

CÍCERO ROMÃO GADÊ NETO

**ESTUDO MICROBIOLÓGICO DA BOLSA PERIODONTAL E
CANALIS RADICULARES DE DENTES DE CÃES COM DOENÇA
PERIODONTAL INDUZIDA.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do Título
de Mestre em Clínica Odontológica-
Endodontia.

PIRACICABA

2000

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

CÍCERO ROMÃO GADÊ NETO

ESTUDO MICROBIOLÓGICO DA BOLSA PERIODONTAL E CANALIS RADICULARES DE DENTES DE CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA.

Orientadora:

Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Prof. Dr. Fabrício Batista Teixeira

Prof. Dr. Luis Antônio Pugliesi Alves de Lima

Dissertação apresentada ao Curso de Clínica
Odontológica, Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do Título de Mestre
em Clínica odontológica-Endodontia.

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPE-036/83
em 22/03/2001

Assinatura do Orientador

PIRACICABA

2000

N.º CHAMADA :
UNICAMP
G117e
V. Ex.
TOMBO BC/ 44550
PROC. 16-392101
C D
PREC. R\$ 11,00
DATA 17/05/01
N.º CPD.

CM00156284-1

Ficha Catalográfica

G117e Gadê Neto, Cícero Romão.
Estudo microbiológico da bolsa periodontal e canais radiculares de dentes de cães com doença periodontal induzida. / Cícero Romão Gadê Neto. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2000. xxxi, 213p. : il.

Orientador : Prof^º. Dr^ª. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Infecção. 2. Doença periodontal. 3. Cão. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - 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 30 de Dezembro de 1999, considerou o candidato CÍCERO ROMÃO GADE NETO aprovado.

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

Handwritten signature of Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.

2. Prof. Dr. LUIS ANTONIO PUGLIESE ALVES DE LIMA

Handwritten signature of Luis Antonio Pugliese Alves de Lima.

3. Prof. Dr. FABRICIO BATISTA TEIXEIRA

Handwritten signature of Fabricio Batista Teixeira.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **João Humberto de Vasconcelos e Maria Helena Gadê de Vasconcelos**, fontes de amor, carinho, ensinamento, compreensão, companheirismo e amizade incondicional, dedico com alegria este trabalho.

Aos meus **irmãos, minhas cunhadas, meu cunhado e meus sobrinhos**,
participantes da construção harmônica de nossa família, sempre presentes, mesmo
distantes, dedico com saudades este trabalho.

A minha tia **Giselda** e a minha saudosa **vozinha Fausta**, que lá do céu deve estar feliz com este momento, dedico com muito amor e gratidão este trabalho.

AGRADECIMENTOS

AGRADEÇO A DEUS.

Por simplesmente **TUDO...**

À Profa. Dra. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES, minha orientadora, pela orientação, participação, dedicação, competência e amizade, que tornou possível a realização deste trabalho e que me abriu as portas para a pesquisa.

**Ao Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho, pela
acolhida, disponibilidade em ajudar e a grande
oportunidade que me deu.**

**Ao Prof. Dr. Luiz Valdrighi, pelos
ensinamentos e exemplo de docente a ser
seguido.**

À Profa. Dra. Rejane A. de Carvalho, exemplo
de luta e competência, honestidade e caráter,
pela amizade sincera, pelo incentivo, pelos
ensinamentos e pelas portas que me abriu na
Endodontia.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum, pelo apoio necessário.

À Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury, coordenadora do curso de pós-graduação da FOP/UNICAMP, pela dedicação e atenção dispensada sempre que solicitada.

À Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, coordenadora do curso de pós-graduação em Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP, pelo apoio recebido.

Ao Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho, responsável pela área de Endodontia da FOP/UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Alexandre Zaia, Prof. Dr. Fabrício Batista Teixeira e Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz, pela atenção, amizade, companheirismo, e apoio durante este mestrado longe de casa.

Às Profas. Inês Rocha e Ana Myrian da UFRN pelos ensinamentos que tanto ajudaram na minha formação profissional.

Ao Fábio Roberto de Souza Viotto, veterinário, pelos prestimosos ensinamentos no trabalho com cães, que tanto me ajudaram na realização desta pesquisa.

Ao colega de pós-graduação Manuel da área de prótese, pelo auxílio na confecção de moldeiras para os cães.

Aos companheiros e amigos da minha turma do Curso de pós-graduação em Endodontia, Ronaldo Rodrigues, Ericka Tavares Pinheiro, Ezilmara de Sousa Rolim, Noboru Imura.

Aos amigos, João Eduardo Gomes Filho, Eneida e Paulo de Araújo, por toda a ajuda espontânea e valiosa que me deram na realização deste trabalho.

Às colegas e amigas de pós-graduação do Maranhão, Soraia Carvalho e Tetis Sauaia pelo convívio alegre e saudável.

Aos colegas e amigos da pós-graduação Gerson Hiroshi Yoshinari, Eudes Gondim Jr, Júlio César, José Assis Pedroso e João Odilo Velasco.

Aos funcionários da Disciplina de Endodontia Denize L. de Pinho, Maria Aparecida Buscariol, Rubens M. Payão e Adailton dos S. Lima, pela convivência e pelo auxílio em meus trabalhos diários.

Aos alunos da graduação e de iniciação científica Vanessa Berber, Tatiana Normanha, Carla Lurika, Carolina Matsumura, Vanessa Rossi, Daniel Pinto de Oliveira,

Marcelo Tavares, Fábio Garrido, Renata Nakagawa, Iadasa De Quadros e todos os outros com os quais convivi no laboratório de Endodontia.

Ao colega do Rio de Janeiro do curso de cirurgia parodontológica com microscópio clínico, Fernando e à colega de pós-graduação, Flaviana Ferreira, pelas vezes que auxiliaram no biotério.

Às estagiárias do laboratório de Microbiologia da área de Endodontia, Keli Cristina de Carvalho, Patrícia Maria Maccagnan, Morgana Eli Vianna e Fabiana Danelon Gardin, pela amizade e auxílio sempre que necessário.

Aos funcionários do biotério Vanderlei e Luiz, pelo auxílio nos trabalhos realizados.

À Cida do Orocentro pelo auxílio na revelação automática dos filmes radiográficos.

A todos que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1. Vias de Comunicação entre Polpa e Periodonto	9
2.2. Microbiologia Endodôntica	17
2.3. Microbiologia do Periodonto	23
2.4. Microbiologia das Lesões Endo-Periodontais	29
2.5. Alterações Patológicas Pulpo-Periodontais	33
2.6. Modelo Animal no Estudo da Doença Periodontal	39
2.7. Doença Periodontal em Cães	41
2.8. Métodos de Indução de Doença Periodontal em Cães	45
2.9. Mobilidade Dentária e Lesão de Furca - Classificação	47
3. PROPOSIÇÃO	49
4. MATERIAL E MÉTODOS	51
5. RESULTADOS	111
6. DISCUSSÃO	127
7. CONCLUSÃO	133
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
ANEXOS	147

ANEXO I – Tabelas Coletas	147
ANEXO II – Meios de Cultura	157
ANEXO III – Meios de Transporte	173
ANEXO IV – Câmara de Anaerobiose	177
ANEXO V – Kits de Identificação Bacteriana	181
ANEXO VI – Certificado do comitê de ética animal	213

RESUMO

Apesar de não ser universalmente aceito existem evidências que infecções cruzadas podem ocorrer entre polpas infectadas e bolsas periodontais profundas. O objetivo deste trabalho foi investigar os microrganismos dos canais radiculares e bolsas periodontais de dentes de cães com doença periodontal induzida, comparando a similaridade das microbiotas entre estas duas regiões. Aspectos clínicos e radiográficos da cavidade pulpar e do periodonto foram também analisados. A doença periodontal foi induzida pelo uso combinado de ligaduras de aço e de algodão. Após 125 dias da colocação das ligaduras foram feitas as coletas microbiológicas das bolsas periodontais e dos canais radiculares. O número de espécies microbianas na bolsa periodontal foi maior do que no canal radicular, consistindo em sua maioria anaeróbios estritos e Gram-negativos, sendo as espécies mais prevalentes *Streptococcus* spp.(79,9%), *Fusobacterium necrophorum* (42,1%), *Veillonella* spp.(26,3%), *Prevotella loescheii* (21,1%), *Prevotella corporis* (15,8%), *Pasteurella multocida* (15,8%), entre outras. De um total de 19 coletas endodônticas, 9 foram positivas, sendo que os gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Neisseria* os mais encontrados. O gênero *Streptococcus* foi encontrado na bolsa periodontal e canal radicular do mesmo dente. Mobilidade dentária e lesão de furca foram achados comuns. Nossos resultados sugerem que em certas circunstâncias microrganismos da bolsa periodontal podem infectar a polpa dentária. Entretanto, fatores como tempo de duração da doença periodontal e especificidade de algumas bactérias podem exercer um papel fundamental na doença pulpar.

Palavras-chave: microbiota, infecção cruzada, canal radicular, doença periodontal induzida, cães.

ABSTRACT

Although not universally accepted, well-documented evidences suggest that cross-infection can occur between infected pulps and deep periodontal pockets. The purpose of the present study was to examine the microorganisms from the root canals and periodontal pockets of dog's teeth with ligature-induced periodontitis in order to compare the predominant cultivable microflora from the canals with those found in the adjacent periodontal pockets. Clinical and radiographic aspects of endodontium and periodontium were investigated. The periodontal disease was induced by means of cotton and wire ligatures combined. After 125 days, the microbiological samples were collected from periodontal pockets and root canals. The total number of microbial species in the periodontal pocket was bigger than in the root canal, showing a predominance of obligate anaerobes and Gram-negative organisms. The species predominantly isolated from periodontal pockets were *Streptococcus* spp. (79.9%), *Fusobacterium necrophorum* (42.1%), *Veillonella* spp. (26.3%), *Prevotella loescheii* (21.1%), *Prevotella corporis* (15.8%), *Pasteurella multocida* (15.8%) among others. Of all 19 endodontic samples collected, 9 had microbial growth being *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Neisseria* the most prevalent genera. The genus *Streptococcus* was common to both regions of the same tooth. Dental mobility and furcal lesion were common findings. Our results suggest that the periodontal pocket may be a possible source of root canal infections. However factors such as duration of periodontitis and presence of specific bacterial species can play a significant role in pulpal pathosis.

Key words: microflora, cross-infection, root canal, induced periodontitis, dogs.

1. INTRODUÇÃO

A polpa dentária e o periodonto são duas estruturas anatomicamente distintas, porém inter-relacionadas funcionalmente, visto que ambas as estruturas têm idêntica origem embriológica e formação concomitante (CHILTON & TRENTON, 1972).

A interdependência existente entre dente e estruturas de suporte é tão grande que a perda de um dos elementos conduz a supressão do outro, ou seja, quando avulsiona-se um dente, ocorre o desaparecimento do alvéolo dental e demais componentes ligamentares. Por outro lado, a permanência de doença periodontal severa, destruindo as estruturas de suporte, conduz fatalmente a esfoliação do órgão dental (PAIVA & ANTONIAZZI, 1988).

Anatomicamente existem três vias de comunicação entre o espaço pulpar e o periodonto: o forame apical, os canais laterais (secundários e acessórios) e os túbulos dentinários (PRICHARD, 1982; PAIVA & ANTONIAZZI., 1988; LINDHE, 1992b; DE DEUS, 1992; SIMON & WERKSMAN, 1997; WALTON & TORABINEJAD, 1997).

Existem ainda áreas mais permeáveis de dentina e cimento, como a zona apical por exemplo, onde o cimento não se comporta como barreira impermeável, permitindo comunicação entre polpa e periodonto (ANTONIAZZI *et al.*, 1968).

O forame apical é a maior e mais importante via de comunicação com o periodonto, permitindo a passagem dos vasos e nervos mais calibrosos do meio externo para o interior do dente, viabilizando a manutenção do tecido pulpar e neoformação dentinária. É portanto a maior abertura do sistema de canais radiculares ao periodonto.

Os canais laterais (secundários e acessórios) normalmente possuem vasos que fazem conexão do sistema circulatório da polpa com aquele do ligamento periodontal. Estas anastomoses se formam durante as fases iniciais do desenvolvimento dentário. No

momento do término da formação da raiz, diversas anastomoses ficam bloqueadas e reduzidas em largura pela deposição contínua de dentina e cemento radicular. Todavia, comunicações entre a polpa e o ligamento periodontal, podem ser observados em todos os tipos de dentes, a maioria sendo encontrada na porção apical da raiz. Nas porções mediana e cervical, a prevalência é pequena (LINDHE, 1992a; DE DEUS, 1975).

Os túbulos dentinários podem ser diretamente expostos ao meio ambiente oral quando a doença periodontal expõe o colo desprotegido de cemento ou após a desorganização do cemento radicular na presença de bolsas periodontais, ou ainda nos procedimentos mecânicos do tratamento periodontal, em que camadas de cemento são removidas (DE DEUS, 1992).

A inter-relação entre doenças periodontal e pulpar tem sido durante anos objeto de especulação. Os pesquisadores, embasados em evidências bem documentadas, concordam que a doença pulpar pode iniciar e/ou manter a doença periodontal (KIPIOTI et al., 1984). Segundo eles as bactérias de uma polpa necrótica podem infectar o periodonto, porém, a teoria inversa não é ainda aceita universalmente.

De um lado estão os que não acreditam na infecção e alteração pulpar provocada pela doença periodontal (FISH & MACLEAN, 1936; SAUERWEIN, 1956; MAZUR, 1961; MAZUR & MASSLER, 1964; CHAKER, 1974; CZARNECKI & SCHILDER, 1979).

Do outro lado estão aqueles que acreditam na infecção e alteração pulpar como consequência da doença periodontal (BENDER & SELTZER, 1972; KIPIOTI *et al.*, 1984; KOBAYASHI *et al.*, 1990; KEREKES *et al.*, 1990).

KIPIOTI *et al.* (1984) demonstrou que os microrganismos presentes nos canais radiculares de dentes livres de cárie, com avançada periodontite, geralmente assemelhavam-se aqueles encontrados nas bolsas periodontais adjacentes.

KOBAYASHI *et al.* (1990) num trabalho semelhante ao de KIPLOTI *et al.* (1984), observaram que os anaeróbios obrigatórios mais prevalentes, comuns ao canal radicular e bolsa periodontal pertencem às espécies, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Bacteroides* e *Fusobacterium*. Entre os anaeróbios facultativos estavam *Actinomyces* e *Streptococcus* embora predominantemente nas bolsas periodontais.

A literatura está repleta de estudos bacteriológicos da infecção endodôntica e da doença periodontal, porém pouco ou nenhum esforço tem sido devotado em estudar a microbiota de canais radiculares de dentes com destruição periodontal severa em relação com a microbiota de suas bolsas (KIPIOTI *et al.*, 1984).

Segundo CLAFFEY & EGELBERG (1994), estudos em humanos tentando relatar microrganismos específicos envolvidos na doença periodontal podem ser dificultados pela incerteza dos padrões clínicos usados para definir a progressão da doença periodontal. Além disso, por razões éticas não é possível investigar histopatologicamente a perda de inserção de ligamento periodontal em associação com microrganismos específicos.

Este trabalho teve como principal objetivo investigar a microbiota dos canais radiculares e bolsas periodontais de dentes de cães com doença periodontal induzida, comparando a similaridade das microbiotas entre estas duas regiões.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. VIAS DE COMUNICAÇÃO ENTRE POLPA E PERIODONTO

São várias as vias de comunicação entre a polpa dentária e o periodonto, considerando que ambos possuem a mesma origem embrionária e desenvolvimento simultâneo (CHILTON & TRENTON, 1972). Entre estas comunicações pode-se citar as ramificações dos canais principais, deltas e foramens apicais; túbulos dentinários; reabsorções de origem endodôntica; perfurações dos canais radiculares; fraturas radiculares parciais ou totais; defeitos anatômicos (fissuras) das coroas de alguns dentes, entre outras (DE DEUS, 1975; SIMON & DE DEUS 1988).

Além dos deltas apicais e do forame apical principal, os únicos canais ou ramificações que conectam o canal principal ao ligamento periodontal são os canais acessórios, secundários e laterais. Eventualmente aparece também o chamado canal cavo-interradicular, que se estende da câmara pulpar ao ligamento periodontal na área de bi ou trifurcação (DE DEUS, 1975; SIMON & DE DEUS 1988).

É possível que um vaso sanguíneo, que supre a polpa via canal lateral, seja traumatizado durante a medição de bolsa ou cirurgia periodontal (RUBACH & MITCHELL, 1965; FELDMAN *et al.*, 1981; WHYMAN, 1988). Em alguns dentes, estes vasos parecem ser mais importantes que aqueles presentes no forame apical, e se eles forem lesados, no mínimo uma necrose pulpar parcial poderá ocorrer (KRAMER, 1960).

Segundo DE DEUS (1975) o canal lateral estende-se do canal principal ao ligamento periodontal na região cervical da raiz. O canal secundário estende-se do canal principal ao ligamento periodontal na região apical da raiz. O canal acessório é derivado do canal secundário, ramificando-se para o ligamento periodontal, também na região apical da raiz. Entretanto, na literatura, é comum encontrar a denominação de canal lateral ou acessório para qualquer ramificação que se estenda do canal principal ao ligamento periodontal (RUBACH & MITCHELL, 1965; VERTUCCI & WILLIAMS, 1974; HESSION, 1977; GUTMANN, 1978).

RUBACH & MITCHELL (1965) estudaram histologicamente 74 dentes humanos com vários graus de doença periodontal, com o objetivo de determinar se a doença periodontal contribuía ou não para as indesejáveis alterações pulpares, como também determinar a frequência e importância dos canais acessórios e laterais como vias de comunicação polpa-periodonto. Os canais acessórios ou laterais estavam presentes em 33 dos 74 dentes examinados (45%). Sua maior localização estava na porção apical da raiz e em muitos casos estavam totalmente cercados por cimento. Contudo, 8 dos canais acessórios estavam localizados numa porção mais coronária da raiz. Os autores concluíram que a inflamação periodontal envolvendo canal acessório ou forame apical pode provocar pulpíte ou necrose pulpar.

ANTONIAZZI *et al.* (1968) num estudo sobre permeabilidade radicular, esclareceram que em certas zonas do dente (apical, por exemplo), o cimento não se comporta como uma barreira impermeável, permitindo comunicação entre polpa e periodonto.

PINEDA & KUTTLER (1972) investigaram radiograficamente 7.275 canais radiculares de 4.138 dentes humanos extraídos. As tomadas radiográficas foram feitas nas direções méso-distal e vestibulo-lingual. Observaram 30,6% dos dentes com ramificações do canal principal. Estas ramificações foram encontradas nos terços médio e apical das raízes, com predominância para o terço apical. Os incisivos centrais superiores apresentaram mais ramificações no terço médio da raiz. Já os segundos pré-molares superiores tiveram mais ramificações no terço apical da raiz. Não foram visualizadas ramificações nas regiões de bifurcação e trifurcação dos dentes multirradiculares.

LOWMAN *et al.* (1973) examinaram 46 molares humanos superiores e inferiores com o objetivo de determinar a incidência de canais acessórios nos terços médio e coronário da superfície radicular. Injetaram um contraste radiopaco (Hypaque 90% - solução de diatrizoato de sódio - com 2 c.c. de uma solução de azul de metileno a 2%) no sistema de canal radicular através de um sistema de vácuo, sendo dentes foram radiografados sob várias angulações. Foram encontrados 59% dos molares com canais acessórios ou laterais. De acordo com os resultados obtidos, os autores sugeriram que as lesões que envolvem a região de furca de dentes multirradiculares podem ter origem endodôntica ou periodontal. Contudo, frisaram que o canal acessório deve estar aberto ao longo de toda a sua extensão,

comunicando polpa e periodonto, para ser considerado causa primária de um envolvimento endo-periodontal.

VERTUCCI & WILLIAMS (1974) estudaram a incidência de canais laterais na região de furca de 100 primeiros molares humanos inferiores extraídos. Os dentes foram descalcificados, preenchidos com corante hematoxilina e diafanizados para análise. Como resultado, observaram que 46% dos dentes estudados apresentaram canais laterais na região de furca. Em 13% deste total, os dentes apresentavam canais laterais simples, que se estendiam do assoalho da câmara pulpar até a região inter-radicular; em 23% dos dentes os canais laterais se estendiam do terço coronário do maior canal radicular para a região de furca e finalmente 10% dos dentes apresentavam os dois tipos de canais laterais acima descritos. Os autores observaram que a distância média do assoalho da câmara pulpar para a região de furca foi de 3,9 mm e que quanto maior esta distância maior a incidência de canais laterais nesta região.

DE DEUS (1975), investigando 1140 dentes humanos extraídos, pela técnica de diafanização, observou que 27,4% deles apresentavam-se com canais laterais (acessórios e secundários), estando a maior frequência na área apical (17%), seguida do corpo (8,8%) e base da raiz (1,6%). Observou ainda que os pré-molares e molares apresentaram maior variedade de ramificações quando comparados aos incisivos.

HESSION (1977) estudou a morfologia endodôntica de 164 dentes extraídos. Injetou um contraste radiopaco (iotolamato de sódio) nos dentes por meio de um sistema de vácuo.

Observou a presença de canais laterais, acessórios ao longo da raiz e na região de furca. Salientou que a incidência de canais laterais nos incisivos centrais superiores foi mais alta que a esperada, com 4 dos 14 dentes apresentando esta característica anatômica. E dois destes dentes apresentando dois canais laterais na mesma raiz.

GUTMANN (1978) estudou a prevalência, localização e completa abertura dos canais acessórios na região de furca de 102 molares humanos permanentes extraídos através da injeção de corante (safranina) na câmara pulpar por meio de um sistema de vácuo. Observou canais acessórios na região de furca em 28,4% dos dentes. Do total das amostras 25,5% exibiram canais apenas na região de furca, enquanto 10,2% exibiram canais na superfície lateral da raiz. A comunicação entre câmara pulpar e superfície externa também foi verificada via túbulos dentinários, especialmente quando havia falhas no cimento.

WEINE (1984) em seu trabalho sobre o enigma do canal lateral, concluiu que a doença periodontal pode causar exposição pulpar via canais laterais localizados coronariamente.

DONGARI & LAMBRIANIDIS (1988) fizeram uma revisão da literatura e estudaram as possíveis comunicações entre polpa e ligamento periodontal, com o objetivo de determinar se uma lesão inflamatória periodontal primária pode levar a uma lesão pulpar secundária. Descreveram as vias de comunicação entre polpa-periodonto como sendo vascular, tubular e fibrinosa. A comunicação fibrinosa ocorre quando apenas a periferia das fibras de Sharpey, no cimento celular, é calcificada, ficando o centro descalcificado. Estas

fibras, se destruídas, deixam uma superfície porosa, cheia de canais, os quais no caso de uma invasão microbiana aumentam a viabilidade de uma extensão inflamatória para dentro dos túbulos. Os autores não puderam afirmar se existe uma associação significativa entre a profundidade de bolsa periodontal ou a extensão de perda óssea e a alteração pulpar.

Apesar da principal comunicação entre polpa e periodonto ser a via vascular, muitas outras vias de acesso existem e devem ser consideradas, como túbulos dentinários, fendas linguais, fraturas dentárias e radiculares, hipoplasia e agenesia de cimento, anomalias radiculares, comunicações fibrinosas e danos ao cimento nos casos de trauma e reabsorção (BELK & GUTMANN, 1990).

Sempre que a dentina é exposta por perda de esmalte ou cimento, a polpa é colocada em risco devido à permeabilidade relativamente alta da dentina normal. As bactérias penetram na dentina basicamente de três formas: contaminação de uma área de dentina exposta por saliva; formação de placa bacteriana sobre uma superfície dentinária exposta; ou por um processo de cárie. O diâmetro dos túbulos dentinários é inteiramente compatível com o da maior parte das bactérias encontradas na cavidade oral. Desta forma, se este fosse o único fator envolvido na invasão bacteriana, seria apropriado afirmar que uma vez que a dentina é exposta, bactérias têm livre acesso à polpa. Entretanto a presença de prolongamentos odontoblásticos, de fibras colágenas e do fluido dentinário em túbulos dentinários de um dente com polpa vital pode retardar a invasão intratubular. Outros fatores como esclerose dentinária; dentina reparadora; *smear layer* e deposição de proteínas plasmáticas como fibrinogênio nas paredes tubulares, podem limitar ou impedir o avanço

bacteriano via túbulos dentinários. Ainda anticorpos e componentes do sistema complemento presentes no fluido dentinário também podem ajudar a conter a invasão bacteriana. Porém, túbulos dentinários de dentes tratados endodonticamente ou com polpa necrosada são facilmente invadidos por bactérias (SIQUEIRA & LOPES, 1999).

Uma camada contínua de cimento é uma barreira eficaz à penetração de bactérias e seus subprodutos. Contudo, a ausência congênita de cimento sobre a dentina radicular, remoção do cimento durante a instrumentação periodontal ou danos durante lesão traumática podem abrir numerosos canalículos de comunicação entre a polpa e o ligamento periodontal. Teoricamente, estes túbulos podem transportar produtos metabólicos tóxicos produzidos durante as doenças pulpares ou periodontais em ambas as direções (AVERY, 1980).

2.2. MICROBIOLOGIA ENDODÔNTICA

A prática endodôntica durante muito tempo foi realizada de forma empírica, apenas com o objetivo de obter-se o alívio da dor e promover a obturação dos canais radiculares. Havia, portanto, a necessidade premente do entendimento dos casos de insucessos do tratamento endodôntico, como a presença de sintomatologia clínica, de fistula, e a persistência ou reincidência de lesões radiográficas pós-tratamento. Estas situações clínicas, até então, eram consideradas decorrentes de erros operatórios inerentes ao próprio tratamento, até que os avanços da Microbiologia Médica proporcionados pelos estudos de KOCH & PASTEUR sobre infecções humanas e espécies anaeróbias alertaram os endodontistas para a participação microbiana nos casos de insucessos, levando-os a crer que, indubitavelmente, os fatores microbiológicos são os principais responsáveis pelo fracasso do tratamento endodôntico (ALVES *et al.*,1994).

Conduzida por esta crença, no final do século XIX, em 1894, a Endodontia começa a firmar-se como ciência. Surge um novo conceito: MILLER (1894) através da análise bacteriológica de esfregaços obtidos de canais radiculares com polpas necróticas evidenciou a presença de bactérias, associando-as à etiologia e manutenção das doenças pulpares e periapicais. Foram identificados vários tipos morfológicos de bactérias: cocos, bacilos e espirilos.

Contudo, somente em 1965, estes achados foram confirmados por KAKEHASHI *et al.* (1965) quando esclareceram o papel desempenhado pelas bactérias e seus produtos na indução das infecções pulpares e perirradiculares. 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).

Na década de 70, a Endodontia obteve um grande avanço como ciência, impulsionada pelo desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de transporte, isolamento e cultivo de anaeróbios estritos.

Graças a estes avanços tecnológicos, SUNDQVIST, em 1976, realizou um estudo no qual avaliou as condições bacteriológicas de 32 canais de dentes unirradiculares com

coroas híginas e com polpas necrosadas em decorrência de trauma dentário, constatando que mais de 90% das cepas bacterianas isoladas eram anaeróbias estritas.

Os achados de SUNDQVIST foram confirmados posteriormente por BYSTRÖM & SUNDQVIST (1983), BAUMGARTNER & FALKIER (1991), SUNDQVIST, 1992; SUNDQVIST, 1994; GOMES *et al.* (1994a,b; 1996a,b) pela constatação da prevalência de bactérias anaeróbias estritas nos canais radiculares infectados, inclusive nos 5.0 mm apicais.

Já está bem definido na literatura endodôntica 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 capaz 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.* 1994a,b; 1996a,b).

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 à infecções persistentes do canal radicular podendo comprometer o sucesso da terapia endodôntica. Dentre estas se destacam os estreptococos, o *Enterococcus faecalis*, *Pseudomona aeruginosa* e *Candida*

spp. (ERGSTRÖM & FROSTELL, 1964; RANTA *et al.*, 1988; e 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 cimento 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 significativo fator etiológico na patologia periapical.

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. As bactérias pigmentadas são muito agressivas pois possuem lipopolissacarídeos (endotoxinas) e a presença de cápsula que inibe sua

fagocitose, além de enzimas como colagenase, hialuronidase e fibrinolisinase, as quais podem afetar o estroma do tecido conjuntivo. Possuem ainda antígenos capazes de induzir as respostas imune celular e humoral (NISENGARD *et al.*, 1997b).

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 frequentemente isolado. Em 11 dentes do grupo sem patologia apical, nenhuma bactéria foi isolada, enquanto nos nove dentes remanescentes foram isoladas 13 espécies bacterianas. 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.

2.3. MICROBIOLOGIA DO PERIODONTO

SLOTS (1977), ao investigar a microbiota presente no sulco gengival saudável de dentes humanos, constatou a predominância de bactérias anaeróbias facultativas e Gram-positivas. Bastonetes estiveram presentes em 44,6% e cocos em 40,4% do total das amostras coletadas. Os actinomicetos predominaram entre os microrganismos identificados.

PAGE & SCHROEDER (1982a) ao estudarem a ação bacteriana sobre os tecidos gengivais, chegaram às seguintes conclusões:

- várias substâncias bacterianas, incluindo endotoxinas, têm acesso direto ao tecido conjuntivo da margem gengival, iniciando o processo inflamatório;
- o crescimento microbiano rápido e a extensão apical da área invadida criam espaços causados pelo desalojamento do epitélio juncional da superfície do dente, provavelmente devido à força física resultante dos fenômenos vasculares, da exudação ou à atividade enzimática;
- algumas bactérias produzem leucotoxinas que interferem com o funcionamento dos mecanismos normais de defesa (fagocitose dos leucócitos);
- os componentes bacterianos podem interagir com várias células e sistemas do hospedeiro, para ativar a inflamação aguda e possivelmente processos imunopatológicos que resultam em destruição patológica de tecidos;
- alguns componentes bacterianos, por exemplo, suas endotoxinas, podem agir diretamente sobre as células ósseas causando reabsorção.

A placa bacteriana na doença periodontal não é homogênea em sua composição bacteriana quantitativa e qualitativa. Existe a placa bacteriana supragengival e subgengival (CARRANZA, 1986; NISENGARD et al., 1997a).

formação da placa supragengival tem início pela aderência das bactérias sobre a película adquirida ou superfície dentária. A placa cresce por adição e multiplicação bacteriana, e acúmulo de produtos bacterianos. A placa supragengival consiste principalmente em microrganismos que proliferam e células epiteliais descamadas, leucócitos e macrófagos em uma matriz intercelular aderente. A colonização da superfície dentária pelas bactérias da placa supragengival parece ser específica e aparentemente depender da interação da superfície bacteriana com a glicoproteína salivar da película (CARRANZA, 1986; NISENGARD et al., 1997a).

Streptococcus sanguis e bastonetes Gram-positivos são os maiores grupos de bactérias que iniciam a placa supragengival. Uma vez iniciado o crescimento desta placa ocorrem o crescimento secundário e a maturação. Os microrganismos comumente encontrados em tais sítios no indivíduo adulto são *Streptococcus mitis*, *S. sanguis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Rothia dentocariosa*, *Actinomyces viscosus*, *A. naeslundii* e ocasionalmente espécies de *Neisseria* e *Veillonella* (CARRANZA, 1986).

O sulco gengival e a bolsa periodontal ancoram uma coleção diversa de bactérias e as espécies de microrganismos que colonizam esses sítios retentivos diferem daquelas encontradas na placa supragengival. De acordo com os seus componentes, a placa

subgingival está dividida em zona aderida e zona não aderida. A zona de placa bacteriana que está aderida à superfície dentária apresenta características particulares, tais como, o predomínio de bactérias Gram-positivas (*Streptococcus mitis*, *S. sanguis*, *Actinomyces viscosus*, *A. naeslundii* e *Propionibacterium*), não se estender ao epitélio juncional, apresentar microrganismos periodontopatogênicos, estar associada à formação de cálculo e cárie de raiz, além de poder ser contínua com a placa supragengival (CARRANZA, 1986; NISENGARD et al., 1997a).

A zona de placa bacteriana que não está diretamente aderida à superfície dentária também apresenta características particulares, tais como, o predomínio de bactérias Gram-negativas (*Fusobacterium nucleatum*, "*Bacteroides melaninogenicus ss assacharolyticus*", *Eikenella corrodens* e *B. fragilis*), apresentar bactérias com motilidade (espiroquetas), estar em contato com o epitélio sulcular e juncional e apresentar microrganismos periodontopatogênicos associados à rápida destruição óssea alveolar (CARRANZA, 1986; NISENGARD et al., 1997a).

LASCALA e MOUSSALLI (1995) relataram que a gengivite representa a sucessão ecológica normal da microbiota adjacente à gengiva. Está associada à passagem da microbiota predominantemente Gram-positiva, com presença dos *Streptococcus* spp., para uma mais complexa, onde vários microrganismos Gram-positivos como os *Actinomyces israelii* e *A. viscosus* e outros Gram-negativos como *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella* spp. e *Treponema* spp. vivem às expensas dos cocos Gram-positivos iniciais e indígenas da superfície do dente, ou seja, o *S. mutans*.

NISENGARD et al. (1997a) declararam que um dos mais importantes avanços no campo da microbiologia periodontal foi o conceito de especificidade. A doença periodontal passou a ser considerada como sendo um grupo de doenças e infecções. Cada doença possui seu próprio grupo de microrganismos associados. Os autores mencionaram ainda que microrganismos anaeróbios Gram-negativos são os tipos principais de bactérias associadas com a maioria das doenças periodontais causadas por bactérias *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.) foram as espécies bacterianas mais frequentemente identificadas até aquela data. Os autores sugeriram a invasão bacteriana nos tecidos, ao relatarem que bactérias foram encontradas na intimidade dos tecidos gengivais e próximo às superfícies ósseas em reabsorção em mais da metade dos casos de periodontite humana avançada.

HE et al. (1998), utilizando o AP-PCR estudaram a caracterização genotípica do *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.). O AP-PCR foi aplicado em 143 cepas de A.a. incluindo 8 cepas de referência e 135 cepas clínicas isoladas de pacientes japoneses com periodontite. Os resultados mostraram uma diversidade genética entre a população investigada. Pôde-se concluir que certos genótipos são mais importantes na patogênese da doença periodontal que outros.

O *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.) é uma bactéria sem motilidade, coco-bacilo, Gram-negativa, que tem sido fortemente relacionada com a periodontite juvenil, como também em certos casos de periodontite de progressão rápida e periodontites refratárias em adultos. Esta bactéria produz numerosos fatores de potencial virulência, tais

como leucotoxinas que podem destruir células da defesa imune, além de poder invadir o tecido conjuntivo gengival. Ao contrário de outros suspeitos patógenos periodontais, o *A.a.* parece ser mais difícil de ser erradicado utilizando a terapia periodontal convencional. Foram identificados vários sorotipos e genótipos entre os *A.a.*, além de existirem diferenças de virulência bacteriana entre diferentes cepas de *A.a.* (HE *et al.*, 1998).

2.4. MICROBIOLOGIA DAS LESÕES ENDO-PERIODONTAIS

As bactérias exercem um papel de fundamental importância na etiopatogenia das doenças pulpares e periodontais. A interrelação entre a microbiota destas duas doenças tem sido estudada por vários pesquisadores, entretanto o desenvolvimento das lesões endo-periodontais não está completamente esclarecido.

KIPIOTI *et al.* (1984) examinaram a microbiota dos canais radiculares e bolsas periodontais de 6 dentes necrosados, com coroas clínicas intactas, sem lesões periapicais e com bolsas periodontais profundas (profundidade ≥ 7 mm). A coleta microbiológica do canal radicular foi realizada sob isolamento absoluto utilizando-se cone de papel, deixando-o por 60 segundos no interior do canal. Para a coleta periodontal utilizou-se dois cones de papel número 40, inserindo-os em dois diferentes sítios da mesma bolsa periodontal e deixando-os lá por 60 segundos. Três amostras foram coletadas de cada um dos 16 pacientes, uma do canal radicular e duas da bolsa periodontal adjacente em dois diferentes sítios. Os autores demonstraram que a microbiota dos canais radiculares era similar àquela encontrada nas bolsas periodontais adjacentes, sendo os organismos mais frequentemente isolados em ambos os locais: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus* spp., *Capnocytophaga* spp., *Actinomyces* spp. e *Streptococcus* spp. Sugeriram que a bolsa periodontal poderia ser a possível fonte de infecção dos canais radiculares.

ADRIAENS *et al.* (1988) estudaram em microscopia óptica e eletrônica de varredura a invasão bacteriana no cimento e dentina radicular de dentes humanos não cariados e com doença periodontal avançada. Encontraram bactérias na base de bolsas gengivais entre os remanescentes das fibras de Sharpey e seus pontos de inserção no cimento. Observaram que nos dentes que tiveram as raízes raspadas e aplainadas, houve remoção de cimento, havendo invasão bacteriana no remanescente do cimento radicular. A invasão pareceu iniciar como um processo localizado, freqüentemente envolvendo apenas uma bactéria. Em outras áreas, bactérias estavam presentes nos defeitos lacunares do cimento que se estendiam para dentro da dentina radicular. A maioria das bactérias foi encontrada na porção mais externa dos túbulos (300 μm), embora ocasionalmente em porções mais profundas. Nenhuma bactéria foi encontrada na porção da raiz localizada apicalmente à inserção epitelial. Concluíram que os túbulos dentinários e as lacunas de cimento poderiam servir de reservatórios bacterianos para a indução de patologias pulpares.

KOBAYASHI *et al.* (1990) realizaram estudo onde compararam a microbiota do canal radicular e bolsa periodontal de dentes não cariados, com periodontite avançada e diagnosticados clinicamente como necrosados pelo teste elétrico pulpar. A coleta microbiológica do canal radicular foi realizada sob isolamento absoluto utilizando-se limas nº 15, 20, 25 e cones de papel número 25. Para a coleta periodontal utilizou-se cone de papel número 40, inserindo-o até o fundo da bolsa e deixando-o lá por 60 segundos. Todo o processamento microbiológico foi realizado em cabine de anaerobiose contendo a mistura de 80% de N_2 , 10% de CO_2 e 10% de H_2 . As espécies bacterianas anaeróbias obrigatórias

predominantes, comuns aos dois sítios, periodonto e canal radicular, foram *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Bacteroides* e *Fusobacterium*. Já os anaeróbios facultativos *Actinomyces* e *Streptococcus* foram detectados predominantemente na bolsa periodontal. Segundo os autores, ocorrência de microrganismos comuns às duas regiões sugere que a bolsa periodontal pode ser uma possível fonte das infecções do canal radicular.

Para KEREKES *et al.* (1990) a similaridade entre as microbiotas endodôntica e periodontal de dentes intactos, sem lesão periapical, mas comprometidos periodontalmente reforça a idéia da infecção cruzada entre canal radicular e bolsa periodontal. Segundo eles, quando se comparou a grande variedade de organismos que colonizavam a bolsa periodontal com o pequeno número coletado de polpas necróticas de dentes intactos, pôde-se observar que as espécies que participavam da infecção cruzada eram limitadas. Os organismos mais freqüentemente envolvidos pertenciam às espécies "*Bacteroides*", *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Weilonella*, *Campylobacter* e *Peptostreptococcus*, sendo encontrado também espiroquetas. Os autores concluíram que a capacidade de sobreviver em ambiente altamente reduzido e a mobilidade eram fatores importantes para os microrganismos que participam de infecção cruzada.

KURIHARA *et al.* (1995) ao realizaram estudo microbiológico de lesões endo-periodontais de dentes não cariados, com o canal radicular intacto e sem história de trauma, encontraram mais microrganismos nas bolsas periodontais que nos canais radiculares, sendo que a microbiota consistia principalmente de bacilos e microrganismos com

motilidade, enquanto que a dos canais radiculares consistia principalmente de bacilos e cocos. As espécies bacterianas mais encontradas nos canais radiculares foram *Peptostreptococcus* e *Streptococcus* (cocos Gram-positivos) e *Actinomyces* e *Rothia* (bastonetes Gram-positivos). Já nas bolsas periodontais foram *Campylobacter* spp., *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Peptostreptococcus productus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus* spp. Os autores sugeriram que a origem da infecção endodôntica numa lesão endo-perio pode ser a bolsa periodontal.

2.5. ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS PULPO-PERIODONTAIS

Revisando a literatura constatamos que existe uma concordância unânime entre os pesquisadores quanto à doença pulpar ter a capacidade de iniciar e perpetuar a doença periodontal. Contudo, embora as vias de comunicação entre polpa e periodonto sejam incontestáveis, não há um consenso na justificativa das alterações patológicas da polpa como extensão da doença periodontal. Procedemos então a uma revisão bibliográfica abordando esta questão ainda tão controversa.

SELTZER *et al.* (1963) ao avaliarem histologicamente 32 dentes periodontalmente comprometidos nos quais não havia qualquer evidência de cárie ou restauração, observaram que 12 dentes (37%) apresentaram polpas com vários graus de atrofia, outros 12 (37%) mostraram lesões pulpares inflamatórias e em 3 dentes as polpas estavam completamente necróticas. Concluíram que estas observações pareceram indicar que as lesões periodontais produziram um efeito degenerativo nas polpas dos dentes envolvidos.

MAZUR & MASSLER (1964) analisaram histologicamente 128 dentes humanos, com o objetivo de estudar a influência da doença periodontal sobre a polpa. Para os autores não há nenhuma relação entre a severidade da doença periodontal e as alterações na polpa. Sugeriram ainda que a condição sistêmica do paciente pode exercer uma influência maior sobre a polpa, do que o padrão periodontal ou a sua idade cronológica.

A excessiva mobilidade de dentes comprometidos periodontalmente pode resultar em estenose ou ruptura de vasos apicais. Com isso a invasão bacteriana através do canal principal ou acessório, exposto à doença periodontal pode ocorrer. Este mecanismo anátomo-patológico pode explicar casos de pulpite idiopática ou infecção pulpar anacorética (RUBACH *et al.* 1965).

BENDER & SELTZER (1972) estudaram histologicamente 178 dentes humanos com o objetivo de investigar o efeito da doença periodontal na polpa. Concluíram que a maior evidência do efeito da doença periodontal na polpa foi baseada na inter-relação anatômica e circulatória. A doença periodontal produziu inflamação e alterações degenerativas na polpa. Como também inflamação nas áreas apical e lateral da polpa. Nas doenças periodontais mais avançadas, necrose pulpar foi detectada em canais laterais mais amplos.

CHACKER (1974) estudou a relação entre as doenças pulpares e periodontais. Com base em seu estudo fez as seguintes observações:

1. A inflamação pulpar pode rapidamente causar uma inflamação periodontal.
2. A doença degenerativa pulpar não é um fator significativo no desenvolvimento das lesões periodontais.
3. A doença degenerativa periodontal pode levar a uma degeneração pulpar parcial ou total.
4. A inflamação periodontal pode levar a uma inflamação pulpar se canais laterais acessórios ou canais da região de furca forem expostos ao meio oral pela instrumentação periodontal ou pela formação de bolças periodontais profundas. Também os túbulos

dentinários podem ser expostos ao meio oral devido à curetagem excessiva e ataque bacteriano;

5. A inflamação periodontal não pode chegar ao tecido pulpar adjacente, pois esta caminha através de canais venosos e estes saem da polpa.

VERTUCCI & WILLIAMS (1974) ao estudarem a incidência de canais laterais na região de furca afirmaram que existe uma interrelação entre polpa e periodonto. Este fato era ilustrado pela ocorrência de necrose pulpar após a terapia periodontal e o insucesso em resolver algumas lesões periodontais sem o tratamento endodôntico.

GUTMANN (1978) afirmou que, se houver a presença de canais acessórios na região de furca de molares permanentes humanos e se estes não forem selados durante o tratamento endodôntico, há a possibilidade do ingresso para a cavidade endodôntica de fluidos e bactérias provenientes do periodonto.

FELDMAN *et al.* (1981) acreditam que a patologia endodôntica pode ser um fator etiológico na doença periodontal, mas a doença periodontal também pode ser um fator etiológico na patologia endodôntica. Concluíram que a relação entre endodonto e periodonto é tal que estas duas estruturas não podem ser separadas.

Para PRICHARD (1982) e PAIVA *et al.* (1988) a lesão periodontal pode causar doença pulpar via canais laterais ou acessórios ou através do forame apical. Segundo os autores a remoção do cimento por aplainamento da raiz, no decorrer do tratamento

periodontal, pode expor os túbulos dentinários aos líquidos orais e à microrganismos e estes fatores podem causar inflamação pulpar. A necrose pulpar pode resultar de trauma causado por curetas aos vasos sanguíneos apicais durante a intervenção cirúrgica em bolsas periodontais que atinjam o ápice do dente. Os autores acreditam que polpa lesada torna-se um alvo importante para as bactérias.

A polpa reage de várias formas na presença da doença periodontal. Esta reação pode ser influenciada não apenas pelo estágio da doença periodontal, mas também pelo tipo de tratamento periodontal, tal como raspagem radicular e administração de medicamentos. O tamanho, número e localização dos canais acessórios, a área da raiz exposta e a quantidade de substratos tóxicas que são transmitidas para o interior da polpa, podem interferir na severidade do dano pulpar. Predominantemente, as alterações pulpares devido a agentes tóxicos e medicamentos que nela penetram via canais laterais e túbulos dentinários, são degenerativas, com formação de dentina secundária, reabsorção interna e fibrose (GULDENER, 1985; WHYMAN 1988).

DONGARI & LAMBRIANIDIS (1988) ao revisarem a literatura afirmaram que não existia até então uma relação consistente entre profundidade de bolsa periodontal ou extensão de perda óssea e o padrão pulpar.

As observações clínicas de sensibilidade radicular, inflamação pulpar associada com cáries radiculares e debridamento radicular, falha na resolução de lesões periodontais

seguindo terapias convencionais, suportam a teoria de uma inter-relação entre os sistemas pulpar e periodontal (MEE-MADISON, 1992).

A perda progressiva de inserção periodontal acompanhada da formação de placa bacteriana induz alterações patológicas no tecido pulpar, pois bactérias e seus produtos ganham acesso à polpa via canais acessórios expostos, forame apical e túbulos dentinários. Porém as alterações inflamatórias da polpa são limitadas e freqüentemente não resultam em necrose, pois ela tem boa capacidade de defesa contra os elementos agressores liberados pela placa bacteriana e lesão periodontal, contanto que o suprimento sanguíneo principal apical permaneça intacto (LINDHE, 1989; MEE-MADISON, 1992; SIQUEIRA & LOPES 1999).

MANDEL *et al.* (1993) discutiram a etiologia, diagnóstico, tratamento e prognóstico de lesões endodônticas e periodontais. Quanto à etiologia, dividiram as lesões como de origem endodôntica, periodontal e de origem combinada endodôntica e periodontal. Relataram que as lesões de origem endodôntica reabsorvem osso apicalmente, lateralmente e destroem as fibras de inserção ao redor do dente desvitalizado. Alertaram que sem o tratamento adequado, estas lesões aumentam e às vezes drenam através do sulco gengival ou através de um dente adjacente. Observaram ainda que as lesões de origem endodôntica podem apresentar-se como uma fistula na região vestibular ou lingual na área de bifurcação, com o remanescente ósseo intacto por mesial e distal do dente. Os autores sugeriram que em adição às lesões de origem endodôntica, raízes fusionadas, pérolas de esmalte em dentes multirradiculares e fraturas radiculares verticais podem causar bolsas

estreitas. Segundo os autores as lesões de origem periodontal são usualmente associadas com mobilidade dentária e os dentes afetados respondem positivamente aos testes de sensibilidade pulpar. Os autores afirmaram que as lesões combinadas endo-periodontais, apresentam dois componentes concorrentes: um é a lesão periapical originária de uma polpa necrótica, a outra é a lesão periodontal que progrediu apicalmente para a lesão periapical.

2.6.

MODELO ANIMAL NO ESTUDO DA DOENÇA PERIODONTAL

O estudo dos efeitos dos vários tipos de terapia periodontal deve ser realizado com base em uma análise histológica das amostras e não apenas nos dados clínicos e radiográficos. Contudo em humanos este tipo de análise fica impedido de ser obtido por questões práticas e éticas.

CATON & ZANDER (1975) sugeriram um modelo animal no qual pudessem ser produzidos defeitos periodontais semelhantes aos que ocorrem em humanos. Mostraram que vários modelos animais têm sido desenvolvidos para testar os procedimentos terapêuticos periodontais. Cães e macacos têm sido usados devido à disponibilidade, controle e adequado tamanho para manipulações clínicas. Concluíram que pelo fato da anatomia dos dentes dos cães ser totalmente diferente da do homem, especialmente a ausência de ponto de contato, limita este modelo no estudo da terapêutica periodontal. Os autores sugeriram o macaco, por apresentar tamanho, morfologia e fisiologia mais assemelhada a do homem.

Para outros pesquisadores o cão é um excelente animal para experimentos, com o qual pode-se estudar doenças gengivais e periodontais. São relativamente pequenos, fáceis de manusear e extremamente cooperativos durante os experimentos. Seus tecidos orais, especialmente a junção dento-gengival, o periodonto e o tamanho de seus dentes são bem similares aos humanos, embora haja evidentes diferenças anatômicas, topográficas e fisiológicas. A raça mais freqüentemente usada e melhor caracterizada é a Beagle, mas cães

sem raça definida e perdigueiros entre outros têm sido também estudadas (PAGE & SCHROEDER, 1982b).

Para CARRANZA JR. (1986) os modelos animais são muitas vezes associados a problemas técnicos e conceituais. Argumentou que todos os animais testados possuem uma microbiota distintamente diferente daquela do homem. Portanto os resultados de experiências usando modelos animais não seriam transferíveis diretamente na consideração da doença periodontal humana. Além das dificuldades encontradas pelos pesquisadores em estabelecer microrganismos humanos na boca de alguns animais.

2.7. DOENÇA PERIODONTAL EM CÃES

Os cães possuem duas dentições, com formulações iguais a I3/3, C1/1, M3/3 para a decídua e I3/3, C1/1, Pm4/4, M2/3 para a permanente

Em cães convencionais mantidos livres de placa por longos períodos, o sulco gengival é freqüentemente ausente.

A periodontite, que prevalece e aumenta com a idade do animal, ocorre espontaneamente em cães criados e mantidos em grandes colônias e em cães domésticos que possuem uma dieta similar à humana ou à base de alimentos comerciais caninos. A doença começa a partir de uma gengivite pré-existente e eventualmente leva à mobilidade dentária e exfoliação (PAGE & SCHROEDER, 1982b).

A periodontite em cães é uma doença bacteriana e pode ser induzida por uma variedade de condições experimentais de certa forma definidas. Em cães jovens e idosos, na ausência de microorganismo, há uma imigração constante, mas provavelmente flutuante e de baixa magnitude, de granulócitos neutrófilos do plexo vascular abaixo do epitélio juncional, através dos espaços intercelulares para os sulcos gengivais, ou em direção à margem da gengiva (PAGE & SCHROEDER, 1982b).

Em geral, a placa bacteriana que forma-se inicialmente numa posição supragengival estende-se apicalmente, resultando na criação e aprofundamento de uma bolsa gengival. A

placa associada à gengivite de longa duração é supragengival e, de forma variável, também subgengival. A microbiota cultivável predominante associada à gengivite difere um pouco na placa supragengival daquela existente em depósitos subgengivais. Enquanto ambos os tipos de depósitos contribuem para uma microbiota predominantemente anaeróbica, com proporções significativas de *P. gingivalis* e *F. nucleatum*, a placa supragengival contém uma microbiota predominantemente Gram-positiva e a placa subgengival uma microbiota predominantemente Gram-negativa. Ambos os tipos de depósitos contêm pequeno número de *Streptococcus*. As bactérias cultiváveis Gram-positivas predominantes em depósitos supragengivais são os *Actinomyces* spp., especialmente *A. viscosus*, assim como outros bastonetes anaeróbicos, ao passo que as bactérias cultiváveis Gram-negativas predominantes em depósitos subgengivais são *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, grupos de cocobacilus e *Capnocytophaga* (PAGE & SCHROEDER, 1982b).

RENVERT *et al.* (1996) utilizando 6 cães da raça Beagle, fizeram estudo microbiológico e histopatológico do periodonto de dentes de cães em três áreas experimentais distintas: 1) áreas onde a saúde periodontal foi mantida pela escovação dos dentes três vezes por semana; 2) áreas onde foi permitido o acúmulo natural de placa, estabelecendo-se uma gengivite marginal durante todo o período do experimento; 3) áreas onde o acúmulo de placa foi estimulado pela colocação de ligaduras de algodão ao redor dos dentes. Antes do início do experimento, procedeu-se a raspagem de todas as amostras dentais. Nas 4 semanas seguintes à raspagem, os dentes foram escovados 3 vezes por semana com uma escova embebida em digluconato de clorexidina a 2%. Os níveis de perda de inserção alcançaram o máximo de 0,15 mm aos 57 dias de experimento. As espécies

Porphyromonas gingivalis e *Prevotella intermédia* foram as bactérias mais associadas com a progressão da doença periodontal. destes animais.

2.8. MÉTODOS DE INDUÇÃO DE DOENÇA PERIODONTAL EM CÃES

O modelo animal há muito tem sido utilizado em trabalhos experimentais da área de periodontia com o fim de melhor entender a etiologia, patogenia e microbiologia da doença periodontal. Os cães são geralmente usados pela sua fácil manipulação, avaliação e adequado tamanho para pesquisas clínicas. As ligaduras feitas de fio de algodão e elástico ortodôntico são os métodos mais freqüentemente utilizados para criação da doença periodontal em animal. Com menor freqüência têm sido utilizados bandas ortodônticas e fios de aço.

A técnica de colocação consiste de incisão intrasulcular ao redor do dente, até o nível da crista alveolar e adaptação das ligaduras na região do colo do dente. Quando do uso de bandas ortodônticas, estas são cimentadas (PILOT *et al.*, 1980; JANSEN & PILOT, 1981; JANSEN *et al.*, 1982).

Para melhorar a adaptação das ligaduras de algodão, podem ser feitos leves sulcos nas superfícies proximais dos dentes (REVERT *et al.* 1996).

O defeito periodontal pode ser produzido pelo uso combinado de banda ortodôntica e fio de algodão. A banda ortodôntica é aplicada inicialmente e com um intervalo de 3 semanas é substituída pelo fio de algodão (JANSEN & PILOT, 1981; JANSEN *et al.*, 1982).

Para favorecer o acúmulo de placa a dieta administrada aos cães é de consistência pastosa (JANSEN & PILOT, 1981; JANSEN *et al.*, 1982; PAQUETTE *et al.*, 1997).

De acordo com PAGE & SCHROEDER (1982b) o uso da ligadura de fio de algodão para a indução da doença periodontal é uma técnica simples, mas de difícil estandardização. O fator incerteza reside na posição exata da mesma, pois sua posição inicial pode ser estabelecida com segurança, mas o tecido mole tende a deslocá-la no decorrer do experimento, devido ao edema ou à recessão dos tecidos gengivais. No entanto esta técnica resulta em uma rápida degradação dos tecidos que suportam o dente, tendo sido usada com sucesso. Com a ligadura posicionada, a placa microbiana que está ligada à superfície do dente tende a avançar subgengivalmente. Na verdade, a posição subgengival da ligadura desempenha papel importante não apenas na iniciação, mas também no prosseguimento da degradação do tecido periodontal.

HOLLAND *et al.* (1998) desenvolveram pesquisa em modelo animal para estudar a doença periodontal severa, utilizando ligaduras de algodão em combinação com uma dieta pastosa em onze cães da raça Beagle. Observaram que nenhuma perda óssea significativa ocorreu após a remoção das ligaduras e que a doença periodontal progressiva foi induzida durante a fase de aplicação destas, porém uma periodontite crônica não foi mantida após a remoção das mesmas.

2.9. MOBILIDADE DENTÁRIA E LESÃO DE FURCA - CLASSIFICAÇÃO

SCHLUGER *et al.* (1981a) descreveram método clínico de avaliação de mobilidade dentária, onde o grau de movimento do dente é estimado e pode ser classificado de I a III, com incrementos de meio marcado como [-]. A interpretação proposta dos valores foi a seguinte:

0 = Mobilidade clínica dentro do limite normal.

[-] = Mobilidade clínica considerada um pouco acima da fisiológica, mas inferior a 1 mm vestibulo-lingualmente.

I = Mobilidade clínica aproximadamente 1 mm vestibulo-lingualmente.

II = Mobilidade clínica aproximadamente 2 mm vestibulo-lingualmente, mas sem nenhuma mobilidade em direção apical.

III = Mobilidade clínica maior que 2 mm vestibulo-lingualmente, além da mobilidade em direção apical.

SCHLUGER *et al.* (1981b) descreveram também classificação para lesão de furca:

Classe I – Invasão incipiente de furca: se desenvolve por perda óssea moderada e uniforme com lesão de tecido mole ou extensão da bolsa para dentro da região de furca. A lesão é marginal e pode ser facilmente descoberta com uma sonda circunferencial no sentido transversal. A sonda irá se aprofundar na chanfradura rasa e em forma de V no bordo marginal. Não há lesão intra-óssea.

Classe II – Invasão patente de furca: este tipo de invasão cria profundas bolsas e vários graus de destruição óssea que se estendem para dentro da região de furca. Não há uma completa comunicação. O caminho da destruição para a furca na destruição horizontal freqüentemente se estende por alguns milímetros e cria um espaço definido com o teto em arco criado pela furca e limitado pelas raízes do osso.

Classe III – Invasão de furca comunicante: é uma exposição nítida que se comunica com a segunda ou terceira abertura de furca. Exemplo é a invasão vestibular de furca de um molar inferior que se estende em direção à posição lingual.

3. PROPOSIÇÃO

Utilizando o cão como modelo animal, este trabalho teve como proposta:

Investigar a microbiota dos canais radiculares e bolsas periodontais de dentes de cães com doença periodontal induzida, a fim de comparar a similaridade entre as microbiotas presentes na bolsa periodontal e canal radicular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

É necessário esclarecer que a indução da doença periodontal foi realizada em 10 dentes de cada cão. Desses 10, 4 dentes foram destinados ao estudo histopatológico da polpa e periodonto, 2 para análise em microscopia eletrônica de varredura e os quatro restantes ao estudo microbiológico da polpa e periodonto. O objetivo de estudo desta dissertação foi a investigação microbiológica desses 4 dentes (em cada cão).

4.1 SELEÇÃO DOS CÃES E AMOSTRAS

Foram utilizados inicialmente 24 dentes de 6 cães adultos, com aparência sadia, boas condições periodontais, ausência de cárie ou lesão periapical, de raça indefinida, do mesmo sexo, com idade variando entre um ano e um ano e meio e peso entre 7 e 19 Kg. Os cães foram provenientes do canil central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), já vacinados (anti-rábica - Defensor, Pfizer Animal Health, New York, U.S.A.), vermifugados (Canex, SESPO, Paulínia, SP, Brasil) e submetidos ao período de quarentena.

De cada cão foram utilizados 4 dentes: 2º PMSD, 2º PMID, 4º PMSE, 4º PMIE.

A indução da doença periodontal foi realizada em sítios separados, para diminuir o risco de interferência nos resultados de uma amostra com a outra.

4.2 ANESTESIA

O animal recebeu inicialmente uma medicação pré-anestésica (MPA) de sulfato de atropina (Fraga-Farmagrícola S.A Importação e Exportação, Mairiporã- SP) administrada por via subcutânea na dosagem de 0,044mg/Kg, utilizando-se seringa de 1 ml (insulina). Após um período de 15 minutos, foi anestesiado com uma associação de Rompun (Bayer S.A. Saúde Animal, São Paulo- SP) e Francotar (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda, Roseira, SP, Brasil) nas dosagens de 1 mg/Kg e 15mg/Kg, respectivamente, injetada na mesma seringa por via intramuscular.

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

4.3 AMOSTRAS

As amostras foram divididas em dois grupos:

Grupo I – Indução da doença periodontal

Composição da amostra: 05 cães e 20 dentes

Sítios de indução da doença periodontal:

Lado direito

- 2º Pré-molar superior.
- 2º Pré-molar inferior.

Lado esquerdo

- 4º Pré-molar superior.
- 4º Pré-molar inferior.

Grupo II – Grupo controle sem doença periodontal

Composição da amostra: 1 cão e 4 dentes.

Lado direito

- 2º Pré-molar superior.
- 2º Pré-molar inferior.

Lado esquerdo

- 4º Pré-molar superior.
- 4º Pré-molar inferior.

4.4 FASE INICIAL DO EXPERIMENTO

No início do experimento, todos os dentes selecionados foram submetidos a raspagem coronária, profilaxia com ultra-som e radiografados para confirmação da normalidade periapical e periodontal, com filme “ultra-speed” Kodak, utilizando-se aparelho de raio X

(DABI ATLANTE – Spectro 70x/8mA - Ribeirão Preto-SP) com tempo de exposição padronizado em 0,6 segundos. As radiografias periapicais foram realizadas em duplicata, sendo uma revelada manualmente pelo método tempo/temperatura e outra processada automaticamente. As tomadas radiográficas foram feitas pela técnica do paralelismo. Para conseguirmos uma padronização destas tomadas foram feitos moldes dos dentes e do posicionador radiográfico infantil (PRISMA INSTRUMENTOS ODONTOLÓGICOS LTDA, SÃO PAULO), com silicona pesada (OPTOSIL® Confort – HERAEUS KULZER, GERMANY) de cada região envolvida no estudo. Estes moldes foram conservados na geladeira, imersos em água destilada estéril, em recipientes tampados.

Em seguida, por um período de uma semana, a higiene oral foi mantida pela escovação dentária com solução de clorexidina a 2%. Estes procedimentos visaram iniciar o experimento numa condição semelhante de saúde oral, para todos os cães (Figuras 4.4.1a, 4.4.1b, 4.4.2., 4.4.3a e 4.4.3b).

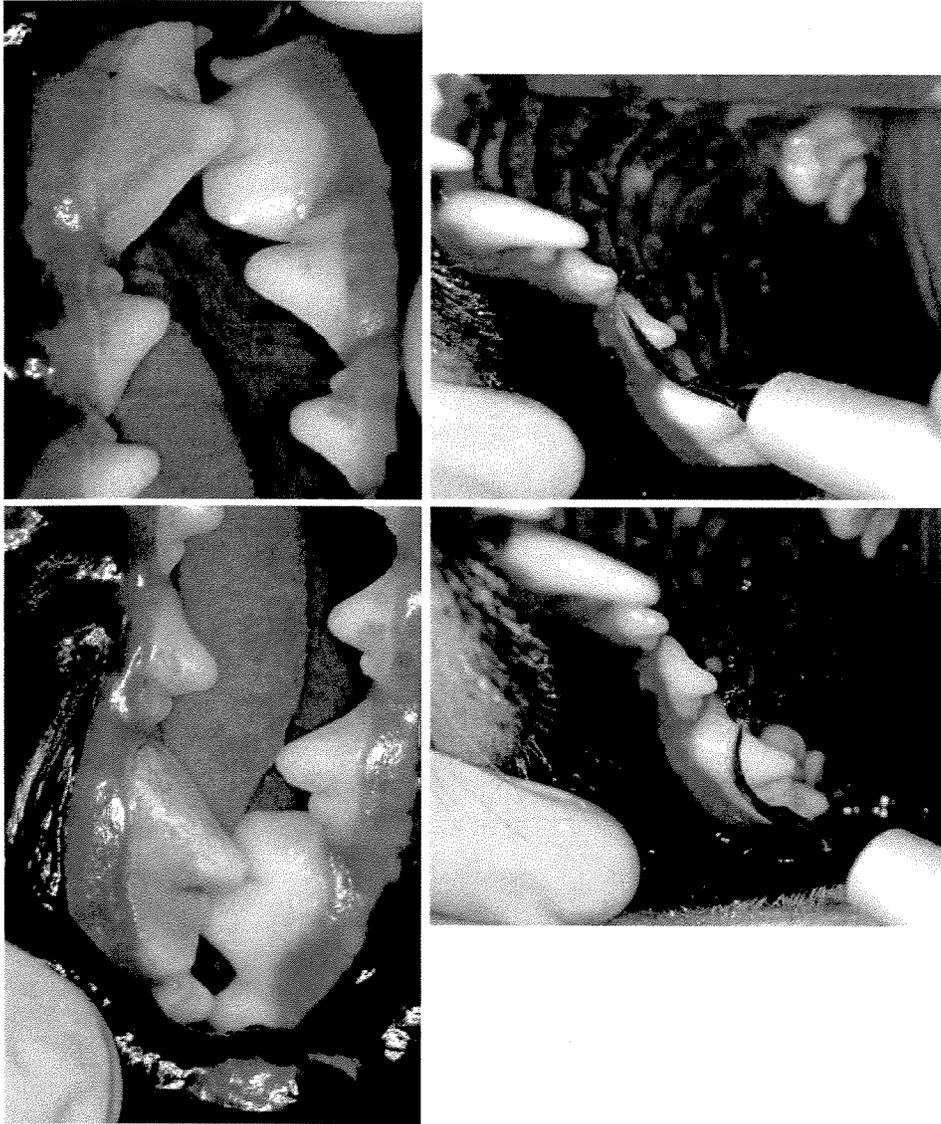


Figura .4.4.1a. Profilaxia com ultra-som em dentes de cães.

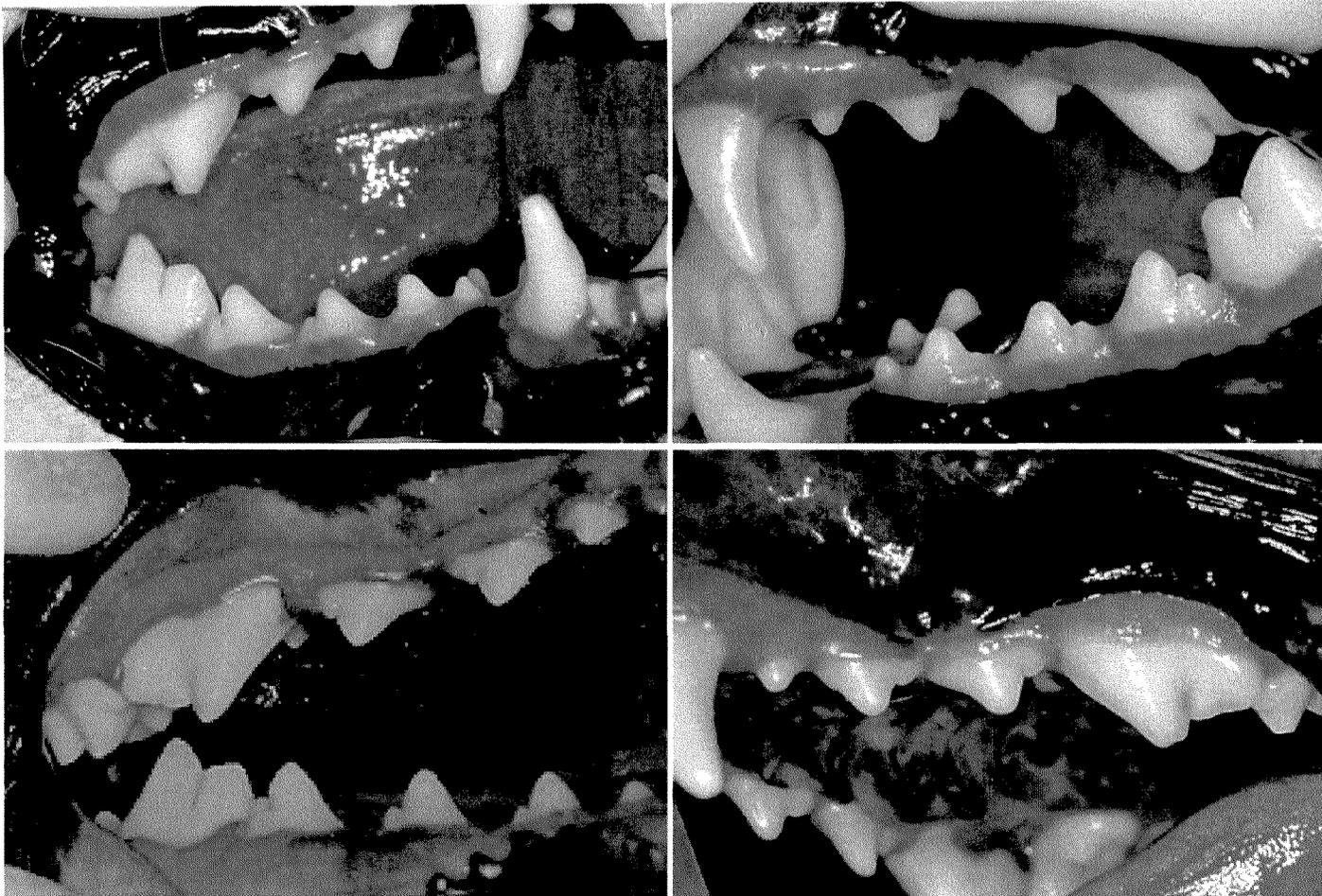


Figura .4.4.1b. Aspecto clínico após profilaxia com ultra-som em dentes de cães.

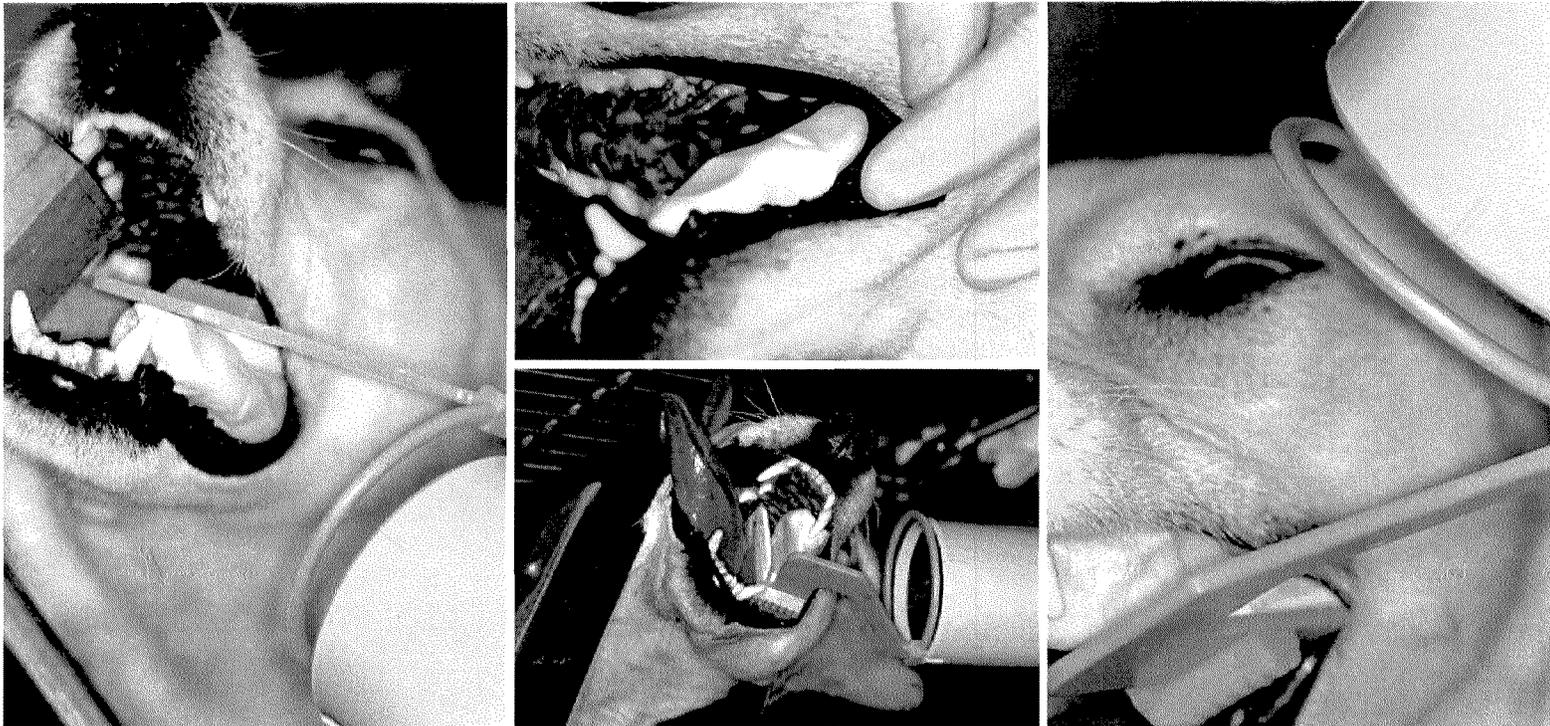


Figura 4.4.2 Tomada radiográfica com moldagem dos dentes e posicionador.

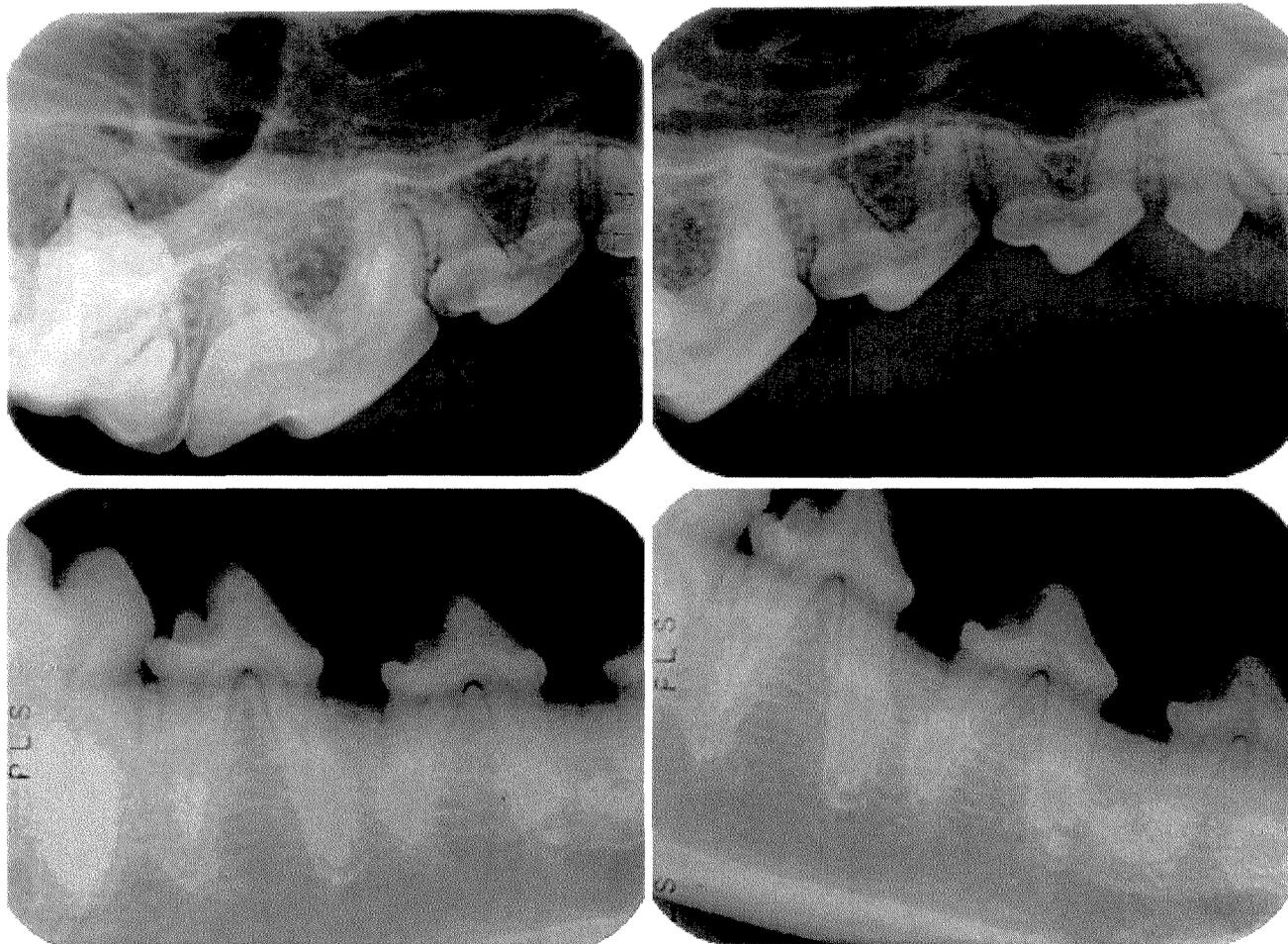


Figura 4.4.3a Exame radiográfico inicial dos dentes de cães (Lado direito)

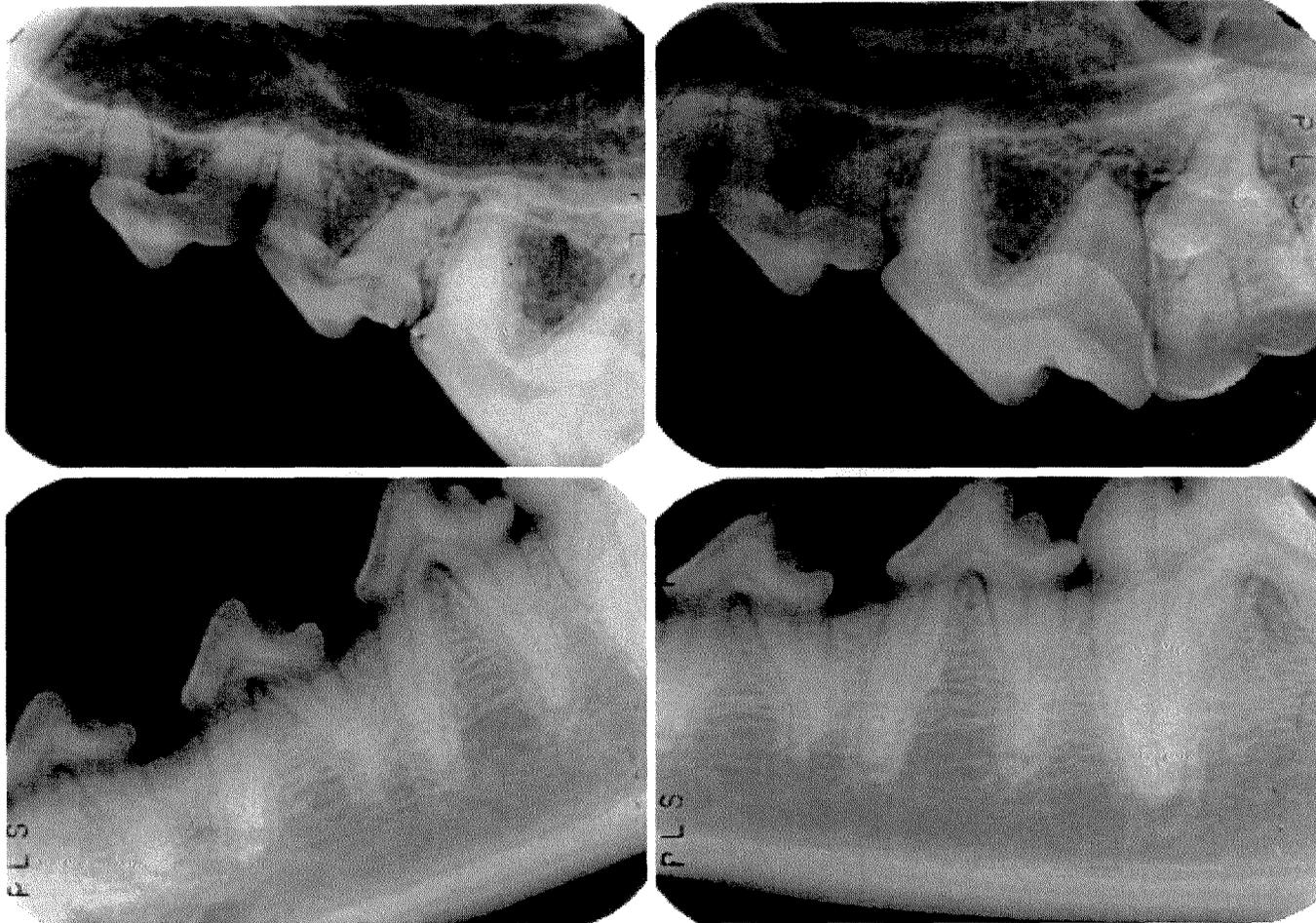


Figura 4.4.3b Exame radiográfico inicial dos dentes de cães (Lado esquerdo)

4.5

INDUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL (Grupo I)

A indução da doença periodontal foi realizada com o uso associado de dois tipos de ligaduras, fio de aço inoxidável nº 0,010'' (0,25 mm) e fio de algodão (linha corrente nº 10).

Foi realizada uma incisão intrasulcular vestibular e duas relaxantes verticais (lâmina de bisturi nº 15) até o limite muco-gengival, enquadrando os limites proximais do dente em questão. Em seguida, com auxílio de um sindesmótomo, procedeu-se o rebatimento do retalho. O fio de aço foi então adaptado apertadamente à região mais cervical do dente com o auxílio de um porta-agulha, sendo padronizado 4 voltas ao redor do dente.

O fio de algodão foi, então adaptado sob o fio de aço na região cervical do dente. O retalho foi reposicionado e suturado. As pontas do fio de aço que foram cortadas e cobertas com resina fotopolimerizável, para evitar o trauma sobre a mucosa oral do animal. Os dentes foram radiografados para confirmar a posição das ligaduras.

As ligaduras foram mantidas em posição por todo o período do experimento (125 dias).

Os animais foram alimentados com uma dieta de consistência mais mole para favorecer o acúmulo de placa bacteriana (Figuras 4.5a - 4.5d).

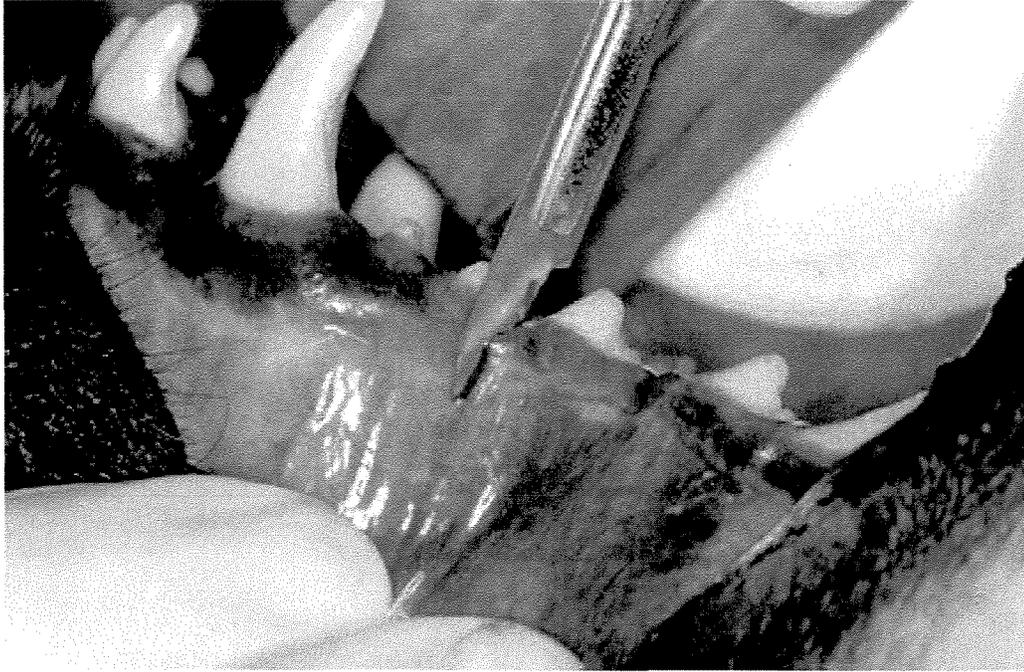


Figura 4.5a. Colocação das ligaduras.

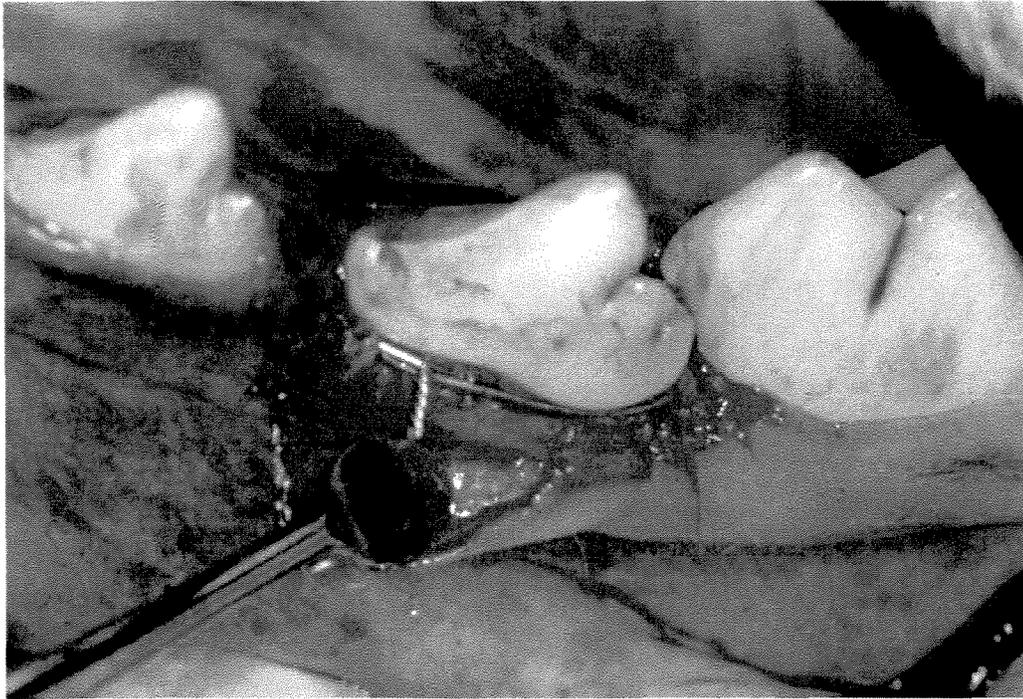


Figura 4.5b. Colocação das ligaduras.

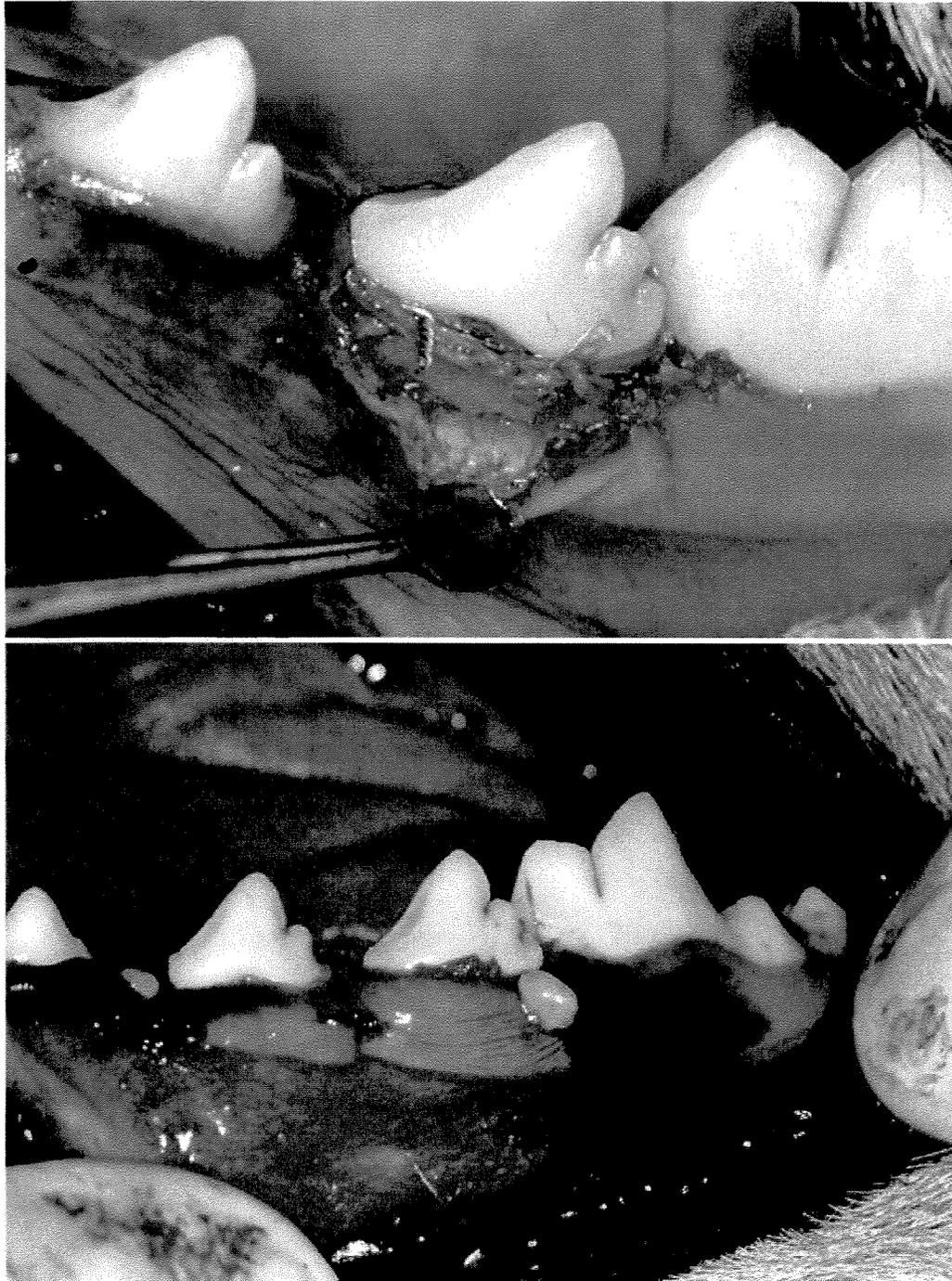


Figura 4.5c. Colocação das ligaduras.

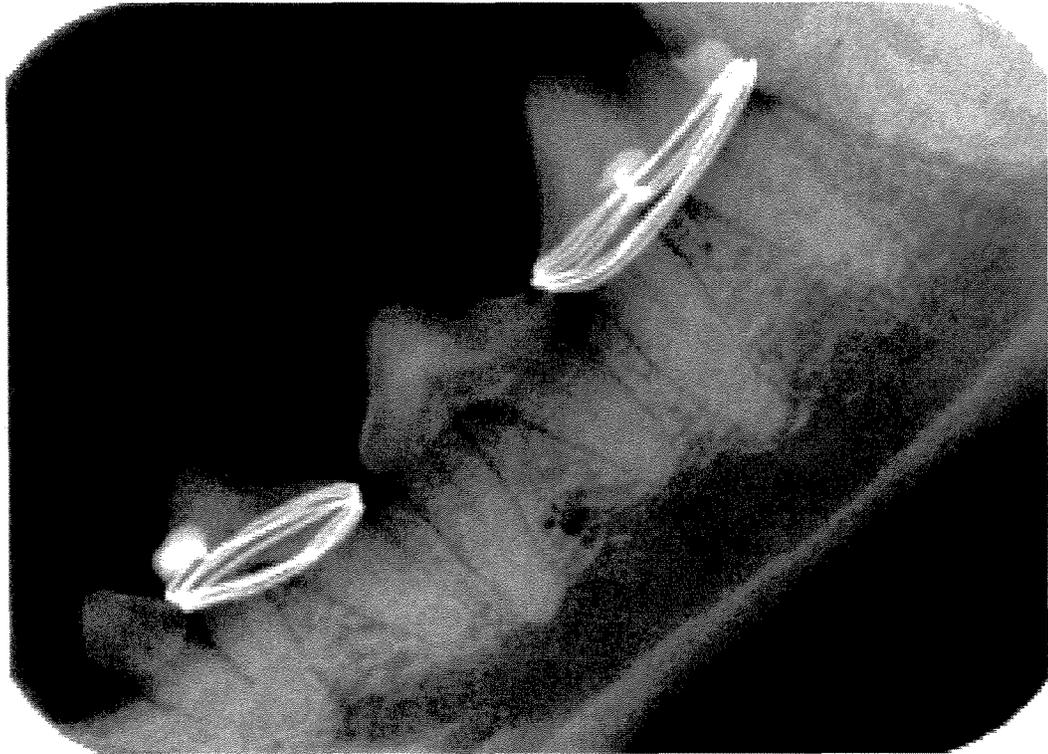


Figura 4.5d. Colocação das ligaduras (radiografia).

4.6 TEMPO PARA O SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS, REGISTRO DO TRATAMENTO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.

Os animais do Grupo I foram sacrificados 125 dias após a colocação das ligaduras. Já no Grupo II os animais foram sacrificados após o período inicial de uma semana que se seguiu à profilaxia e radiografias. No dia do sacrifício foram registrados os dados clínicos e radiográficos e feita a coleta das amostras microbiológicas.

Foram anotados os aspectos clínicos da doença periodontal, tais como edema e sangramento gengival, abscesso periodontal, profundidade de sondagem, mobilidade dentária e lesão de furca. Durante a coleta das amostras registrou-se as características físicas do canal, tais como polpa vital, polpa necrosada, canal calcificado e presença de exsudato. Radiograficamente registrou-se a presença ou não de lesão periapical e/ou periodontal (Figuras 4.6a - 4.6e).

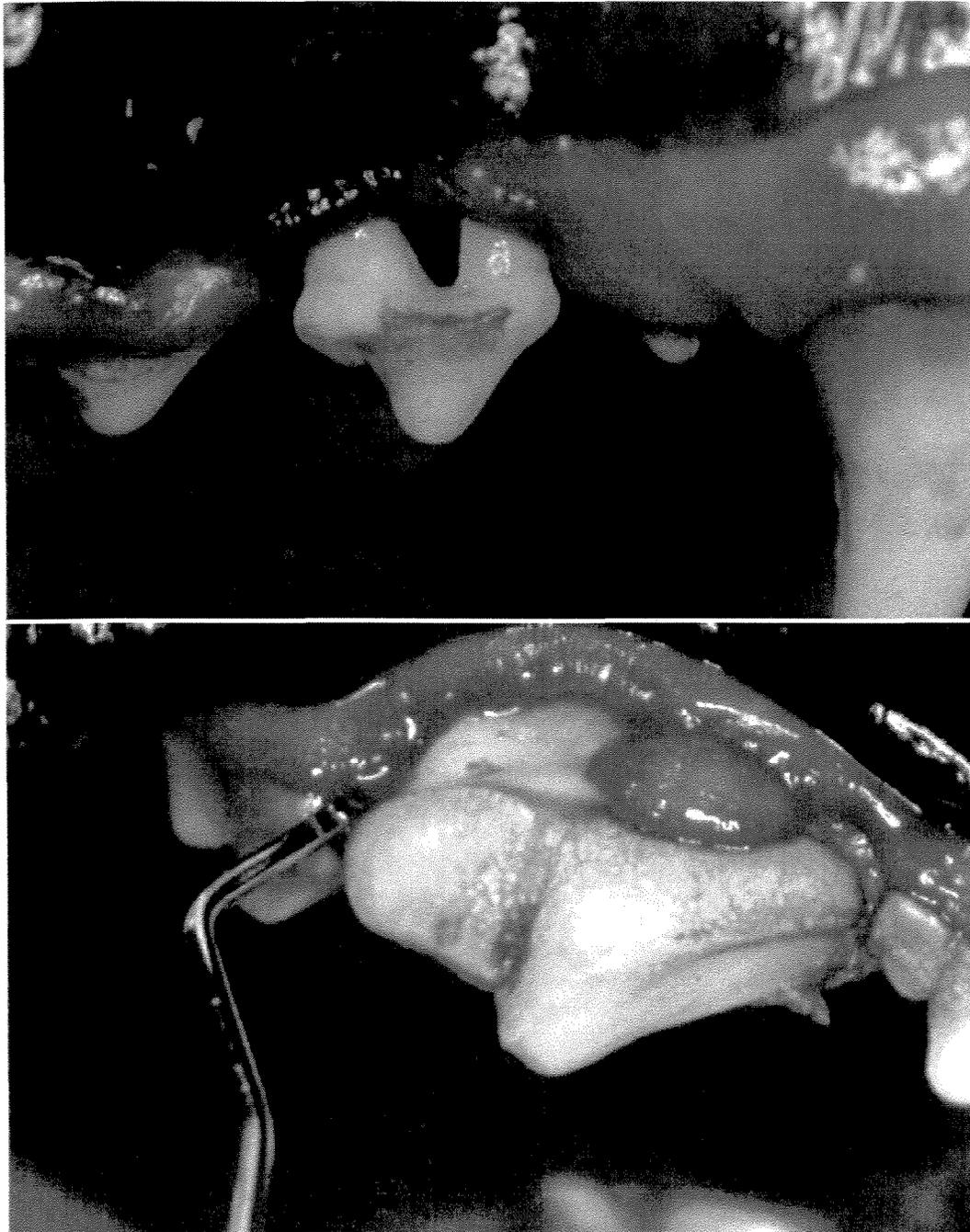


Figura 4.6a. Aspectos clínicos pós-indução de doença periodontal.

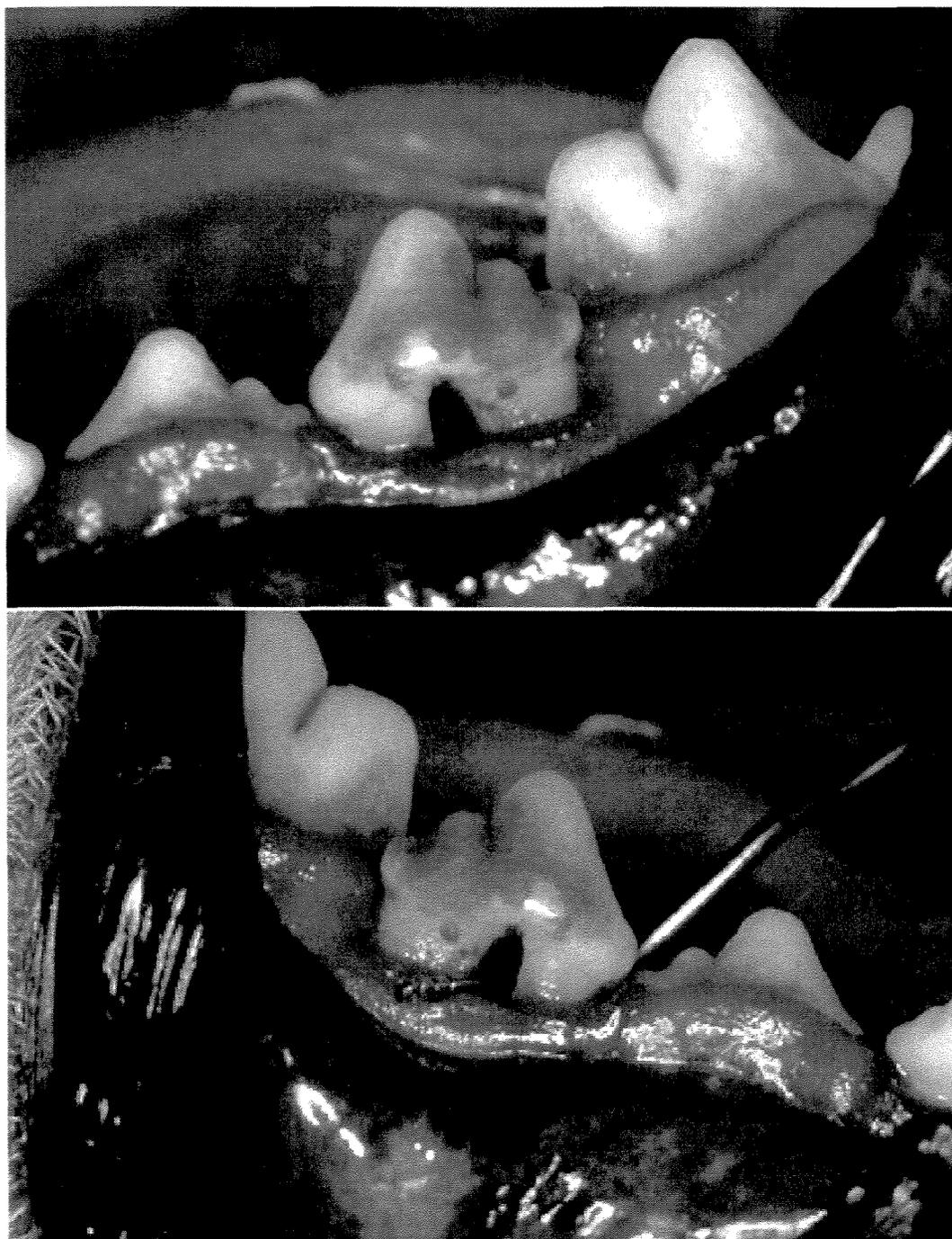


Figura 4.6b. Aspectos clínicos pós-indução de doença periodontal.

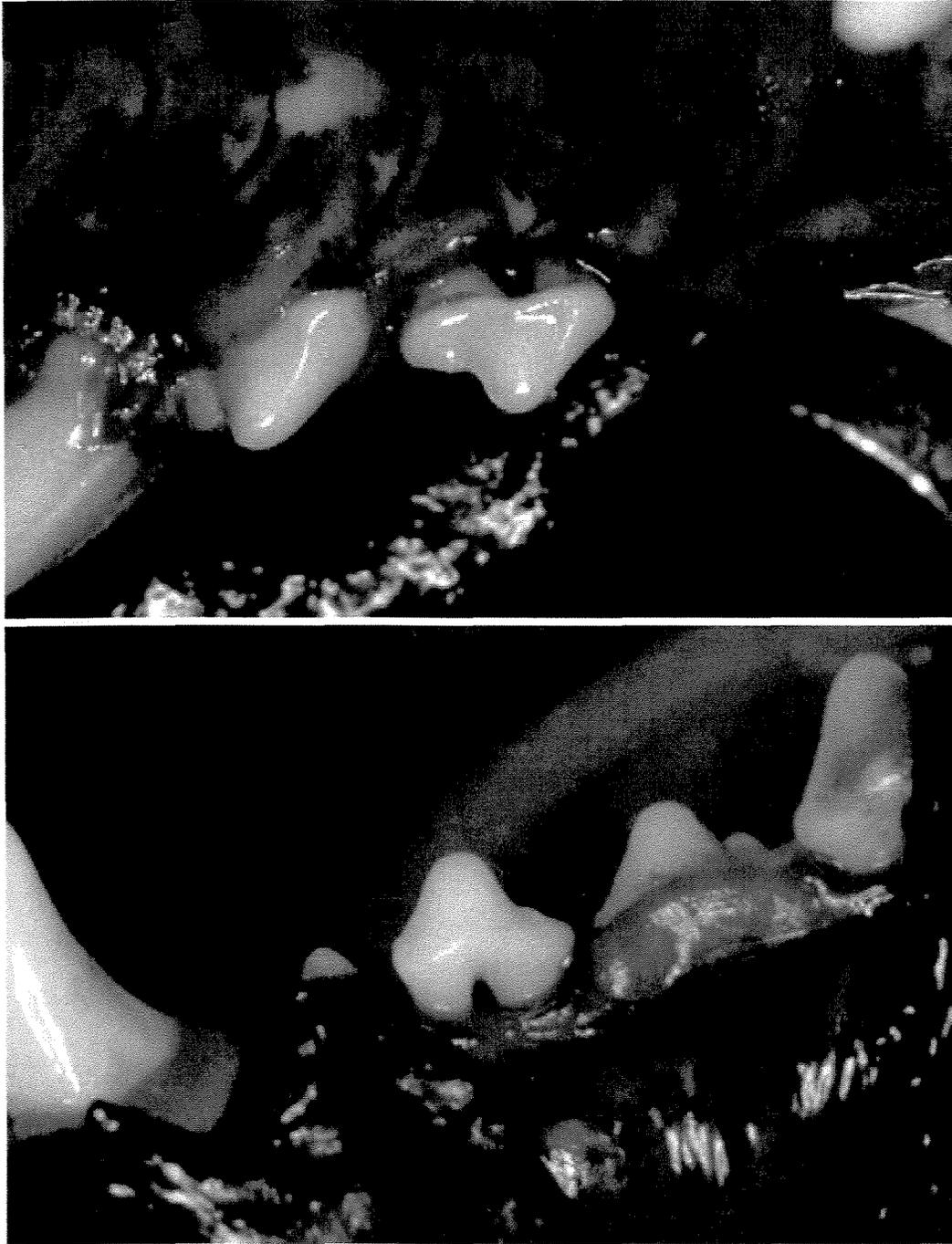


Figura 4.6c. Aspectos clínicos pós-indução de doença periodontal.



Figura 4.6d. Aspectos pós-indução de doença periodontal em cães. (Lado direito)

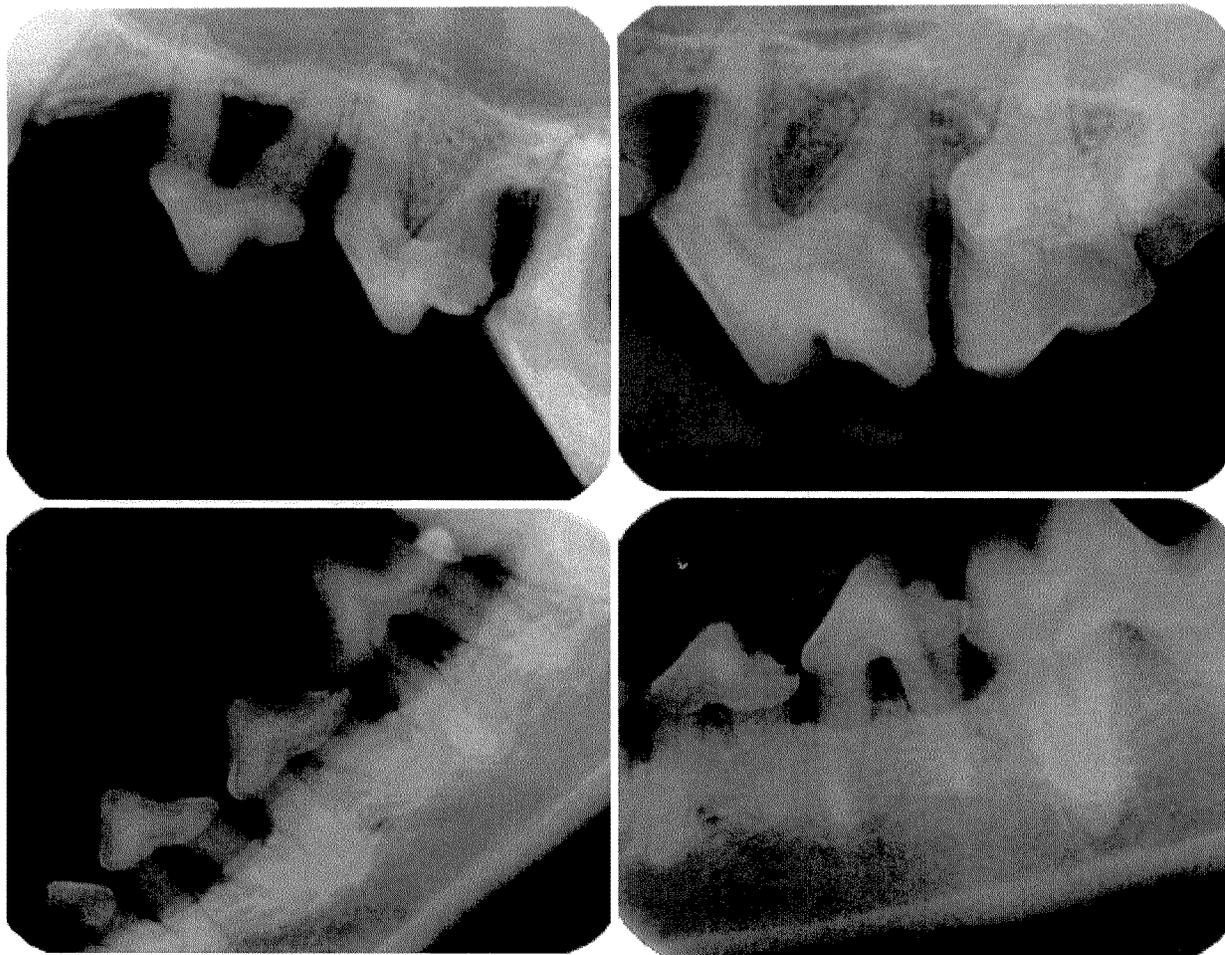


Figura 4.6e. Aspectos pós-indução de doença periodontal em cães. (Lado esquerdo)

O registro do grau de mobilidade foi feito de acordo com SCHLUGER *et al.* (1981a):

0 = Mobilidade clínica dentro do limite normal.

[-] = Mobilidade clínica considerada um pouco acima da fisiológica, mas inferior a 1 mm vestibulo-lingualmente.

I = Mobilidade clínica aproximadamente 1 mm vestibulo-lingualmente.

II = Mobilidade clínica aproximadamente 2 mm vestibulo-lingualmente, mas sem nenhuma mobilidade em direção apical.

III = Mobilidade clínica maior que 2 mm vestibulo-lingualmente, além da mobilidade em direção apical.

O registro da lesão de furca foi feito de acordo com a severidade da invasão (SCHLUGER *et al.*, 1981b):

Classe I – Invasão incipiente de furca.

Classe II – Invasão avançada de furca não comunicante.

Classe III – Invasão de furca comunicante.

4.7 COLETA DAS AMOSTRAS

Alguns princípios foram observados na coleta das amostras:

- Utilização de técnicas assépticas.
- Remoção dos contaminantes coronários (na coleta endodôntica).
- Descontaminação do campo operatório (na coleta endodôntica).
- Promoção de um fácil acesso aos instrumentos utilizados para coleta das amostras.
- Evitar contaminação química do periodonto e espaço pulpar.

4.7.1. COLETA DA AMOSTRA PERIODONTAL

Foi utilizado o isolamento relativo com roletes de algodão, para evitar a contaminação por saliva.

A matéria alba foi removida esfregando-se uma gaze na coroa do dente.

Foi realizada sondagem periodontal com sondas milimetradas nos dentes selecionados.

A coleta da amostra periodontal foi realizada na bolsa de maior profundidade, com sonda periodontal, cureta de haste longa e pontas de papel absorventes, introduzidas até o fundo da bolsa e lá permanecendo por 60 segundos.

Em seguida o conteúdo das sonda, cureta e papel absorvente foi imediatamente introduzido num tubo de 1,5 ml tipo Eppendorf, previamente esterilizado, contendo 1 ml de líquido de transporte pré-reduzido VMGA III (MOLLER 1966, DAHLÉN *et al.* 1993), o qual foi colocado num meio de transporte anaeróbico (jarros anaeróbicos) e transportado sem demora para o laboratório de microbiologia da Endodontia.

As amostras foram coletadas sob fluxo contínuo de nitrogênio (Figura 4.7.1a – 4.7.1c).



Figura 4.7.1a. Coleta periodontal de dentes de cães.

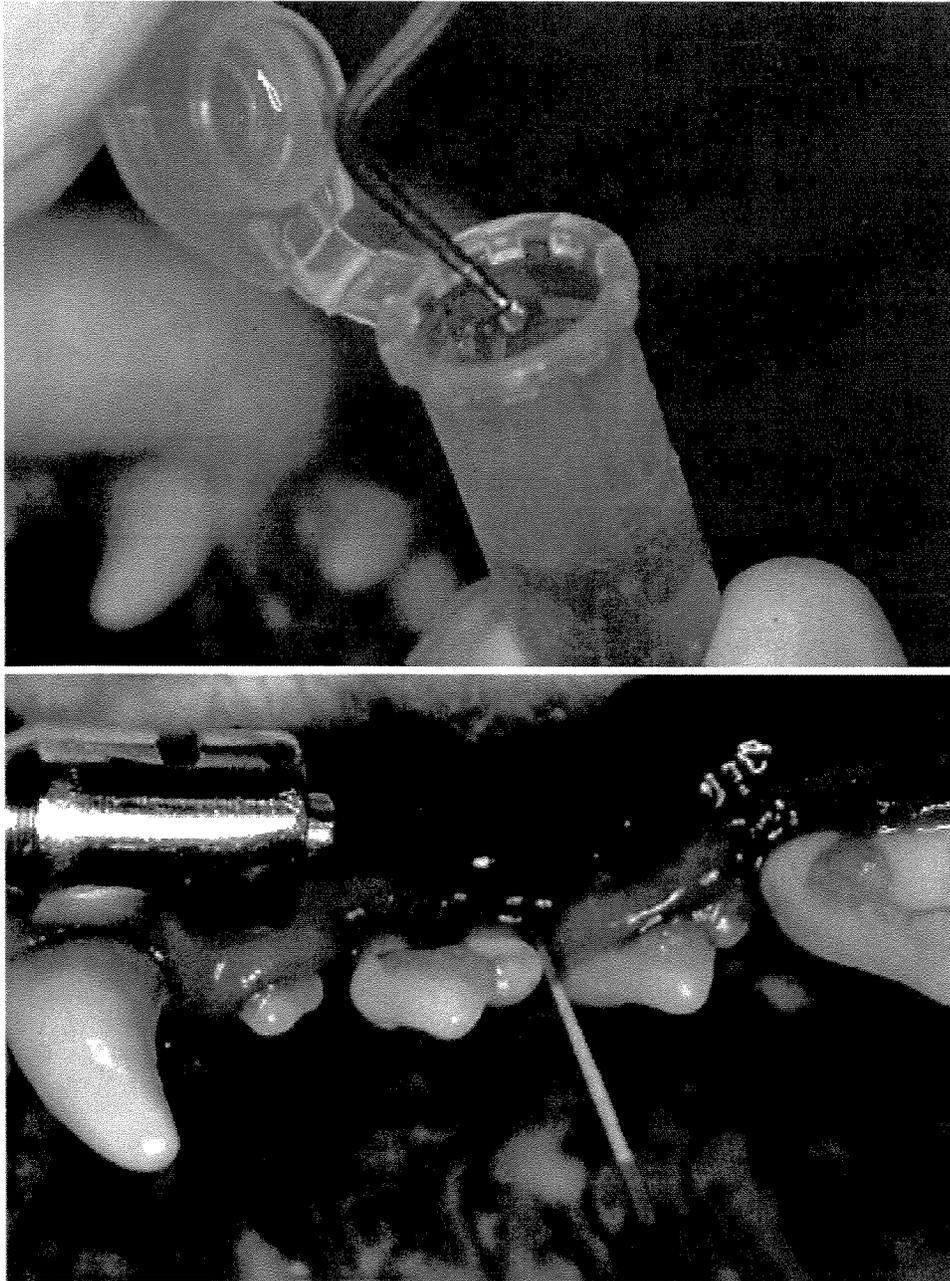


Figura 4.7.1b. Coleta periodontal de dentes de cães.

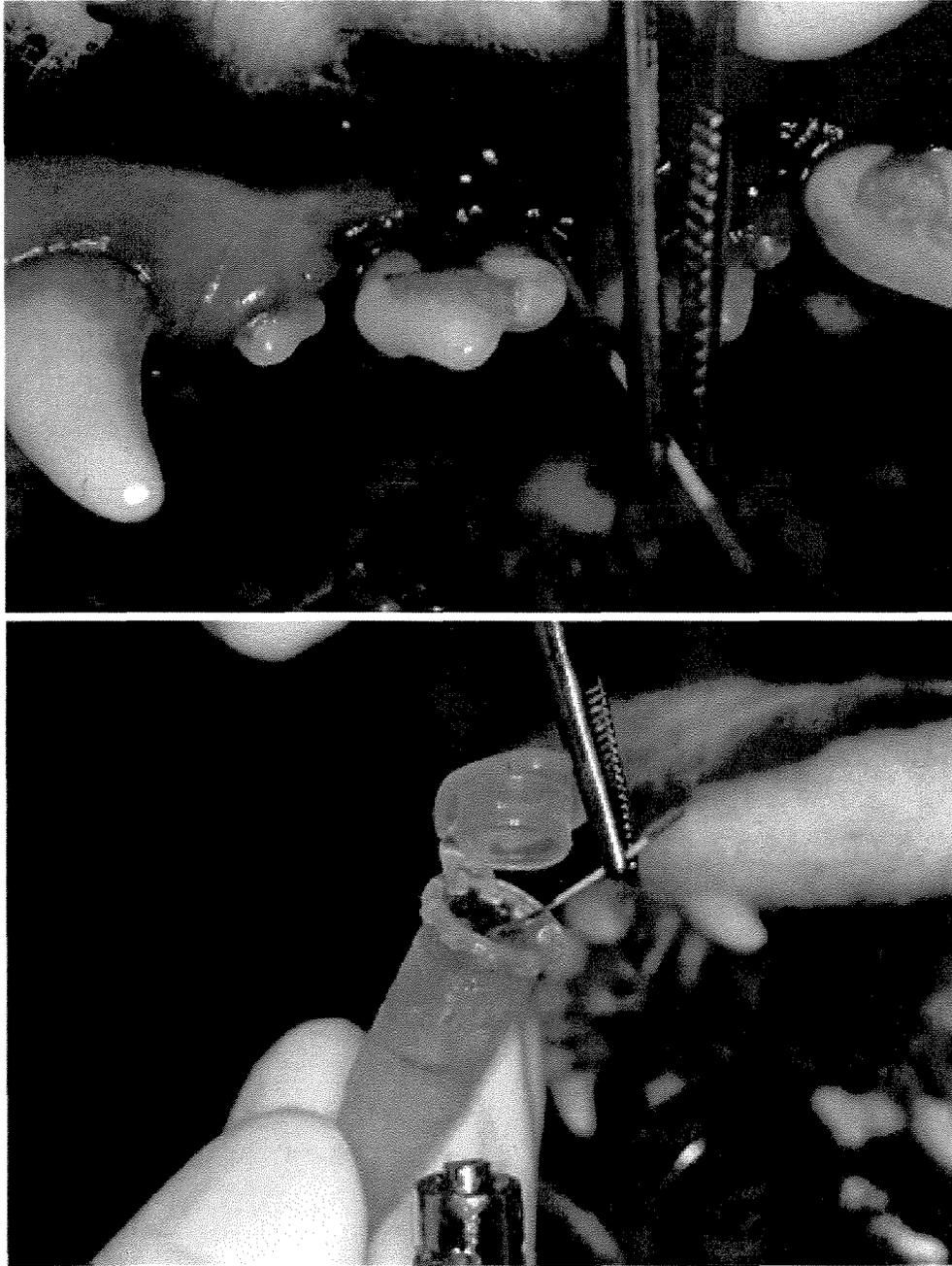


Figura 4.7.1c. Coleta periodontal de dentes de cães.

4.7.2. COLETA DA AMOSTRA DO CANAL RADICULAR

Foi realizada profilaxia com ultra-som antes da coleta endodôntica. Após o isolamento absoluto, o hipoclorito de sódio a 1% foi aplicado sobre a coroa dentária para evitar o risco de contaminação secundária da coleta endodôntica. O hipoclorito foi neutralizado em seguida pelo tiosulfato de sódio a 5%. Sob isolamento absoluto a abertura coronária para o acesso à câmara pulpar foi realizada inicialmente com brocas esféricas estéreis para pontas de alta rotação nº 1112 (Sorensen) complementada com broca tronco-cônica nº 3082 estéril (Sorensen).

Limas endodônticas estéreis tipo K nº 10 ou 15 (dependendo do diâmetro do canal) foram introduzidas em todo o comprimento aparente do canal radicular visualizado pela radiografia inicial, ali permanecendo por 60 segundos. As limas foram então cortadas e introduzidas no meio de transporte adequado.

A seguir foram introduzidas pontas de papel absorventes estéreis nº15 ou 20 (dependendo do diâmetro do canal) para aumentar a chance de isolar o maior número possível de microrganismos do interior dos canais radiculares. Estas pontas (juntamente com as limas) foram imediatamente introduzidas em tubos de 1,5 ml tipo Eppendorf, previamente esterilizados, contendo 1 ml de líquido de transporte pré-reduzido VMGA III (MOLLER 1966, DAHLÉN *et al.* 1993), os quais foram colocados em jarros de anaerobiose e transportados sem demora para o laboratório de microbiologia da Endodontia (Figuras 4.7.2a – 4.7.2c).

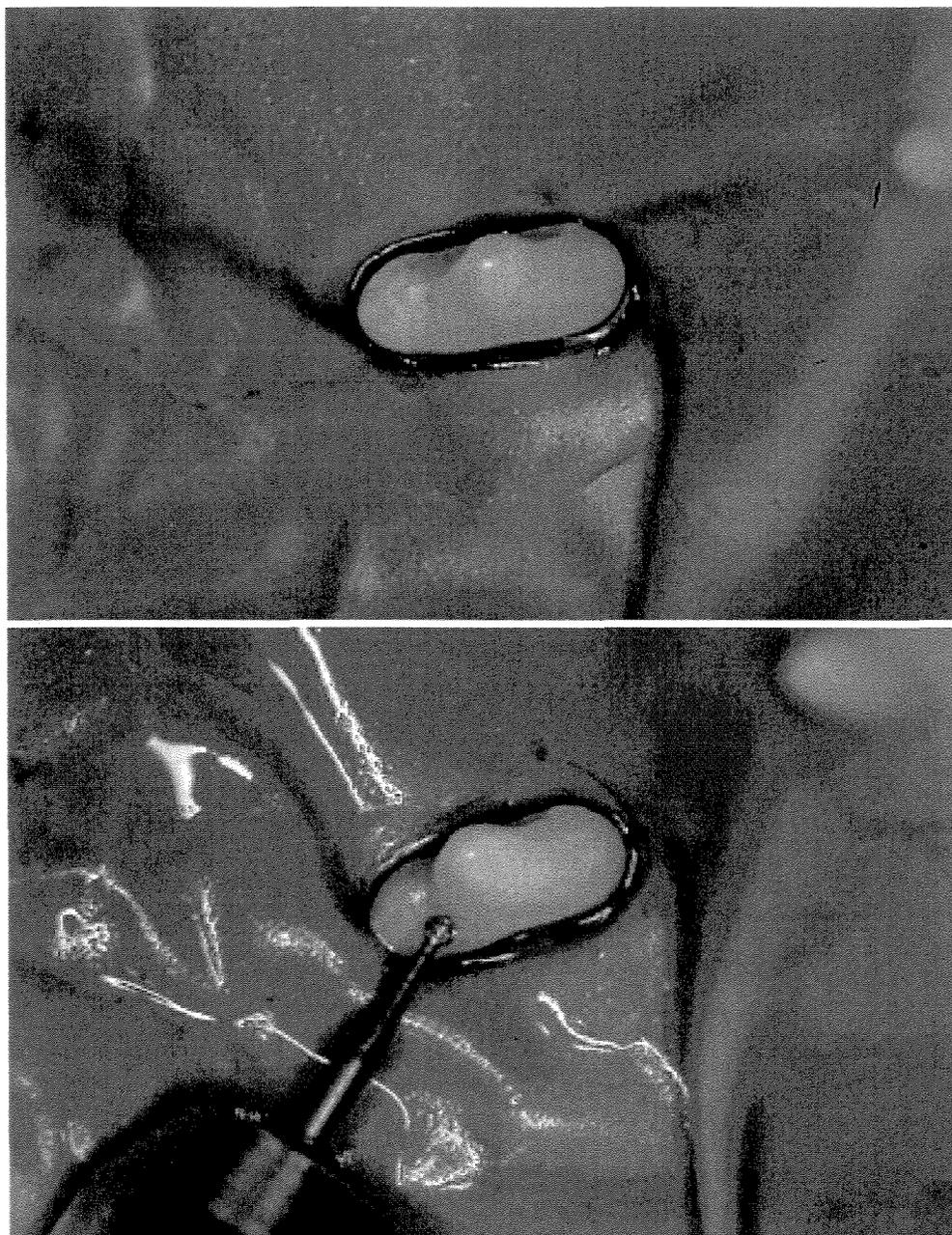


Figura 4.7.2a. Coleta endodôntica de dentes de cães com doença periodontal induzida.

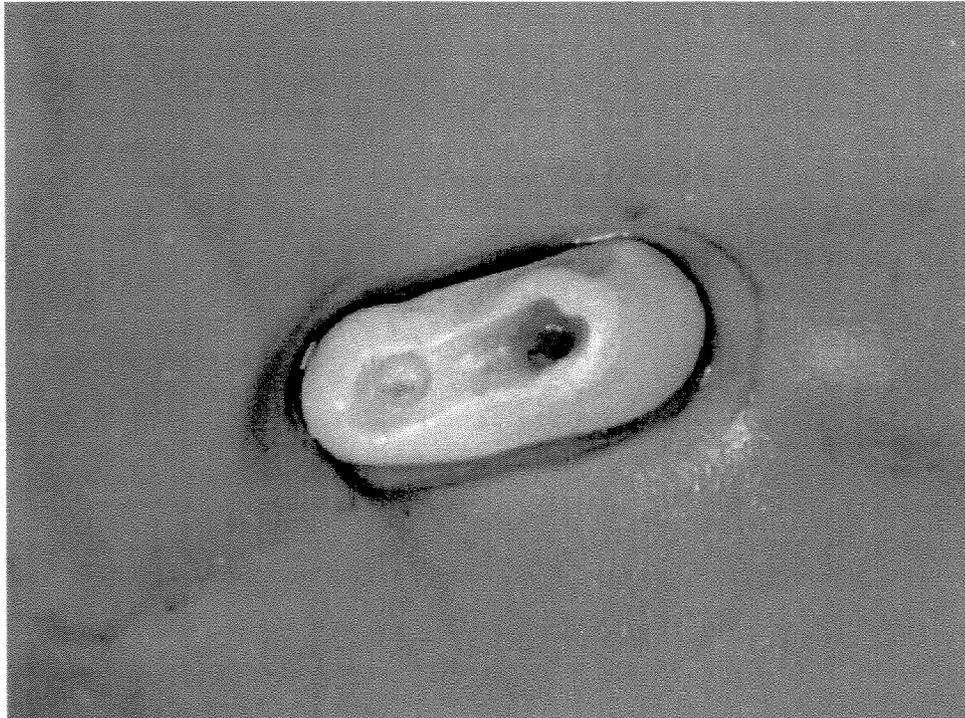


Figura 4.7.2b. Coleta endodôntica de dentes de cães com doença periodontal induzida.

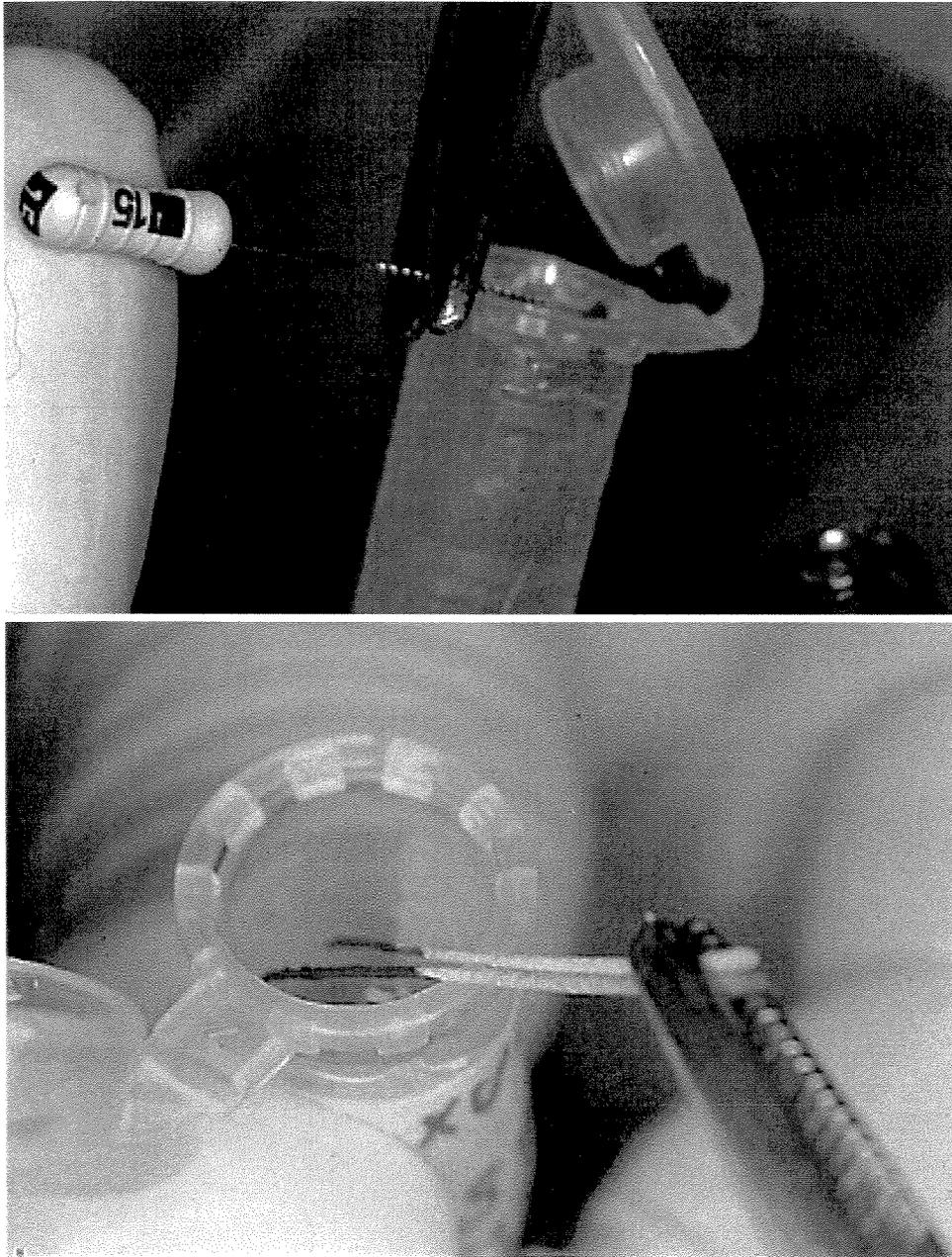


Figura 4.7.2c. Coleta endodôntica de dentes de cães com doença periodontal induzida.

No interior da cabine de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Bradford, UK), os tubos foram agitados no Vortex mixer por 60 segundos. A seguir foram realizadas diluições seriadas a 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10.000 e inoculados 50 µL de cada diluição em placas pré-reduzidas de ágar sangue (FAA-Fastidious Anaerobe Agar), as quais foram incubadas na cabine anaeróbica, a 37°C numa atmosfera de 10% de H₂, 10% CO₂ e 80% N₂ até 14 dias, para permitir a detecção de organismos de crescimento lento.

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

- Placas de agar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA (Fastidious Anaerobe Agar), 37° C, aerobicamente, por dois dias (aeróbios e anaeróbios facultativos).
- Placas de agar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA (Fastidious Anaerobe Agar), 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias.
- 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 + KAN (Kanamicina) + VAN (Vancomicina), 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar anaeróbios Gram-negativos (particularmente os “pigmentados de negro”).
- 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 + FAA + NAL (ácido nalidíxico), 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar anaeróbios Gram-positivos e actinomicetos.
- Placas de agar contendo soro de cavalo + TSBV (soja-tripticaseína, bacitracina e vancomicina), em cabine de anaerobiose e estufa de CO₂ a 37° C, por 2, 5 e 14 dias para selecionar *Actinobacillus actinomicetomitans*.

Este estudo utilizou meios de cultura pré-fabricados na forma de pó desidratados. O meio de transporte VMGA III foi preparado de acordo com a fórmula original (Figura 4.8).

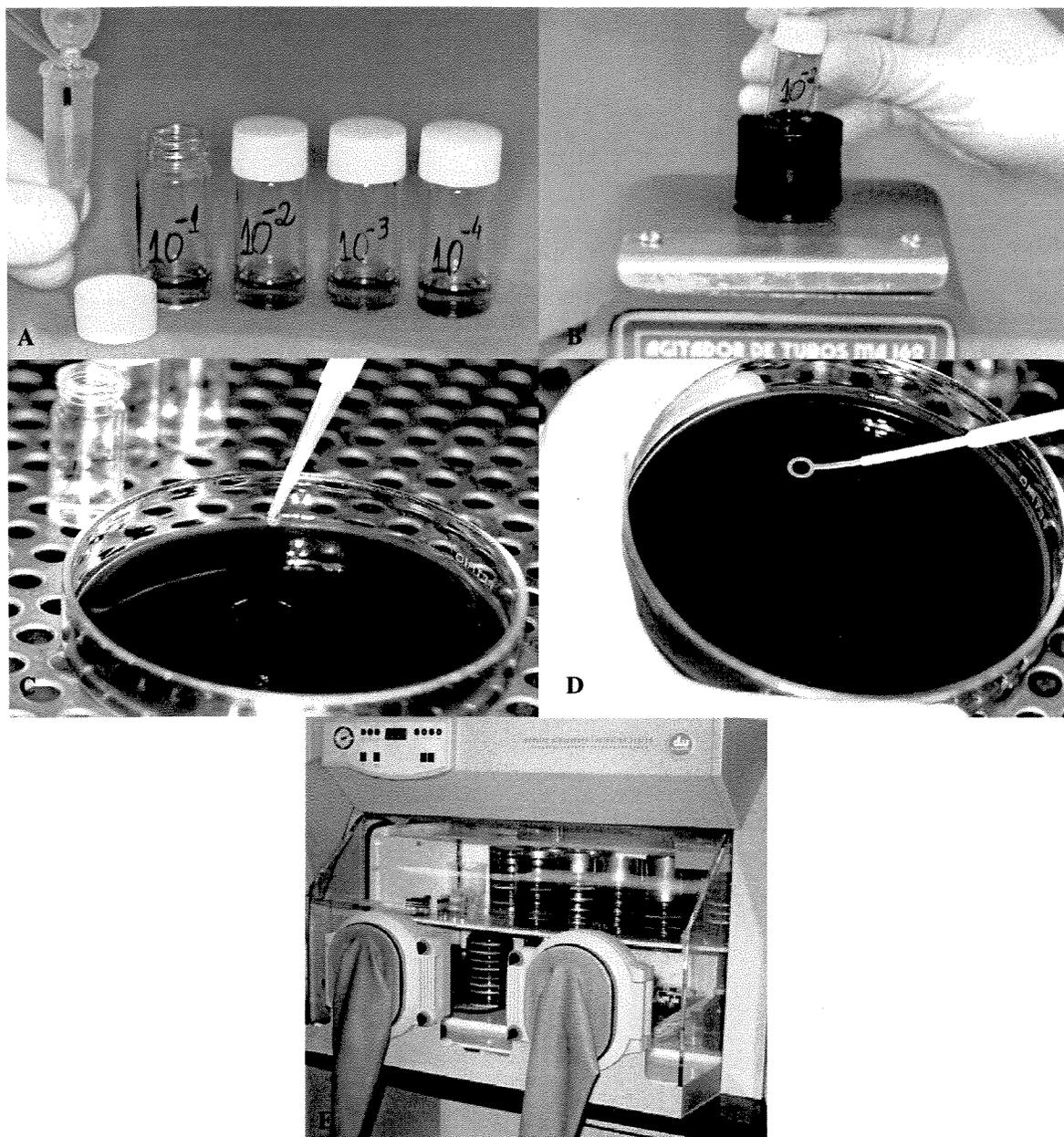


Figura 4.8 – A- diluição; B- dispersão no Vortex; C- Inoculação D- Plaqueamento; E- incubação em cabne de anaerobiose

4.9

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA

As placas com crescimento bacteriano foram examinadas em lupa estereoscópica e as colônias foram diferenciadas de acordo com as suas características macroscópicas na placa, observando tamanho, cor, forma, textura, elevação, opacidade e hemólise. As colônias bacterianas foram isoladas em 2 placas contendo 5% de sangue de carneiro + FAA (Fastidious Anaerobe Agar) e testadas quanto ao seu requerimento gasoso, colocando uma placa na estufa de O₂ e uma na câmara de anaerobiose, observando em qual condição gasosa houve um melhor 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 CO₂, para podermos especificar se eram anaeróbias estritas ou capnofílicas. Em seguida, as culturas puras foram coradas pelo método do Gram e testadas quanto a produção de catalase (Figura 4.9a - 4.9g).

Os seguintes métodos de identificação foram utilizados para a especificação primária dos organismos isolados:

- 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 estafilococcus 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*.

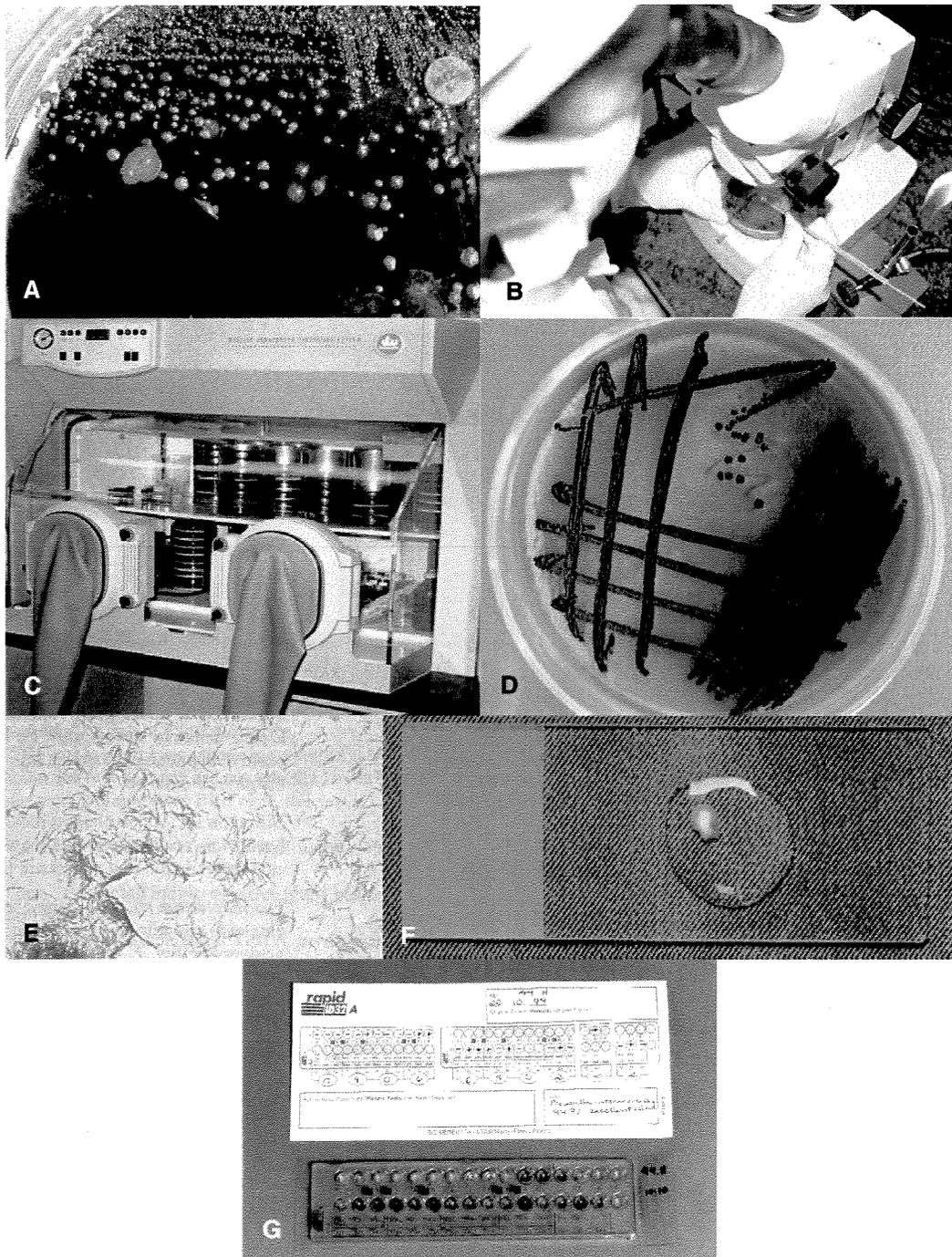


Figura 4.9 - A - Cultura primária; B - Isolamento em lupa estereoscópica; C - Incubação em cabine de anaerobiose; D - Cultura pura; E - Coloração de Gram; F - Teste de catalase; G - Teste bioquímico

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram inseridos numa planilha de cálculo (QUATTRO PRO, Bordland International Inc., Scotts Valley, CA, USA) e estatisticamente analisados usando SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). O teste exato de Fisher foi escolhido para testar a hipótese nula de que não existe, por exemplo, nenhuma relação entre a microbiota endodôntica e a periodontal.

5. RESULTADOS

Após 125 dias de indução da doença periodontal foram obtidos os seguintes resultados:

Do total de 20 dentes estudados, houve perda de um dente (2° PMSD) por exfoliação. Após a indução da doença periodontal, todos os dentes apresentaram cálculo supra e sub-gengival, edema e sangramento gengival. As características clínicas dos 19 dentes são mostradas na Tabela 5.1.

Na análise radiográfica foi observada uma predominância de perda óssea periodontal (84,2%), conforme está mostrado na Tabela 5.2.

A frequência da distribuição de espécies microbianas nas bolsas periodontais mostrou uma predominância de 4 espécies por coleta (31,6%), seguida de 7 espécies (26,3%), conforme é mostrado na Figura 5.1.

A frequência da distribuição de espécies microbianas nas coletas endodônticas mostrou um percentual de 52,6% de ausência de bactérias, conforme é mostrado na Figura 5.2.

As espécies microbianas mais prevalentes nas coletas periodontais foram *Streptococcus* spp. (em 15 coletas - 79,9%), *Fusobacterium necrophorum* (em 8 coletas - 42,1%), *Veillonella* spp. (em 5 coletas - 26,3%), *Prevotella loescheii* (em 4 coletas -

21,1%), *Prevotella corporis*, *Pasteurella multocida* (em 3 coletas - 15,8%), entre outras, conforme está mostrado na Tabela 5.3.

As espécies microbianas mais prevalentes nas coletas endodônticas foram *Staphylococcus epidermidis* (em 2 canais - 10,3%), *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus* spp., *Streptococcus mitis*, *Pasteurella multocida* (em 1 canal - 5,3%), entre outras, conforme está mostrado na Tabela 5.4.

As espécies microbianas isoladas em comum da bolsa periodontal e canal radicular do mesmo dente, foram *Streptococcus* spp., *Streptococcus mitis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Neisseria mucosa*, conforme está mostrado na Tabela 5.5.

A prevalência dos gêneros bacterianos nas coletas periodontais foi *Streptococcus* (100%), *Prevotella* (57,8%), *Fusobacterium* (47,4%), *Peptostreptococcus* (36,8%), *Veillonella*, *Staphylococcus* (26,3%), *Neisseria*, *Bacteroides* (21%), *Haemophilus*, *Pasteurella* (15,8%), *Porphyromonas* e *Clostridium* (10,5%), entre outros, conforme está mostrado na Figura 5.3.

A prevalência dos gêneros bacterianos nas coletas endodônticas foi *Staphylococcus* (15,8%), *Streptococcus*, *Neisseria* (10,5%), *Pasteurella*, *Cardiobacterium* e *Actinomyces* (5,3%), conforme está mostrado na Figura 5.4.

Bactérias anaeróbias estritas, anaeróbias facultativas, Gram-positivas e Gram-negativas estiveram presentes em 100% das coletas periodontais, conforme está ilustrado na Figura 5.5.

Bactérias anaeróbias facultativas (47,4%), Gram-positivas (36,8%) e Gram-negativas (15,8%) estiveram presentes nas coletas endodônticas, conforme está ilustrado na Figura 5.6.

Associação estatisticamente significativa ($p < 0,01$) foi encontrada entre lesão de furca e presença do gênero bacteriano *Porphyromonas*.

As coletas periodontais no cão controle foram compostas pelas espécies microbianas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Lactococcus lactis cremosis*, *Neisseria sicca/subflava*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus* spp, além de um bacilo Gram-positivo anaeróbio não identificado.

Tabela 5.1. Características clínicas dos 19 dentes com doença periodontal induzida

	Número	Porcentagem
Mobilidade fisiológica	2	10,5%
Mobilidade patológica	17	89,5%
Grau 1	3	15,8%
Grau 2	10	52,6%
Grau 3	4	21,1%
Sondagem periodontal (mm)		
0-2 mm	1	5,3%
3-4 mm	13	68,4%
>4 mm	5	26,3%
Ausência de lesão de furca	2	10,5%
Lesão de furca	17	89,5%
1	2	10,5%
2	3	15,8%
3	12	63,2%
Polpa com vitalidade	16	84,2%
Polpa necrosada	3	15,8%

Tabela 5.2. Características radiográficas dos 19 dentes com doença periodontal induzida

	Número	Porcentagem
Lesão periodontal independente	16	84,2%
Lesão endodôntica independente	0	0%
Lesão endo-perio	3	15,8%
Atresia pulpar	7	36,8%

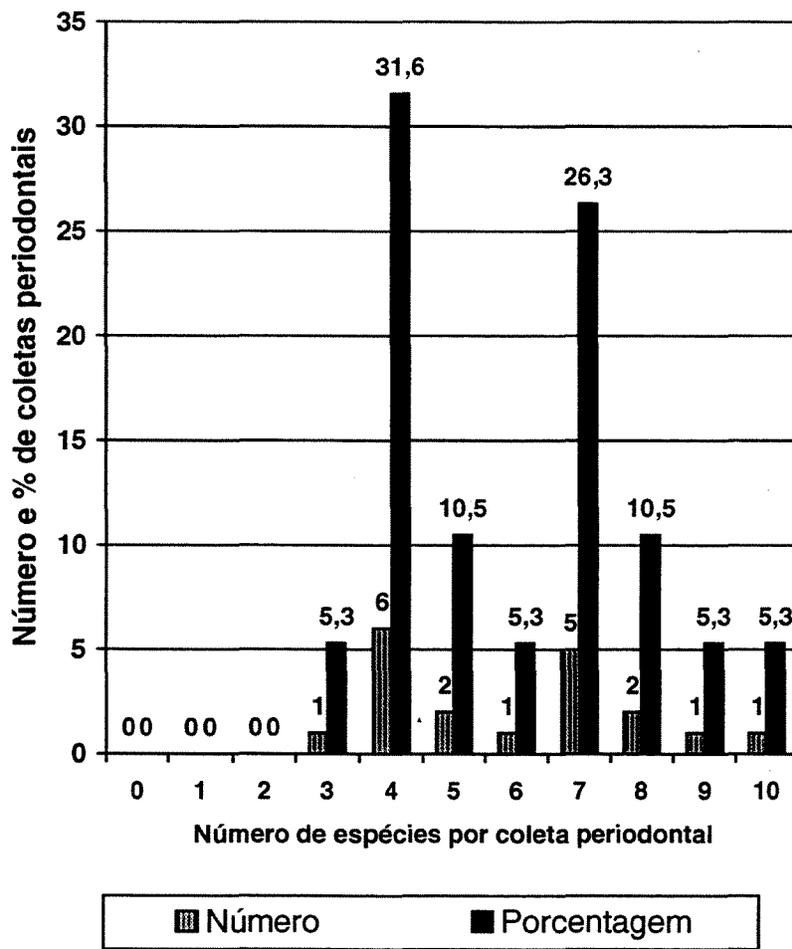


Figura 5.1. Distribuição de espécies microbianas em 19 coletas de bolsas periodontais.

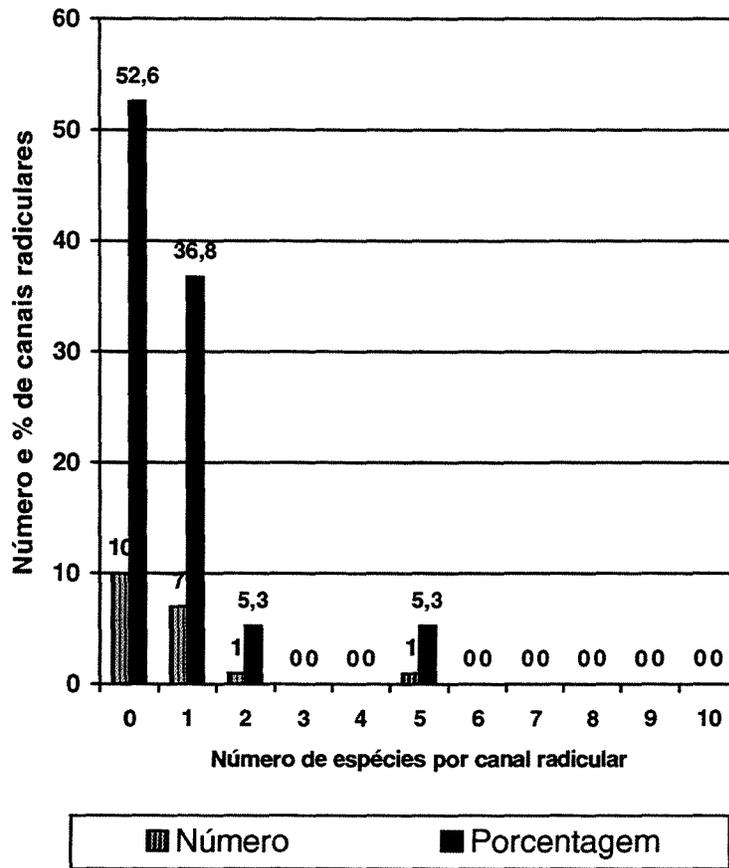


Figura 5.2. Distribuição de espécies microbianas em 19 coletas endodônticas de dentes com doença periodontal.

Tabela 5.3. Microrganismos isolados em 19 coletas de bolsas periodontais.

Espécies microbianas	Nº de bolsas	% de bolsas
<i>Streptococcus</i> spp.*	15	79,9
<i>Streptococcus sanguis</i>	1	5,3
<i>Streptococcus mitis</i>	1	5,3
<i>Streptococcus bovis</i>	1	5,3
<i>Streptococcus oralis</i>	1	5,3
<i>Prevotella loescheii</i>	4	21,1
<i>Prevotella corporis</i>	3	15,8
<i>Prevotella intermedia</i>	2	10,5
<i>Prevotella denticola</i>	2	10,5
<i>Prevotella oralis</i>	1	5,3
<i>Prevotella oris</i>	1	5,3
<i>Porphyromonas gengivalis</i>	1	5,3
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	1	5,3
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	8	42,1
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1	5,3
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	4	21,1
<i>Peptostreptococcus assaccharolyticus</i>	2	10,5
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1	5,3
<i>Veillonella</i> spp.	5	26,3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	10,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	5,3
<i>Staphylococcus intermedius</i>	1	5,3
<i>Bacteroides estercoris</i>	3	15,8
<i>Bacteroides gracillis</i>	1	5,3
<i>Neisseria sicca/subflava</i>	2	10,5
<i>Neisseria lactamica</i>	1	5,3
<i>Neisseria mucosa</i>	1	5,3
<i>Haemophilus influenzae</i>	2	10,5
<i>Haemophilus aphrophylus</i>	1	5,3
<i>Haemophilus ducrevii</i>	1	5,3
<i>Pasteurella multocida</i>	3	15,8
<i>Clostridium difficile</i>	2	10,5
<i>Gemella morbillorum</i>	1	5,3
<i>Cardiobacterium hominis</i>	1	5,3
<i>Tissierella praecuta</i>	1	5,3
<i>Oligella ureolytica</i>	1	5,3
<i>Propionibacterium granulosum</i>	1	5,3
<i>Bifidobacterium</i> spp.	1	5,3

* Estas bactérias foram identificadas pelo gênero.

Tabela 5.4. Microrganismos isolados 19 coletas de coletas endodônticas de dentes com doença periodontal. Piracicaba-SP, 2000.

Espécies microbianas	Nº de canais	% de canais
<i>Streptococcus</i> spp.	1	5,3
<i>Streptococcus mitis</i>	1	5,3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	10,5
<i>Staphylococcus intermedius</i>	1	5,3
<i>Neisseria sicca/subflava</i>	1	5,3
<i>Neisseria mucosa</i>	1	5,3
<i>Pasteurella multocida</i>	1	5,3
<i>Cardiobacterium hominis</i>	1	5,3
<i>Abiotrophia adiacens</i>	1	5,3
<i>Actinomyces viscosus</i>	1	5,3

Tabela 5.5. Microrganismos isolados da bolsa periodontal e canal radicular no mesmo dente

Espécies microbianas	Nº de bolsas	% de bolsas	Nº de canais	% de canais
<i>Streptococcus</i> spp.	1	5,3	1	5,3
<i>Streptococcus mitis</i>	1	5,3	1	5,3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	5,3	1	5,3
<i>Neisseria mucosa</i>	1	5,3	1	5,3

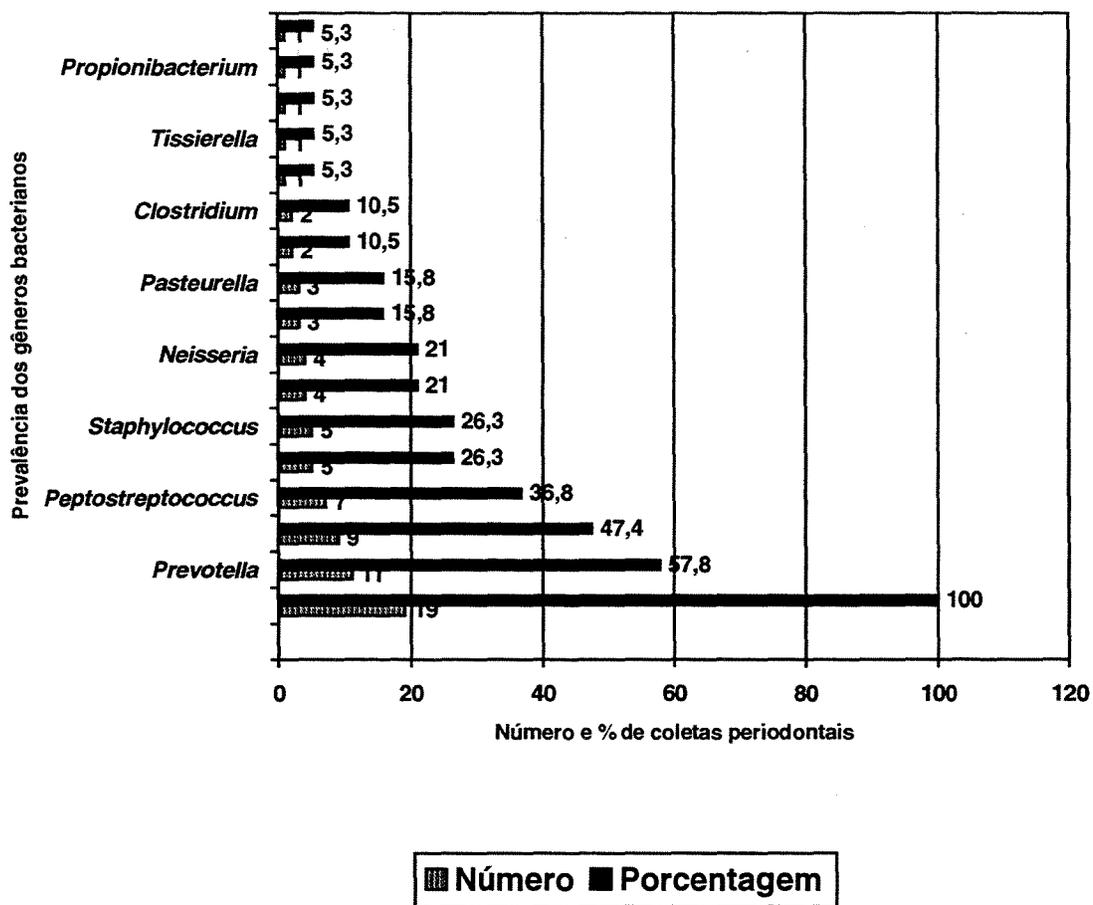


Figura 5.3. Prevalência dos gêneros bacterianos isolados em 19 coletas de bolsas periodontais.

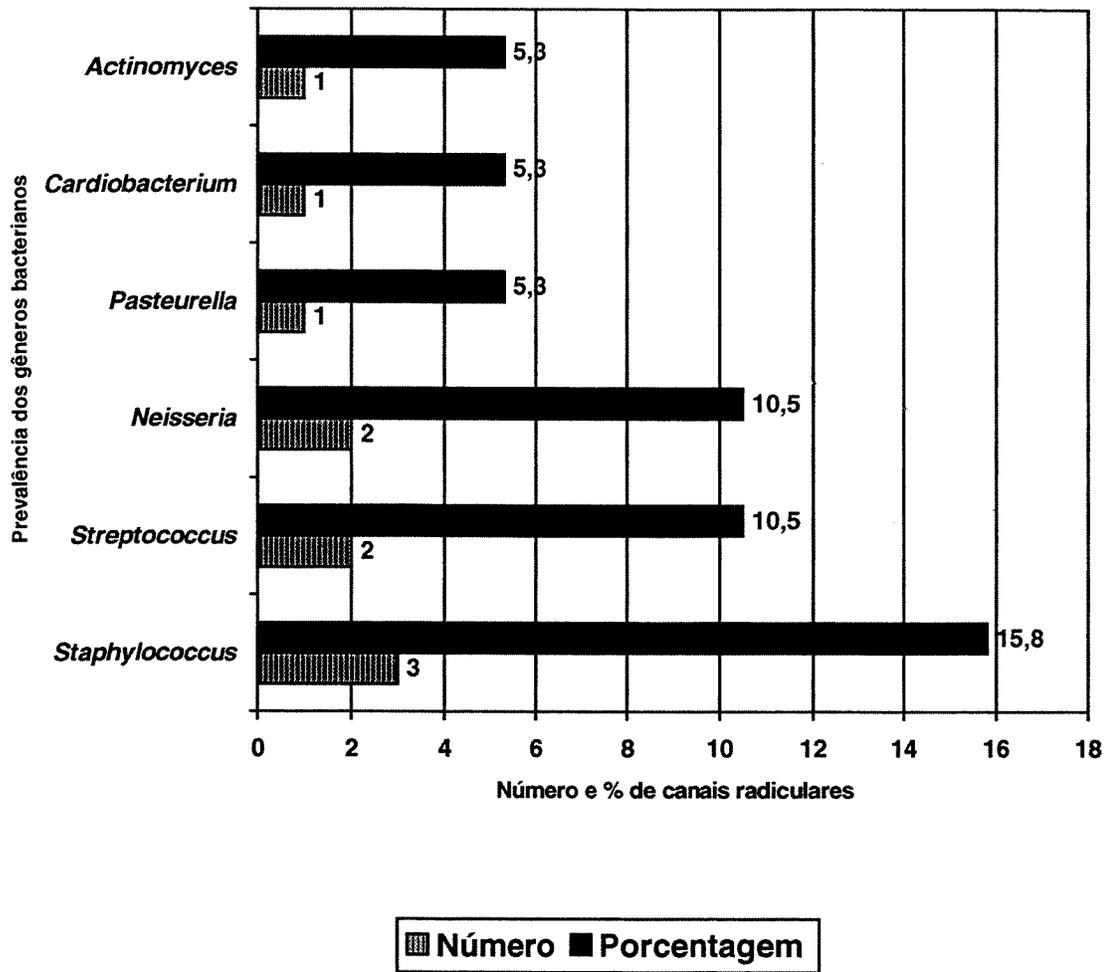


Figura 5.4. Prevalência dos gêneros bacterianos isolados em 19 coletas endodônticas de dentes com bolsas periodontais.

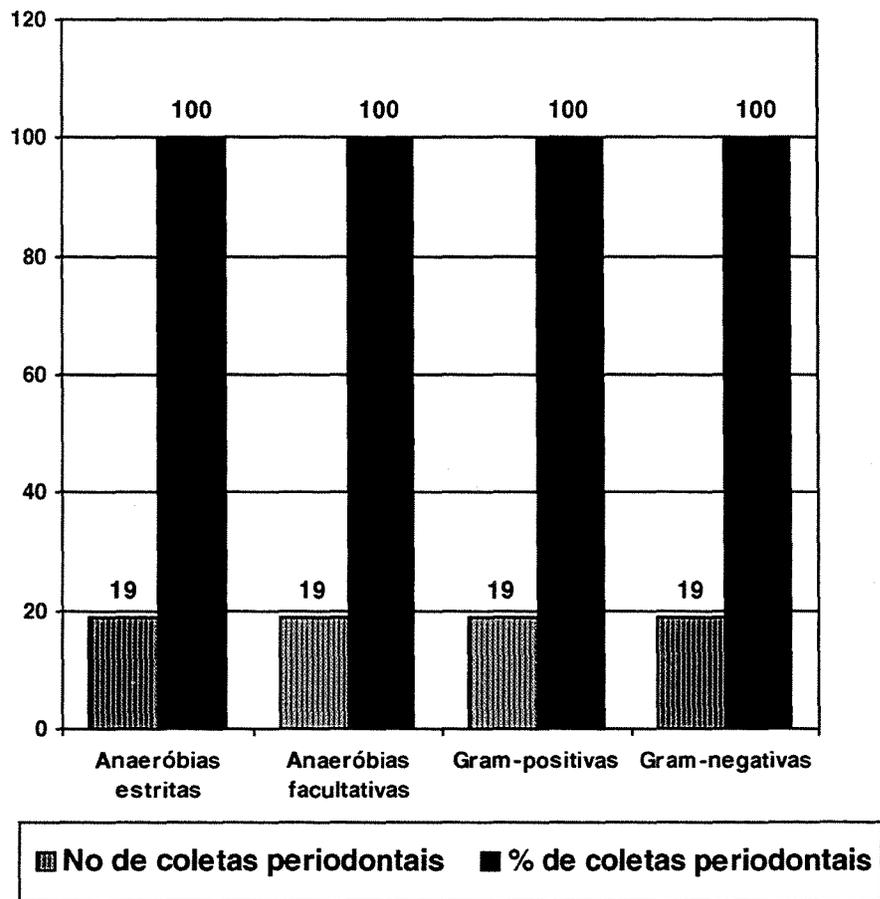


Figura 5.5. Frequência de bactérias anaeróbias estritas, anaeróbias facultativas, Gram-positivas e Gram-negativas em 19 coletas de bolsas periodontais.

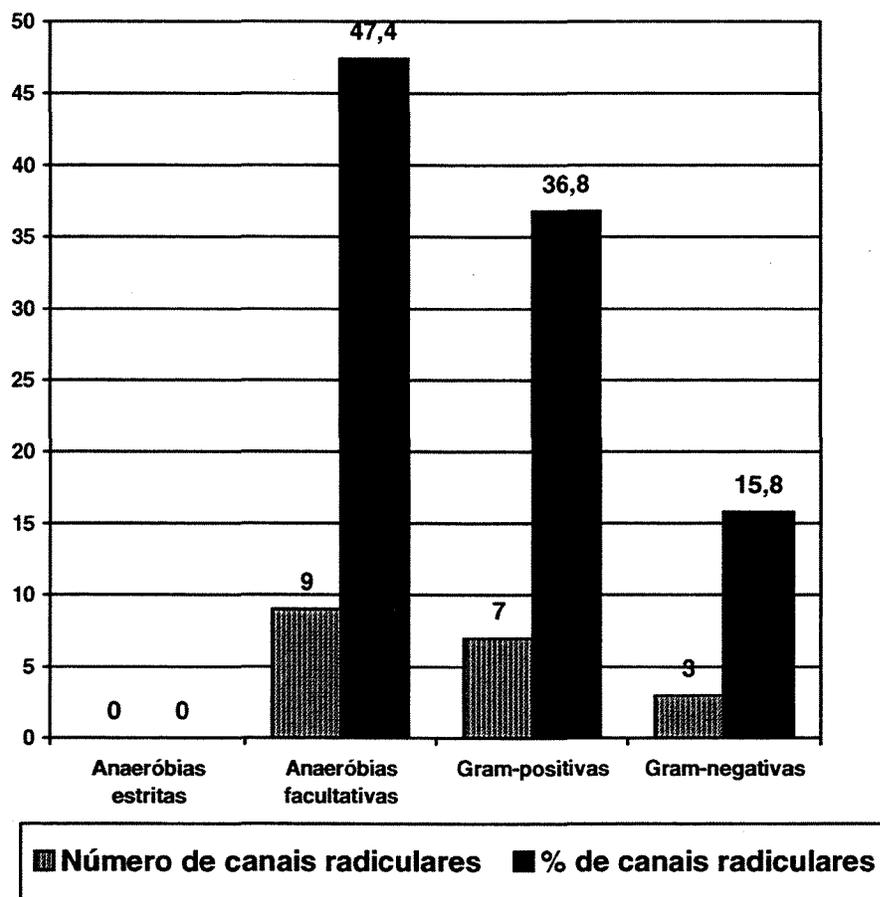


Figura 5.6. Frequência de bactérias anaeróbias estritas, anaeróbias facultativas, Gram-positivas e Gram-negativas em 19 coletas endodônticas de dentes com bolsas periodontais.

6. DISCUSSÃO

O estudo detalhado da doença periodontal quanto ao diagnóstico, etiologia, tempo de duração, relação com estruturas anatômicas vizinhas ao periodonto, microbiota prevalente, microbiota específica associada a sinais e sintomas clínicos, bem como os efeitos dos vários tipos de terapia periodontal, deve ser realizado com base em uma análise histológica e microbiológica das amostras e não apenas nos dados clínicos e radiográficos (CLAFFEY & EGELBERG 1994; KIPLOTI *et al.*, 1984)).

Em humanos, este estudo muitas vezes fica impedido por razões éticas e práticas. Talvez por isso os animais têm sido utilizados com frequência no estudo da doença e terapia periodontal (RENVERT *et al.*, 1996; CATON & ZANDER, 1975; PILOT *et al.*, 1980; JANSEN & PILOT, 1981; LIMA *et al.*, 1997; HOLLAND *et al.*, 1998; MACHADO *et al.*, 1999). Em nossa pesquisa utilizamos o cão como modelo de estudo pelo seu tamanho adequado, facilidade de manipulação e pela sua frequência de uso em pesquisas odontológicas. Contudo para CARRANZA JR. (1986) os modelos animais são muitas vezes associados a problemas técnicos e conceituais. Argumentou que todos os animais testados possuem uma microbiota distintamente diferente daquela do homem. Portanto os resultados de experiências usando modelos animais não seriam transferíveis diretamente na consideração da doença periodontal humana. Além das dificuldades encontradas em estabelecer microrganismos humanos na boca de alguns animais.

Em cães, a periodontite, que prevalece e aumenta com a idade do animal, ocorre espontaneamente. Buscando uma padronização, vários autores desenvolveram suas pesquisas utilizando métodos de indução da doença periodontal nestes animais (RENVERT *et al.*, 1996; PILOT *et al.*, 1980; JANSEN & PILOT, 1981; JANSEN *et al.*, 1982; PAGE & SCHROEDER, 1982b; PAQUETE *et al.*, 1997; HOLLAND *et al.*, 1998; MACHADO *et al.*, 1999).

As ligaduras feitas de fio de algodão e elástico ortodôntico são os métodos mais freqüentemente utilizados para criação da doença periodontal. Com menor freqüência têm sido utilizados bandas ortodônticas e fio de aço. Utilizamos em nosso estudo o uso combinado do fio de aço e de algodão, adaptados ao colo anatômico do dente, após exposição cirúrgica do mesmo. A ligadura de aço permitiu uma melhor retenção para o fio de algodão e assim garantindo a permanência subgingival delas durante todo o período do experimento. Isto foi muito importante pois a posição subgingival da ligadura mostrou representar um papel chave não apenas na iniciação, mas também no prosseguimento da degradação do tecido periodontal (PAGE & SCHROEDER, 1982b). O fio de aço permitiu ainda o controle radiográfico da posição do mesmo em relação à perda óssea.

Em nosso estudo houve perda por exfoliação de um dente, o 2º PMSD. Isto pode ser justificado porque em cães, a inflamação gengival e a deposição de cálculos são mais intensas na arcada superior e nas regiões posteriores do que na arcada inferior e regiões mais anteriores, além do que a reabsorção óssea ocorre mais cedo e em maior extensão na maxila

do que na mandíbula. Os primeiros e segundos pré-molares superiores são os dentes normalmente perdidos (PAGE & SCHROEDER, 1982b)

Radiograficamente, entre o dia 1 e o dia 125, observou-se diminuição considerável do espaço pulpar em 7 dentes (36,8%), sendo mais evidente nos cães que apresentavam canais amplos. Isto poderia indicar que a polpa sofreu alterações degenerativas, provocadas pela agressão da doença periodontal (BENDER & SELTZER., 1972; CHACKER, 1974; SELTZER *et al.*, 1963). Contudo só com um estudo histopatológico poder-se-ia confirmar se estas foram alterações fisiológicas ou patológicas da polpa dentária.

Na maioria dos dentes (84,2%), as polpas estavam clinicamente com algum grau de sangramento, sugerindo vitalidade. Resultado semelhante ao de KUPIOTI *et al.* (1984). Isto poderia indicar a boa capacidade de defesa da polpa contra os elementos agressores da placa bacteriana e doença periodontal, enquanto o suprimento sanguíneo apical estiver intacto (GULDENER, 1985; MEE-MADISON, 1992; LINDHE, 1992a; JANSSON & EHNEVID, 1998; SIQUEIRA & LOPES 1999). Entretanto, mais uma vez torna-se necessário estudos histopatológicos para fazer esta afirmação.

A indução ativa da doença periodontal foi de 125 dias, com o objetivo de haver tempo para um possível comprometimento e infecção pulpar.

O número de espécies microbianas coletadas da bolsa periodontal foi bem maior que o das coletadas do canal radicular. Enquanto na bolsa a média foi de 4 espécies (31,6%) e 7 espécies (26,3%) por coleta, no canal radicular a média foi de 1 espécie (36,8%) e 2 e 5

espécies (5,3%) por coleta. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de KUPIOTI et al. (1984), KEREKS et al. (1990) e KURIHARA et al. (1995).

O gênero *Streptococcus* foi coletado tanto da bolsa periodontal como do canal radicular do mesmo dente. Considerando que os dentes selecionados apresentavam-se com ausência de cárie e lesão periapical, portanto teoricamente hígidos do ponto de vista endodôntico, poder-se-ia sugerir que a bolsa periodontal poderia ser a fonte desta infecção do canal radicular (KUPIOTI et al., 1984 e KOBAYASHI et al., 1990).

Na bolsa periodontal houve uma predominância de bactérias anaeróbias estritas Gram-negativas, sugerindo que o baixo potencial de oxirredução e a baixa concentração de oxigênio da bolsa periodontal, favorecem a predominância destas bactérias. (PAGE & SCHROEDER, 1982b; CARRANZA et al., 1986 e RENVERT et al., 1996; NISENGARD et al, 1997b).

A associação estatisticamente significativa ($p < 0,01$) encontrada entre lesão de furca e presença do gênero bacteriano *Porphyromonas*, sugere a importância deste gênero na doença periodontal (RENVERT et al., 1996).

Dos 19 dentes com doença periodontal induzida apenas 9 apresentaram canais com cultura microbiológica positiva. Não é fácil afirmar com exatidão se a predominância de culturas negativas foi devido à ausência de bactérias ou falhas nas técnicas microbiológicas empregadas. Resultado semelhante foi obtido por KUPIOTI et al. (1984). Sabe-se que as técnicas são importantes na coleta e cultura dos microrganismos (BERG & NORD, 1973).

Porém utilizamos técnicas e materiais que permitem o crescimento de microrganismos anaeróbios mais exigentes. As coletas foram feitas sob fluxo contínuo de nitrogênio e o veículo de transporte utilizado foi o o VMGA III (MÖLLER, 1966; DAHLÉN et al., 1993). Este foi transportado até o laboratório de microbiologia da Endodontia em jarras anaeróbicas, sendo todo o processamento das amostras realizado em cabine de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Bradford, UK). As amostras foram agitadas no Vortex mixer por 60 segundos, para permitir maior dispersão dos microrganismos (OLSEN & SOCRANSKY, 1981). Foram utilizados meios de cultura que permitem o crescimento de aeróbios, anaeróbios facultativos e anaeróbios estritos Gram-negativos e Gram-positivos.

O fato de nas coletas endodônticas não terem sido identificadas bactérias anaeróbias estritas, poderia sugerir que a vitalidade do tecido pulpar selecionou as anaeróbias facultativas.

No cão controle, livre de doença periodontal, houve uma predominância de bactérias anaeróbias facultativas Gram-positivas, mais encontradas na placa supra-gengival (CARRANZA, 1986; NISENGARD et al, 1997b).

7. CONCLUSÃO

Baseados nos resultados obtidos e nas condições experimentais adotadas nesse experimento, pôde-se concluir que:

1. Em certas circunstâncias microrganismos da bolsa periodontal podem infectar a polpa dentária. Entretanto, fatores como tempo de duração da doença periodontal e especificidade de algumas bactérias podem exercer um papel fundamental na doença pulpar;
2. O gênero *Streptococcus* esteve presente na bolsa periodontal e no canal radicular do mesmo dente, sugerindo infecção endodôntica via periodonto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIAENS PA., EDWARDS CA., DE BOEVER JA., LOESCHE WJ. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. J Periodontol 1988; 59: 493-503.

ALVES JA, ZINET MPA, GONÇALVES EN. Novos avanços na Microbiologia Endodôntica: uma breve revisão. Ver Paul Odont 1994; 16: 22-32.

ANTONIAZZI JH, MJOR IA, NYGAARD-OSTBY B. Assessment of the sealing properties of root filling materials. Odont T 1968; 76: 261-71.

AVERY J.K. In: BHASKAR S.N. Orban's oral histol and embriol 9^a ed., Saint Louis, Mosby, 1980; 107-40.

BAUMGARTNER JC, FALKLER WA. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. J Endodon 1991; 17: 380-83.

BELK CE, GUTMANN JL. Perspectives, controversies and directives on pulpal-periodontal relationships. J Canadian Dent Assoc 1990; 56: 1013-14.

BENDER IB, SELTZER S. The effect of periodontal disease on the pulp. Oral Surg 1972; 33: 458-74.

BERG JO, NORD GE. A method for isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. Scand J Dent Res 81: 163-166, 1973.

- BERGENHOLTZ G, CRAWFORD JJ. Endodontic Microbiology. In: WALTON RE, TORABINEJAD M., eds. Principles and practice of endodontics. 1^a ed. Philadelphia, PA, USA: W.B. Saunders Co. 267-82.
- BYSTROM A, SUDQVIST G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0,5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1983; 55: 307-12.
- CARRANZA JR. FA. Periodontia clínica de Glickman 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986: 341-367.
- CATON JG, ZANDER HA. Primate Model for testing periodontal treatment procedures: I. Histologic investigation of localized periodontal pockets produced by orthodontic elastics. J Periodontol 1975; 46: 71-77.
- CHACKER FM. The endodontic - periodontic continuum. Dent Clin North Am 1974; 18: 393-414.
- CHILTON NW, TRENTON NJ. Periodontic-endodontic relationships: A synthesis. Oral Surg 1972; 34: 327-28.
- CLAFFEY N, EGELBERG J. Clinical characteristics of periodontal sites with probing attachment loss following initial periodontal treatment. J Clin Periodontol 1994; 21: 670-700.
- CZARNECKI RT, SCHILDER H. (1979) A histological evaluation of human pulp in teeth with varying degrees of periodontal disease. J Endodon 1979; 5: 242-53.

- DAHLÉN G, PIPATTANAGOVIT P, ROSLING B, MÖLLER AJR. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol*. 1993; 8: 375-82.
- DE DEUS QD. *Endodontia*. 5^a ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992: 615-26.
- DE DEUS QD. Frequency, location, and direction of the lateral, secondary and accessory canals. *J Endodon* 1975; 1: 361-366.
- DONGARI A, LAMBRIANIDIS T. Periodontally derived pulpal lesions. *Endod Dent Traumatol* 1988; 4: 49-54.
- ENGSTRÖM B, FROSTELL G. Experiences of bacteriological root canal control. *Acta Odontol Scand* 1964; 22: 43-69.
- FELDMAN G, SOLOMON C, NOTARO P.J, MOSKOWITZ E, WESELEY P, COFFINER M, KELLERT M. Endodontic treatment of periodontal problems. *Dent Radiog and Photog* 1981; 54: 1-15.
- FISH EW, MAC LEAN I. The distribution of oral *streptococci* in the tissues. *Br Dent J* 1936; 61: 336-62.
- GOMES B.P.F.A., DRUCKER D.B., LILLEY J.D. Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dent* 1996a; 24: 47-55.
- GOMES B.P.F.A., DRUCKER D.B., LILLEY J.D. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J* 1996b; 29: 255-241.

- GOMES BPFA, DRUCKER DB, LILLEY JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J* 1994a; 27: 291-8.
- GOMES BPFA, DRUCKER DB, LILLEY JD. Positive and negative associations in dental root canals. *Microbios* 1994b; 80: 231-43.
- GULDENER PHA. The relationship between periodontal and pulpal disease. *Int Endod J* 1985; 18: 41-54.
- GUTMANN JL. Prevalence, location, and patency of accessory canals in the furcation region of permanent molars. *J Periodontol* 1978; 49: 21-6.
- HAAPASALO M, RANTA H, RANTA K. Facultative Gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. *Acta Odontol Scandin* 1983; 41: 19-22.
- HE T, HAYASHI J, YAMAMOTO M, ISHIKAWA I. Genotypic Characterization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from periodontitis patients by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Periodontol* 1998; 69: 69-75.
- HESSION RW. Endodontic morphology – a radiographic analysis. *Oral Surg* 1977; 44: 610-20.
- HOLLAND M, BORING G, BOYLE CR, PICKRUM HM, JEFFCOAT MK. Radiographic bone loss correlations and technetium-99m-MDP bone uptake in ligature-induced periodontal disease in the Beagle. *Veterinary Radiol Ultras* 1998; 39: 366-74.
- JANSEN J, PILOT T. Predictability of probing depths in ligature-induced periodontal defects in beagle dogs. *J Periodontal Res.* 1981; 16: 372-78.

- JANSEN J, VAN DIJK J, PILOT T. Histometric analysis of ligature-induced periodontal defects in beagle dogs. *J Periodontol Res.* 1982; 17: 202-09.
- JANSSON LE, EHNEVID H. The influence of endodontic infection on periodontal status in mandibular molars. *J Periodontol* 1998; 69: 1392-1396.
- KAKEHASHI S, STANLEY HR, FITZGERALD JR. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg* 1965; 20: 340-9.
- KEREKES K, OLSEN I. Similarities in the microfloras of root canals and deep periodontal pockets. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6: 1-5.
- KIPIOTI A, NAKOU M, LEGAKIS N, MITSIS F. Microbiological findings of infected root canals and adjacent periodontal pockets in teeth with advanced periodontitis. *Oral Surg* 1984; 58: 213-20.
- KOBAYASHI T, HAYASHI A, YOSHIKAWA R, OKUDA K, HARA K. The microbial flora from root canals and periodontal pockets of non-vital teeth associated with advanced periodontitis. *Int Endod J* 1990; 23: 100-06.
- KRAMER IRF. The vascular architecture of the human dental pulp. *Arch Oral Biol* 1960; 2:177-89.
- KURIHARA H, KOBAYASHI Y, FRANCISCO IA, ISOSHIMA O, NAGAI A, MURAYAMA Y. A microbiological and immunological study of endodontic-periodontic lesions. *J Endodon* 1995; 21: 617-21.
- LASCALA NT, MOUSSALLI NH. *Compêndio terapêutico periodontal 2ª ed.* São Paulo: Artes Médicas, 1995: 92-134.

- LIMA LA, ANDERSON GB, WANG MM., NASJLETI CE, MORRISON EC, KON S, CAFFESSE RG. J Periodontol 1997; 68: 240-248.
- LINDHE J. Tratado de Periodontologia Clínica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992a: 185-202.
- LINDHE J. Tratado de Periodontologia Clínica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992b: 88-106.
- LOMÇALI G, SEN BH, ÇANKAYA H. Scanning electron microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. Endod Dent Traumatol 1996; 12: 70-6.
- LOWMAN JV, BURKE RS, PELLEU GB. Patent accessory canals: Incidence in molar furcation region. Oral Surg 1973; 36: 580-84.
- MACHADO MAN, STEFANI CM, SALLUM EA, SALLUM AW, TRAMONTINA VA, NOCITE JR FH. Treatment of ligature-induced peri-implantitis defects by regenerative procedures: a clinical study in dogs. J Oral Science 1999; 41: 181-85.
- MANDEL E, MACHTOU P, TORABINEJAD M. Clinical diagnosis and treatment of endodontic and periodontal lesions. Quint Int 1993; 24: 135-39.
- MARSH P, MARTIN M. Oral Microbiology 3ª ed. London, UK: Chapman & Hall, 1992.
- MATUSOW R.J. Endodontic cellulitis “flare-up”. Case report. Aust Dent J 1995; 40: 36-8.
- MAZUR B, MASSLER M. Influence of periodontal disease on the dental pulp. Oral Surg Oral Med O Pathol 1964; 17: 593-603.

MAZUR, B.(1961) Influence of periodontal disease on the pulp. Thesis, University of Illinois 1961.

MEE-MADISON TR. The effect of periodontal disease on the pulp. Periodon Abstracts 1992; 40: 37-40..

MILLER W.D. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. Dent Cosmos 1894; 36: 505-28.

MOLANDER A, REIT C, DAHLÉN G, KVIST T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J. 1998; 31: 1-7.

MÖLLER AJR. Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth; methodological studies. Göteborg, Sweden: Akademiförlaget, 1966.

MORSE DR (1987), 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. In: COHEN S. & BURNS R.C. Caminhos da polpa. 7^a ed. St. Louis, Mosby Co.

NISENGARD R.J., GOODMAN D, SCHEIN B. Microbiologia oral e imunologia 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997b: 336-41.

NISENGARD RJ., NEWMAN MG., ZAMBON JJ. Microbiologia oral e imunologia 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997a: 309-30.

OLSEN I, SOCRANSKY S. Ultrasonic dispersion of pure cultures of plaque bacteria and plaque. J Dent Res 1981; 89: 307-12.

- PAGE RC, SCHROEDER HE. Periodontitis in man and other animals – a comparative review.
New York: Karger, 1982a: 5-57.
- PAGE RC, SCHROEDER HE. Periodontitis in man and other animals – a comparative review.
New York: Karger, 1982b:127-58.
- PAIVA JG, ANTONIAZZI JH. Endodontia – bases para a prática clínica. 2ª ed. São Paulo:
Artes Médicas, 1988: 781-802.
- PAQUETTE DW, FIORELLINI JP, MARTUSCELLI G, ORINGER RJ, HOWELL TH,
McCULLOUGH JR, REASNER DS, WILLIAMS RC. Enantiospecific inhibition of
ligature-induced periodontitis in beagles with topical (S)-ketoprofen. J Clin
Periodontol 1997; 24: 521-28.
- PILOT T, VAN DER WEELE LT, VAN DIJK LJ, JANSEN J. Variations in artificial
periodontal defects in Beagle dogs. IADR Abstracts 1980; 373.
- PINEDA F, KUTTLER Y Mesiodistal and buccolingual roentgenographic investigation of
7,275 root canals. Oral Surg 1972; 33: 101-10.
- PRICHARD JF. Diagnóstico e Tratamento das Doenças Periodontais na Prática
Odontológica Geral. 1ª ed. São Paulo: Médica Panamericana, 1982: 104-18.
- RANTA K, HAAPASALO M, RANTA H. Monoinfection of root canal with *Pseudomonas
aeruginosa*. Endod Dent Traumatol 1988; 4: 269-72.
- RENVERT S, WIKSTROM M, MUGRABI M, CLAFFEY N. Histological and microbiological
aspects of ligature-induced periodontitis in beagle dogs. J Clin Periodontol. 1996; 23: 310-19.

- RUBACH WC, MITCHELL DF. Periodontal disease, accessory canal and pulp pathosis. J Periodontol 1965; 36: 34-38.
- SAUERWEIN E. Histopathology of the pulp in instances of periodontal disease. Dent Abstr 1956; 1: 467-68.
- SCHLUGER SS, YUODELIS RA, PAGE RC. Periodontia – fenômenos básicos, tratamento e inter-relações oclusais e restauradoras. 1ª ed. Rio de Janeiro: Interamericana. 1981a: 228-301.
- SCHLUGER SS, YUODELIS RA, PAGE RC. Periodontia – fenômenos básicos, tratamento e inter-relações oclusais e restauradoras. 1ª ed. Rio de Janeiro: Interamericana. 1981b: 513-32.
- SELTZER S, BENDER B, ZIONTZ M. The interrelationship of pulp and periodontal disease. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1963; 16: 1474-90.
- SIMON JHS, WERKSMAN LA. Inter-relação Endodontia e Periodontia. In: COHEN S, BURNS RC. Caminhos da Polpa. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1997. p.515-532.
- SIMON JHS, DE DEUS QD. Endodontic – periodontal relations. In: Cohen S., Burns R.C. eds. Pathways of the pulp. 5ª ed. St. Louis: c.v. mosby, 1988, 584-612.
- SIQUEIRA JR JF, LOPES HP. Endodontia – biologia e técnica 1ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999: 185-216.

SLOTS J. Microflora in the healthy gingival sulcs in man. Scand J Dent Res 1977; 85: 247-54.

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 1998; 85: 86-93.

SUNDQVIST G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps Odontological Dissertation 1976 No. 7, University of Umea, Sweden.

SUNDQVIST G. Ecology of the root canal microflora. J Endodon 1992; 18: 427-30.

SUNDQVIST G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994; 78: 522-530.

VERTUCCI FJ, WILLIAMS RG. Furcation canals in the human mandibular first molar. Oral Surg 1974; 38: 308-14.

WALTON RE, TORABINEJAD M. Princípios e Prática em Endodontia. 2^a ed. São Paulo: Santos, 1997: 166-79.

WEINE FS. The enigma of the lateral canal. Dent Clin North Am 1984; 28: 833-52.

WHYMAN R.A. Endodontic-periodontic lesions. Part I: prevalence, aetiology, and diagnosis. New Zeal Dent J 1988; 84: 74-77.

YOSHIDA M, FUKUSHIMA H, YAMAMOTO K, OGAWA K, TODA T, SAGAWA H.

Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals

of teeth with periapical pathosis. J Endodon 1987; 13: 24-28.

ANEXOS
ANEXO I – TABELAS COLETAS

	Gram ⁺	Gram ⁻	Cocos	Bacilos	<u>A.</u> estricto	<u>A.</u> facultativo	Espécies
2°PMSD	2	2	1	3	3	1	<i>Prevotella loeschei</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Streptococcus</i> spp.
2°PMID	2	3	2	3	3	2	<i>Pasteurella multocida</i> , <i>Peptostreptococcus. assaccharolyticus</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Prevotella denticola</i> , <i>Streptococcus</i> spp.
4°PMSE	3	4	2	5	5	2	<i>Prevotella oralis</i> , <i>Haemophilus ducrevi</i> , <i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Bacteroides stercoris</i> , <i>Streptococcus</i> spp. 1 bacilo G ⁺ não identificado 1 bacilo G ⁻ não identificado
4°PMIE	2	2	1	3	3	1	<i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Prevotella loescheii</i> , <i>Streptococcus</i> spp.
TOTAL	9	11	6	14	14	6	

CADELA 1 (coleta periodontal).

A: Anaeróbio

	Gram ⁺	Gram ⁻	Cocos	Bacilos	A. estrito	A. facultativo	Espécies
2°PMSD	-	-	-	-	-	-	-
2°PMID	5	2	5	2	2	5	<i>Staphylococcus shleifeer</i> , <i>Propionibacterium granulosum</i> , <i>Neisseria mucosa</i> , <i>Gemella morbillorum</i> , <i>Streptococcus oralis</i> , <i>Streptococcus sanguis</i> , 1 bacilo G ⁻ anaeróbio não identificado
4°PMSE	1	9	2	8	5	5	<i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Haemophilus aphrophilus/paraphrophilus</i> , <i>Neisseria sicca/subflava</i> , <i>Cardiobacterium hominis</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Bacteroides gracilis</i> , <i>Streptococcus</i> spp. 3 bacilos G ⁻ anaeróbio não identificado
4°PMIE	3	5	4	4	5	3	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> , <i>Neisseria lactamica</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Tissierella praecuta</i> , <i>Prevotella corporis</i> , <i>Peptostreptococcus</i> spp. 1 bacilo G ⁻ anaeróbio não identificado.
	9	16	11	14	12	13	

CADELA 2 (coleta periodontal).**A:** Anaeróbio

	Gram ⁺	Gram ⁻	Cocos	Bacilos	<u>A.</u> estricto	<u>A.</u> facultativo	Espécies
2°PMSD	-	-	-	-	-	-	-
2°PMID	2	3	3	2	0	5	<i>Pasteurella multocida</i> , <i>Abiotrophia adiacens</i> , <i>Neisseria mucosa</i> , <i>Cardiobacterium hominis</i> , <i>Streptococcus spp.</i>
4°PMSE	2	0	0	2	0	2	<i>Candida spp.</i> <i>Actinomyces viscosus</i>
4°PMIE	1	0	1	0	0	1	<i>Streptococcus mitis</i>
TOTAL	5	3	4	4	0	8	

CADELA 2 (coleta endodôntica).

A: Anaeróbio

	Gram ⁺	Gram ⁻	Cocos	Bacilos	A. estricto	A. facultativo	Espécies
2°PMSD	2	2	2	2	2	2	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Prevotella corporis</i> , <i>Streptococcus</i> spp. 1 bacilo G ⁻ anaeróbio não identificado
2°PMID	2	6	2	6	4	4	<i>Neisseria</i> spp. <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Bacteroides gracilis</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Streptococcus</i> spp. 1 bac. G ⁺ facult. não ident. 2 bacilos G ⁻ anaeróbios não identificados
4°PMSE	2	2	2	2	2	2	<i>Streptococcus bovis</i> II, <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i>
4°PMIE	1	6	1	6	6	1	<i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Bacteroides stercoris</i> , <i>Prevotella loescheii</i> , <i>Prevotella denticola</i> , <i>Streptococcus</i> spp. 2 bacilos G ⁻ anaeróbios não identificados
TOTAL	7	16	7	16	14	9	

CADELA 3 (coleta periodontal).**A: Anaeróbio**

	Gram ⁺	Gram ⁻	Cocos	Bacilos	<u>A.</u> estrito	<u>A.</u> facultativo	Espécies
2°PMSD	1	0	1	0	0	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
2°PMID	-	-	-	-	-	-	-
4°PMSE	1	0	1	0	0	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
4°PMIE	1	0	1	0	0	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
TOTAL	3	0	3	0	0	3	

CADELA 3 (coleta endodôntica).

A: Anaeróbio

	Gram ⁺	Gram ⁻	Cocos	Bacilos	A. estricto	A. facultativo	Espécies
2°PMSD	2	3	2	3	3	2	<i>Staphylococcus intermedius</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Streptococcus</i> spp. 2 bacilos G ⁻ anaeróbios não identificados
2°PMID	1	6	2	5	6	1	<i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Bacteroides capillosus</i> , <i>Bacteroides stercoris</i> , <i>Veillonella</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. 2 bacilos G ⁻ anaeróbios não identificados
4°PMSE	2	5	2	5	5	2	<i>Porphyromonas endodontalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> spp. 4 bacilos G ⁻ anaeróbios não identificados
4°PMIE	2	2	3	1	2	2	<i>Oligella ureolytica</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> , <i>Streptococcus</i> spp.
TOTAL	7	16	9	14	16	7	

CADELA 4 (coleta periodontal).

A: Anaeróbio

	Gram ⁺	Gram ⁻	Cocos	Bacilos	<u>A.</u> estrito	<u>A.</u> facultativo	Espécies
2°PMSD	-	-	-	-	-	-	-
2°PMID	0	1	0	1	0	1	1 bacilo G ⁻ facultativo não ident.*
4°PMSE	0	1	0	1	0	1	1 bacilo G ⁻ facultativo não ident.*
4°PMIE	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	0	2	0	2	0	2	

CADELA 4 (coleta endodôntica).

A: Anaeróbio.

ident.*: identificado.

	Gram ⁺	Gram ⁻	Cocos	Bacilos	A. estricto	A. facultativo	Espécies
2°PMSD	5	4	2	7	3	6	<i>Pasteurella multocida</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Veillonella</i> spp. <i>Prevotella oris</i> , <i>Streptococcus</i> spp. 3 bacilos G ⁺ facultativos 1 bacilo G ⁻ anaeróbio
2°PMID	2	2	3	1	3	1	<i>Peptostreptococcus</i> spp. <i>Prevotella corporis</i> , <i>Veillonella</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp.
4°PMSE	3	3	3	3	5	1	<i>Prevotella intermedia</i> , <i>Veillonella</i> spp. <i>Prevotella loeschei</i> , <i>Peptostreptococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. 1 bacilo G ⁺ anaeróbio não identificado
4°PMIE	2	1	3	0	2	1	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> , <i>Veillonella</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp.
TOTAL	12	10	11	11	13	9	

CADELA 5 (coleta periodontal).

A: Anaeróbio

	Gram ⁺	Gram ⁻	Cocos	Bacilos	<u>A.</u> estricto	<u>A.</u> facultativo	Espécies
2°PMSD	-	-	-	-	-	-	-
2°PMID	-	-	-	-	-	-	-
4°PMSE	-	-	-	-	-	-	-
4°PMIE	1	0	1	0	0	1	<i>Staphylococcus intermedius</i>
TOTAL	1	0	1	0	0	1	

CADELA 5 (coleta endodôntica).

A: Anaeróbio

	Gram ⁺	Gram ⁻	Cocos	Bacilos	<u>A.</u> estricto	<u>A.</u> facultativo	Espécies
2°PMSD	4	0	3	1	1	3	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus</i> spp. 1 bacilo G ⁺ anaeróbio não identificado
2°PMID	1	0	1	0	0	1	<i>Lactococcus lactis cremosis</i>
4°PMSE	2	1	2	1	0	3	<i>Neisseria sicca/subflava</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus mitis</i>
4°PMIE	1	0	1	0	0	1	<i>Streptococcus</i> spp.
TOTAL	8	1	7	2	1	8	

CADELA 6 – controle - (coleta periodontal).

A: Anaeróbio

ANEXO II – Meios de cultura

1. Fastidious Anaerobe Agar (FAA) – LAB M (Bury, UK)

1.1. Descrição

Meio primário de isolamento capaz de favorecer o crescimento dos anaeróbios de maiores implicações clínicas.

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 são os seguintes: cisteína para o *Fusobacterium necrophorum*, *Propionibacterium acnes* e *Bacteroides fragilis*; arginina para *Eubacterium* spp., pirofosfato solúvel para *Porphyromonas asaccharolytica*. Piruvato contribui 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 poderiam inibir o crescimento bacteriano.

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 de carneiro desfibrinado, misturar bem e distribuir nas placas de petri.

1.3. Aparência

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

1.4. Armazenagem

Placas: até 7 dias a 4 °C no escuro.

1.5. Inoculação

Em superfície, plaqueando para obter colônias puras.

1.6. Incubação

37 °C anaerobicamente, por períodos de 48 horas e 7 dias.

1.7. Fórmula

Fórmula	g/L
Mistura de peptonas	23,0
Cloreto de sódio	5,0
Amido	1,0
Agar 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



Figura A1- FAA

O meio FAA pode ser seletivo para várias espécies de anaeróbios através da adição de antibióticos seletivos.

2. FAA + ácido nalidíxico (X 091) – LAB M (Bury, UK)

Este meio é seletivo para anaeróbios Gram-positivos não formadores de esporos.

Para o preparo de 500 ml de FAA, um vidro de pó de ácido nalidíxico (X091) é diluído em 5 ml de água destilada, e adicionado assepticamente ao meio esterilizado e resfriado a 47 °C. A concentração final de ácido nalidíxico é de 0,01 mg/ml.

3. FAA + ácido nalidíxico + vancomicina (X 090) - LAB M (Bury, UK)

Este meio é seletivo para anaeróbios Gram-negativos. A concentração final de ácido nalidíxico é de 0,01 mg/ml, e da vancomicina é de 0,0025 mg/ml.

4. FAA + neomicina (X 015) - LAB M (Bury, UK)

Quando adicionado ao ágar-sangue, resultará em um meio que permite o crescimento de *Clostridium* e outros anaeróbios, como *Bacteroides fragilis* e alguns cocos anaeróbios. A concentração final de neomicina é de 0,075 mg/ml.

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

5.1. Descrição

Meio de cultura líquido capaz de favorecer o crescimento de bactérias anaeróbias. 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.

5.2 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.

5.3 Aparência

Amarelo claro.

5.4 Armazenagem

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

5.5 Inoculação

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

5.6 Incubação

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

5.7. Fórmula

Fórmula	g/L
Mistura de peptonas	15,0
Cloreto de sódio	2,5
Extrato de levedura	1,0
Agar 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



Figura A5- FAB

6. Tripcaseina de Soja Bacitracina -Vancomicina Ágar.

6.1. Descrição

Meio de cultura seletivo capaz de favorecer o crescimento de bactérias dos gêneros *Haemophilus*, *Pasteurella* e *Actinobacillus*. O isolamento do *A. actinomycetemcomitans* a partir de espécimes orais requer, frequentemente, a utilização seletivos, como o TSBV, para a detecção de pequenos números do microrganismo, os quais podem ter significado clínico, e para impedir a inibição *in vitro* promovida pelos estreptococos presentes na amostra.

6.2. Ingredientes

Tripcaseina de Soja Ágar.....	20 g
Extrato de levedura.....	0,5 g
Água destilada.....	500 ml
Soro de Cavallo Estéril.....	50 ml
Solução de estoque de Bacitracina (7,5 mg/ml).....	0,5 ml
Solução de estoque de Vancomicina (5 mg/ml).....	0,5 ml
Solução de estoque de Vitamina K (1 mg/ml).....	0,5 ml
Solução de estoque de Hemina (5 mg/ml).....	0,5 ml

6.3. Preparação

- Misturar Tripcaseina de Soja Ágar, água destilada, extrato de levedura, vitamina K e hemina.
- Ajustar o pH de 7,2.
- Aquecer para dissolver.
- Autoclavar a 121° C por 15 minutos.
- Adicionar soro de cavalo, solução de estoque de Vancomicina e Bacitracina.
- Distribuir nas placas.

Observação: se for utilizado o Caldo de Soja de Tripcaseina tem-se que adicionar o ágar:

Caldo de Soja Tripcaseina.....15 mg

Ágar.....7,5 g

6.4. Aparência

Amarelo claro.

6.5. Inoculação

Em superfície, plaqueando para obter colônias puras.

6.6. Incubação

37 °C anaerobicamente, por períodos de 48 horas e 7 dias.

37 °C em estufa de CO₂ por períodos de 48 horas e 7 dias.

6.6. Fórmula do Caldo de Soja Tripcaseina (g/l) - (bioBRÁS DIAGNÓSTICOS)

Peptona de caseína.....17,0

Peptona de soja.....3,0

Dextrose.....2,5

Cloreto de sódio.....5,0

Fosfato bibásico de potássio.....2,5



Figura: Caldo de Soja Trypticaseína

ANEXO III - Meio de transporte

VMGA III - Viability Medium Göteborg Agar

1. Descrição

Meio de transporte para amostragens pequenas como, por exemplo, com ponta de papel absorvente. Apresenta uma consistência semi-sólida em temperatura ambiente e semi-fluida acima de 30 °C.

2. Preparo

Soluções

◆ Solução A

Água destilada estéril	550 ml
Triptose (DIFCO, Detroit, EUA)	0,5 g
Thitone e Peptone (BBL, Cockeysville, EUA)	0,5 g

Dissolver com agitação e aquecimento (microondas 10s).

◆ Solução B

Água destilada estéril	50 ml
Bacto ágar 4% (DIFCO, Detroit, EUA)	2 g

Autoclavar a 121 °C por 20 minutos.

◆ Solução C

Água destilada estéril previamente aquecida	300 ml
Gelatina (DIFCO, Detroit, EUA)	0,5 g

Dissolver com agitação e aquecimento (microondas 10s).

Misturar as soluções A, B e C em um frasco de 2 L, na manta. Resfriar a 45-50 °C, em banho-maria. Adicionar à mistura 100 mL da solução de estoque de sais*. Adicionar 0,5 mL de ácido tioglicólico PA (SIGMA, St Louis, EUA). Aquecer a solução por 5 minutos até que a cor azul desapareça (fica amarelo depois que ferve). Resfriar em água morna sob fluxo de N₂. Levar para a câmara de anaerobiose. Misturar 10 mL de água destilada estéril com 0,5 g de L-cisteína-dihidroclorito (SIGMA, St Louis, EUA), e adicionar à solução. Ajustar o pH 7,2 com uma solução de 8 M NaOH + 8 KOH. Colocar 1 mL da solução em cada tubo de Eppendorf e deixar levemente aberto. Permitir que os tubos fiquem na cabine de anaerobiose por pelo menos 2 horas. Depois de remover os tubos da cabine, feche-os firmemente. Autoclavar em 115 °C por 20 minutos.

- *Sais de estoque

I. Água destilada estéril	300 ml
Acetato de fenilmercuriocromo	0,5 g

Dissolver em banho-maria durante a noite a 56 °C.

II. Água destilada estéril	200 ml
Glicerofosfato de sódio	0,5 g

Dissolver aquecendo levemente na manta

III. Água destilada estéril	300 ml
Cloreto de cálcio hidratado (CaCl ₂ .2 H ₂ O)	1,6 g
Cloreto de potássio	4,2 g
Cloreto de sódio	10,0 g
Sulfato de magnésio hidratado (MgSO ₄ . H ₂ O)	1,0 g

Misturar a solução I, II e III bem dissolvidas e resfriadas em uma proveta graduada e adicionar água destilada estéril até completar o volume de 1000 mL. Adicionar 0,03 g de azul de metileno, e colocar em frascos de 100 mL de solução de sal.

ANEXO IV - Câmara de anaerobiose

A câmara de anaerobiose consiste em uma câmara de incubação, feita de resina acrílica e tem a capacidade de armazenar placas de petri de 180 x 90 mm.

O acesso à cabine feito através de portas com luvas de borracha.

Um controlador de temperatura digital indica e mantém uma temperatura constante no interior da cabine.

A cabine utiliza o sistema “Anotox” e o catalisador Palladium Deoxo “D” para manter anaerobiose estrita dentro da cabine e evitar a formação de metabólitos voláteis tóxicos. Grandes sachês ficam situados em frente do ventilador para permitir máxima exposição à atmosfera e evitar qualquer condensação de água no “Anotox” e catalisador.

A função do “Anotox” é purificar a atmosfera pela remoção de ácidos gordurosos voláteis e hidrogênio sulfúrico da atmosfera.

A função do catalisador Palladium Deoxo “D” é catalisar rastros de oxigênio dentro da câmara via hidrogênio, o qual também está dentro da câmara. O vapor de água produzido pelo catalisador é removido automaticamente por um sistema de controle de umidade. O catalisador Palladium Deoxo “D” e o “Anotox” devem ser trocados uma vez por ano no serviço de manutenção. Se eles ficarem muito úmidos durante o uso, devem ser removidos e secados. O “Anotox” que é feito de material plástico deve ser seco numa incubadora com temperatura de 37°C – 60°C por algumas horas. O sachê catalisador que é feito de aço inoxidável deve ser seco em forno a 160°C por uma ou duas horas.

O controle de anaerobiose no interior da cabine é feito com uma solução de azul de metileno ou outro indicador de redução de oxigênio.

A cabine apresenta um controle de umidade que permite que qualquer excesso de umidade condensada nas placas seja canalizada para fora da câmara.

A iluminação na cabine é feita por luzes fluorescentes.

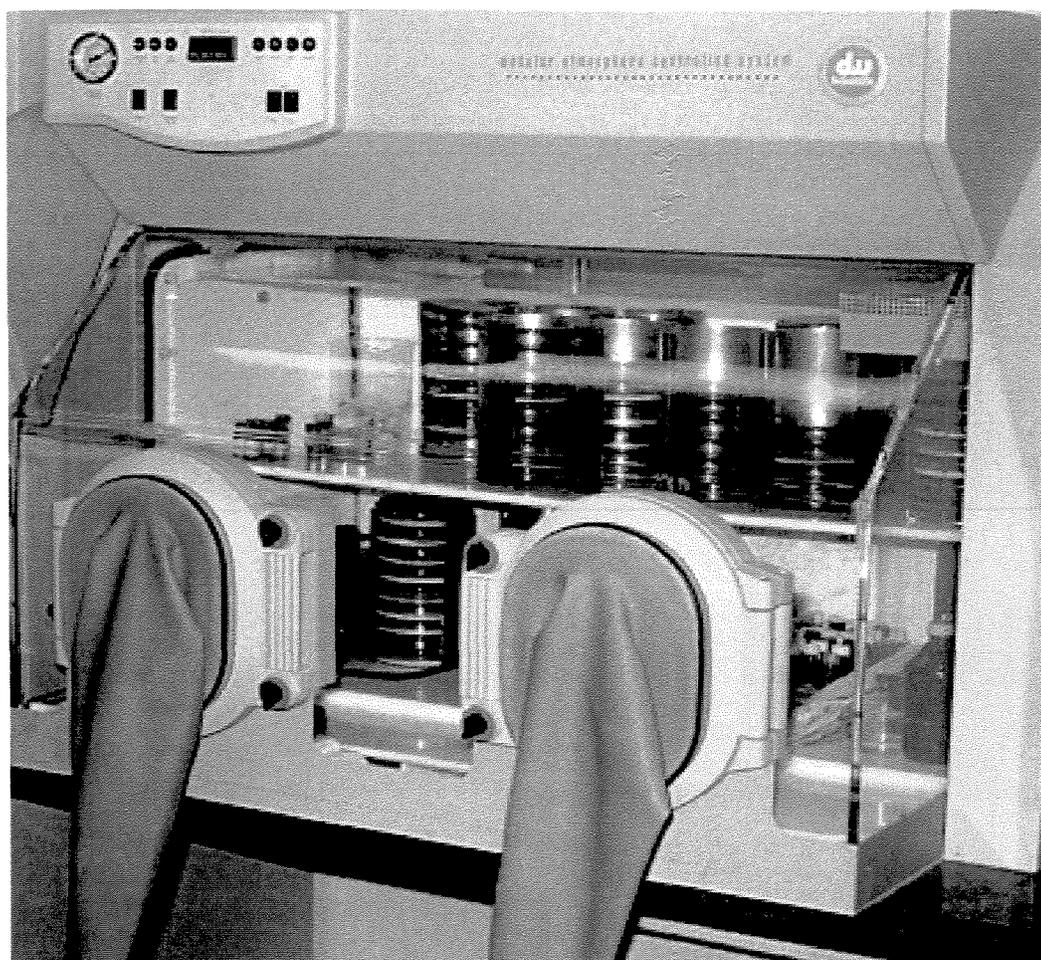


Figura A IV- Cabine de Anaerobiose

ANEXO V – Kits de identificação bacteriana

1. Api 20 Strep

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”.

1.2. Materiais

Um 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 plásticas
- 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 Busen
- Cabine ou jarra de anaerobiose

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 negativa 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 1.4. 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 Strep Analytical Profile Index”.

1.3. Quadro de interpretação do Api Strep

api 20 Strep

07625 C - 10/98

READING TABLE

TESTS	SUBSTRATES	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS			
			NEGATIVE		POSITIVE	
VP	Pyruvate	Acetoin production	VP 1 + VP 2 / wait 10 min (3)			
			Colorless		Pink-Red	
HIP	Hippurate	Hydrolysis	NIN / wait 10 min			
			Colorless/Pale blue		Dark blue/Violet	
ESC	Esculin	β -glucosidase	4 hrs.	24 hrs.	4 hrs.	24 hrs.
			Colorless Pale yellow	Colorless Pale yellow Light grey	Black Grey	Black
PYRA	Pyrrolidonyl 2 naphthylamide	Pyrrolidonyl ary/amidase	ZYM A + ZYM B / 10 min (PYRA to LAP) (1) if necessary, decolorize with intense light			
			Colorless or very pale orange		Orange	
α GAL	6-Bromo-2-naphthyl α -D-galactopyranoside	α -galactosidase	Colorless		Violet	
β GUR	Naphthol AS-BI β -D-glucuronate	β -glucuronidase	Colorless		Blue	
β GAL	2-naphthyl- β -D- galactopyranoside	β -galactosidase	Colorless or very pale violet		Violet	
PAL	2-naphthyl phosphate	Alkaline phosphatase	Colorless or very pale violet		Violet	
LAP	L-leucine-2-naphthylamide	Leucine arylamidase	Colorless		Orange	
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Yellow		Red	
			4 hrs.	24 hrs.	4 hrs.	24 hrs.
<u>RIB</u>	Ribose	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>ARA</u>	L-Arabinose	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>MAN</u>	Mannitol	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>SOR</u>	Sorbitol	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>LAC</u>	Lactose	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>TRE</u>	Trehalose	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>INU</u>	Inulin	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>RAF</u>	Raffinose	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>AMD</u>	Starch (2)	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>GLYG</u>	Glycogen	Acidification	Red or Orange		Bright yellow	

(1) During a second reading after 24 hours of incubation, a deposit may be noticed in the tubes where the ZYM A and ZYM B reagents have been added. This phenomenon is normal and should not be taken into consideration.

(2) The acidification of starch is frequently weaker than that of other sugars.

(3) A pale pink color obtained after 10 minutes should be considered negative.

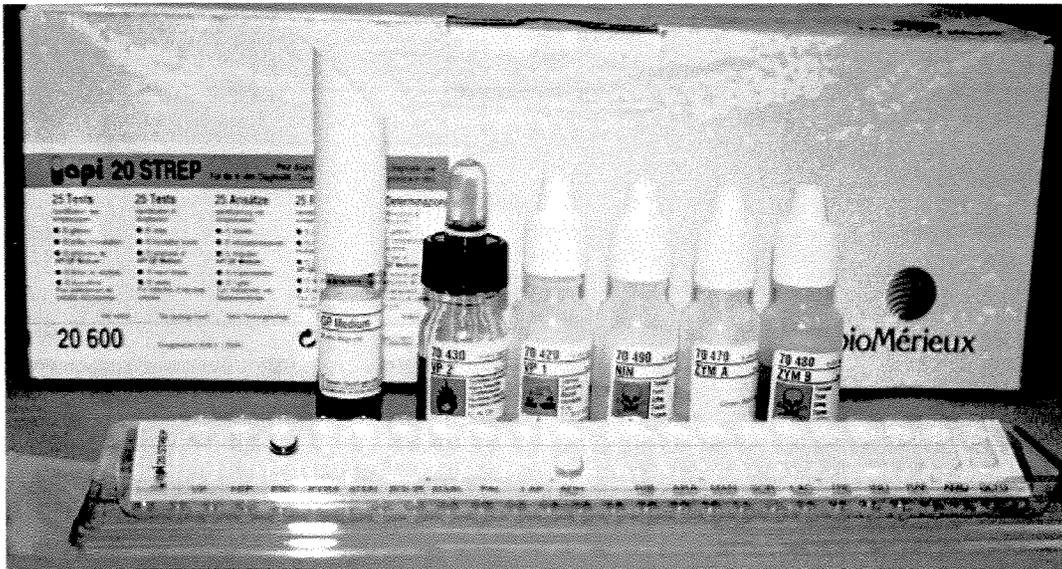


Figura A V1- Kit api 20 STREP

2. Api Staph

2.1. 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” (bioMérieux, ref. 20 590).

2.2 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 plásticas
- Swabs estéreis
- Óleo mineral
- Catálogo: Api Staph Analytical Profile Index

2.3. Procedimentos para identificação

Microorganismos 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 contendo 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 -naftil 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. Quadro de interpretação do Api Staph

api Staph

07468 E - 09/92

READING TABLE

TESTS	SUBSTRATE	REACTIONS / ENZYMES	RESULT	
			NEGATIVE	POSITIVE
0	No substrate	Negative control	red	—
GLU	D-Glucose	(Positive control) Acidification due to carbohydrate utilization	red	yellow
FRU	D-Fructose			
MNE	D-Mannose			
MAL	Maltose			
LAC	Lactose			
TRE	D-Trehalose			
MAN	D-Mannitol			
XLT	Xylitol			
MEL	D-Melibiose			
NIT	Potassium nitrate	Reduction of nitrate to nitrite	<u>NIT 1 + NIT 2 / 10 min</u>	
			colorless-light pink	red
PAL	β -naphthyl-acid phosphate	Alkaline phosphatase	<u>ZYM A + ZYM B / 10 min</u>	
			yellow	violet
VP	Sodium pyruvate	Acetyl-methyl-carbinol production	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u>	
			colorless	violet-pink
RAF	Raffinose	Acidification due to carbohydrate utilization	red	yellow
XYL	Xylose			
SAC	Sucrose			
MDG	α -methyl-D-glucoside			
NAG	N-acetyl-glucosamine			
<u>ADH</u>	Arginine	Arginine dihydrolase	yellow	orange-red
<u>URE</u>	Urea	Urease	yellow	red-violet

The acidification tests should be compared to the negative (0) and positive (GLU) controls.

When MNE and XLT are preceded or followed by positive tests, then an orange test should be considered negative.

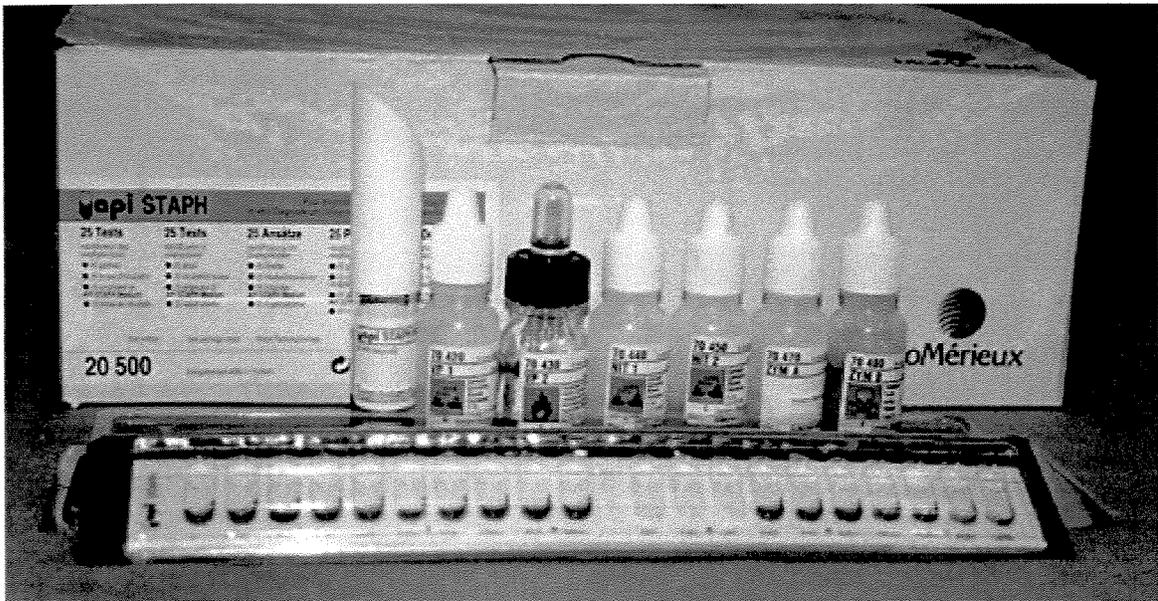


Figura A V2- Kit api STAPH

3. Rapid ID 32 A

3.1. Descrição

Rapid ID 32 A é um sistema de identificação para anaeróbios utilizando testes enzimáticos estandardizados e em miniauturas. 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.”

3.2. 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

3.3. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas contendo Fastidious Anaerobe Agar mais sangue de carneiro desfibrinado por 24-48 horas a 37 °C anaerobicamente. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do 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 anaerobicamente 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 (cúpula 0.1) 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 de acordo com o quadro do item 3.4. 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 “Rapid ID 32 A Analytical Profile Index”.

3.4. Quadro de interpretação do Rapid ID 32 A

rapid ID 32 A

07881 B - 05/98

READING TABLE

CUPULE	TEST	REACTION	RESULT	
			NEGATIVE	POSITIVE
1.0	<u>URE</u>	UREase	yellow	red
1.1	ADH	Arginine DiHydrolase		
1.2	α GAL	alpha GALactosidase	colorless	yellow
1.3	β GAL	beta GALactosidase		
1.4	β GP	beta Galactosidase 6 Phosphate		
1.5	α GLU	alpha GLUcosidase		
1.6	β GLU	beta GLUcosidase		
1.7	α ARA	alpha ARAbinosidase		
1.8	β GUR	beta GlucURonidase		
1.9	β NAG	beta N-Acetyl-Glucosaminidase		
1.A	MNE	MaNnosE fermentation	red	yellow-orange
1.B	RAF	RAFFinose fermentation		
1.C	GDC	Glutamic ac. DeCarboxylase	yellow-green	blue
1.D	α FUC	alpha FUCosidase	colorless	yellow
1.E		Empty cupules		
1.F				
0.0	NIT	Reduction of NITrates	<u>NIT 1 + NIT 2 / 5 min - < 10 min</u> colorless red	
0.1	IND	INDole Production	<u>JAMES / 5 min - < 10 min</u> colorless pink	
0.2	PAL	Phosphatase ALcaline	<u>FB / 5 min - < 10 min</u> colorless purple	
0.3	ArgA	Arginine Arylamidase	<u>FB / 5 min - < 10 min (ArgA → SerA)</u> colorless orange pale orange	
0.4	ProA	Proline Arylamidase		
0.5	LGA	Leucyl Glycine Arylamidase		
0.6	PheA	Phenylalanine Arylamidase		
0.7	LeuA	Leucine Arylamidase		
0.8	PyrA	Pyroglutamic ac. Arylamidase		
0.9	TyrA	Tyrosine Arylamidase		
0.A	AlaA	Alanine Arylamidase		
0.B	GlyA	Glycine Arylamidase		
0.C	HisA	Histidine Arylamidase		
0.D	GGA	Glutamyl Glutamic ac. Arylamidase		
0.E	SerA	Serine Arylamidase		
0.F		Empty cupule		

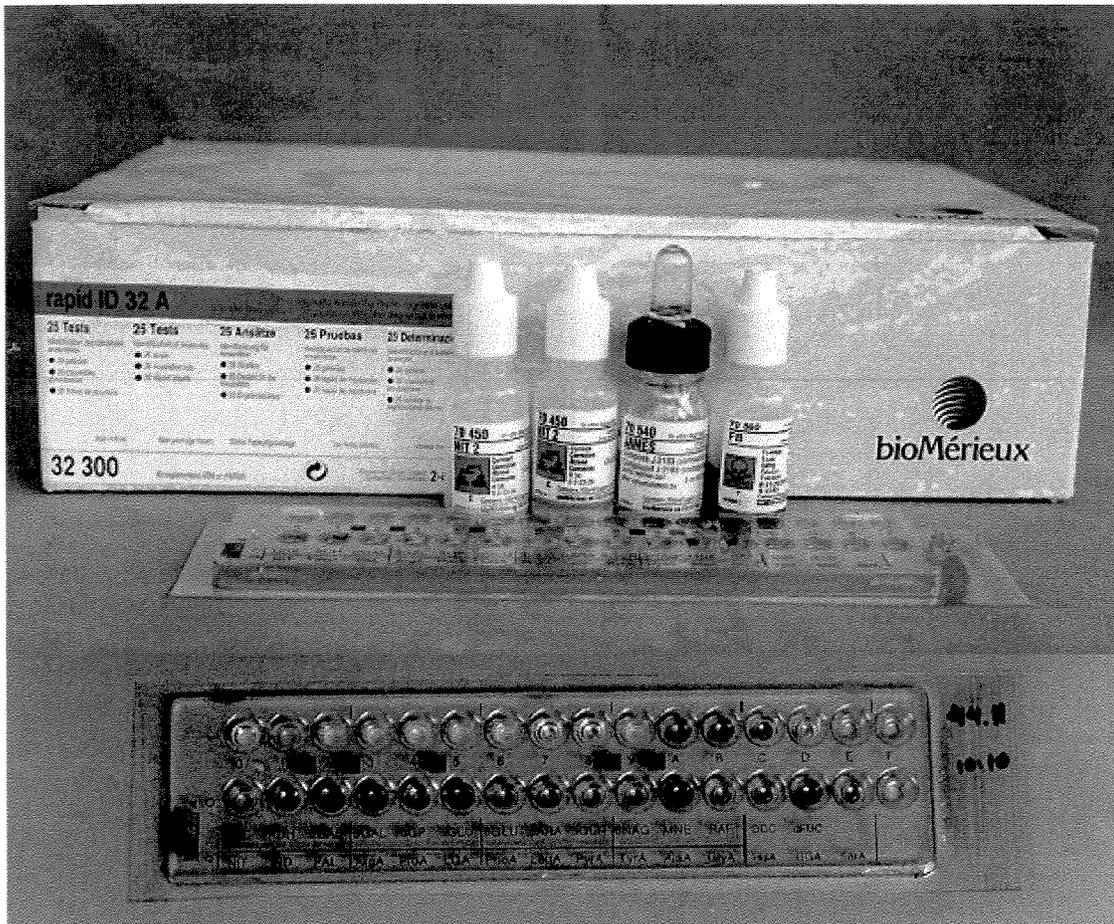


Figura A V3 – Kit rapid ID 32A

4. RapID ANA II

4.1 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 desidratadas) 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.

4.2 Materiais:

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

KCl.....7,5g

CaCl₂.....0,5g

Água deionizada.....1000 mL

PH: 7,5-9,5.

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

Ingredientes reativos:

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

Ácido hidrocloreídrico.....0,1 %

Ácido acético.....1 %

Detergente.....0,1 %

- d) Swabs estéreis
- e) Pipetas estéreis.
- f) Padrão McFarland: 3
- g) Placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro desfibrinado.
- h) Jarras para anaerobiose + gerador de anaerobiose (Anaerogen-OXOID, Hampshire-Inglaterra) + indicadores de anaerobiose (OXOID, Hampshire-Inglaterra) ou Câmara de anaerobiose.

4.3 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.

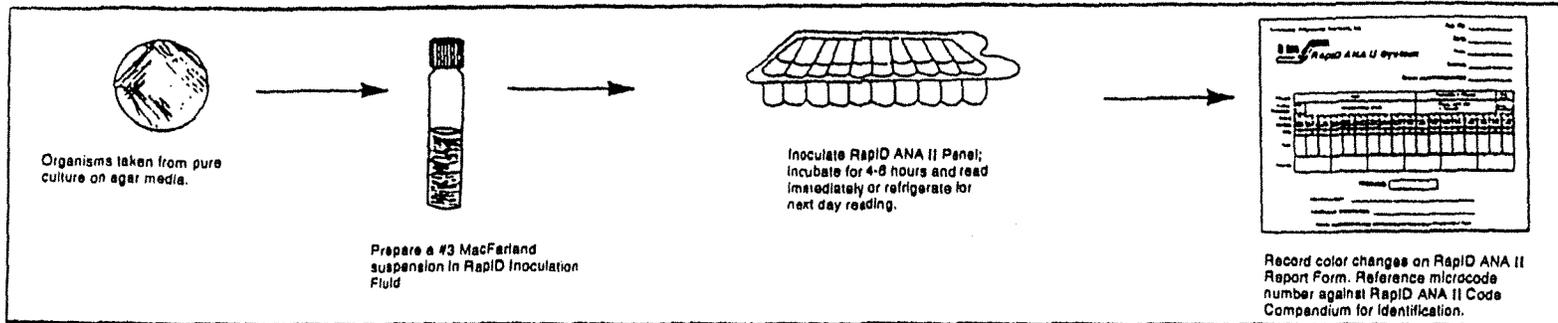
Um swab estéril é usado para inoculação das colônias bacterianas no fluido de inoculação RapID. A suspensão do microrganismo que será testado deve atingir no mínimo o equivalente ao padrão MacFarland 3 (uma suspensão com turbidez menor que o padrão MacFarland 3 pode comprometer o desenvolvimento do teste). 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.

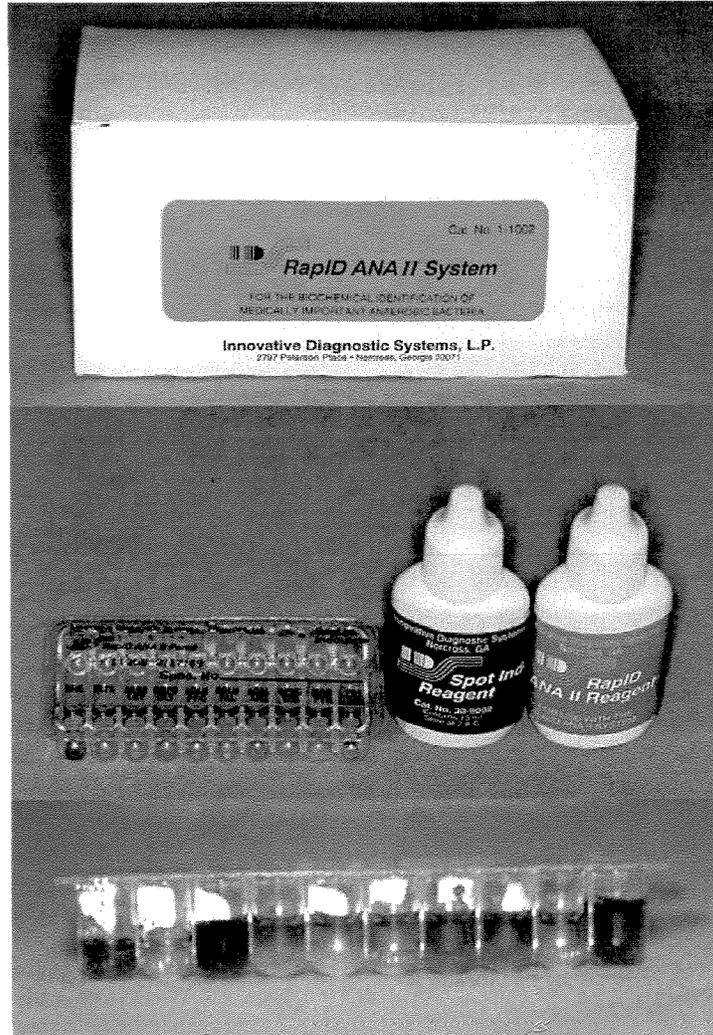
Ao adicionarmos os reagentes nas cavidades de teste específicas, obtém-se o segundo resultado, através da reação do reagente e observando-se a alteração de cor.

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



INTERPRETATION OF Rapid ANA II SYSTEM TESTS

Cavity No.	Test Code	Reagent	Reaction		Comment
			Positive	Negative	
BEFORE REAGENT ADDITION					
1	URE	None	Red or Purple	Yellow to orange	Shades of orange or reddish-orange should be scored as negative.
2	BLTS				
3	aARA				
4	ONPG				
5	aGLU	None	Medium or bright yellow	Clear, tan or very pale yellow	Only the development of a distinct yellow is a positive test. Pale yellow or a hint of yellow should be scored NEGATIVE .
6	BGLU				
7	aGAL				
8	aFUC				
9	NAG				
10	PO4				
AFTER REAGENT ADDITION					
3	LGY				
4	GLY				Allow at least 30 seconds but no more than 2 minutes for color development.
5	PRO	Rapid ANA II REAGENT	Purple, violet red or dark pink	Yellow, orange or pale pink	Only significant color development should be scored as positive. Pale shades of color should be scored as negative.
6	PAL				
7	ARG				
8	SER				
9	PYR				
10	IND	Innova Spot Indole Reagent	Blue or blue-green	Any other color	Any shade of blue or blue-green should be scored positive without regard to intensity.



Innovative Diagnostic Systems • Norcross, GA

Ref. No. _____



Rapid ANA II System

Date: _____

Tech: _____

Source: _____

Gram stain/Morphology: _____

Reagent Position Reactions*	Name										Rapid ANA II Reagent										Spot Indice Blue or Green
	Medium or bright yellow										Purple, violet, red or dark pink										
Cavity #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Test Code	URE	BLTS	APFA	ONPG	SCGL	HGLU	AGAL	AFUC	NAG	PMI	LYG	GLY	PHG	PGA	APB	SER	APR	INT			
Value	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Result	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Value total	0		2			2			3		0			4							

Microcode: _____

Identification: Prevotella intermedia

Figura A V4- Kit Rap ID ANA II System

5. RapID NH

5.1 Descrição:

O sistema RapID NH (# 1-1001), é um método miniaturizado qualitativo empregado para identificação de espécies clinicamente significantes de *Neisseria* e *Haemophilus*, *Eikenella* e *Actinobacillus*, através de substratos convencional e cromogênico.

Cada “kit” consiste de 20 recipientes para testes de RapID NH, blocos de anotações para os resultados e um manual de instruções.

O recipiente para teste do RapID NH contém 10 cavidades para reações (com enzimas desidratadas), que proporciona 12 “scores” para os testes, e se necessário, um décimo terceiro “score” dew teste (NO₂). As cavidades de teste 8, 9 e 10 são bifuncionais contendo 2 testes diferentes na mesma cavidade. O primeiro teste é obtido sem adição do reagente, fornecendo o primeiro resultado. Na mesma cavidade é adicionado o reagente que fornece o segundo resultado. Os testes bifuncionais são distintos e não necessariamente relatados.

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 da colônia, 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 o 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.

5.2 Materiais:

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

KCl.....7,5g

CaCl₂.....0,5g

Água deionizada.....1000 mL

PH: 7,5-9,5.

b) 1 frasco contendo 15 mL de reagente Innova Spot Indole (#30-9002).

c) 1 frasco contendo 15 mL de reagente Innova Nitrate Reagent A (#30-9003).

d) 1 frasco contendo 15 mL de reagente Innova Nitrate Reagent B (#30-9004).

e) Swabs estéreis.

f) Placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro desfibrinado.

5.3 Procedimentos para identificação:

Os organismos são subcultivados em placas de agar (Columbia) com 5% de sangue de cavalo por 18-24 horas a 37°C. A pureza da cultura é primariamente checada pela morfologia da colônia, coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Um swab de algodão estéril é usado para inocular as colônias bacterianas no RapID Inoculation Fluid, até obter-se uma suspensão leitosa com turbidez equivalente ao McFarland 3 (suspensões preparadas com turbidez inferior ao McFarland 3 podem comprometer o resultado do teste). A suspensão é agitada no Vortex, devendo ser utilizada dentro de 15 minutos.

A tampa da cartela é aberta para que seja feita a inoculação bacteriana. Uma pipeta estéril é usada para transferir todo o inóculo preparado (RapID Inoculation Fluid + bactérias) para a cartela que contém as enzimas reagentes. O inóculo é depositado na cúpula do canto superior direito. A cartela é fechada novamente e inclinada para o lado de forma que o inóculo seja distribuído uniformemente por todas as cúpulas. A cartela é em seguida inclinada cerca de 45° para o lado oposto fazendo com que a suspensão bacteriana escoe para as cavidades que contêm as enzimas reagentes. Volta-se a cartela a sua posição horizontal. A cartela é então incubada em aerobiose a 37°C por 4 horas.

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

O segundo resultado é obtido após a adição dos reagentes.

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

5.4 Quadro de interpretação do RapID NH

INTERPRETATION OF RapID PANEL TESTS

Cavity No.	Test Code	Reagent	REACTION		Comments
			Positive	Negative	
BEFORE REAGENT ADDITION:					
1	PRO	None	Yellow	Clear or Tan	Any development of a YELLOW color should be scored POSITIVE
2	GGT				
3	ONPG				
4	GLU	None	Yellow or yellow orange	Red or orange	Only a YELLOW or yellow orange color is POSITIVE Red or dark orange is negative test
5	SUC				
6	EST	None	Yellow or yellow orange	Red or orange	The development of a YELLOW or YELLOW-ORANGE color throughout the well should be scored POSITIVE. A red layer may form on the top of the well. Gently shake the panel to mix and score as outlined.
7	RLS	None	Pink	Purple, blue or violet	ONLY the development of a significant PINK color is a POSITIVE test
8	PO4	None	Yellow	Clear, tan, or very pale yellow	Only the development of a significant YELLOW color should be scored POSITIVE
9	ORN	None	Red	Yellow or orange	Only the development of a RED color should be scored as POSITIVE
10	URE	None	Red or reddish violet	Yellow or light orange	Only the development of a RED color should be scored as POSITIVE.
AFTER REAGENT ADDITION:					
Allow at least 1 minute, but no more than 5 minutes for color development. Prolonged standing of tests after reagent addition may lead to color development in negative test cavities.					
8	NO ₂	Nitrate A Reagent Nitrate B Reagent	Clear or straw	Red or pink	ANY development of a RED or PINK color is a NEGATIVE test
9	NO ₃	Nitrate A Reagent Nitrate B Reagent	Red or orange	Yellow	ANY development of a RED or ORANGE color is a POSITIVE test
10	IND	Spot Indole Reagent	Brown, black or darkening	Orange or red	ANY development of a BROWN or BLACK is a POSITIVE test



Figura A V5- Rap ID NH



Comissão de Ética na Experimentação Animal
Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 046 - 21, sobre "Estudo microbiológico e histopatológico da Infecção pulpar proveniente da Bolsa Periodontal em cães" sob a responsabilidade de Cícero Romão Badi Neto

..... 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 06/08/1999. Este certificado expira em 06/08/2000

CERTIFICATE

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

..... agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Biological Institute/UNICAMP Ethical Committee for Animal Research (CEEA) in/...../.....

Expiration date/...../.....

Alba R. M. Souza Berto
Alba R. M. Souza Berto
Prof(a) Dr(a)
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Campinas, 06 de 8 de 1999
Armando Ferreira Lima Filho
Armando Ferreira Lima Filho
Prof(a) Dr(a)
Secretário(a) - CEEA/IB/UNICAMP