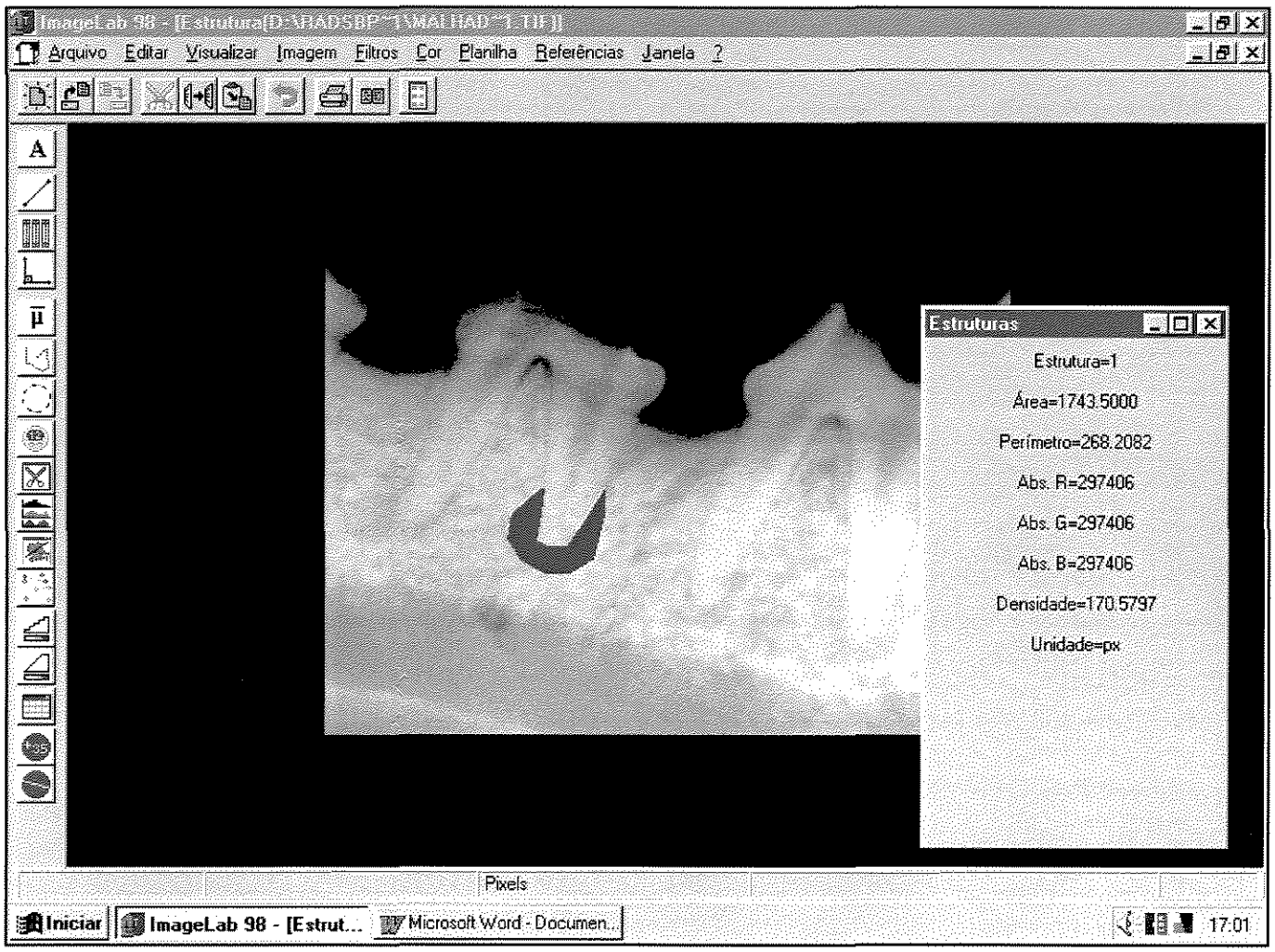

Figura 4.5. Mensuração das imagens radiográficas das lesões periapicais utilizando o software Imagelab.

Para mensurar as imagens das lesões periapicais induzidas, as imagens radiográficas foram capturadas através de scanner, sendo então sido avaliadas pelo "software" Imagelab 98 versão 2.4 (SOFTIUM INFORMÁTICA LTDA - São Paulo, SP), e suas dimensões mensuradas segundo área e perímetro **(Fig. 4.5)**, por três diferentes examinadores, em diferentes dias, sem referência aos registros anteriores.

4.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS CANAIS RADICULARES

4.6.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Princípios, previamente detalhados na literatura por **GOMES *et al* (1994); GOMES (1995); GOMES *et al* (1996a,b,c); GOMES (2002)**, foram observados nos procedimentos de coleta das amostras dos canais radiculares:

1. Utilização de técnicas assépticas durante a coleta da amostra.
2. Remoção dos contaminantes coronários.
3. Isolamento absoluto do dente.
4. Descontaminação do campo operatório.
5. Promoção de um fácil acesso aos instrumentos utilizados para coleta das amostras.
6. Evitar contaminação química do espaço pulpar.
7. Coletar amostras eficientemente e efetivamente.

Portanto, antes da coleta da amostra, foram realizadas raspagem e profilaxia coronária com ultra-som, e o isolamento absoluto foi procedido com lençol de borracha, preso ao arco de Ostby, e fixado com auxílio de grampos. A seguir, promoveu-se o vedamento da interface coroa/lençol com cianocrilato (Super Bonder - LOCTITE BRASIL LTDA, Itapevi, SP) **(OTOBONI FILHO, 2000)**, para evitar a infiltração com saliva. Procedeu-se então a primeira descontaminação do campo operatório (dente, grampo, lençol de borracha, arco e cianocrilato) com a utilização de swabs esterilizados umedecidos primeiramente em H_2O_2 a 30% (v/v), e depois em NaOCl 5.25% por 30 segundos cada, sendo subseqüentemente neutralizados com solução de tiossulfato de sódio a 5% **(MÖLLER, 1966).**

Cuidadosa remoção dos detritos que preenchiam a câmara coronária com a utilização de sonda exploradora reta **(Fig. 4.6-A e B)** foi promovida. Em seguida, executou-se a descontaminação da câmara com as mesmas soluções, aplicadas com "microbrush" (Microbrush-original disposable applicators – MICROBRUSH CORPORATION, USA) **(Fig. 4.7-A)**. Com intuito de evitar a contaminação química do espaço pulpar, o excesso de hipoclorito do "microbrush" foi removido em gaze esterilizada, e logo após sua aplicação, o mesmo foi neutralizado com utilização de tiossulfato de sódio a 5% em outro "microbrush".

Figura 4.6-A. Aspectos clínicos dos dentes antes da limpeza e descontaminação coronária.

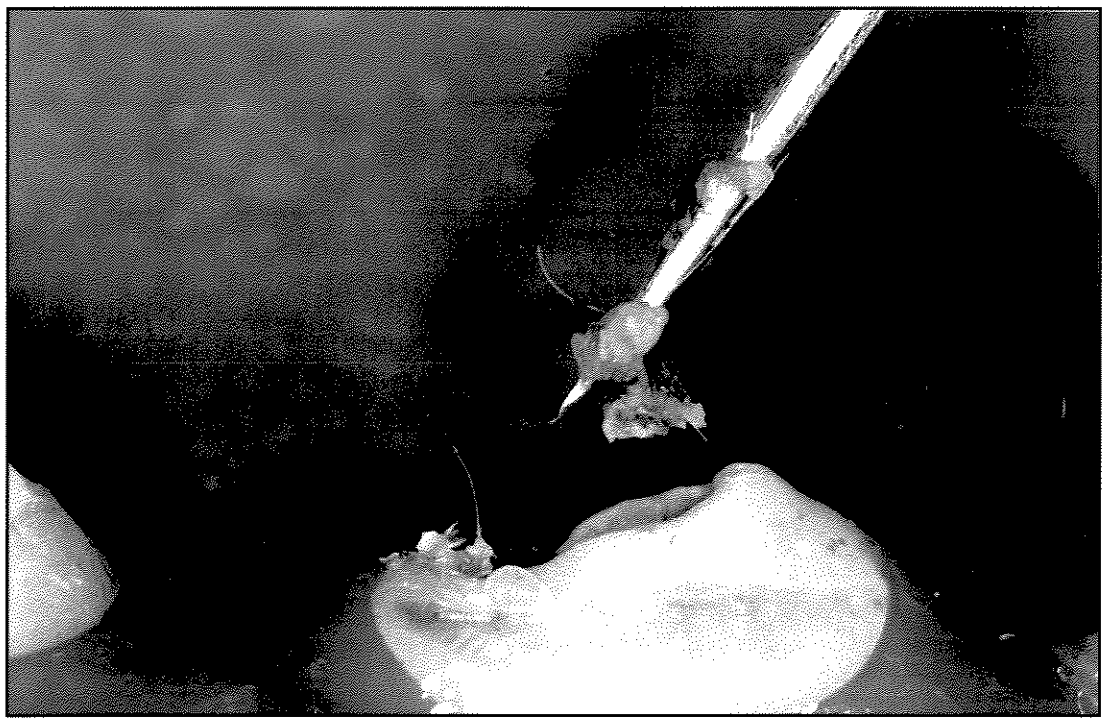

Figura 4.6-B. Remoção de detritos da câmara pulpar.

A seguir, seqüencialmente, três pontas de papel absorventes esterilizadas nº 20 ou 25 (dependendo do diâmetro do canal) foram introduzidas no comprimento de trabalho, aí permanecendo por 60 segundos **(KOBAYASHI *et al.*, 1990)**. Cada uma das pontas absorventes, ao ser removida do canal, foi imediatamente introduzida em eppendorf (Microtubes MCT-150-C, 1.5 mL Clear – AXYGEN INC, Union City, Califórnia - USA) esterilizado contendo três bolinhas de vidro e 1 mL de meio de transporte pré-reduzido RTF (*Reduced Transport Fluid*) **(SYED & LOESCHE, 1972) (Fig. 4.7-B)**. A adição das bolinhas de vidro tem por finalidade produzir uma dispersão satisfatória das bactérias das pontas de papel no meio de transporte, quando da sua agitação **(KOBAYASHI *et al.*, 1990; WIKSTRÖM *et al.*, 1993)**. Este eppendorf, devidamente identificado de acordo com o dente do qual a coleta procedia, foi transportado para o laboratório de Microbiologia da disciplina de Endodontia da FOP - UNICAMP.

A coleta das amostras dos canais radiculares foi realizada sob fluxo contínuo de nitrogênio, para manter a viabilidade das bactérias anaeróbias **(BERG & NORD, 1973)**. Esse procedimento foi realizado com o auxílio de um cilindro de gás nitrogênio, ao qual se acoplam uma válvula de segurança (WHITE MARTINS, MOD. R 86-n - São Paulo, SP), uma mangueira e uma cânula aspiradora endodôntica, formando um dispositivo que direciona o gás somente para a região do dente no qual foi realizada a coleta. O tempo máximo entre a realização da coleta e o seu processamento laboratorial foi de 4 horas.

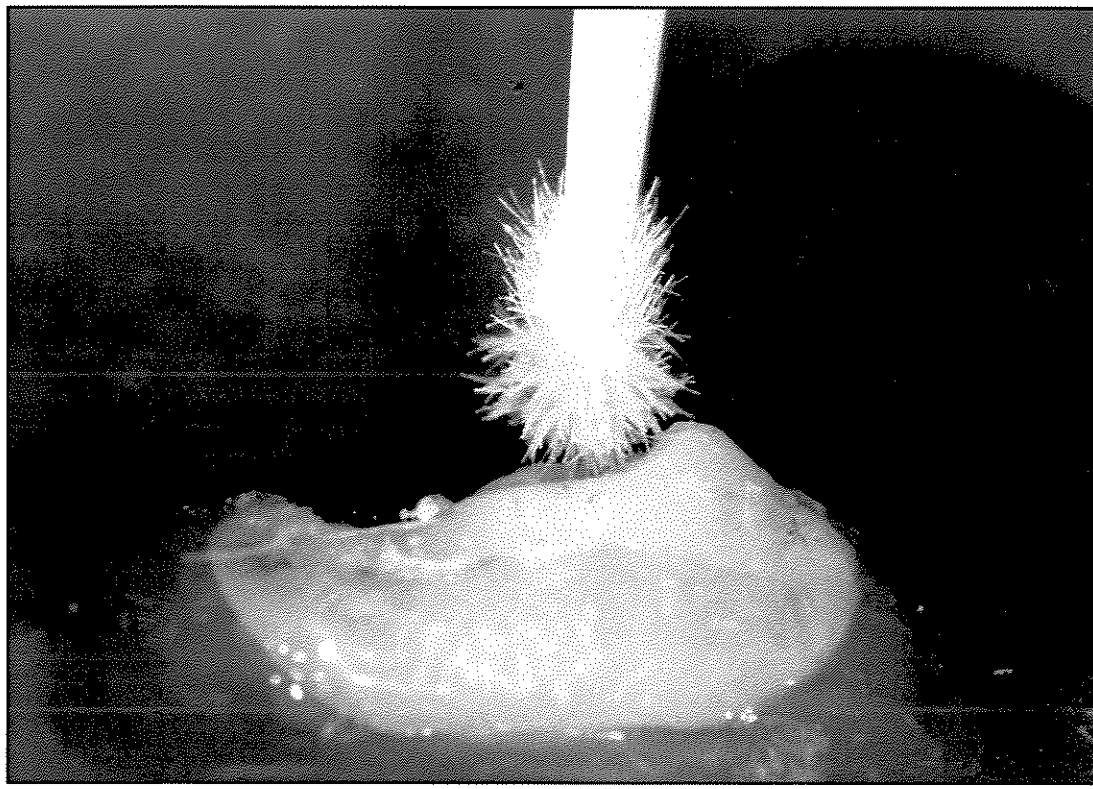

Figura 4.7-A. Descontaminação da câmara pulpar

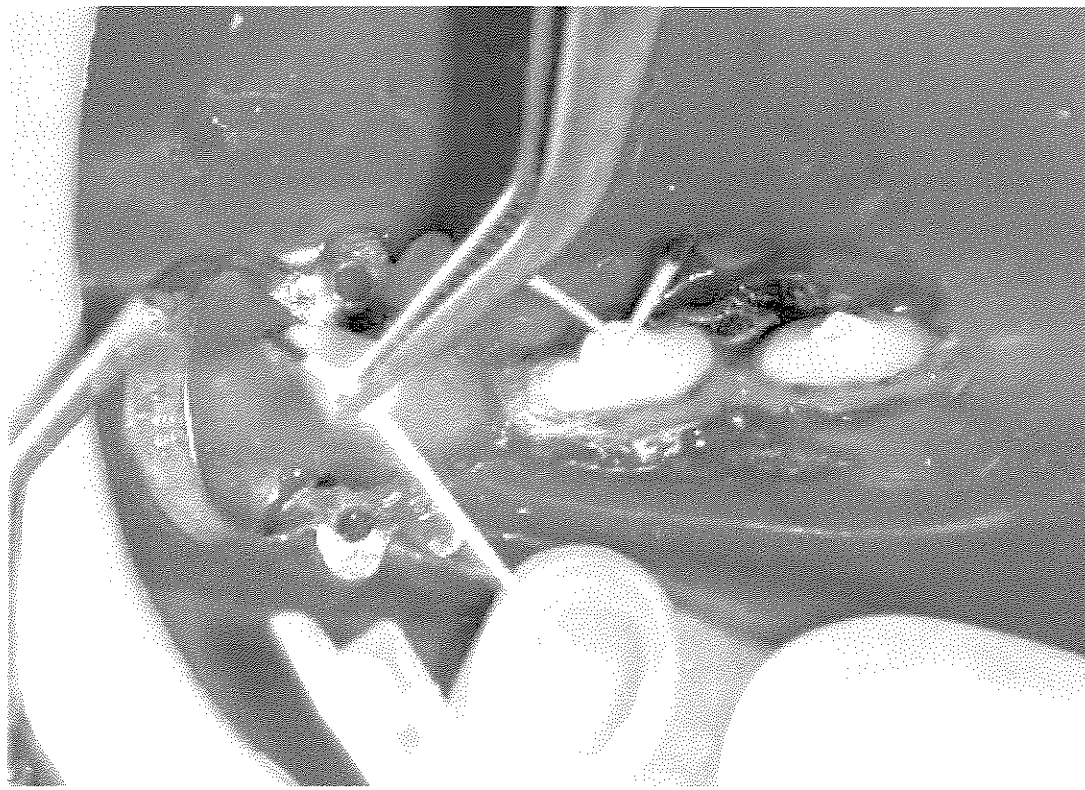

Figura 4.7-B. Coleta das amostras microbiológicas

4.6.2 INOCULAÇÃO E INCUBAÇÃO

Já no laboratório, no interior da cabine de anaerobiose (DON WHITLEY SCIENTIFIC, Bradford, UK), o tubo de eppendorf contendo RTF e as pontas de papel absorventes foram agitados mecanicamente (Agitador de tubos tipo vortex modelo MA 162 – MARCONI EQUIPAMENTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA, Piracicaba, SP) por 60 segundos. A seguir, 100 μL da amostra foram removidos do referido tubo e diluições seriadas a 1/10, 1/100, 1/1.000, e 1/10.000, utilizando FAB (*Fastidious Anaerobe Broth* – LAB M., Bury, UK) pré-reduzido, foram realizadas **(Fig. 4.8-A)**. Cinqüenta μL de cada diluição foram inoculados em placas pré-reduzidas contendo FAA (*Fastidious Anaerobe Agar* - LAB M., Bury, UK), acrescido de sangue (5% sangue de carneiro desfibrinado), contendo ou não meios seletivos para anaeróbios (OXOID – Basingstoke, Inglaterra) **(Fig. 4.8-B)**, as quais foram incubadas na câmara de anaerobiose **(Fig. 4.8-C)**, a 37°C numa atmosfera de 10% de H_2, 10% CO_2 e 80% N_2 até 14 dias, para permitir a detecção de organismos de crescimento lento. Cinqüenta μL foram também inoculados em uma placa de Brain Heart Infusion (BHI, OXOID, Basingstoke, UK) ágar sangue, a qual foi incubada aerobicamente a 37°C por 2 dias, para permitir o crescimento de organismos aeróbios ou facultativos.

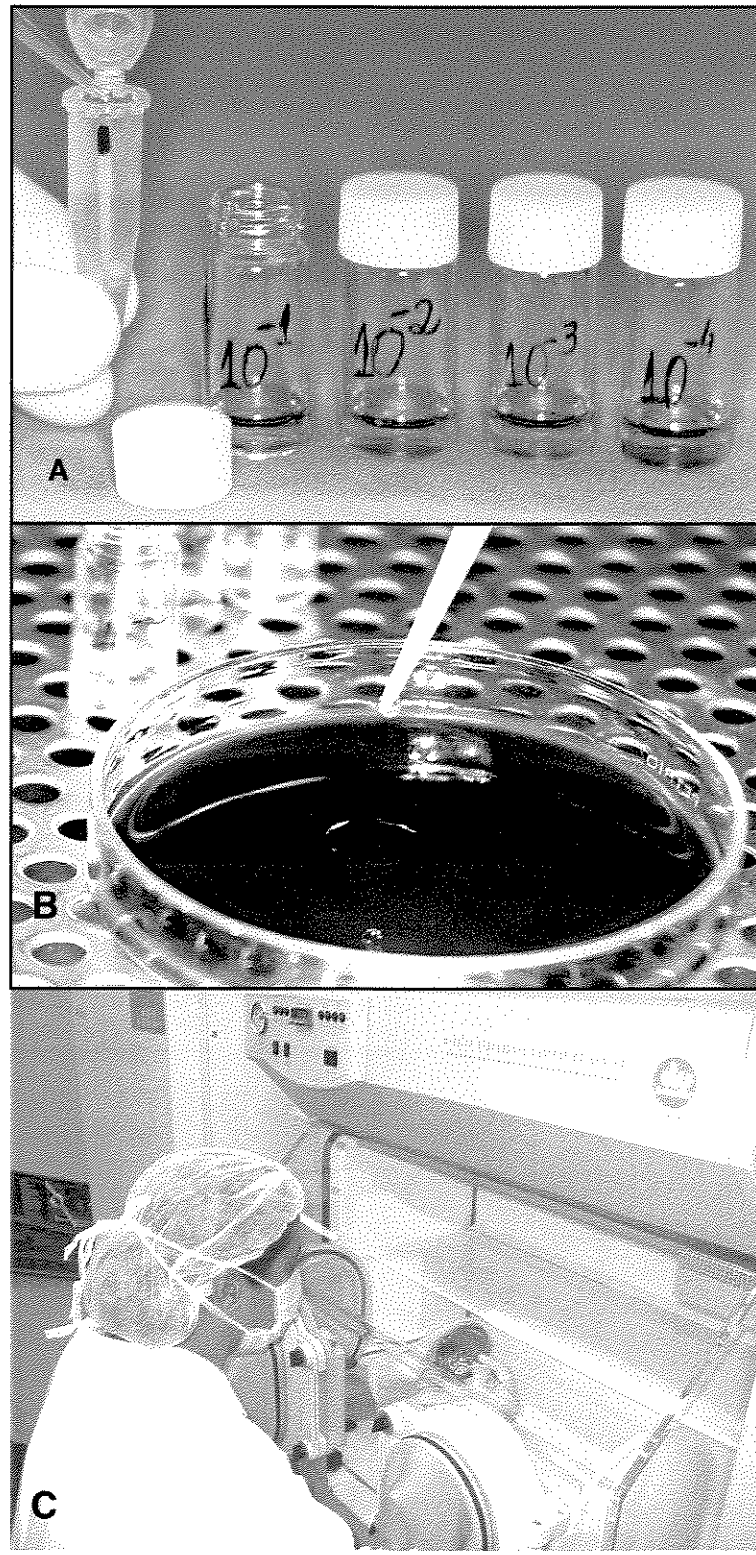

Figura 4.8 - Processamento microbiológico das amostras:
A- Diluição seriada da amostra;
B- Inoculação em placas de agar-sangue;
C- Incubação em câmara de anaerobiose.

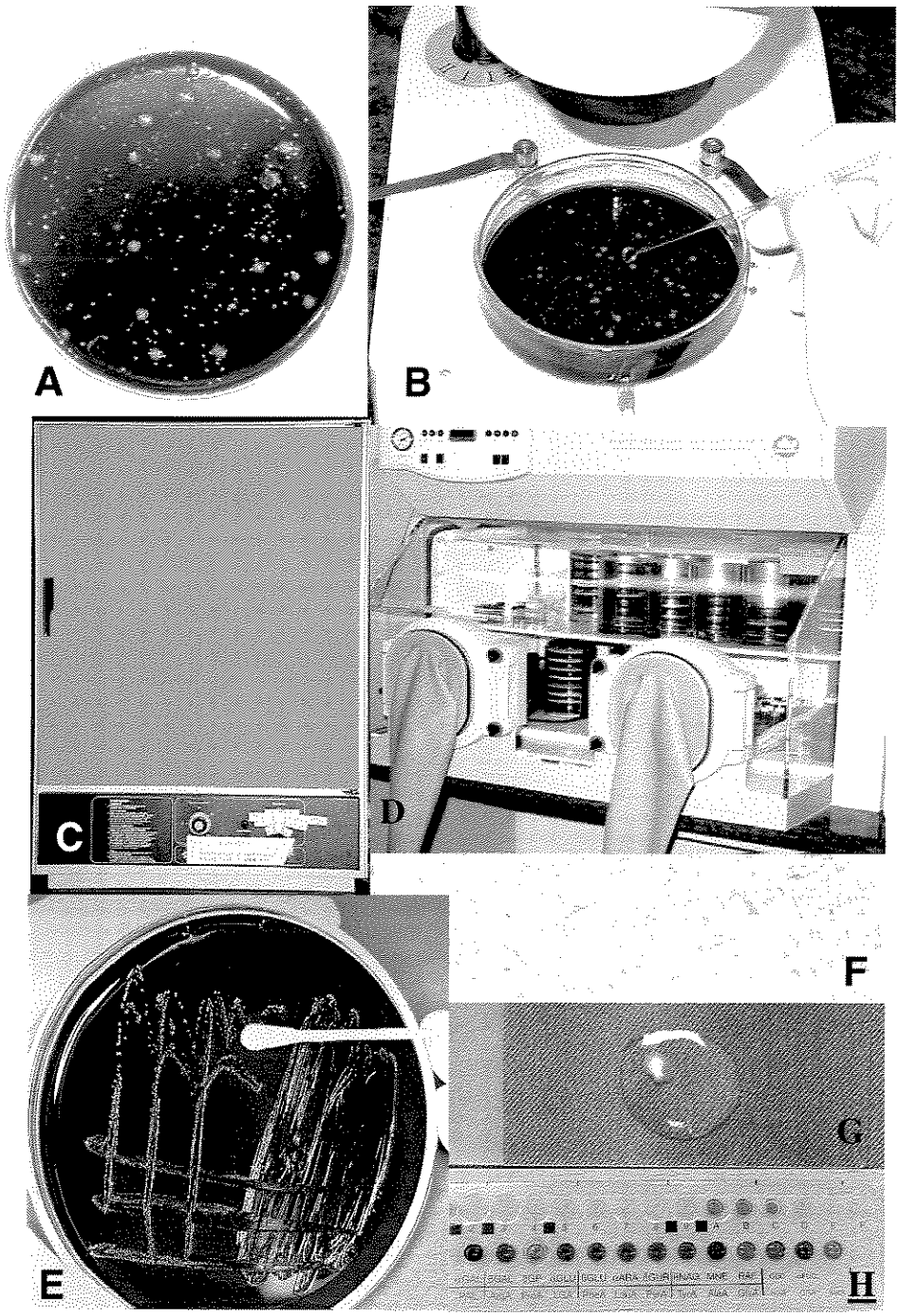

Figura 4.9 - Fases da Identificação Microbiana:
A- Cultura primária; **B-** Lupa estereoscópica;
C- Estufa de O_2; **D-** Câmara de anaerobiose;
E- Cultura pura;
F- Gram; **G-** Catalase; **H-** Kits de identificação bioquímica.

Para o isolamento primário de fungos, o material da coleta só foi cultivado após 24-48 horas, quando foi inoculado em uma placa de Agar Dextrose Sabouraud (OXOID - Basingstoke, UK) e incubado aerobicamente.

As amostras do canal radicular foram inoculadas e incubadas como a seguir:

- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA (Fastidious Anaerobe Ágar), 37° C, anerobicamente, por 2, 5 e 14 dias, para permitir o crescimento de anaeróbios estritos e facultativos.
- Placas de agar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA + NAL (ácido nalidíxico), 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias, para selecionar anaeróbios Gram-positivos a actinomicetos.
- Placas de agar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA + NAL + VAN (vancomicina), 37 ° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias, para selecionar anaeróbios Gram-negativos.
- Placas de agar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA + VAN + KAN (kanamicina), 37 ° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias, para selecionar anaeróbios Gram-negativos (particularmente os "bacilos formadores de pigmento preto").
- Placas de agar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA + NEO (neomicina), 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias, para selecionar clostrídios e outros anaeróbios.

- Placas de agar contendo 5% de sangue de carneiro + Brain Heart Infusion (BHI) agar (OXOID, Basingstoke, UK), aerobicamente a 37° C, por 1 dia, para permitir o crescimento de organismos aeróbios ou facultativos.
- Placas de agar contendo Sabouraud Dextrose Agar (OXOID, Basingstoke, UK), 37° C, aerobicamente, por 2 dias, para permitir o crescimento de leveduras.

Este estudo utilizou meios de cultura pré-fabricados na forma de pó desidratados, que foram preparados de acordo com as orientações do fabricante **(ANEXO II)**. O meio de transporte RTF foi preparado de acordo com a fórmula original, descrita por **SYED & LOESCHE em 1972 (ANEXO I)**.

4.6.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA

Após a incubação, cada placa **(Fig. 4.9-A)** foi examinada em lupa estereoscópica (LAMBDA LET 2 - Atto Instruments CO, Hong Kong) em aumento de 3 vezes **(Fig. 4.9-B)**. Os diferentes tipos de colônias foram subcultivadas em meios de culturas recém-preparados, para obter culturas puras de tantas espécies presentes nos canais quanto fossem possíveis para serem estudadas posteriormente. A identificação inicial foi feita de acordo com as características macroscópicas das colônias na placa, observando-se: tamanho, cor, forma, elevação, borda, superfície, textura, consistência, opacidade, efeito no agar e

efeito no sangue (nenhum, hemólise parcial, hemólise total). As colônias puras foram então isoladas em duas placas contendo 5% de sangue de carneiro + FAA, e testadas quanto ao seu requerimento gasoso, colocando-se uma placa na estufa de O_2 **(Fig. 4.9-C)** e outra na câmara de anaerobiose **(Fig. 4.9-D)**, e observando em qual condição gasosa houve crescimento bacteriano. Ou seja, se cresceram somente em estufa de O2 eram aeróbias, em ambas: facultativas e se somente na cabine anaeróbica: anaeróbias estritas. As colônias que cresceram somente em anaerobiose foram também plaqueadas em duplicata, sendo que uma placa foi colocada novamente na câmara de anaerobiose e a outra na câmara de CO_2 (IG 150 CO_2 Incubator – JOUAN S.A., Saint-Herblain, Cedex, França), para que se pudesse especificar se eram anaeróbias estritas ou capnofílicas. Em seguida, as culturas puras **(Fig. 4.9-E)** foram identificadas de acordo com sua morfologia e coloração pelo método do Gram **(Fig. 4.9-F)** e testadas quanto à produção de catalase **(Fig. 4.9-G)**.

Os seguintes métodos de identificação foram utilizados para a especificação primária dos organismos isolados **(Fig. 4.9-H)**:

- RapID ANA II System (Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, GA., USA) para os cocos Gram-positivos e bastonetes Gram-negativos de pigmento negro anaeróbios obrigatórios.
- API Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) para os estreptococcus (cocos Gram-positivos catalase negativa).

- API Staph (Bio Mérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) para os estafilococos e micrococos (cocos Gram-positivos, catalase positiva).
- Rapid ID 32A (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France) para os bastonetes Gram-positivos e Gram-negativos, anaeróbios obrigatórios.
- RapID NH System (Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, Ga., USA) para *Eikenella, Haemophilus, Neisseria e Actinobacillus.*

4.6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados, referentes aos aspectos radiográficos e microbiológicos dos dentes estudados, foram introduzidos numa planilha de cálculo (QUATRO PRO, Bordland International Inc., Scotts Valley, CA, EUA) e estatisticamente analisados usando SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA). O teste de "Pearson chi-square", ou o "Fisher`s Exact test", quando apropriado, foi escolhido para testar a hipótese nula de que não existe correlação entre os aspectos clínico-radiográficos das lesões periapicais induzidas e os aspectos microbiológicos estudados.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE CLÍNICA E RADIOGRÁFICA DAS LESÕES PERIAPICAIS INDUZIDAS

5.1.1 ANÁLISE CLÍNICA

Sinais de dor ou desconforto oral em cães incluem bater com as patas na face ou boca, esfregar a cara no chão ou paredes, mastigação ou movimentos de deglutição excessivos ou inapropriados **(BURROWS & HARVEY, 1985)**. Quando a condição progride, o cão pode pender sua cabeça para um lado, ter seus hábitos alimentares alterados, perder peso. A sensibilidade é particularmente notada após a ingestão de alimentos ou água **(DILLON, 1986).** Os cães utilizados nesta pesquisa foram observados diariamente. Todos toleraram bem os procedimentos, e nenhum demonstrou sinais de sofrimento durante o período de observação.

Foram procedidos exames clínicos, com sondagem periodontal e avaliações radiográficas aos 15, 30, 60 e 90 dias. Não houve evidência de edema, trajeto fistuloso ou alterações periodontais associados a qualquer dos dentes envolvidos neste estudo. Foi observada grande quantidade de detritos que preenchia a câmara pulpar, porém não houve presença de fraturas no tempo deste experimento, com exceção de um dente, onde se observou fratura coronária.

Dos 26 dentes inferiores estudados, 9 foram segundos pré-molares (P_2), nove foram terceiros pré-molares (P_3), e oito foram quartos pré-molares (P_4). Isto devido a presença de anodontia do P_4 em um dos cães.

O comprimento real de trabalho (CRT) dos dentes variou entre 9 e 14 mm **(Anexo III)**. Os P_2 apresentaram média de CRT de 9,83 mm, os P_3 de 10,83 mm e os P_4 apresentaram as maiores médias de CRT, 13,87 mm **(Fig. 5.1)**.

5.1.2 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

Na análise radiográfica, observou-se indução de lesões periapicais em todos os dentes estudados no período de 120 dias.

A média das áreas das imagens radiográficas foi de 0,06 cm^2 para P_2; 0,12 cm^2 para P_3 e 0,17 cm^2 para P_4 **(Fig. 5.2)**. A média dos perímetros das lesões periapicais induzidas foi de 1,5 mm para os P_2, 2 mm para os P_3 e 2,5 mm para os P_4 **(Fig. 5.3)**.

A análise estatística dos dados demonstrou associação entre os dentes de menor CRT e as menores áreas de imagem radiográfica de lesão periapical (p=0,02). Da mesma forma, houve associação entre os dentes de maior CRT e as maiores áreas de imagem radiográfica de lesão periapical (p=0,02).

5.2 MICROBIOTA DOS CANAIS RADICULARES

Foram isoladas 70 bactérias cultiváveis, as quais pertenciam a 16 diferentes gêneros e 34 diferentes espécies **(Tab. 5.1)**. As espécies microbianas isoladas de cada dente podem ser visualizadas no **Anexo III**.

Houve uma associação positiva entre os dentes de maior CRT e os dentes com maior número de microrganismos identificados **(Fig. 5.4)**.

O crescimento bacteriano foi verificado em 21 dos 26 dentes envolvidos nesta pesquisa, com o número de espécies por canal variando de 0 a 9 **(Fig. 5.5)**. Os dentes com as maiores médias de CRT, P_4, apresentaram crescimento microbiano em 100% dos casos.

Anaeróbios facultativos corresponderam a 77,14 % do total de bactérias isoladas, sendo encontrados em canais radiculares de 19 dentes. Por sua vez, anaeróbios estritos foram isolados de 10 dentes, correspondendo a 22,8 % do total de bactérias. Os canais radiculares apresentaram uma microbiota predominantemente Gram-positiva **(Fig. 5.6)**.

Na análise dos aspectos radiográficos e microbiológicos, não houve associação estatisticamente significante entre estes dois aspectos. Entretanto,

verificamos que em dentes com menores áreas de lesão havia uma menor porcentagem de anaeróbios estritos por canal (33,3%) quando comparados com a porcentagem (40 - 41,7%) encontrada nos dentes com lesões maiores. Quanto à relação existente entre área da lesão e número de espécies microbianas isoladas por coleta, observou-se que quanto maior a área da lesão, maior o número de espécies microbianas isoladas, de tal forma que os dentes com maiores médias das áreas das lesões periapicais (P_3 e P_4) apresentarvam frequentemente infecções com 4 ou mais microrganismos **(Anexo III)**.

Os anaeróbios facultativos mais freqüentemente isolados dos canais radiculares foram: *Neisseria sicca/ subflava* (7/26), *Streptococcus bovis* I (4/26), *Propionibacterium propionicum* (4/26) e *P. acnes* (4/26). *Prevotella oralis* foi a espécie anaerobia estrita mais isolada (5/26).

Os gêneros bacterianos mais frequentemente isolados estão relacionados na **Figura 5.7**.

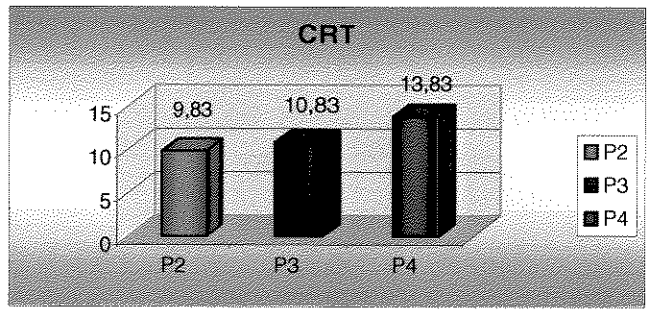

Figura 5.1. Média do Comprimento Real de Trabalho (mm).

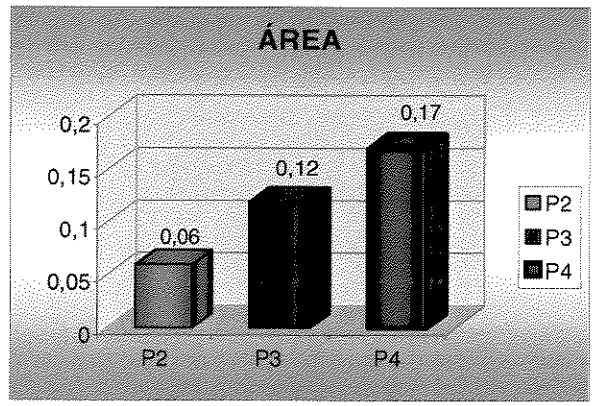

Figura 5.2. Média da Área das lesões periapicais (cm^2).

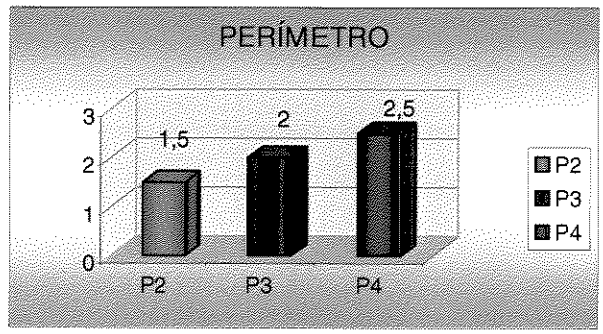

Figura 5.3. Média do Perímetro das lesões periapicais (mm).

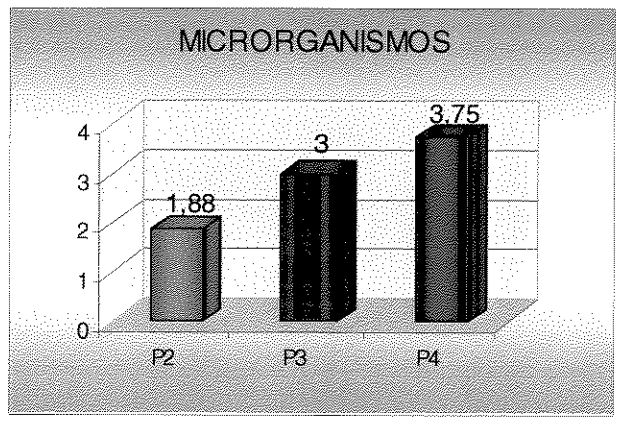

Figura 5.4. Média do Número de Microorganismos.

Tabela 5.1. Microrganismos isolados de 26 canais de dentes de cães com lesão periapical induzida.

Espécies microbianas	N° de canais	% de canais
Neisseria sicca /subflava	7	26.9
Prevotella oralis	5	19.2
Streptococcus bovis I	4	15.4
Propionibacterium acnes	4	15.4
Propionibacterium propionicum	4	15.4
Actinomyces odontolyticus	3	11.5
Bifidobacterium ssp.	3	11.5
Staphylococcus intermedius	3	11.5
Streptococcus bovis II	2	7.7
Streptococcus suis II	2	7.7
Streptococcus salivarius	2	7.7
Staphylococcus aureus	2	7.7
Lactococcus lactis cremoris	2	7.7
Enterococcus faecalis	1	3.8
Enterococcus faecium	1	3.8
Enterococcus avium	1	3.8
Streptococcus spp.	1	3.8
Peptostreptococcus anaerobius	1	3.8
Peptostreptococcus spp.	1	3.8
Actinomyces naeslundii	1	3.8
Actinomyces israelli	1	3.8
Staphylococcus capitis	1	3.8
Staphylococcus lentus	1	3.8
Staphylococcus epidermidis	1	3.8
Staphylococcus xylosus	1	3.8
Porphyromonas gingivalis	1	3.8
Bacteroides uniformis	1	3.8
Bacteroides capillosus	1	3.8
Clostridium tyrobutyricum	1	3.8
Clostridium clostridiforme	1	3.8
Abiotrophia adiacens	1	3.8
Aerococcus viridans 1	1	3.8
Aerococcus viridans 3	1	3.8
Lactobacillus acidophilus	1	3.8

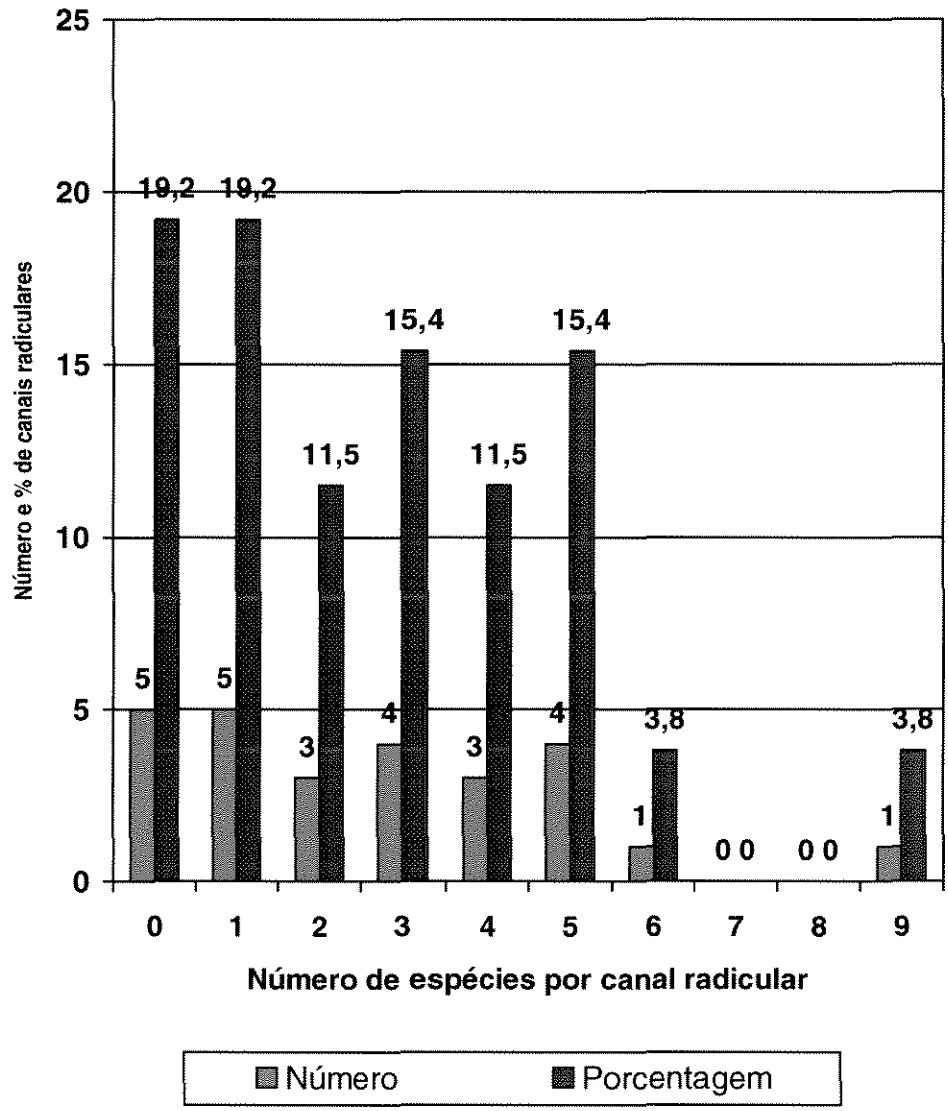

Figura 5.5. Distribuição de espécies microbianas em 26 canais de dentes de cães com lesão periapical induzida.

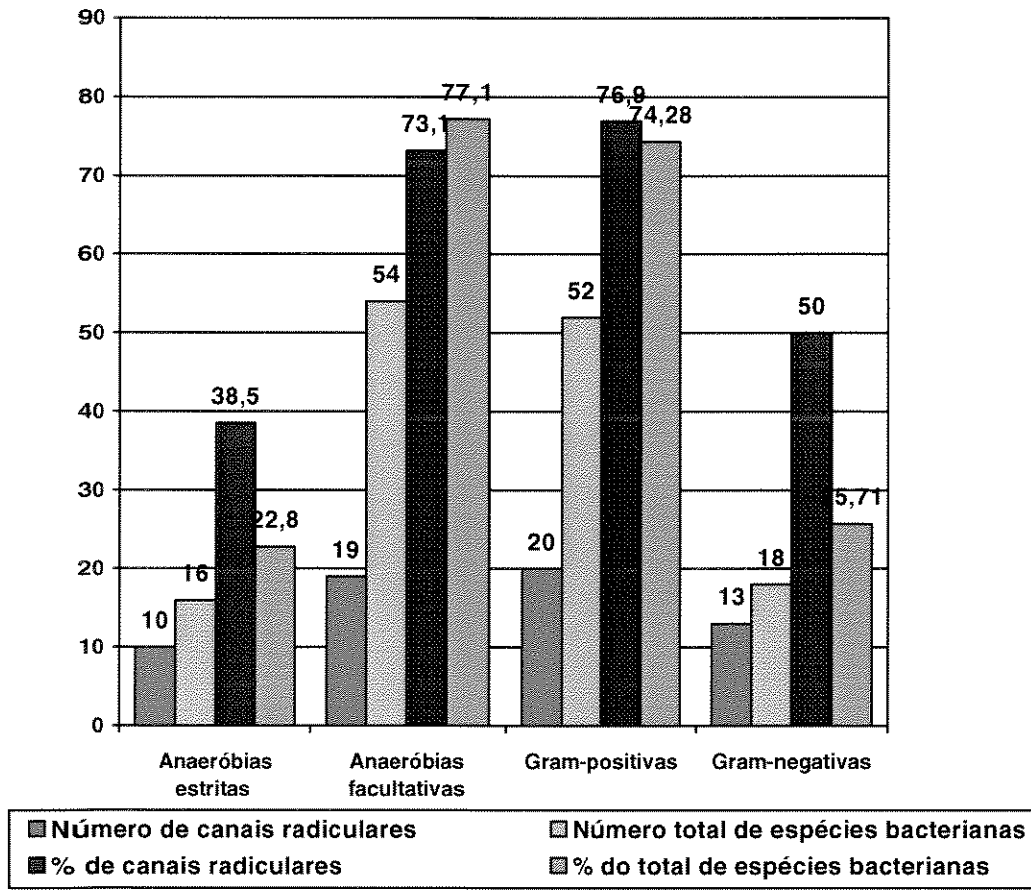

Figura 5.6. Freqüência de bactérias anaeróbias estritas, anaeróbias facultativas, Gram-positivas e Gram-negativas.

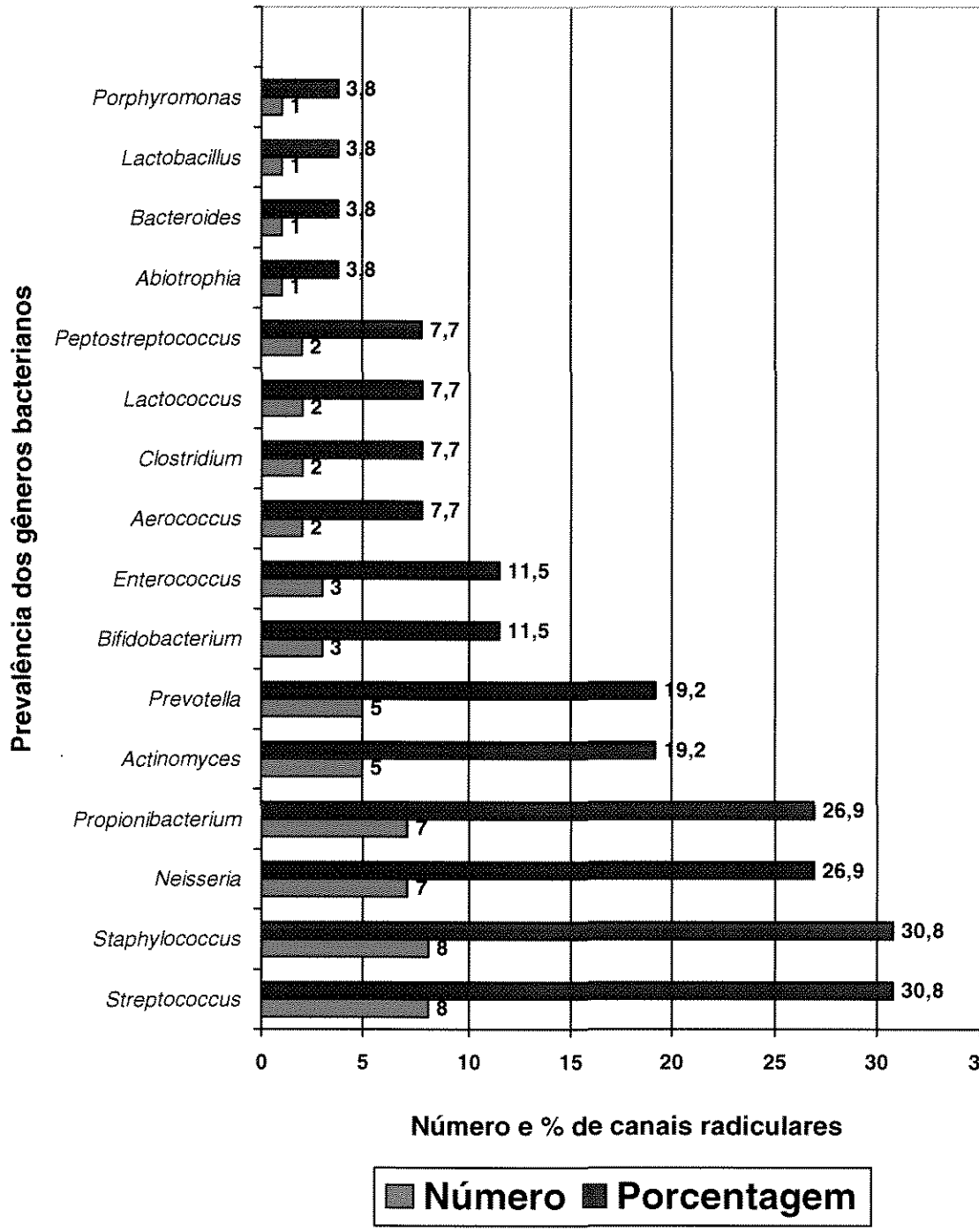

Figura 5.7. Prevalência dos gêneros bacterianos isolados de 26 canais de dentes de cães com lesão periapical induzida.

6. DISCUSSÃO

Para o estudo microbiológico dos canais radiculares, seguindo os princípios já detalhados por **GOMES (1995)**, houve a necessidade da promoção de um fácil acesso aos instrumentos utilizados para a coleta das amostras, além da remoção de todo teto da câmara pulpar. Desta forma, as aberturas coronárias foram estendidas no sentido mésio-distal, com remoção da ponte de esmalte vestíbulo-lingual, porém sem destruição da cúspide mediana, o que difere do método de acesso descrito por outros autores **(LEONARDO, 1992**; **TANOMARU FILHO, 1996**; **SILVEIRA, 1997**; **BERBERT, 1999)**. Estes, com o objetivo de propiciar maior resistência às paredes dentárias e evitar possíveis fraturas, realizaram uma abertura coronária na fossa mesial e outra na distal da face oclusal dos dentes, mantendo a ponte vestíbulo-lingual. Entretanto, no presente estudo, embora a referida ponte tenha sido removida, com exceção de um dente, não houve a presença de fraturas coronárias.

Neste trabalho, a utilização do microscópio clínico, que pode propiciar visualização de aspectos internos e profundos do canal radicular, com ampliação de até 20 vezes e melhor iluminação do campo operatório **(SOUZA-FILHO & TEIXEIRA, 1999, 2001)**, foi de grande importância para a condução de todas as fases da metodologia. Com este recurso, a abertura de acesso coronário foi

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

conduzida conservadoramente e a localização dos canais foi facilitada, concordando com **BALDASSARI-CRUZ *et al.* (2002)**, que demonstraram o aumento da habilidade do clínico na localização de canais de difícil acesso. O microscópio também facilitou a remoção da grande quantidade de contaminantes coronários que preenchiam a câmara pulpar, que ficaram expostas ao meio oral por todo o período do experimento. Além da remoção mecânica dos contaminantes coronários, de acordo com princípios que devem ser observados, foi realizada a descontaminação do campo operatório previamente à coleta microbiológica **(MÖLLER, 1966; BYSTRÖM & SUNDQVIST, 1983; GOMES, 1995; GOMES *et al.*, 1994, 1996 a,b,c; GOMES, 2002; BAUMGARTNER *et al.*, 1999; SIQUEIRA *et al.*, 2001).**

O método clássico da coleta e cultura bacteriana pode sofrer interferências de agentes químicos ou físicos, dando falsos resultados. No presente trabalho, após o processamento das coletas, em 5 dentes não foi conseguido o cultivo de bactérias. Este fato pode ser devido a descontaminação do campo operatório, que foi realizada com H_2O_2 a 30% e NaOCl 5,25% **(DOUGHERTY *et al.*, 1998; PINHEIRO *et al.*, 2003)**. Embora estas substâncias tenham sido neutralizadas com tiossulfato de sódio 5%, uma possível contaminação química do espaço pulpar pode ter ocorrido devido ao menor comprimento radicular e ao maior diâmetro dos canais dos dentes de cães.

Os resultados mostraram que os canais com ausência de crescimento bacteriano apresentavam menores comprimentos de trabalho (CRT), enquanto crescimento bacteriano foi observado em 100% das coletas dos dentes com maiores CRT.

Tradicionalmente, a identificação bacteriana tem incluído cultura em meios sólidos ou líquidos e crescimento baseado em métodos bioquímicos. Estes procedimentos são usualmente laboriosos, caros, e consomem muito tempo. Além disto, dificuldades podem ser observadas quando se avaliam infecções mistas, como nos canais radiculares, pelo método de cultura. Durante a década passada, métodos genéticos moleculares foram sendo usados para identificação bacteriana em amostras clínicas, sem a necessidade de cultura **(MORAES *et al.*, 2002)**.

Estima-se que menos de 1% das bactérias do planeta e menos de 50% das presentes na microbiota oral não sejam cultiváveis É possível que muitos patógenos verdadeiros ainda não tenham sido detectados, pois o método de cultura, mais amplamente utilizado, pode não ser sensível o suficiente **(SIQUEIRA & LOPES, 1999)**. Em trabalho de **WADE *et al.*, 1997**, algumas cepas de *P. endodontalis* e de *F. nucleatum,* foram apenas detectáveis pela técnica molecular, não sendo cultiváveis. A cultura pode falhar no crescimento de microrganismos anaeróbicos fastidiosos **(SIQUEIRA *et al.*, 2001).** Além disto, é conveniente lembrar que resultados negativos não indicam apenas ausência de bactérias, mas

também concentração bacteriana insuficiente para que ocorra o crescimento em meio de cultura, ou falha na técnica microbiológica.

NIEVES *et al.* (1997), em pesquisa de identificação bacteriana de placas dentárias de cães, com método de cultura, observou que alguns gêneros não puderam ser especificados porque as características das colônias ou as características bioquímicas não puderam ser correlacionadas com espécies conhecidas daquele gêneros.

Portanto, sugerimos que em trabalhos futuros, métodos moleculares **(SOCRANSKY *et al.*, 1994**; **SIQUEIRA JUNIOR *et al.*, 2000, 2001)**, além da cultura, sejam usados para identificação de microrganismos em canais radiculares de cães com lesão induzida. Os resultados obtidos pelos métodos de identificação, clássico e molecular, poderiam então ser comparados **(MORAES *et al.*, 2002)**.

Pela metodologia empregada neste estudo, as coletas microbiológicas dos canais radiculares revelaram uma microbiota predominantemente anaeróbia facultativa e Gram-positiva. Essa microbiota difere daquela encontrada em canais radiculares com polpas necrosadas e lesão periapical em dentes humanos, que apresentam uma microbiota predominantemente anaeróbia estrita com iguais proporções de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas **(SUNDQVIST, 1992; GOMES, 1995; GOMES *et al.*, 1994, 1996a,b,c; GOMES, 2002;**

BAUMGARTNER *et al.*, 1999). Embora tenha sido isolado um maior número de bactérias anaeróbias facultativas, os métodos microbiológicos empregados neste estudo foram adaptados para isolar o maior número de espécies bacterianas possível, inclusive anaeróbios estritos **(GOMES, 1995; GOMES *et al.*, 1994, 1996 a,b,c; GOMES, 2002)**.

A microbiota presente no interior do sistema de canais radiculares é o resultado de fatores de seleção, tais como: tensão de oxigênio, fatores nutricionais e interações bacterianas, formando um ambiente propício para o desenvolvimento de determinadas espécies **(SUNDQVIST, 1992)**. A presença de uma maior proporção de anaeróbios facultativos nos canais estudados pode estar relacionada ao fato desses dentes possuírem menores comprimentos, o que pode dificultar a geração de anaerobiose na porção apical desses canais, diferentemente do que ocorre em dentes humanos **(BAUMGARTNER *et al.*, 1991, SUNDQVIST, 1992)**. Enquanto estes apresentam, em sua maioria, comprimento médio entre 19 e 27 mm **(DE DEUS, 1960)**, os CRT dos dentes estudados variaram entre 9 e 14 mm. Observou-se no presente estudo que a proporção de anaeróbios estritos era menor nos dentes com menor CRT. Estes dentes, que eram representados em sua maioria pelos P_2, também apresentaram menores áreas de lesões periapicais induzidas. Da mesma forma, os P_4 apresentaram os maiores CRT e as maiores áreas de lesão, e os P_3, valores intermediários entre os P_2 e os P_4.

Embora sem associação estatisticamente significante, observou-se que quanto maior a área da lesão, maior o número de espécies microbianas isoladas, o que concorda com os achados prévios de **SUNDQVIST (1976) (1992)**.

SELTZER *et al.* (1964), SNYDER *et al.* (1966), ROWE & BINNIE, (1974) não observaram correlação entre o tamanho aparente da lesão periapical, radiograficamente, e a real extensão da lesão, histologicamente, e **PITT FORD (1984)** conclui que as radiografias não são um substituto satisfatório para o exame histológico na detecção de presença ou ausência de doença periapical em cães. Entretanto, **ALLARD *et al.* (1987)** e **LEONARDO *et al.* (1994)** observaram boa correlação entre seus achados radiográficos e microscópicos.

Neste estudo, as áreas das imagens das lesões periapicais nas radiografias variaram de 0,06 a 0,17 cm^2. Sugerimos, então que estudo futuro avalie histologicamente o desenvolvimento de lesões periapicais induzidas. **ALLARD *et al.* (1987)** e **LEONARDO *et al.* (1994)** observaram boa correlação entre seus achados radiográficos e microscópicos.

Durante o tempo do experimento, clinicamente, não foram observadas exarcebações agudas. Sabendo-se que os processos agudos estão relacionados à presença de bactérias anaeróbias estritas e Gram-negativas **(GOMES, 1995; GOMES *et al,* 1994, 1996 a,b,c, GOMES, 2002)**, a ausência, nos casos estudados, de aspectos clínicos característicos de processos agudos (edema e

abscessos) pode ser explicada pela presença de uma microbiota endodôntica predominantemente anaeróbia facultativa e Gram-positiva.

Na cavidade oral do cão, há uma prevalência de espécies de *Streptococcus* e *Staphylococcus*, seguidos de *Actinomyces* e enterobactérias **(DILLON 1976; MISIRLIGIL & TUNCER, 1990; STEPANOVIC *et al.*, 2001)**. Nosso trabalho mostrou que os *Streptococcus* e *Staphylococcus* também são importantes componentes da microbiota de canais radiculares infectados pela metodologia empregada, na qual os canais estavam em contato direto com o meio oral. A microbiota periodontal de dentes de cães tem sido estudada **(KORNMAN *et al.*, 1981; RENVERT *et al.*, 1996)**, porém, trabalhos que identifiquem a microbiota de canais radiculares desses animais são escassos na literatura.

Com o objetivo de melhor estudar o modelo cão para a pesquisa em Endodontia, foram realizados trabalhos nos quais se avaliou a microbiota dos canais radiculares **(FERREIRA *et al.*, 2002)** e a evolução radiográfica de lesões periapicais **(RABANG *et al.*, 2002)** utilizando dois métodos de indução: dentes contaminados com a microbiota oral por 1 semana e posteriormente selados; e dentes que permaneceram abertos por todo período do experimento. Nesses estudos, observou-se que nos canais dos dentes selados houve uma maior proporção de anaeróbios estritos e as lesões induzidas nesses dentes foram significantemente maiores que as dos dentes mantidos abertos. Alguns dentes que foram selados também desenvolveram abscessos durante o período

experimental, e reabsorções radiculares externas foram observadas em algumas imagens radiográficas dos dentes desse grupo.

Quando analisamos os resultados da microbiota dos canais radiculares infectados no presente estudo, em que os dentes foram mantidos expostos ao meio oral, verificamos que, por este método de indução, esta difere substancialmente da microbiota dos canais radiculares necrosados em dentes humanos. O método de indução de lesões periapicais em cães utilizando dentes selados após a contaminação **(FERREIRA *et al.*, 2002)**, permitiu a formação de uma microbiota mais representativa das situações clínicas encontradas nos pacientes indicados para o tratamento endodôntico, sendo, portanto, mais apropriado para estudos microbiológicos utilizados na Endodontia.

7. CONCLUSÃO

Embasados nos resultados obtidos e nas condições experimentais adotadas neste estudo, concluiu-se que;

1. O método de indução empregado, em que os canais radiculares ficaram expostos a contaminação do meio oral pelo período de 120 dias, produziu lesões periapicais.

2. A microbiota dos canais radiculares de dentes de cães com lesão periapical induzida, por exposição ao meio oral, é predominantemente anaeróbia facultativa e Gram-positiva, representada pelos gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus.*

3. Existe uma relação entre comprimento do dente, tamanho da lesão e o tipo de microbiota.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, U.; STRÖMBERG, U.; STRÖMBERG, T. Endodontic treatment of experimentally induced apical periodontitis in dogs. Endod Dent Traumatol, v. 3. p. 240-244, 1987.

ALLAKER, R.P.; LLOYD, D.H.; BAILEY, R.M. Population sizes and frequency of stafilococci at mucocutaneous sites on healthy dogs. The Veterinary Record, v. 30, p. 303-304, 1992.

ALLAKER, R.P.; *et al.* Prevallence of Porphyromonas and Prevotella species in the dental plaque of dogs. The Veterinary Record, v. 140, p. 147-148, 1997a.

ALLAKER, R.P.; *et al.* Dental plaque flora of the dog with reference to fastidious and anaerobic bacteria associated with bites. J Vet Dent, v. 14, n. 4, p. 127-130, 1997b.

ARAÚJO-FILHO, N.C. Neoformação óssea em seios maxilares de macacos elevados e enxertados com hidroxiapatita e plasma rico em plaquetas. Rio de Janeiro, 2001. 72 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Periodontia) – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

BALDASSARI-CRUZ, L.A.; LILLY, J.P.; RIVERA, E.M. The influence of dental operating microscope in locating the mesiolingual canal orifice. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, v.93, p. 190-194, 2002.

BALTIERI, P.W.Q.; *et al.* Estudo da anatomia interna de dentes de cães através do método de diafanização. Pesquisa Odontológica Brasileira, v. 16, p. 64, suplemento 2002.

BARKER, B.C.W.; LOCKETT, B.C. Utilization of the mandibular premolars of the dog for endodontic research. Austral Dent J, v. 16, n. 5, p. 280-286, 1971.

BAUMGARTNER, J.C.; FALKLER JR., WA. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. J Endod, v. 17, n. 8, p. 380-383, 1991.

BAUMGARTNER, J.C. Microbiologia endodôntica. *In*: WALTON, R.E.; TORABINEJAD, M. Principles and practice of endodontics. 1ª ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1997. cap. 16, p. 278.

BAUMGARTNER, J.C., *et al* Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. J Endod, v. 25, n. 6: 413-415, 1999.

BENATTI, O., *et al.* A histological study of the effect of diameter enlargement of the apical portion of the root canal. J Endod, v. 11, n. 10, p. 428-434, 1985.

BERBERT, F.L.C.V., *et al.* Influence of root canal dressings and sealers on repair of apical periodontitis after endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 93, n. 2, p. 184-189, 2002.

BERBERT, F.L.C.V. Análise histológica da reparação apical e periapical pós-tratamento endodôntico de dentes de cães com reação periapical crônica induzida, em função do curativo de demora com Calen/PMCC ou Calasept, e da obturação do canal radicular com Sealapex ou AH Plus. Bauru, 1999. 306 p. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

BERG, J.O.; NORD, C.E. A method for isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. Scand J Dent Res, v. 81, n. 2, p. 163-166, 1973.

BERGENHOLTZ, G.; CRAWFORD, J.J. Endodontic Microbiology. *In:* WALTON, R.E.; TORABINEJAD, M. Principles and practice of endodontics. 1st ed. Philadelphia, USA: W.B. Saunders Co, 1989. p. 267-282.

BERKOVITZ, B.K.B. Tooth development in the albino ferret (*Mustela putorius*) with special reference to the permanent carnassial. Arch Oral Biol, v. 18, n. 4, p. 465-471, 1973.

BHASKAR, S.N.; RAPPAPORT, H.M. Histologic evaluation of endodontic procedures in dogs. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 31, n. 4, p. 526-535, 1971.

BLOCK, R.M.; *et al.* Antibody formation to dog pulp tissue altered by AH-26 sealer via the root canal. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 48, n. 2, p. 169-174, 1979.

BOWEN, W.H. Ethical use of animals. J Dent Res, v. 73, n.11, p. 1773-1777, 1994.

BROOK, I. Human and animal bite infecctions. J. Pharm. Pract., v. 28, p. 713-718, 1989.

BURROWS, C.F.; HARVEY, C.E. Oral examination and diagnostic techniques. *In*: HARVEY, C.E. Veterinary Dentistry. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1985. cap. 3.

BYSTRÖM, A.; SUDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 55, n. 13: 307-312, 1983.

CITROME, G.P.; KAMINSKI, E.J.; HEUER, M.A. A comparative study of tooth apexification in the dog. J Endod, v. 5, n. 10, p. 290-297, 1979.

CONRADS, G.; *et al.* The use of 16S rDNA direct PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. J Endod, v. 23, n. 7, p.433-438, 1997.

DAVIS, M.S.; JOSEPH, S.W.; BUCHER, J.F. Periapical and intracanal healing following incomplete root canal fillings in dogs. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 31, n. 5, p. 662-675, 1971.

DE DEUS, Q.D. Topografia da cavidade pulpar.Contribuição ao seu estudo. Belo Horizonte, 1960. Tese. UFMG.

DE DEUS, Q.D. Frequency, location and direction of the lateral, secondary and accessory canals. J. Endod., v. 1, p. 361-366, 1975.

DILLON, A.R. The oral cavity. *In*: JONES, B.D. Canine and feline gastroenterology. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1986. cap. 1.

DIXON, C.M.; RICKERT, U.G. Histologic verification of results of root canal therapy in experimental animals. J Am Dent Assoc, v. 25, n. 11, p. 1781-1803, 1938.

DOUGHERTY, W.J.; *et al.* Black-pigmented bacteria in coronal and apical segments of infected root canals. J Endod, v.24, n. 5, p. 356-358, 1998.

ERGSTRÖM, B.; FROSTELL, G. Experiences of bacteriological root canal control. Acta Odontol Sacandin, v. 22, p.43-69, 1964.

ESBERARD, R.M. Reparação apical e periapical dos dentes de cães portadores de lesões periapicais induzidas - influência da técnica. Estudo radiográfico e microscópico. Araraquara, 1992. 225 p. Tese (Livre Docência em Endodontia) - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade de São Paulo.

FABRICIUS, L.; *et al.* Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. Scand Den J Res, v. 90, n. 3, p. 200-206, 1982.

FERREIRA, F.B.A.; *et al.* Microbiota dos canais radiculares de dentes selados e dentes abertos no modelo experimental cão. Anais da 16ª JAFOA, Araraquara, SP, 2002.

FISCHER, R.G.; KLINGE, B. Clinical and histological evaluation of ligature – induced periodontitis in the domestic ferret. J Clin Periodontol, v. 21, p. 230-239, 1994.

FITZGERALD, R.J. Dental caries research in gnotobiotic animals. Caries Res, v. 2, p. 139-146, 1968.

FOUAD, A.F.; WALTON, R.E.; RITTMAN, B.R. Induced periapical lesions in ferret canines: histologic and radiographic evaluation. Endod Dent Traumatol, v. 8, p. 56-62, 1992.

FREITAS, A.; ROSA, J.E.; SOUZA, I.F. Radiologia odontológica. 5ª. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2000. cap. 8, p. 114-131.

FRIEDMAN, S.; *et al.*. In vivo model for assessing the functional efficacy of endodontic filling materials and techniques. J Endod, v. 23, n. 9, p.557-561, 1997.

FRIEDMAN, S.; *et al.* In vivo resistance of coronally induced bacterial ingress by an experimental glass ionomer cement root canal sealer. J Endod, v. 26, n. 1, p.1-5, 2000.

GADÊ-NETO, C.R. Estudo microbiológico da bolsa periodontal e canais radiculares de dentes de cães com doença periodontal induzida. Piracicaba, 2000.

213 p. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica- Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

GADÊ-NETO, C.R.; *et al.* Avaliação *in vivo/in vitro* da microinfiltração coronária – estudo piloto em cães. Anais da 18ª JOP. Piracicaba, SP, 2002.

GENCO, R.J.; EVANS, R.T.; ELLISON, S.A. Dental research in microbiology with emphasis on periodontal disease. J Am Dent Assoc, v. 78, p. 1016-1036, 1969.

GOLDSTEIN, E.J.C.; CITRON, D.M.; FINEGOLD, S.M. Role of anaerobic bacteria in bite-wound infections. Reviews of Infectious Diseases, v. 6, supplement 1, p.S177-S183, 1984.

GOLDSTEIN, E.J. Bites wounds and infeccions. Clin. Infect. Dis., v. 14, p. 633-640, 1992.

GOMES, B.P.F.A.; DRUCKER, D.B.; LILLEY, J.D. Association of specific bacteria wiyh some endodontic signs and symptons. Int Endod J, v. 27, p. 291-298, 1994a.

GOMES, B.P.F.A.; DRUCKER, D.B.; LILLEY, J.D. Positive and negative associations between bacterial species in root canals. Microbios, v. 80, p. 231-243, 1994b.

GOMES, B.P.F.A. An investigation into the root canal microflora. Manchester, UK, 1995. 450 p. PhD Thesis - University of Manchester.

GOMES, B.P.F.A.; LILLEY, J.D.; DRUCKER, D.B. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. Int Endod J, v. 29, n. 2, p. 69-75, 1996a.

GOMES, B.P.F.A.; LILLEY, J.D.; DRUCKER, D.B. Clinical significance of dental root canal microflora. J Dent, v. 24, n. 1-2, p. 47-55, 1996b.

GOMES, B.P.F.A.; LILLEY, J.D.; DRUCKER, D.B. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. Int Endod J, v. 29, n. 4, p. 235-241, 1996c.

GOMES, B.P.F.A. Investigação dos microrganismos envolvidos na sintomatologia e no insucesso do tratamento endodôntico. Piracicaba, 2002. 210 p. Tese (Livre Docência em Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

GOTTLIEB, B.; SCHWARTZ, A.M.; STEIN, G. Neue Wwege der biologischen kontrolle von wurzelbehandlungsmethoden . Deutsche Zahnärtzl Wchnschr, v. 32, p. 145, 1929.

GREEN, C.J. Animal anestesia. London: Laboratory Animals Ltd., 1979. cap.12, p. 203.

GROISMAN, M.; KLINGE, B. Clinical and histological findings in ligature-induced experimental periodontitis in dogs. J Clin Periodontol, v. 17, p. 186-190, 1990.

HAAPASALO, M.; RANTA, H.; RANTA, K. Facultative Gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. Acta Odontol Scandin, v. 41, p. 19-22, 1983.

HARVEY, C.E.; DUBIELZIG, R.R. Anatomy of the oral cavity in the dog and cat. *In*: HARVEY, C.E. Veterinary Dentistry. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1985. cap. 2, p. 12.

HESS, W.; KELLER, O. Le tavole anatomiche di W. Hess. Itália: Edizioni Scientifiche Oral B, 1988.

HILL, T.J. Experimental dental granulomas in dogs. J Am Dent Assoc, v. 19, n. 8, p. 1389-1398, 1932.

HOLLAND, R. Processo de reparo do coto pulpar e dos tecidos periapicais após biopulpectomia e obturação de canal com hidróxido de cálcio ou óxido de zinco e eugenol. Estudo histoilógico em dentes de cães. Araçatuba, 1975. 111 p. Tese (Livre Docência em Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista.

HOLLAND, R.; *et al.* A histological study of the effect of calcium hidroxide in the treatment of pulpless teeth of dogs. J Br Endod Soc, v. 12, n. 1, p. 15-23,1979a.

HOLLAND, R.; *et al.* Root canal treatment with calcium hidroxide. I. Effect of overfilling and refilling. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 47, n. 1, p. 87-92, 1979b.

HOLLAND, R.; SOARES, I.J.; SOARES, I.M. Influence of irrigation and intracanal dressing on the healing process of dogs´ teeth with apical periodontitis. Endod Dent Traumatol, v. 8, p. 223-229, 1992.

ISERMANN, G.T; KAMINSKI, E.J. Pulpal response to bacteria in the dog. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 48, n. 4, p. 353-357, 1979.

JANSEN, J.; PILOT, T. Predictability of probing depths in ligature-induced periodontal defects in beagle dogs. J Periodontal Res, v.16, p. 372-378, 1981.

JANSEN, J. Artificial periodontal defects around incisor teeth of beagle dogs. J Periodontal Res., v.17, p. 210-218, 1982.

JORDAN, H.V.; KEYES, P.H. Aerobic, gram-positive, filamentous bacteria as etiologic agents of experimental periodontal disease in albino hamsters. Arch Oral Biol, v. 9, p. 401-414, 1964.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R.; FITZGERALD, R.J. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and convencional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 20, N. 3, p. 340-349, 1965.

KETTERING, J.D.; TORABINEJAD, M. Microbiologia e imunologia. *In*: COHEN, S.; BURNS, R.C. Caminhos da polpa. 6ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1994. cap. 13, p. 364.

KEYES, P.H., *et al.* The effect of various drugs on caries and periodontal disease in albino hamsters. Adv F Res Dent Caries Prev, v. 1, p. 159-177, 1962.

KING, J.D. Experimental production of gingival hyperplasia in ferrets given "epanutin" (sodium diphenylhydantoin). J Exp Pathol, v. 33, p. 491-489, 1952.

KING, J.D.; *et al.* Chemical and x-ray examination of deposits removed from the teeth of golden hamsters and ferrets. J Dent Res, v. 34, n. 5, p. 650-660, 1955.

KOBAYASHI, T.; *et al.* The microbial flora from root canals and periodontal pockets of non-vital teeth associated with advanced periodontitis. Int Endod J, v. 23, P. 100-106, 1990.

KOENIGS, J.F.; *et al.* Induced apical closure of permanent teeth in adult primates using a resorbable form of tricalcium phosphate ceramic. J Endod, v.1, n.3, p. 102-106, 1975.

KOLBERG, R. Animal models point the way to humam clinical trials. Science, v. 256, n. 5058, p. 772-773, 1992.

KORNMAN, K.S.; *et al.* The predominant cultivable subgingival flora of beagle dogs following ligature placement and metronidazole therapy. J Periodontal Res, v.16, p. 251-258, 1981.

LALIBERTÉ, M.; MAYRAND, D. Characterization of black-pigmented *Bacteroides* strains isolated from animals. J Appl Bacteriol, v. 55, p. 247-252, 1983.

LAWSON, D.D. *et al.* Development and eruption of the canine dentition. Br Vet J, v. 123, p. 26-30, 1967.

LEE, A. Animal models and vacine development. Baillieres Clin Gatroenterol, v. 9, n. 3, p. 615-632, 1995.

LEONARDO, R.T. Avaliação microscópica da reação apical e periapical frente a dois cimentos obturadores de canais radiculares a base de hidróxido de cálcio (CRCS e Sealapex) em dentes de cães. Bauru, 1992. 108 p. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

LEONARDO, M.R.; *et al.* Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. J Endod, v. 19, n. 7, p. 348-352, 1993.

LEONARDO, M.R.; *et al.* Radiographic and microbiologic evaluation of posttreatment apical and periapical repair of root canals of dogs` teeth with experimentally induced chronic lesion. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 78, n. 2, p. 232-238, 1994.

LEONARDO, M.R.; *et al.* Histopathological observations of periapical repair in teeth with radiolucent areas submitted to two different methods of root canal treatment. J Endod, v. 21, n. 3, p. 137-141, 1995.

LEVY, B.M. Animal analogues for the study of dental and oral diseases. Dev Biol Standard, v. 45, p. 51-59, 1980.

LOMÇALI, G.; SEN, B.H.; ÇANKAYA, H. Scanning electron microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. Endod Dent Traumatol, v. 12, p. 70-76, 1996.

MARSH, P.; MARTIN, M. Oral Microbiology. 3rd ed. London, UK: Chapman & Hall, 1992.

MASSON, E.; HENNET, P.R.; CALAS, P.L. Apical root canal anatomy in the dog. Endod Dent Traumatol, v. 8, p.109-112, 1992.

MASSONE, F. Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap.12, p.116.

MATUSOW, R.J. Endodontc cellulites "flare-up". Case report. Aust Den J, v.40, p. 36-38, 1995.

MATSUMIYA, S.; KITAMURA, M. Histo-pathological and histo-bacteriological studies of the relation between the condition of sterilization of the interior of the root

canal and the healing process of periapical tissues in experimentally infected root canal treatment. Bull Tokyo Dent Coll, v. 1, n. 1, p. 1-19, 1960.

McCORMICK, J.E.; WEINE, F.S.; MAGGIO, J.D. Tissue pH of developing periapical lesions in dogs. J Endod, v. 9, n. 2, p. 47-51, 1983.

MILLER, W.D. An introdution to the study of the bacteriological pathology of dental pulp. Dent Cosmos, v. 36, p. 505-528, 1894.

MISIRLIGIL, A.; TUNCER, I. Oral bacterial flora of dogs. Ankara Üniv. Dis. Hek. Fak. Derg. v. 17, n. 1, p. 79-82, 1990.

MOLANDER, A.; *et al.* Microbial status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J, v. 31, p.1-7, 1998.

MÖLLER, A.J.R. Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth: methodological studies. Göteborg: Akademiförlaget, 1966. 380 p.

MORAES, S.R.; *et al.* Comparison of the effectiveness of bacterial culture, 16S rDNA direct polymerase chain reaction, and checkerboard DNA-DNA hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic infections. J Endod, v. 28. n. 2, p. 86-89, 2002.

MORELAND, A.F.; GLASER, C. Evaluation of ketamine, ketamine-xylasine and ketamine-diazepam anesthesia in the ferret. Lab Animal Science, v. 35, n. 3, p. 287-290, 1985.

MORSE, D.R.; *et al.* Infectious flare-ups and serious sequelae following endodontic treatment: a prospective randomized trial on efficacy of antibiotic prophylaxis in

cases of asymptomatic pulpal-periapical lesions. Oral Surg, v. 64, n. 1, p. 96-109, 1987.

NAKAMURA, Y.; *et al.* The induction of reparative dentine by enamel proteins. Int Endod J, v. 35, n.5, p. 407-417, 2002.

NIEVES, M.A.; *et al.* Bacterial isolates from plaque and from blood during and after routine dental procedures in dogs. Veterinary Surgery, v. 26, p. 26-32, 1997.

NISENGARD, R.J.; GOODMAN, D.; SCHEIN, B. Infecções periapicais. *In:* NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G. Microbiologia oral e imunologia. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 30, p. 336-341.

ORBÁN, B. The problem of root canal treatment. J Am Dent Assoc, v. 19, p. 1384-1388, 1932.

ORBÁN, B. Action of paraformaldehyde on dental pulp. J Dent Res, v. 13, n. 3, p. 215-216, 1933.

ÖSTBY, B.N. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. Acta Odontol Scand, v. 19, n. 3-4, p. 323-353, 1961.

OTOBONI FILHO, J.A, Processo de reparo de dentes de cães com lesão periapical após tratamento endodôntico em uma ou duas sessões. Influência do tempo de curativo de demora e do tipo de material obturador. Araçatuba, 2000. 341 p. Tese (Livre docência em Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista.

PAGE, R.C.; SCHROEDER, HE. Periodontitis in man and other animals. A comparative review. New York: Karger, 1982, p.127-158.

PANZARINI, S.R. Tratamento de dentes com lesão periapical crônica. Influência de diferentes tipos de curativo de demora e material obturador de canal. Estudo histológico em cães. Araçatuba, 1996. 200 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Cirurgia e Traumatologia Buço-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista.

PASHLEY, D. H.; MICHELICH, V.; KEHL, T. Dentin permeability: effects of smear layer removal. J Prosthet Dent, v. 46, p. 531-37, 1981.

PINHEIRO, E.T.; GOMES, B.P.F.A.; FERRAZ, C.C.R.; SOUSA, E.L.R.; TEIXEIRA, F.B.; SOUZA FILHO, F.J. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Int Endod J, v. 36, p. 1-11, 2003.

PITT FORD, T.R. The radiographic detection of periapical lesions in dogs. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 57, n. 6, p. 662-667, 1984.

RABANG, H.R.C., *et al.* Análise radiográfica de dois métodos de indução de reações periapicais em dentes de cães. Pesquisa Odontológica Brasileira, v. 16, p. 219, suplemento 2002.

RANTA, K.; HAAPASALO, M.; RANTA, H. Monoinfection of root canal with P*seudomonas aeruginosa*. Endod Dent Traumatol, v. 4, p.269-272, 1988.

RENVERT, S., *et al.* Histological and microbiological aspects of ligature-induced periodontitis in beable dogs. J Clin Periodontol, v. 23, n. 4, p. 310-319, 1996.

RODRIGUES, R.R. Análise radiográfica da região de furca, após a confecção e contaminação de trepanações experimentais em dentes de cães seladas com diferentes materiais. Piracicaba, 2000. 77 p. Dissertação (Mestrado em Clínica

Odontológica – Área de Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

ROUSH, J.K.; HOWARD, P.E.; WILSON, J.W. Normal blood supply to the canine mandible and manbibular teeth. Am J Vet Res, v. 50, n. 6, p. 904-907, 1989.

ROWE, A.H.R. Effect of root filling materials on the periapical tissues. Br Dent J, v. 122, p. 98-102, 1967.

ROWE, A.H.R.; BINNIE, W.H. The incidence and location of micro-organisms following endodontic treatment. Br Dent J, v. 141, p. 91-95, 1977.

ROWE, A.H.R. Problems of intra-canal testing of endodontic materials. Int Endod J, v. 13, p. 96-103, 1980.

SALMAN, M.A., *et al.* Histological evaluation of repair using a bioresorbable membrane beneath a resin-modified glass ionomer after mechanical furcation perforation in dogs` teeth. J Endod, v. 25, n. 3, p. 181-186, 1999.

SAPHIR, D.A.; CARTER, G.R. Gingival flora of the dog with special reference to bacteria associated with bites. J Clin Microbiol, v. 3, n. 3, p. 344-349, 1976.

SCHNECK, G.W. Caries in the dog. J Am Vet Med Assoc, v. 150, n. 10, p. 1142-1143, 1967.

SELTZER, S., *et al.* A histologic evaluation of periapical repair following positive and negative root canal cultures. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 17, n. 4, p. 507-532, 1964.

SHABESTARI, L.; TAYLOR, G.N.; ANGUS, W. Dental eruption pattern of the beagle. J Dent Res, v.46, n. 1, p. 276-278, 1967.

SHOJI, S.; NAKAMURA, M.; HORIUCHI, H. Histopathological changes in dental pulps irradiated by CO_2 laser: a preliminary report on laser pulpotomy. J Endod, v. 11, n. 9, p. 379-384, 1985.

SILVEIRA, F.F. Efeito do tempo de ação do "curativo de demora" à base de hidróxido de cálcio, utilizado em canais radiculares de dentes de cães com lesão periapical crônica induzida. Análise histológica e microbiológica. Araraquara, 1997. 218 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Concentração Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista.

SINAI, I., *et al.* Biologic aspectcs of endodontics II. Periapical tissue reactions to pulp extirpation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 23, p. 664-679, 1967.

SIQUEIRA JUNIOR, J.F.; LOPES, H.P. Microbiologia oral. *In*: LOPES, H.P.; SIQUEIRA JUNIOR, J.F. Endodontia: biologia e técnica. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999. cap. 10, p. 185, e 199.

SIQUEIRA JUNIOR, J.F., *et al.* Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 89, n. 6, p. 744-748, 2000.

SIQUEIRA JUNIOR, J.F., *et al.* Polymerase chain reaction detection of *Treponema denticola* in endodontic infections within root canals. Int Endod J, v. 34, p. 280-284, 2001.

SJÖGREN, U., *et al.* Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. Int Endod J, v. 30, p. 297-306, 1997.

SNYDER, D.E.; SELTZER, S.; MOODNIK, R. Effects of N_2 in experimental endodontic therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 21, n. 5, p. 635-656, 1966.

SOARES, I.J.; HOLLAND, R.; SOARES, I.M.L. Comportamento dos tecidos periapicais após tratamento endodôntico em uma ou duas sessões – influência do cimento obturador. Rev Bras Odontol, v. XLVII, n. 2, p. 34-41, 1990a.

SOARES, I., *et al.* Periapical tissue response to two calcium hydroxide-containing endodontic sealers. J Endod, v. 16, n. 4, p. 166-169, 1990b.

SOARES, J.A. Estudo microbiológico dos canais radiculares, histopatológico e histobacteriológico dos tecidos apicais e periapicais, em função do preparo biomcânico e de dois curativos de demora à base de hidróxido de cálcio, utilizados em dois períodos de avaliação, no tratamento endodôntico de dentes de cães, com reação periapical crônica induzida. Araraquara, 1999. 455 p. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista.

SOCRANSKY, S.S., *et al.* "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. Biotechniques, v. 17, n. 4, p. 788-792, 1994.

SOUZA FILHO, F.J.; BENATTI, O.; ALMEIDA, O.P. Influence of the enlargement of the apical foramen in periapical repair of contaminated teeth of dog. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 64, n. 4, p. 480-484, 1987.

SOUZA FILHO, F.J.; VALDRIGHI, L.; BERNARDINELLI, N. Influência do nível da obturação e alargamento do forame apical no processo de reparo tecidual. Rev Assoc Paul Cir Dent, v. 50, n. 2, p. 175-177, 1996.

SOUZA FILHO, F.J.; TEIXEIRA, F.B. Uso do Microscópio em Endodontia. *In:* LOPES, H.P.; SIQUEIRA JUNIOR, J.F. Endodontia: biologia e técnica. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999. cap. 29, p. 633-638.

SOUZA FILHO, F.J.; TEIXEIRA, F.B. O emprego da microscopia ótica em endodontia. *In*: VANZILLOTTA, P.S.; GONÇALVES, A.R. (Coord.) Odontologia integrada: atualização multidisciplinar para o clínico e o especialista. Rio de Janeiro: Pedro Primeiro, 2001. cap. 10, p. 279-287.

STEPANOVIC, S., *et al. Staphylococcus sciuri* as a part of skin, nasal and oral flora in healthy dogs. Veterinary Microbiology, v. 82, p. 177-185, 2001.

STRÖMBERG, T. Wound healing after total pulpectomy in dogs. Odontol Revy, v. 20, p. 147-163, 1969.

SU, R.Y. The effect of berberine in sterilizing infective root canal of deciduous teeth. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi , v. 27, n. 5, p. 302-305, 319, 1992.

SUNDQVIST, G. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps. Umea: University of Umea, 1976. Odontological Dissertation, 7.

SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. J Endod, v. 18, n. 9, p. 427-430, 1992.

SUNDQVIST, G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 78, n. 4, p. 522-530. 1994.

SUNDQVIST, G.; FIDGOR, D.; SJOGREN, U. Microbiology analyses of teeth with endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 85, p. 86-93, 1998.

SYED, S.A.; LOESCHE, W.J. Survival of human dental plaque flora in various transport media. Appl Microbiol, v. 24, n. 4, p. 638-644, 1972.

TAKAHASHI, K.; KISHI, Y.; KIM, S. A scanning electron microscope study of the blood vessels of dog pulp using corrosion resin casts. J Endod, v. 8, n. 3, p. 131-135, 1982.

TAKAHASHI, K. Vascular architecture of dog pulp using corrosion resin cast examined under a scanning electron microrcope. J Dent Res, v. 64, (Spec Issue), p. 579-584, 1985.

TANI-ISHII, N. *et al.* Changes in root canal microbiota during the development of rats periapical lesions. Oral Microbiol Immunol, v. 9, p. 129-135, 1994.

TANOMARU FILHO, M. Comportamento dos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães portadores de reação periapical crônica em função da técnica de neutralização do conteúdo séptico-tóxico e do cimento obturador empregado no tratamento endodôntico. Avaliação radiográfica e histopatológica. Araraquara, 1996. 296 p. Tese (Doutorado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista.

TORNECK, C.D.; SMITH, J.S. Biologic effects of endodontic procedures on developing incisor teeth. I. Effect of partial and total pulp removal Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 30, n. 2, p. 258-266, 1970.

TORNECK, C.D.; SMITH, J.S.; GRINDALL, P. Biologic effects of endodontic procedures on developing incisor teeth. IV. Effect of débridement procedures and calciumhydroxide-canphorated parachorophenol paste in the treatment of experimentally induced pulp and periapical disease Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 35, n. 4, p. 541-554, 1973.

UZEDA, M. Microbiologia oral: etiologia da cárie, doença periodontal e infecções endodônticas. Rio de Janeiro: MEDSI, 2002. 104 p.

VALDRIGHI, L. Influência dos "espaços vazios" nos resultados dos tratamentos de canais radiculares. Avaliação radiográfica e histopatológica (Estudo experimental em cães). Piracicaba, 1976. Tese (Livre docência em Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

VIDAIR, R.V.; BUTCHER, E.O. Regeneration of tissue into the pulp canal of monkey's teeth. J Dent Res, v. 10, n. 4, p. 163-166, 1955.

VIEIRA, S.; HOSSNE, W.S. Pesquisa médica: a ética e a metodologia. São Paulo: Pioneira, 1998. cap. 2, p. 38-40.

WADE, W.G.; *et al.* Molecular detection of novel anaerobic species in dentoalveolar abcesses. Clin Infect Dis, v.25 (Suppl. 2), p. 235-236, 1997.

WEAVER, M.E.; SORENSEN, F.M.; JUMP, E.B. The miniature pig as an experimental animal in dental research. Arch Oral Biol , v. 7, p. 17-24, 1962.

WEST, N.M.; *et al.* A new approach to the use of silver cones: the effect of negatively charged Teflon: a preliminary study. J Endod, v. 5, n. 7, p. 208-213, 1979.

WIKSTRÖM, M.; *et al.* Microbial associations in periodontitis sites before and after treatment. Oral Microbiology and Immunology, v. 8, n. 4, p. 213-218, 1993.

XU, J.; JIANG, Y.; DONG, Q. Experimental study on supraeruption of the unopposed miniature pig molars. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi , v. 32, n. 5, p. 276-278, 1997.

YANKELL, S.L. Oral disease in laboratory animals: animal models of human dental disease. *In*: HARVEY, C.E. Veterinary Dentistry. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1985. cap. 19.

YOSHIDA, M., *et al.* Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. J Endod, v. 13, n. 1, p. 24-28, 1987.

ZAMBON, J.J.; HARASZTHY, V.I. The laboratory diagnosis of periodontal infections. Periodontology 2000, v. 7, p. 69-82, 1995.

ANEXO I

1. MEIO DE TRANSPORTE

1.1. RTF – Reduced Transport Fluid *

1.1.1. Descrição

É um meio não seletivo de transporte e estocagem. Com exceção de 0,02% de dithiothreitol (DTT), que é adicionado ao meio como um agente redutor, não há nenhum outro componente que propicie o crescimento bacteriano. A adição de uma pequena concentração de EDTA (0,1M) ao RTF promove uma distribuição mais uniforme das células bacterianas. Como EDTA atua como um agente quelante, sua incorporação ao RTF é útil por se ligar a cátions bivalentes, como Ca^{+2}, que estão presentes em altas concentrações na placa e contribuem para a agregação da placa bacteriana.

RTF não contem agentes bacteriostáticos que poderiam afetar a multiplicação de bactérias na amostra. Conseqüentemente, crescimento pode ocorrer neste meio, se a amostra contiver nutrientes que permitam a multiplicação

*Syed AS, Loesche WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media. Appl Microbiol 1972: **24**: 638-644.

por período limitado. Contudo, não foi comprovado crescimento de microrganismos da placa neste meio. Embora sua eficiência como um meio de estoque varie de acordo com a natureza da amostra, o desempenho do RTF é melhor do que outros meios já testados. A suplementação do meio com Dithiothreitol (DTT) o torna mais resistente à oxidação em condições de aerobiose. A viabilidade dos organismos pode ser mantida neste meio quando congelado. A adição de Resazurin ao RTF indica se houve ou não oxidação durante o experimento.

1.1.2. Fórmula

Solução 1 (Estoque)

K_2HPO_4	0,6g
H_2O	100mL

Solução 2 (Estoque)

NaCl	1,2g
KH_2PO_4	0,6g
$(NH_4)_2SO_4$	1,2g
Mg SO_4	0,25g
H_2O	100mL

RTF	100mL
Solução 1	7,5mL
Solução 2	7,5mL
EDTA 0,1M (0,3722g/10mL)	1mL
Na2CO3 8% (0,4g/5mL)	0,5mL
Dithiothreitol 1% (0,05g/5mL)	2mL
Resazurin 0,1% (0,01g/10ml)	0,1mL
H_2O	81,4mL

pH: 7 ± 0,2

ANEXO II

1. MEIOS DE CULTURA

1.1 Fastidious Anaerobe Ágar (FAA) – LAB M (Bury, UK)

1.1.1. Descrição

Meio capaz de favorecer o crescimento dos anaeróbios isolados clinicamente. As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação de crescimento. Amido e bicarbonato atuam como agentes desintoxicantes, enquanto a hemina favorece a produção de pigmento nos "*Bacteroides*" produtores de pigmento preto. Agentes específicos de estimulação de crescimento: cisteína para *Fusobacterium* spp, *Propionibacterium acnes,* e *Bacteróides fragilis*; arginina para *Eubacterium* spp.; pirofosfato solúvel para *Porphyromonas asaccharolytica.* Piruvato contribui para a neutralização do peróxido de hidrogênio e pode ser também utilizado pela *Veillonella* spp. como fonte de energia. Vitamina K e succinato de sódio fornecem fatores essenciais de crescimento para alguns anaeróbios, como também 0,1% de glicose. O nível baixo de glicose impede a produção de níveis elevados de ácidos e álcoois que podem inibir o crescimento bacteriano.

1.1.2. Preparo

Adicionar 23,0 g do pó em 500 ml de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min. e depois agitada. É esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min e resfriada a 47 °C. Então adicionar assepticamente 5% de sangue desfibrinado de carneiro, misturar bem e distribuir nas placas de petri.

1.1.3. Aparência

Vermelho devido à adição de sangue. O meio fica escuro (reduzido) mais tarde devido à adição de redutores.

1.1.4. Armazenagem do meio preparado

Placas: até 7 dias a 4 °C fora do alcance da luz.

1.1.5. Inoculação

Plaqueamento na superfície da placa.

1.1.6. Incubação

37 °C anaerobicamente (80% H_2, 10% N_2, 10% CO_2 , por períodos de 48 horas e 7 dias).

1.1.7. Fórmula

	g/L
Mistura de peptonas	23,0
Cloreto de sódio	5,0
Amido solúvel	1,0
Ágar nº 2	12,0
Glicose	0,4
Piruvato de sódio	1,0
HCL cisteína monoidratada	1,0
Hemina	0,5
Vitamina K	0,001
L-arginina	1,0
Pirofosfato solúvel	0,25
Succinato de sódio	0,5

pH: 7,4 ± 0,2

Este meio pode ser enriquecido através da adição de Vitamina K_1 e Hemina:

1.2. Solução Vitamina K_1 (1 mg/mL) - Sigma-Aldrich, USA.

1.2.1. Preparo

Pese 0,1 g de Vitamina K_1 e adicione a um tubo contento 100 mL de etanol absoluto. Armazene o vidro em refrigerador, devidamente vedado e protegido da luz. Para usar como suplemento para o meio de cultura adicione 1 µL/mL.

1.3. Solução de Hemina (5 mg/mL) - Sigma-Aldrich, USA.

1.3.1. Preparo

Dissolva 0,5 g de Hemina em 10 mL de Hidróxido de sódio (1N). Complete com água destilada até atingir 100 mL. Autoclave a 121°C por 15 minutos. Para usar como suplemento para o meio de cultura adicione 1 µL/mL.

Este meio pode se tornar seletivo para várias espécies de anaeróbios através da adição do antibiótico apropriado:

1.4. FAA (Fastidious Anaerobe Ágar)+ NAL (ácido nalidíxico-X 091) – LAB-M, Bury-UK

Meio seletivo para anaeróbios Gram-positivos não formadores de esporos.

1.4.1 Preparo

Para 500mL de água deionizada + FAA (g) + 5% de sangue desfibrinado de carneiro, utiliza-se um vidro de ácido nalidíxico (X091) (5 mg), previamente diluído em 5 mL de água destilada, adicionando-o assepticamente ao meio estéril e resfriado à 47°C.

Concentração final: Ácido nalidíxico=0,01mg/Ml

1.5. FAA + NAL+ VAN (Vancomicina-X090)- LAB-M, Bury-UK

Meio seletivo para anaeróbios Gram-negativos.

1.5.1. Preparo

Para 500mL de água deionizada + FAA (g) + 5% de sangue desfibrinado de carneiro, utiliza-se um vidro de ácido nalidíxico (X091) (5mg) e um vidro de vancomicina (X090) (1,25 mg), previamente diluídos em 5mL de água destilada,

em seguida as misturas são adicionadas assepticamente ao meio estéril e resfriado à 47°C.

Concentração final:

Ácido nalidixico=0,01mg/mL

Vancomicina=0,0025mg/mL

1.6. FAA + NEO (neomicina-X015)- LAB-M, Bury-UK

Meio seletivo para clostrídios e outros anaeróbios, como *Bacteroides fragilis* e alguns cocos anaeróbios.

1.6.1. Preparo

Para 500mL de água deonizada + FAA (g) + 5% de sangue de carneiro, utiliza-se um vidro de neomicina (37,5 mg) que é previamente diluído em 5mL de água destilada. Em seguida a mistura é adicionada assepticamente ao meio estéril e resfriado a 47°C.

Concentração final: neomicina=0,075mg/mL

1.7. FAA + VAN(X090) + KAN (Kanamicina-X018) – LAB-M, Bury-UK.

Meio seletivo para anaeróbios Gram-negativos, particularmente bactérias produtoras de pigmento negro.

1.7.1 Preparo

Para 500mL de água deionizado + FAA (g) + 5% de sangue de desfibrinado de carneiro, um vidro de vancomicina (X090) (1,25 mg) e um vidro de Kanamicina (X018) (37,5 mg) que são previamente diluídos em 5mL de água destilada. Em seguida as misturas são adicionadas assepticamente ao meio estéril e resfriado à 47°C.

Concentração final: Vancomicina =0,0025mg/mL; Kanamicina=0,075mg/mL

1.8. FAA + SUPLEMENTO ANAERÓBICO G-N

Anaerobe Selective Supplement G-N (OXOID, Hamshire-UK)

Suplemento seletivo para anaeróbios Gram-negativos.

Cada vidro é suficiente para suplementar 500mL de meio.

1.8.1. Composição

Hemina	2,50mg
Menadiona	0,25mg
Succinato sódico	1,23mg
Ácido nalidíxico	5,0mg
Vancomicina	1,25mg

1.8.2. Preparo

Agregar ao vidro 10mL de água destilada e misturar suavemente até dissolver completamente. Agregar o conteúdo do vidro a 500mL de meio de cultura + 5% de sangue desfibrinado de carneiro que deve estar a 47°C. Misturar bem e distribuir em placas de petri estéreis.

1.9. Fastidious Anaerobe Broth (FAB) - LAB M (Bury, UK)

1.9.1. Descrição

Meio de cultura líquido capaz de favorecer o crescimento de bactérias anaeróbias e facultativas. As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação de crescimento. Vitamina K, hemina e L-cisteína são também fatores de crescimento para alguns anaeróbios. L-cisteína e tioglicolato de sódio reduzem o Eh (redox) do meio e o ágar inibe a absorção do oxigênio.

1.9.2. Preparo

Dispensar 14,85g do pó em 500 mL de água deionizada. A mistura é dispensada em tubos que são deixados semiabertos durante a esterilização, que é feita por autoclavagem a 121°C por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a autoclavagem.

1.9.3. Aparência

Amarelo claro.

1.9.4. Armazenagem

Em tubos com tampas, até 3 meses a 15-20 °C fora do alcance da luz.

1.9.5. Inoculação

Se usado como meio de cultura com sangue, uma diluição mínima de 1:10 deve ser usada.

1.9.6. Incubação

37 °C por 24-72 horas. Tubos bem fechados.

1.9.7 Fórmula

	g/L
Mistura de peptonas	15,0
Cloreto de sódio	2,5
Extrato de levedura	1,0
Ágar nº 1	0,75
L-cisteína	0,5
Hemina	0,005
Vitamina K	0,005
Resazurina	0,001
Bicarbonato de sódio	0,4

pH: 7,4 ± 0,2

1.10. Brain Heart Infusion Ágar (BHI) – LAB M (Bury, UK)

1.10.1. Descrição

Este meio foi desenvolvido inicialmene para o isolamento de patógenos orais. Com a adição de 5% de sangue desfibrinado, este meio permite o crescimento da maioria dos microrganismos fastidiosos. O fosfato tamponado ajuda neutralizar os ácidos produzidos pela utilização da glicose, mantendo a viabilidade dos microrganismos. Este meio não é recomendado para a determinação das reações hemolíticas porque contém glicose em sua composição.

1.10.2. Preparo

Adicionar 24.5 g do pó em 500 ml de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min. e depois agitada. É esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min e resfriada a 47 °C antes de distribuir sobre as placas. Caso deseje adicionar assepticamente 5% de sangue desfibrinado de carneiro, misturar bem e distribuir nas placas de petri.

1.10.3. Aparência

Amarelo claro (sem a adição de sangue) ou vermelho devido à adição de sangue.

1.10.4. Armazenagem

Placas: até 7 dias a 4 °C no escuro.

1.10.5. Inoculação

Em superfície.

1.10.6 Incubação

Tempo e temperatura para cada microrganismo.

1.10.7. Fórmula

	g/L
Infusão de sólidos de cérebro e coração	17,5
Proteose petona	10,0
Glicose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato di-sódico	2,5
Ágar nº 2	12,0

pH: 7,4 ± 0,2

1.11. Brain Heart Infusion Broth (BHI) – LAB M (Bury, UK)

1.11.1. Descrição

Meio de infusão isotônico rico em triptose (uma mistura de carne e petonas do leite) promovendo uma ampla gama de substratos. Uma concentração baixa de glicose é utilizada para estimular o crescimento precoce. É ligeiramente tamponado para impedir a morte rápida de algumas espécies devido à produção de ácido.

1.11.2. Preparo

Dispensar 18,5 g do pó em 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ficar em repouso por 10 minutos, sendo a seguir dissolvida sob aquecimento brando, antes de ser dispensada em tubos que são deixados semiabertos durante a esterilização. A esterilização é feita por autoclavagem a 121°C por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a autoclavagem.

1.11.3. Aparência

Amarelo claro.

1.11.4. Armazenagem

Em tubos com tampas, até 3 meses a 15-20 °C no escuro.

1.11.5. Inoculação (como meio de cultura para sangue)

Usar um volume mínimo de 50 ml de meio e adicionar sangue numa diluição de 1:10 a 1:20. Usar em conjunto com um meio de cultura anaeróbico.

1.11.6. Incubação

37 °C aerobicsmente até 15 dias.

1.11.7. Fórmula

	g/L
Infusão de sólidos de cérebro de boi	12,5
Infusão de sólidos de coração	5,0
Proteose peptona	10,0
Glicose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato di-sódico	2,5

pH: 7,4 ± 0,2

1.12. Brucella Medium Base (OXOID, Hampshire-UK)

1.12.1. Descrição

As peptonas são incorporadas para máxima estimulação do crescimento microbiano. A glicose fornece fatores essenciais de crescimento para alguns anaeróbios. O nível baixo de glicose impede a produção de níveis elevados de ácidos e de álcoois que poderiam inibir o crescimento microbiano. O ágar inibe a absorção do oxigênio e corrente de propagação.

1.12.2. Preparo

Misturar 22,5g do pó a 500mL de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 minutos e depois agitada. Autoclavagem a 121°C por 15 minutos e resfriada a 47°C. Adicionar assepticamente 5% de sangue desfibrinado de carneiro, 500uL de Hemina e menadiona preparados previamente. Misturar bem e distribuir em placas de petri estéreis.

1.12.3. Aparência

Vermelho devido à adição de sangue. O meio fica escurecido após acrescentar a hemina.

1.12.4. Armazenagem

Placas: até 7 dias a 4°C fora do alcance da luz.

1.12.5. Inoculação

Plaqueamento na superfície da placa.

1.12.6. Incubação

A 37°C anaerobicamente em atmosfera de 80% H_2, 10% N_2, 10% CO_2, por períodos entre 48 horas e 7 dias.

1.11.7. Fórmula

	g/L
Peptona	10,0
Extrato de carne	5,0
Glicose	10,0
Cloreto de sódio	5,0
Agar	15,0

pH: 7,5 ± 0,2

2. Kits de identificação microbiana

2.1. **API 20 Strep** - BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France.

2.1.1. Descrição

Api 20 Strep é um método padronizado que combina 20 testes bioquímicos que permitem a identificação, em grupos ou espécies, da maioria dos *Streptococcus* encontrados na microbiologia médica.

A fita do Api 20 Strep consiste em 20 microtubos contendo substratos desidratados para demonstração da atividade enzimática ou fermentação de açúcares.

Os testes enzimáticos são inoculados com uma suspensão densa de microrganismos, feita de uma cultura pura, que é utilizada para reidratar os substratos enzimáticos. Os produtos metabólicos finais produzidos durante o período de incubação são revelados através de reações caracterizadas por alterações cromáticas que ocorrem espontaneamente ou por adição de reagentes.

Os testes de fermentação são inoculados com um meio enriquecido (API GP Medium) que reconstituem os substratos de açúcares. A fermentação de carboidratos é detectada por uma mudança no indicador de pH.

As reações são lidas de acordo com o quadro de leitura do manual do fabricante, e a identificação obtida no catálogo "Api 20 Strep Analytical Profile Index".

2.1.2. Materiais

Cada Kit contém:

- 25 fitas API 20 STREP

- 25 caixas para incubação
- 25 ampolas de API GP Medium
- 25 folhas de resposta
- 25 swabs

Produtos adicionais que não estão incluídos no Kit:

- Meio para suspensão: Suspension Medium, 2 ml
- Reagentes: NIN, VP 1, VP 2, ZYM A, ZYM B
- Padrão de McFarland
- Pipetas pláticas
- Óleo mineral
- Catálogo: Api Staph Analytical Profile Index
- Rack para ampolas
- Placas de ágar-sangue

Equipamentos laboratoriais requeridos:

- Estufa de incubação a 37 °C
- Refrigerador
- Bico de Bulsen
- Cabine ou jarra de anaerobiose

2.1.3. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de ágar-sangue por 18-24 horas a 37 °C, em condições aeróbicas ou anaeróbicas, de acordo com as melhores condições de crescimento das amostras. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Esses procedimentos permitem a identificação primária das amostras como cocos Gram-positivos, catalase negativos e anaeróbios facultativos.

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio para suspensão "Suspension Medium" ou em água destilada estéril, para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 4.

Cinco mL de água são colocados no recipiente de incubação para manter a umidade da atmosfera e a tira do Api Staph é colocada dentro da caixa.

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher os microtubos da tira do Api Strep com o inóculo bacteriano preparado até a metade da fita (até o teste da arginina-ADH). A seguir, abre uma ampola de "API GP Medium" e transfere o resto da suspensão para dentro dela, mistura bem, e preenche a segunda metade da

fita (testes de ribose-RIB até glicogênio-GLYG). O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37 °C por 4 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes VP 1 e VP 2 no teste do piruvato de sódio (VP); ZYM A e ZYM B no teste de PYRA até LAP, e NIN no teste HIP. Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas de acordo com o quadro do item.

Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo "Api Strep Analytical Profile Index".

2.2. **Rapid ID 32 Strep** - BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France.

2.2.1. Descrição

Rapid ID 32 A é um sistema de identificação para streptococos e microrganismos relacionados utilizando testes enzimáticos estandardizados e miniaturizados. Cada Kit contém 25 fitas, recipientes para incubação, folhas de resultados e um manual do Kit. Cada fita consiste de 32 cúpulas que são utilizadas para testes e contêm substratos desidratados. Após o período de incubação de 4

horas, as reações podem ser lidas visualmente, e a identificação obtida usando o catálogo "Rapid ID 32 A Analytical Profile Index."ou o ***mini API.***

2.2.2. Materiais

Produtos adicionais que não estão incluídos no Kit:

Meio para suspensão: Suspension Medium, 2 ml

- Reagentes: FB, NIN, VP A, VP B
- Padrão de McFarland
- Pipetas
- Swabs estéreis
- Catálogo: Rapid ID 32 Strep Analytical Profile Index

Equipamentos laboratoriais requeridos:

- Estufa de incubação a 37 °C
- Refrigerador
- Bico de Busen

2.2.3. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas Ágar sangue. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração de Gram, produção de

catalase e requerimento gasoso.

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio líquido "Suspension Medium" ou em água destilada estéril para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 4,0.

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher as cúpulas com o inóculo bacteriano preparado no "Suspension Medium". Duas gotas de óleo mineral são adicionadas a cúpula URE (1.0). O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37°C anaerobicamete por 4 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes VP A e VP B no teste do VP (cúpula 0.0); FB nos testes APPA a GTA (cúpulas 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 e 0.5); e NIN no teste de HIP (cúpula 0.6). Todas as reações são lidas após 5 minutos baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas.

Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo "Rapid ID 32 Strep Analytical Profile Index" ou a leitura é feita no aparelho **mini API.**

2.3. **API Staph** - BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France

2.3.1. Descrição

Api Staph (# 20 500) é um sistema de identificação dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* utilizando testes bioquímicos padronizados. O sistema consiste de uma tira contendo substratos desidratados em microtubos individuais. Os testes são realizados adicionando a cada tubo uma alíquota do meio "Api Staph Medium" que foi inoculado com a amostra bacteriana a ser estudada. Cada Kit contém 25 tiras, recipientes para incubação, ampolas de "Api Staph Medium", folhas de resultados e um manual do Kit. A identificação das amostras pode ser interpretada no catálogo "Api Staph Analytical Profile Index" (bioMeriéux, ref. 20 590).

2.3.2. Materiais

Produtos adicionais que não estão incluídos no Kit:

- Reagentes: VP 1, VP 2, NIT 1, NIT 2, ZYM A, ZYM B
- Padrão de McFarland
- Pipetas pláticas
- Swabs estéreis

- Óleo mineral
- Catálogo: Api Staph Analytical Profile Index

2.3.3. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de ágar-sangue por 18-24 horas a 37 °C. a cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Esses procedimentos permitem a identificação primária das amostras como cocos Gram-positivos, catalase positiva e aeróbios ou anaeróbios facultativos.

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio líquido "Api Staph Medium" para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 0,5.

Cinco mL de água são colocados no recipiente de incubação para manter a umidade da atmosfera e a tira do Api Staph é colocada dentro da caixa.

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher os microtubos da tira do Api Staph com o inóculo bacteriano preparado no "Api Staph Medium", evitando a formação de bolhas. Após preencher toda a tira, os tubos contento os testes da arginina (ADH) e uréia (URE) são preenchidos com óleo mineral para promover

anaerobiose. O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37 °C por 18-24 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes VP 1 e VP 2 no teste do piruvato de sódio (VP); NIT 1 e NIT 2 no teste do nitrato de potássio (NIT); e ZYM A e ZYM B no teste do ácido β-nafttil fosfato (PAL). Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas de acordo com o quadro do item 2.4. Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo "Api Staph Analytical Profile Index".

2.4. **Rapid ID 32 A** - BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France

2.4.1. Descrição

Rapid ID 32 A é um sistema de identificação para anaeróbios utilizando testes enzimáticos estandardizados e miniaturizados. Cada Kit contém 25 fitas, recipientes para incubação, folhas de resultados e um manual do Kit. Cada fita consiste de 32 cúpulas, 29 das quais são utilizadas para testes e contêm substratos desidratados. Após o período de incubação de 4 horas, as reações

podem ser lidas visualmente, e a identificação obtida usando o catálogo "Rapid ID 32 A Analytical Profile Index."

2.4.2. Materiais

Produtos adicionais que não estão incluídos no Kit:

Meio para suspensão: Suspension Medium, 2 ml

- Reagentes: JAMES, NIT 1, NIT 2, FB
- Padrão de McFarland
- Pipetas
- Swabs estéreis
- Óleo mineral
- Catálogo: Rapid ID 32 A Analytical Profile Index
- Placas de ágar-sangue com suplementos para o crescimento de bactérias anaeróbias.

Equipamentos laboratoriais requeridos:

- Estufa de incubação a 37 °C
- Refrigerador
- Bico de Busen
- Cabine ou jarra de anaerobiose

2.4.3. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas contendo Fastidious Anaerobe Ágar mais sangue de carneiro desfibrinado por 24-48 horas a 37 °C anaerobicamente. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso.

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio líquido "Suspension Medium" ou em água destilada estéril para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 4,0.

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher as cúpulas com o inóculo bacteriano preparado no "Suspension Medium". Duas gotas de óleo mineral são adicionadas a cúpula URE (1.0). O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37°C anaerobicamete por 4 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes NIT 1 e NIT 2 no teste do NIT (cúpula 0.0) para verificar a redução de nitratos; JAMES no teste IND (cúpula0.1) para verificar a produção de indol; e FB nos testes de PAL a SerA (cúpula 0.2 a 0.E). Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas.

Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo "Rapid ID 32 A Analytical Profile Index".

2.5. Api 20 C AUX

2.5.1. Descrição

Api 20 C AUX é um sistema de identificação preciso para a maioria dos fungos encontrados na clínica microbiológica.

O API 20 C AUX consiste em 20 microtubos contendo substratos desidratados para demonstração da atividade enzimática ou fermentação de açúcares. Os microtubos são inoculados com um meio semi-sólido e os fungos crescerão apenas se forem capazes de utilizar cada substrato. As reações são lidas em comparação com o crescimento controle e identificação é obtida pelo catálogo *Analytical Profile Index* ou usando um programa computadorizado de identificação.

2.5.2. Materiais

Um Kit contém:

- 25 fitas API 20 C AUX
- 25 caixas para incubação
- 25 ampolas de C Medium
- 25 folhas de resposta

Produtos adicionais que não estão incluídos no Kit:

Meio para suspensão: Suspension Medium (2 mL) ou NaCl 0,85% (2 mL)

- Ágar Sabouraud
- Padrão de McFarland #2
- Pipetas plásticas
- Óleo mineral
- Catálogo: API 20 C AUX Analytical Profile Index ou programa computadorizado de identificação
- Rack para ampolas

Equipamentos laboratoriais requeridos:

- Estufa de incubação a 30 °C
- Refrigerador
- Bico de Busen
- Caneta para vidro

2.5.3. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de ágar-sabouraud 18-24 horas a 37 °C, em condições aeróbicas ou anaeróbicas, de acordo com as melhores condições de crescimento das amostras. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Esses procedimentos permitem a identificação primária das amostras como cocos Gram-positivos, catalase negativos e anaeróbios facultativos.

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria em 2 mL meio para suspensão "Suspension Medium" ou em água destilada estéril, para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 2. São colocados 100 μ L no tubo "C Medium".

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher os microtubos da tira do API C AUX com o inóculo bacteriano preparado C Medium. Evite a formação de bolhas. Incubar a 30°C por 48-72 horas.

Após o período de incubação checar o crescimento, após 48 h o GLU deve estar mais turvo que o controle (cúpula "0" da galeria) para ser interpretada a

leitura d e toda galeria. Através do catálogo "Analytical Profile Index" os resultados numéricos obtidos pelas reações podem ser identificados.

2.6. RapID ANA II - Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, GA., USA.

2.6.1. Descrição

O sistema RapID ANA II é um método miniaturizado empregado para identificação bioquímica de substratos cromogênicos e convencionais, neste caso, de bactérias anaeróbias clinicamente significantes.

Cada "kit" consiste de 20 recipientes para testes de RapID ANA II, bloco de anotações para os resultados, manual de instruções, manual de dados (RapID ANA II System Code Compendium) e 1 frasco de reagente RapID ANA II.

Cada recipiente de RapID ANA II contém 10 cavidades com reações (reações dehidratadas) e proporciona 18 scores de teste. As cavidades de 3 a 10 são bifuncionais, contendo 2 testes diferentes na mesma cavidade. Teste bifuncional significa que o primeiro score é obtido sem adição do reagente, mostrando o primeiro resultado do teste. Na mesma cavidade é observado outro score com a adição do reagente fornecendo o resultado do segundo teste. A identificação é obtida após 4 horas de incubação.

O recipiente de teste RapID ANA II e reagentes devem ser estocados a 2-10° C. O fluido para inoculação RapID (RapID Inoculation Fluid), deve ser estocado a 15-30° C, na embalagem original.

2.6.2. Materiais

- 25 tubos fechados contendo em cada 1 mL de fluido de inoculação RapID (#25-102)

  KCl.....7,5

  $CaCl_2$.....0,5g

  Água deionizada.....1000 mL

PH: 7,5-9,5.

- 1 frasco contendo 15 mL de reagente Innova Spot Indole (#30-9002).
- 1 frasco contendo reagente suficiente para 20 recipientes de RapID ANA II Reagent
- Ingredientes reativos

  3-fenil 4 metilaninoacrolein.....0,01 %

  Ácido hidroclorídrico.....0,1 %

  Ácido acético.....1 %

  Detergente.....0,1 %

- Swabs estéreis
- Pipetas estéreis
- Padrão McFarland: 3

- Placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro desfibrinado.
- Jarras para anaerobiose + gerador de anaerobiose (Anaerogen-OXOID, Hampshire-Inglaterra) + indicadores de anaerobiose (OXOID, Hampshire-Inglaterra) ou Câmara de anaerobiose

2.6.3. Procedimentos para identificação

Os microrganismos são subcultivados em placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro por 18 a 24 horas a 37° C. As culturas puras são primariamente checadas pela morfologia da colônia, coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso.

Um swab estéril é usado para inoculação das colônias bacterianas no fluido de inoculação RapID. A suspensão do microrganismo que será testado deve atingir no mínimo o equivalente ao padrão MacFarland 3 (uma suspensão com turbidez menor que o padrão MacFarland 3 pode comprometer o desenvolvimento do teste). As suspensões são agitadas (se necessário) e usadas até 15 minutos do preparo. A película de proteção do recipiente é devidamente deslocada para a inoculação bacteriana.

Uma pipeta estéril é introduzida na suspensão bacteriana e todo o conteúdo é transferido para o recipiente de teste, na cúpula do canto direito superior. O

recipiente para teste é então selado novamente pela película de proteção, mantendo-o em posição horizontal em superfície plana. Este é gentilmente inclinado, de forma que a suspensão seja distribuida uniformemente nas cúpulas superiores. Em seguida o recipiente é inclinado aproximadamente 45° C durante 4 horas.

Após a incubação do recipiente, cada cavidade é examinada quanto à reação enzimática, observando presença ou ausência de coloração, sendo este o primeiro resultado.

Ao adicionarmos os reagentes nas cavidades de teste específicas, obtém-se o segundo resultado, através da reação do reagente e observando-se a alteração de cor.

O resultado obtido é comparado com o padrão, que é encontrado no manual de dados.

2.7. RapID NH system - Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, GA., USA.

2.7.1. Descrição

O sistema RapID NH é um método miniaturizado qualitativo empregado para identificação de espécies clinicamente significantes de *Neisseria* e *Haemophilus*, e também *Eikenella* e *Actinobacillus*, através de substratos convencionais e cromogênico.

Cada Kit consiste de 20 recipientes para testes de RapID NH, blocos de anotações para resultados e um manual de instruções.

Após 4 horas de incubação as reações são obtidas através da leitura visual. Identificações são realizadas usando cada *score* de teste individual, em conjunto com as informações obtidas através da morfologia colonial, coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. O resultado padrão do *score* positivo e negativo é usado como base para identificação do teste isolado pela comparação dos resultados obtidos com resultado padrão que é encontrado no manual de dados *(RapID NH System Code Compendium)*.

O recipiente de teste RapID NH e reagentes devem ser estocados a 2-10°C. O fluido para inoculação RapID (RapID Inoculation Fluid), deve ser estocado a 15-30°C, na embalagem original.

2.7.2. Materiais

- 25 tubos fechados contendo em cada 1 mL de fluido de inoculação RapID (#25-102)

KCl.....7,5g

$CaCl_2$.....0,5g

Água deionizada.....1000 mL

PH: 7,5-9,5.

- 1 frasco contendo 15 mL de reagente Innova Spot Indole (#30-9002).
- 1 frasco contendo 15 mL de reagente Innova Nitrate Reagent A (#30-9003).
- 1 frasco contendo 15 mL de reagente Innova Nitrate Reagent A (#30-9004).
- Swabs estéreis
- Padrão MacFarland: 3
- Placas contentdo FAA + 5% de sangue desfibrinado de carneiro.
- Jarras para anaerobiose + gerador de anaerobiose (Anaerogen-OXOID, Hampshire-Inglaterra) + indicadores de anaerobiose (OXOID, Hampshire-Inglaterra) ou Câmara de anaerobiose.

2.7.3. Procedimentos para identificação

Os microrganismos são subcultivados em placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro por 18 a 24 horas a 37° C. As culturas puras são primariamente checadas pela morfologia da colônia, coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso.

Um swab estéril é usado para inoculação das colônias bacterianas no fluido de inoculação RapID. A suspensão do microrganismo que será testado deve atingir no mínimo o equivalente ao padrão MacFarland 3 (uma suspensão com turbidez menor que o padrão MacFarland 3 pode comprometer o desenvolvimento do teste). As suspensões são agitadas (se necessário) e usadas até 15 minutos do preparo. A película de proteção do recipiente é devidamente deslocada para a inoculação bacteriana.

Uma pipeta estéril é introduzida na suspensão bacteriana e todo o conteúdo é transferido para o recipiente de teste, na cúpula do canto direito superior. O recipiente para teste é então selado novamente pela película de proteção, mantendo-o em posição horizontal em superfície plana. Este é gentilmente inclinado, de forma que a suspensão seja distribuída uniformemente nas cúpulas superiores. Em seguida o recipiente é inclinado aproximadamente 45° C durante 4 horas.

Após a incubação do recipiente, cada cavidade é examinada quanto à reação enzimática, observando presença ou ausência de coloração, sendo este o primeiro resultado.

Ao adicionarmos os reagentes nas cavidades de teste específicas, obtém-se o segundo resultado, através da reação do reagente e observando-se a alteração de cor.

O resultado obtido é comparado com o padrão, que é encontrado no manual de dados.

ANEXO III. Aspectos microbiológicos e radiográficos de 26 dentes investigados.

AMOSTRA	DENTE	CRT (mm)	ÁREA (mm^2)	PERÍMETRO	FORMA	GRAM	H_2/O_2	GÊNERO	ESPÉCIE
C1.1	P2 D	9,75	0,06	1,44	coco	+	ANF	*Enterococcus*	*faecalis*
C1.3	P3 D	10,5	0,13	1,9	coco/bacilo	-	ANE	*Prevotella*	*oralis*
C2.1	P2 D	10	0,06	1,79	coco/bacilo	-	ANE	*Porphyromonas*	*gingivalis*
					bacilo	-	ANE	*Clostridium*	*tyrobutyricum*
					coco	+	ANE	*Peptostreptococus*	*anaerobius*
					coco/bacilo	-	ANE	*Prevotella*	*oralis*
C2.3	P3 D	11	0,11	2,04	----------	-----	---	----------	----------
C2.5	P4 D	14	0,18	2,94	bacilo	-	ANF	----------	----------
					coco	+	ANF	*Staphylococcus*	*intermedius*
C2.7	P2 E	10	0,16	2,23	coco	-	ANF	*Neisseria*	*sicca/subflava*
C2.9	P3 E	11	0,16	2,41	bacilo	+	ANE	*Propionibacterium*	*acnes*
					coco	+	ANF	*Staphylococcus*	*intermedius*
					bacilo	-	ANF	----------	----------
					coco	-	ANF	*Neisseria*	*sicca/subflava*
					coco	+	ANF	*Streptococcus*	*bovis I*
C2.11	P4 E	14	0,15	2,38	coco	-	ANF	*Neisseria*	*sicca/subflava*
					bacilo	+	ANF	*Propionibacterium*	*propionicum*

P2 D= segundo prémolar direito; **P2 E=** segundo prémolar esquerdo; **P3 D**= terceiro prémolar direito; **P3 E=** terceiro prémolar esquerdo; **P4 D=** quarto prémolar direito; **P4 E=** quarto prémolar esquerdo; **ANE**= anaeróbio estrito; **ANF**= anaeróbio facultativo.

ANEXO III. Aspectos microbiológicos e radiográficos de 26 dentes investigados (continuação).

AMOSTRA	DENTE	CRT (mm)	ÁREA (mm^2)	PERÍMETRO	FORMA	GRAM	H_2/O_2	GÊNERO	ESPÉCIE
C2.11	P4 E	14	0,15	2,38	coco	+	ANF	*Streptococcus*	*bovis I*
					coco	+	ANF	*Streptococcus*	*bovis II*
					bacilo	-	ANE	*Prevotella*	*oralis*
C3.1	P2 D	9,5	0,05	1,41	bacilo	+	ANE	*Propionibacterium*	*acnes*
					bacilo	+	ANF	*Actinomyces*	*odontolyticus*
C3.3	P3 D	11	0,12	2,21	coco	-	ANF	*Neisseria*	*sicca/subflava*
					bacilo	+	ANF	*Lactobacillus*	*acidophilus*
					bacilo	+	ANF	*Actinomyces*	*naeslundii*
					bacilo	+	ANF	*Bifidobacterium*	*ssp*
					bacilo	+	ANF	*Propionibacterium*	*acnes*
					coco	-	ANF	*Streptococcus*	*suis II*
					coco	-	ANE	----------	----------
					coco	+	ANE	*Peptostreptococcus*	*ssp*
					coco	+	ANF	*Staphylococcus*	*capitis*
C3.5	P4 D	13	0,19	2,61	coco	+	ANF	*Streptococcus*	*bovis I*
					coco	+	ANF	*Streptococcus*	*bovis II*
					bacilo	-	ANE	*Prevotela*	*oralis*

P2 D= segundo prémolar direito; **P2 E**= segundo prémolar esquerdo; **P3 D**= terceiro prémolar direito; **P3 E**= terceiro prémolar esquerdo; **P4 D**= quarto prémolar direito; **P4 E**= quarto prémolar esquerdo; **ANE**= anaeróbio estrito; **ANF**= anaeróbio facultativo.

ANEXO III. Aspectos microbiológicos e radiográficos de 26 dentes investigados (continuação).

AMOSTRA	DENTE	CRT (mm)	ÁREA (mm^2)	PERÍMETRO	FORMA	GRAM	H_2/O_2	GÊNERO	ESPÉCIE
C3.5	P4 D	13	0,19	2,61	bacilo	+	ANF	*Bifidobacterium*	*ssp*
					bacilo	+	ANF	*Propionibacterium*	*propionicum*
					bacilo	+	ANF	*Propionibacterium*	*acnes*
C3.7	P2 E	9,5	0,07	1,79	------	-------	-------	----------	----------
C3.9	P3 E	10,5	0,13	2,09	bacilo	+	ANF	*Propionibacterium*	*propionicum*
					coco	+	ANF	*Enterococcus*	*faecium*
					coco	+	ANF	*Aerococcus*	*viridans*
C3.11	P4 E	13	0,13	12,31	coco	+	ANF	*Enterococcus*	*avium*
					coco	+	ANF	*Aerococcus*	*airidans 3*
					coco	-	ANF	*Neisseria*	*sicca/subflava*
					coco	+	ANF	*Staphylococcus*	*epidermidis*
					bacilo	+	ANF	----------	----------
C4.1	P2 D	10,5	0,05	1,28	coco	+	ANF	*Staphylococcus*	*intermedius*
C4.3	P3 D	11	0,12	1,79	------	---------	----------	----------	----------
C4.5	P4 D	13	0,21	2,43	bacilo	+	ANF	*Bifidobacterium*	*ssp*
					coco	+	ANF	*Staphylococcus*	*xylosus*
					coco	+	ANF	*Streptococcus*	*bovis I*

P2 D= segundo prémolar direito; **P2 E**= segundo prémolar esquerdo; **P3 D**= terceiro prémolar direito; **P3 E**= terceiro prémolar esquerdo; **P4 D**= quarto prémolar direito; **P4 E**= quarto prémolar esquerdo; **ANE**= anaeróbio estrito; **ANF**= anaeróbio facultativo.

ANEXO III. Aspectos microbiológicos e radiográficos de 26 dentes investigados (continuação).

AMOSTRA	DENTE	CRT (mm)	ÁREA (mm^2)	PERÍMETRO	FORMA	GRAM	H_2/O_2	GÊNERO	ESPÉCIE
C4.5	P4 D	13	0,21	2,43	coco	+	ANF	*Abiotrophia*	*adiacens*
C4.7	P2 E	9,5	0,04	1,11	coco	+	ANF	*Streptococcus*	*salivarius*
					coco	+	ANF	*Streptococcus*	*ssp*
					coco	+	ANF	*Staphylococcus*	*aureus*
C4.9	P3 E	11	0,07	1,63	coco	+	ANF	*Lactococcus*	*lactis cremoris*
					coco	+	ANF	*Staphylococcus*	*aureus*
					coco	-	ANF	*Neisseria*	*sicca/subflava*
					coco	+	ANF	*Staphylococcus*	*lentus*
					coco	+	ANF	*Streptococcus*	*suis*
C4.11	P4 E	13	0,15	2,21	coco	-	ANF	*Neisseria*	*sicca/subflava*
					coco	+	ANF	*Lactococcus*	*latis cremoris*
					coco	+	ANF	*Streptococcus*	*salivarius*
C5.1	P2 D	9,75	0,04	1,44	---	---	---	---	---
C5.3	P3 D	10,5	0,17	2,57	---	---	---	---	---
C5.5	P4 D	13,5	0,23	2,95	bacilo	+	ANF	*Actinomyces*	*israelli*
C5.7	P2 E	10	0,02	1,03	bacilo	+	ANE	*Clostridium*	*clostridiforme*
					bacilo	-	ANE	*Prevotella*	*oralis*

P2 D= segundo prémolar direito; **P2 E**= segundo prémolar esquerdo; **P3 D**= terceiro prémolar direito; **P3 E**= terceiro prémolar esquerdo; **P4 D**= quarto prémolar direito; **P4 E**= quarto prémolar esquerdo; **ANE**= anaeróbio estrito; **ANF**= anaeróbio facultativo.

ANEXO III. Aspectos microbiológicos e radiográficos de 26 dentes investigados (continuação).

AMOSTRA	DENTE	CRT (mm)	ÁREA (mm^2)	PERÍMETRO	FORMA	GRAM	H_2/O_2	GÊNERO	ESPÉCIE
C5.7	P2 E	10	0,02	1,03	bacilo	+	ANF	*Actinomyces*	*odontolyticus*
C5.9	P3 E	11	0,08	1,82	bacilo	+	ANE	----------	----------
C5.11	P4 E	13,5	0,12	2,49	bacilo	-	ANE	*Bacteroides*	*uniformis*
					bacilo	+	ANF	*Actinomyces*	*odontolyticus*
					bacilo	+	ANF	*Propionibacterium*	*propionicum*
					bacilo	-	ANE	*Bacteroides*	*capillosus*

P2 D= segundo prémolar direito; **P2 E=** segundo prémolar esquerdo; **P3 D**= terceiro prémolar direito; **P3 E**= terceiro prémolar esquerdo; **P4 D=** quarto prémolar direito; **P4 E=** quarto prémolar esquerdo; **ANE**= anaeróbio estrito; **ANF**= anaeróbio facultativo.

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 380-2, sobre "ESTUDO HISTOBACTERIOLÓGICA DOS EFEITOS DA AMPLIAÇÃO DO DIÂMETRO DO FORAME APICAL E PREPARO QUÍMICO MECÂNICO EM DENTES DE CÃO COM NECROSE PULPAR INDUZIDA" sob a responsabilidade de HELENA ROSA CAMPOS RABANG E BRENDA PAULA DE ALMEIDA FIGUEIREDO GOMES está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de ...../...../.....

Campinas, 07 de JUNHO de 2002.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº "....., entitled "

.....

.....",

is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas – UNICAMP) on __/__/__.

Campinas 07 de junho de 2002.

Prof(a) Dr(a) Alba R.M. Souza Brito
Presidente – CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ
CEP - 13 083-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE (019) 788 7136
FAX (019) 289.3124