

CRISTIANE TOMAZ ROCHA

*MEV - Biofilme apical em dentes decíduos de humanos, com e sem vitalidade pulpar*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Odontopediatria.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcos A. Rossi

Ribeirão Preto-SP  
2007

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Rocha, Cristiane Tomaz

MEV – Biofilme apical em dentes decíduos de humanos, com e sem vitalidade pulpar. Ribeirão Preto, 2007.

62 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Odontopediatria.

Orientador: Rossi, Marcos Antonio.

1. Biofilme apical. 2. Dentes decíduos. 3. Lesão periapical. 4. Microrganismos. 5. Infecção extra-radicular

CRISTIANE TOMAZ ROCHA

***MEV - Biofilme apical em dentes decíduos de humanos, com e sem vitalidade pulpar***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Odontopediatria.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **DADOS CURRICULARES**

### ***CRISTIANE TOMAZ ROCHA***

Nascimento	02 de dezembro de 1979 – Fortaleza/CE
Filiação	Ronaldo Martins Rocha Maria Josiane Tomaz Rocha
2000-2004	Curso de Graduação Universidade Federal do Ceará - UFC
2005-2007	Especialização em Odontopediatria Associação Odontológica de Ribeirão Preto - AORP
2006	Curso de Aperfeiçoamento no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP
2006	Curso de Aperfeiçoamento no Atendimento Odontológico a Bebês Normais e Especiais Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP
2005-2007	Curso de Pós-graduação (Mestrado) em Odontologia Área de Concentração: Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP

## OFEREÇO ESTE TRABALHO

*A Deus,*

*por ter me guiado nos momentos em que minha cabeça não tinha razão. Por ter me iluminado quando eu me sentia só. Por ter me protegido quando eu estive longe de casa. Obrigado por ouvir as minhas preces. Obrigado por ter me concedido força e determinação para a concretização deste sonho. Sei que, em muitos momentos, me tomou em seus braços e que a vitória hoje alcançada me faz testemunha de Sua presença em minha vida.*

## DEDICO ESTE TRABALHO,

Aos meus pais, *Ronaldo Martins Rocha* e *Maria Josiane Tomaz Rocha*, pelo apoio incondicional, confiança e todo esforço que sempre dispensaram em prol de minha educação. Agradeço as oportunidades dadas para percorrer meu caminho, abrindo mão de seus sonhos para realizarem os meus. Obrigada, meus pais, pelo sonho que realizo neste dia. Sei que a cada vitória que esta carreira me proporcionar, vocês estarão por trás dela, como estiveram em cada momento da minha vida.

Aos meus irmãos, *Ronaldo Martins Rocha Filho* e *Ticiane Tomaz Rocha*, pois longe do convívio diário com vocês, aprendi que ser irmão é muito mais do que viver sob o mesmo teto, mas sim amar, mesmo que de longe.

À minha querida avó, senão a "segunda mãe", *Ana Teles de Menezes Tomaz* ou simplesmente *Anete* (*in memoriam*), por ter me criado desde pequena e ter me ensinado muitas coisas que jamais serão esquecidas. Em qualquer lugar que a senhora esteja, sei que reza por mim e torce a cada vitória. Meu amor é recíproco e minha saudade é imensurável. Obrigada por ter feito parte da minha vida! Neste momento, também não poderia esquecer da "voinha"!

Aos meus avós, *Joaquim Arnóbio Tomaz* e *Ivone Dias Rocha*, que ainda presenciaram todos os meus passos e que sempre desejaram que eu me tornasse uma pessoa cada vez melhor, profissional e pessoalmente falando. Na ausência de meus pais, vocês foram peças fundamentais no meu aprendizado! Obrigada!

"Não há nada que não se consiga com a força de vontade, a bondade e, principalmente,  
com o amor".

Marcus Cícero

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador *Prof. Dr. Marcos A. Rossi*, pela sua disponibilidade e pelo conhecimento científico dispensado a este trabalho. Foi uma honra ter sido orientada por um professor de imensurável competência e enorme dedicação à pesquisa científica. Professores como o senhor nos incentivam a almejar uma melhor carreira profissional. Ao senhor, minha admiração e eterna gratidão!

À *Profª. Dra. Lêa Assed Bezerra da Silva*, exemplo de dedicação à Odontopediatria. Pela valiosa participação neste trabalho. Meus profundos agradecimentos são destinados à excelente profissional e pesquisadora que a senhora representa. Obrigada por compreender minha ansiedade em alguns momentos em virtude da saudade de casa. Obrigada, ainda, por me incentivar a escolher os caminhos certos, me apoiar nas minhas decisões profissionais e por me mostrar que nada é impossível desde que se tenha vontade de conseguir. Meu enorme agradecimento nunca será totalmente expresso por meio de palavras. Obrigada por tudo!

Ao *Prof. Dr. Mário Roberto Leonardo*, grande nome na Endodontia nacional e internacional. Professor digno de muita admiração. Sua incansável dedicação à pesquisa me incentivou nos meus primeiros passos na vida acadêmica.

À *Profª. Dra. Izabel Yoko Ito*, pela valiosa contribuição dada a este trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos e pela dedicação a Pós-Graduação!

Ao *Prof. Dr. Paulo Nelson Filho*. Professor exemplar. Pesquisador competente. Seus ensinamentos ficarão marcados em minha memória. Tento, a cada dia que passa, ser um pouco mais de você. Todas as suas orientações foram essenciais e contribuíram na minha formação profissional. Foi um privilégio conviver todos estes dias e compartilhar grandes momentos de sabedoria e aprendizado. Obrigada por acreditar em minhas possibilidades e entender minhas dificuldades. Ao senhor, minha eterna gratidão e respeito!

Ao *Prof. Dr. Lenaldo Branco Rocha*, pela inestimável colaboração no desenvolvimento deste trabalho. Pela disponibilidade, atenção e paciência. Meus sinceros agradecimentos.

À *Profª. Dra. Anna Galganny Fernandes Almeida*, por despertar em mim o desejo de engrandecimento profissional, me incentivando a realizar uma pós-graduação. Obrigada por me ensinar que as dificuldades podem ser transformadas em conquistas e realizações.

À grande amiga *Ivna Fernandes Queiroz*, pelo grande incentivo a ingressar neste curso de mestrado e por tantos outros que não caberiam neste agradecimento. Nossa estadia em Ribeirão Preto provou que nossa amizade é verdadeira e eterna! Sua responsabilidade e determinação, ao morar sozinha em outra cidade, serviram de exemplo para mim! Agradecer é muito pouco diante do que você fez e faz por mim! Amiga, te adoro!

À mais nova amiga *Patrícia Motta Fernandes* por me apoiar no dia-a-dia e dividir as angústias e as alegrias, fazendo com que a convivência diária ajudasse a suportar a saudade de casa. Não sei como agradecer toda a sua compreensão diante das minhas dificuldades e aflições. Obrigada por sorrir comigo nos momentos alegres e chorar nos difíceis. Esse trabalho é fruto de nossa amizade e companheirismo. Ao retornar para casa, terei saudades de você!



## MEUS AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa de sua Diretora, *Profª. Dra. Maria Semprini* e da Vice-Diretora *Profª. Dra. Saça Assed*.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da coordenadora *Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva* e do Vice-Coordenador *Prof. Dr. Paulo Nelson Filho*, por terem me concedido a oportunidade para trilhar o início da minha carreira neste conceituado Programa de Pós-graduação.

Aos docentes do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, *Prof. Dr. Adilson Thomazinho*, *Profª. Dra. Aldevina Campos de Freitas*, *Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira*, *Profª. Dra. Kranya Victória D'áz Serrano*, *Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva*, *Profª. Dra. Saça Assed*, *Prof. Dr. Mário Roberto Leonardo*, *Profª. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuaní*, *Profª. Dra. Maria Conceição Pereira Saraiva*, *Profª. Dra. Maria Cristina Borsatto*, *Profª. Dra. Míriam Aiko Nakane Matsumoto*, *Profª. Alexandra Mussolino de Queiroz*, pela atenção, orientação e ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *Fátima Aparecida Jacinto Daniel*, *Marco Antônio dos Santos*, *Nilva Aparecida Afonso Ruggiero*, *Cleber Barbosa Rita*, *Vera Ribeiro do Nascimento*, *José Aparecido Neves do Nascimento* e *Carmo Eurípedes Terra Barreto* pelo carinho e atenção dispensada.

Aos funcionários do "Centro de Formação de Recursos Humanos Especializados no Atendimento Odontológico de Pacientes Especiais", *Benedita Viana Rodrigues*, *Fátima Rizóli*, *Naçir Felício* e *Renata Aparecida Fernandes Rodrigues*, pelo carinho e atenção constante.

À secretária *Rejane Gomes Cavalheiro de Mazer* pelo carinho, atenção e paciência em todos os momentos.

Às funcionárias do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, *Mônica Azevedo de Abreu* e *Lígia Baroza Santoro*, pela disposição na execução da parte experimental deste trabalho.

À *Profª. Alexandra Mussolino de Queiroz*, por me orientar em muitos trabalhos e por proporcionar uma agradável convivência. Obrigada por ser mais amiga que professora!

À *Carolina Paes Torres*, *Raquel Assed Bezerra da Silva* e *Gisele Faria*, por terem me ajudado em muitos momentos. Obrigada por toda compreensão e carinho!

À *Isabel Cristina Galino Sola* e à *Regiane Cristina Moi Sacilotto*, funcionárias da Seção de Pós-graduação por toda dedicação nesta minha caminhada.

Às minhas amigas, *Caroline Gadelha Cavalcanti*, *Anna Karine Teixeira*, *Brenda Fontenele*, *Beatriz Bezerra*, *Beatriz Neves*, *Manuela Almeida*, *Cristiane Fõnseca*, *Rafaelly Cabral*, *Luciana Waki*, *Denise Carvalho* e *Keliny Teixeira*, que mesmo distantes me apoiaram na decisão e no decorrer do mestrado. Nada teria conseguido se não fosse pela amizade de vocês!

Aos amigos conterrâneos, *Paula Araújo*, *Melina Frota*, *Clarissa Carvalho*, *Maximiliano Porto*, *Rômulo Rocha* e *Celso Lopes*, que vivenciaram de perto todo o desenvolvimento deste trabalho, compreendendo minhas fraquezas diante dos obstáculos e me ajudando a contorná-los. Os almoços de domingo foram essenciais para lembrarmos a nossa querida terra natal!

Às colegas de mestrado *Iza Teixeira Alves Peixoto, Thaís Helena Andreolli do Amaral, Jaciara Gomes Miranda Silva, Carolina de Souza Guerra, Christiane Ristum Bagatin Rossi, Maria Stella Gaspar Gomes Raffaini, Regina Aparecida Segato Saiani, Soraya Dibb Sheyer Gonçalves, Patrícia Maria Monteiro e Patrícia Motta Fernandes*, pela amizade, convivência e experiências compartilhadas no decorrer do curso de Pós-Graduação, tornando essa jornada agradável e produtiva.

Aos alunos do doutorado *Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva, Alexandra Mussolino de Queiroz, Raquel Assed Bezerra da Silva, Soraya Monique Fioratti Aguiar, Marta Estela Saravia, Valéria Pontelli Navarro, Sara Elisa Matar e Maria Angélica Hueb* por também proporcionarem uma convivência agradável.

A mais recente amiga *Tajana Dias*, por ter me dado muita força para a finalização deste curso e pela sua preciosa amizade.

Ao *Júlio César de Matos, Cláudia Regina Côrrea de Matos e Rosemary Alves*, pela diagramação e impressão deste trabalho.

Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio financeiro.

A todas as pessoas que, de algum modo, contribuíram para a concretização deste trabalho.

## RESUMO

ROCHA, CT. MEV - Biofilme apical em dentes decíduos de humanos, com e sem vitalidade pulpar. Ribeirão Preto, 2007. 62 p. Dissertação [Mestrado] - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), a presença de microrganismos sob a forma de biofilme na região do ápice radicular de dentes decíduos de humanos, com diferentes graus de patologia pulpar e periapical. Dezoito dentes foram selecionados em três situações clínicas específicas: dentes decíduos portadores de vitalidade pulpar (Grupo I), portadores de necrose pulpar sem lesão periapical visível radiograficamente (Grupo II) e portadores de necrose pulpar e nítida lesão periapical visível radiograficamente (Grupo III). Após exodontia, os dentes foram lavados com solução salina e imersos em solução de tripsina a 0,03 g/mL por 20 minutos. A seguir, foram lavados com solução tampão de cacodilato de sódio a 0,1M e armazenados em solução de Karnovsky modificada. Após cinco dias, os dentes foram seccionados e desidratados em soluções crescentes de etanol e submetidos à secagem no ponto crítico, fixados em "stubs" e metalizados para análise em MEV. Nos dentes do Grupo I e II, a superfície radicular estava recoberta por fibras colágenas, sem a presença de bactérias, em 100% das amostras. Nos dentes portadores de necrose pulpar e nítida lesão periapical visível radiograficamente (Grupo III), o ápice radicular apresentava ausência de fibras e presença de áreas de reabsorção com microrganismos em seu interior, representados predominantemente por cocos e bacilos, porém filamentosos e espiroquetas também foram observados, em 100% dos casos. Assim, observou-se que houve a presença de microrganismos sob a forma de biofilme apical na região do ápice radicular apenas nos dentes decíduos portadores de necrose pulpar e nítida lesão periapical visível radiograficamente.

**Palavras-chave:** biofilme apical, dentes decíduos, lesão periapical, microrganismos, infecção extra-radicular

## **ABSTRACT**

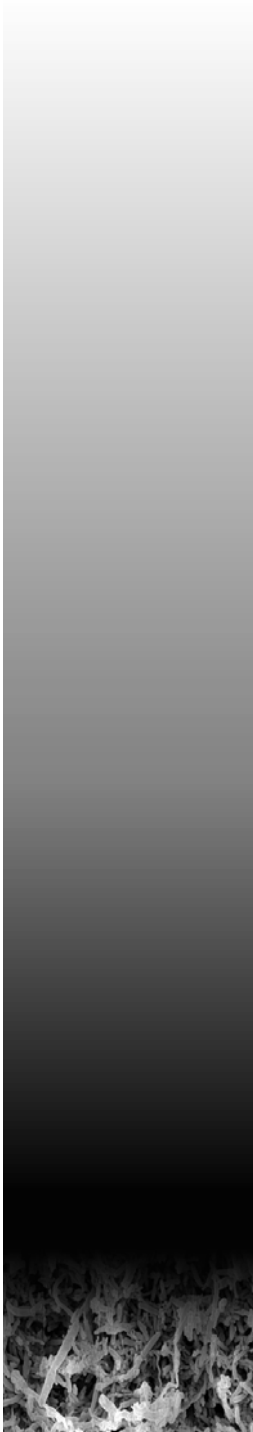
ROCHA, CT. Scanning electron microscopic study of apical biofilm in vital and non-vital human primary teeth. Ribeirão Preto, 2007. 62 p. Dissertação [Mestrado] - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

The purpose of this study was to evaluate, by scanning electron microscopy (SEM), the presence of microorganisms organized as biofilms in the apical root third of vital and nonvital human primary teeth. Eighteen teeth were selected in three clinical situations: Group I - pulp vitality, Group II - pulp necrosis without periapical lesion and Group III - pulp necrosis with well defined radiographically visible periapical lesion. After extraction, the teeth were washed with saline and immersed in 0.03 g/mL trypsin solution during 20 minutes. Next, the teeth were washed in 0,1M sodium cacodilate buffer and stored in receptacles containing modified Karnovsky solution. After 5 days, the teeth were sectioned, dehydrated in an ethanol series, critical-point dried with CO<sub>2</sub>, sputter-coated with gold and examined by SEM. The results showed that in the teeth of Groups I and II, the root surface was covered by collagen fibers, without the presence of bacteria in all specimens (100%). In the teeth with pulp necrosis with well defined radiographically visible periapical lesion (Group III), the root apex showed no collagen fibers and presence of resorption areas containing microorganisms (cocci, bacilli, filaments and spirochetes) in all cases (100%). The presence of microorganisms organized as biofilms was detected only in the primary teeth with pulp necrosis and radiographically visible periapical lesion.

**Key words:** apical biofilm, primary teeth, apical periodontitis, microorganisms, extraradicular infection

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO</b>	<b>20</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>22</b>
3.1 Seleção da amostras	23
3.2 Preparo das amostras	25
3.3 Processamento para Microscopia Eletrônica de Varredura	28
3.4 Análise das amostras	30
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>31</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>42</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO</b>	
<b>APÊNDICE</b>	



# ***1 Introdução***

## 1 INTRODUÇÃO

O importante papel dos microrganismos na patogênese das alterações pulpares e periapicais, em dentes permanentes de animais experimentais e de humanos, tem sido amplamente descrito na literatura (Takehashi et al., 1965; Möller et al., 1981; Fabricius et al., 1982a; Fabricius et al., 1982b; Sjögren et al., 1990; Lin et al., 1991; Kiryu et al., 1994; Tani-Ishii et al., 1994; Nair, 1997; Möller et al., 2004; Lin et al., 2006; Fabricius et al., 2006; Sabeti et al., 2006).

A microbiota responsável pela contaminação e necrose do tecido pulpar é oriunda da lesão de cárie ou da saliva (Consolaro, 2005). Evidências sobre a dinâmica da infecção do canal radicular mostram que mecanismos seletivos ocorrem, na qual certas espécies bacterianas sobrevivem e se multiplicam mais facilmente que outras, devido à disponibilidade de nutrientes, baixa tensão de oxigênio e interações microbianas, constituindo um ambiente propício à proliferação das mesmas (Fabricius et al., 1982b; Sundqvist, 1992), principalmente de anaeróbios (Möller et al., 1981; Fabricius et al., 1982b; Sundqvist et al., 1989; Baumgartner e Falker, 1991; Sundqvist, 1992; Gomes et al., 1994; Assed et al., 1996; Peters et al., 2002).

Com a progressão da infecção no tecido pulpar, estes microrganismos, seus produtos e sub-produtos, que inicialmente se localizavam apenas na luz do canal radicular, invadem o sistema de canais radiculares, isto é, túbulos dentinários (Shovelton, 1964; Akpata e Blechman, 1982; Haapasalo e Orstavik, 1987; Safavi et al., 1990; Orstavik e Haapasalo, 1990; Perez et al., 1993; Sen et al., 1995; Siqueira et al., 1996; Peters et al., 2001; Matsuo et al., 2003), canais



laterais, acessórios, secundários, ramificações do delta apical, forame apical e superfície do cimento radicular apical (Leonardo et al., 2002; Leonardo 2005), bem como os tecidos periapicais, em virtude da sua íntima relação com esta região (Block et al., 1976; Pitt-Ford, 1982; Bergenholtz et al., 1983; Byström et al., 1987; Nair et al., 1990), levando à instalação da lesão periapical. Esta infecção periapical é conhecida como infecção extra-radicular, localizada em uma área considerada inacessível ao preparo biomecânico e à ação do curativo de demora, permitindo que os microrganismos possam persistir e se multiplicar mesmo após o tratamento endodôntico convencional (Noiri et al., 2002; Ferreira et al., 2004; Noguchi et al., 2005). Esse fato explica a ocorrência dos menores índices de sucesso pós-tratamento nos dentes com necrose pulpar e lesão periapical crônica (Haapasalo et al., 1983; Byström et al., 1987; Tronstad et al., 1987; Nair et al., 1990; Sjögren et al., 1990; Tronstad et al., 1990a; Tronstad et al., 1990b; Reader et al., 1994; Sjögren et al., 1997; Noiri et al., 2002; Ferreira et al., 2004; Leonardo, 2005; Noguchi et al., 2005; Fabricius et al., 2006).

Outro importante fator responsável pela manutenção da inflamação e infecção dos tecidos apicais e periapicais em dentes permanentes é a presença de microrganismos protegidos por uma matriz de consistência gelatinosa ou matriz extracelular, formando o biofilme apical (Tronstad et al., 1990a; Tronstad et al., 1990b; Lomçali et al., 1996; Gutiérrez et al., 1999; Siqueira e Lopes, 2001; Leonardo et al., 2002; Noiri et al., 2002; Ferreira et al., 2004; Noguchi et al., 2005), o qual constitui uma barreira mecânica contra a ação de substâncias antimicrobianas e dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Costerton et al., 1999), permitindo a sobrevivência e o crescimento destes microrganismos nestas

áreas. Segundo Costerton e Lashen (1984), o biofilme é definido como produto do crescimento natural das bactérias em superfícies sólidas, em ecossistemas que contém líquido, podendo ser formado em todo o sistema de canal radicular, inclusive nas lacunas de reabsorção do cimento, que servem como nichos para a colonização bacteriana em sítios extra-radulares (Tronstad et al., 1990a; Lomçali et al., 1996; Gutiérrez et al., 1999; Ferreira et al., 2004).

A presença de bactérias sob forma de biofilme apical anteriormente foi associada somente aos casos de lesões refratárias ao tratamento endodôntico (Wayman et al., 1992; Nair et al., 1990; Haapasalo et al., 1987; Tronstad et al., 1987; Byström et al. 1987; Tronstad et al., 1990a; Noiri et al., 2002; Ferreira et al., 2004; Noguchi et al., 2005). Entretanto, sabe-se que o biofilme apical também está presente nos dentes com necrose pulpar e lesão periapical que não foram submetidos ao tratamento endodôntico, particularmente nos casos de infecções de longa duração (Lomçali et al., 1996; Siqueira e Lopes, 2001; Leonardo et al., 2002). Assim, a persistência de infecções endodônticas posteriormente ao tratamento endodôntico são altamente justificadas pela permanência deste biofilme (Tronstad et al., 1987; Nair et al., 1990; Tronstad et al., 1990a; Tronstad et al., 1990b; Gutiérrez et al., 1999; Noiri et al., 2002; Ferreira et al., 2004; Noguchi et al., 2005).

Por meio da microscopia eletrônica de varredura, vários autores avaliaram a presença do biofilme em ápices radulares de dentes permanentes (Tronstad et al., 1990a; Tronstad et al., 1990b; Lomçali et al., 1996; Gutiérrez et al., 1999; Siqueira e Lopes, 2001; Leonardo et al., 2002; Ferreira et al., 2004).

Entretanto, apesar da literatura relativa à avaliação da microbiota de canais radiculares com necrose pulpar e lesão periapical ser vasta com relação aos dentes permanentes, as pesquisas a esse respeito, em dentes decíduos, são escassas (Cohen et al., 1960; Marsh e Largent, 1967; Hobson, 1970; Tomic-Karovic e Jelinek, 1971; Brook et al., 1981; Toyoshima et al., 1988; Sato et al., 1993; Godoy, 1999; Souza-Gugelmin et al., 2001; Pazelli et al., 2003; Onçag et al., 2003; Silva et al., 2006; Matoba-Júnior, 2006; Ruvierre et al., 2007). É importante salientar que resultados de estudos efetuados pela técnica da cultura microbiológica e pela técnica "Checkerboard DNA-DNA hybridization" apontam que a microbiota endodôntica, em ambas as dentições, é semelhante (Pazelli et al., 2003; Silva et al., 2006; Matoba-Júnior, 2006; Ruvierre et al., 2007).

Todavia, estes estudos não contêm informações suficientes com relação aos padrões da colonização bacteriana na infecção extra-radicular, que é um conhecimento de fundamental importância para a terapêutica medicamentosa nesses casos (Siqueira et al., 2002). Segundo Molven et al. (1991) e Sen et al. (1995), a microscopia eletrônica de varredura tem sido considerada o método mais apropriado para avaliar estes padrões de colonização.

Deve-se enfatizar que os microrganismos desempenham um papel fundamental na progressão das lesões periapicais em dentes decíduos (Cohen et al., 1960; Edwards e Nord, 1972; Hobson, 1970; Brook et al., 1981; Toyoshima et al., 1988), devido à presença de amplos espaços medulares no tecido ósseo da criança, que favorecem a disseminação microbiana. Além disso, a persistência de infecção na região do periápice de dentes decíduos se torna crítica, devido à proximidade com o germe do dente permanente sucessor em desenvolvimento,

podendo provocar interferências em sua formação (Fanning, 1962; Binns e Escobar, 1967; Kaplan et al., 1967; Jerrel, 1982; Toyoshima et al., 1988; Yamaka et al., 2002; Cordeiro e Rocha, 2005). Outro aspecto que difere dos dentes permanentes é a ocorrência do processo de reabsorção fisiológica (rizólise) nos dentes decíduos, o qual ocasiona irregularidades na superfície radicular, permitindo o acúmulo de microrganismos nesta área (Godoy, 1999).

Em função do número limitado de estudos avaliando a infecção extraradicular em dentes decíduos e da freqüente necessidade de tratamento endodôntico radical nestes dentes na prática clínica, é de fundamental importância que pesquisas sejam realizadas no intuito de avaliar a região apical de dentes decíduos, com diferentes graus de patologia pulpar e periapical.

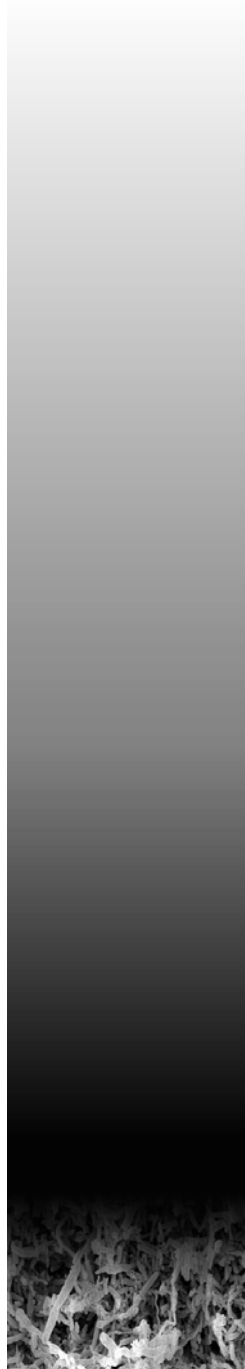


## ***2 Proposição***

## **2 PROPOSIÇÃO**

O objetivo do presente trabalho foi avaliar, por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), a região do ápice radicular de dentes decíduos de humanos com relação à presença ou não de microrganismos sob a forma de biofilme (infecção extra-radicular), em três situações clínicas específicas:

- Dentes decíduos portadores de vitalidade pulpar;
- Dentes decíduos portadores de necrose pulpar, sem lesão periapical visível radiograficamente; e
- Dentes decíduos portadores de necrose pulpar e nítida lesão periapical crônica visível radiograficamente.



## ***3 Material e Método***

### **3 MATERIAL E MÉTODO**

#### **3.1 Seleção das Amostras**

Inicialmente, o projeto foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo de nº 2006.1.1311.58.9 – Anexo A), tendo sido aprovado.

Participaram da pesquisa pacientes de ambos os sexos, com faixa etária entre 4 e 8 anos de idade, com boa saúde geral, que compareceram à Clínica de Odontopediatria do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, para tratamento odontológico, e que não tinham sido submetidos à antibioticoterapia há pelo menos 3 meses.

Os responsáveis pelos pacientes foram informados a respeito do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, confirmando a participação de seus filhos na pesquisa.

Dentes decíduos com indicação de exodontia (incisivos centrais e laterais, primeiros e segundos molares, superiores e inferiores), sem nenhum tratamento prévio, com coroa extensamente destruída em função da cárie dental, sem a possibilidade de tratamento restaurador ou dentes hígidos com retenção prolongada na cavidade bucal foram incluídos no estudo. Para a seleção dos dentes, foi realizada a anamnese, exame clínico e exame radiográfico, tendo como base a ficha da disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP.



Foram selecionados dentes com necrose pulpar, sem e com lesão periapical visível radiograficamente, que apresentavam exposição pulpar por cárie, presença ou ausência de fístula e menos de 2/3 de rizólise. Também, os dentes não poderiam apresentar profundidade de sondagem periodontal superior a 3mm. Ao exame radiográfico periapical, nos dentes portadores de lesão deveriam ser observadas áreas radiolúcidas definidas na região periapical (lesão periapical crônica).

Os dentes com vitalidade pulpar, comprovada após testes de sensibilidade, apresentaram coroa íntegra e raízes com menos de 2/3 de rizólise, ausência de mobilidade, ausência de fístula, profundidade de sondagem periodontal menor que 3mm, espaço do ligamento periodontal normal e integridade da lâmina dura.

Para a realização do exame radiográfico, foram utilizados filmes periapicais Ultraspeed (Eastman Kodak Comp. - Rochester - NY - USA) de tamanho 0 ou 2, conforme a idade da criança, e aparelho de Rx (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP) com 70KVp e 10mA. O tempo de exposição utilizado foi de 0,6 segundos. As radiografias foram reveladas e arquivadas em cartelas plásticas.

Após a anti-sepsia da cavidade bucal com 10,0 mL de solução de gluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard - Colgate/Palmolive Ind. Brasileira - Osasco - SP), sob a forma de bochecho por 1 minuto, foi realizada a anestesia local com Mepivacaína a 2% (DFL Ind. e Comércio Ltda - Rio de Janeiro). A seguir, foi efetuado o descolamento dos dentes com espátula 7 ou Hollenback, luxação e extração com elevadores ou fórceps. Na dependência da necessidade, a região foi ou não suturada.

A tabela 1 apresenta a distribuição dos diferentes grupos experimentais e o número de amostras.

**Tabela 1** - Distribuição dos grupos experimentais

Grupos	Diagnóstico	Número de Amostras
I	Dentes decíduos portadores de vitalidade pulpar	5
II	Dentes decíduos portadores de necrose pulpar sem lesão periapical visível radiograficamente	7
III	Dentes decíduos portadores de necrose pulpar e nítida lesão periapical visível radiograficamente	6

### 3.2 Preparo das amostras

Após a obtenção dos espécimes, as superfícies radiculares foram cuidadosamente lavadas com solução de cloreto de sódio a 0,9% esterilizada. Cuidados foram tomados com o objetivo de não ocasionar danos à superfície radicular. Nos casos onde havia lesão periapical aderida à superfície radicular, a mesma foi removida com auxílio de lâmina de bisturi, com o cuidado de não afetar a superfície radicular.

Em seguida, os dentes foram colocados, durante 20 minutos, em recipientes de vidro esterilizados contendo 0,15g de tripsina (tipo T7409 de 10g, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) (Figura 1A), pesada em balança eletrônica de alta precisão (Bioprecisa FA2104N, Curitiba, PR, Brasil) (Figura 1B) e diluída em 5,0mL de água destilada, obtendo-se uma concentração de 0,03g/mL (Figura 1C). Posteriormente, os dentes foram lavados em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1M (Figura 1D) e colocados em recipientes individualizados contendo solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído a 8%, paraformaldeído a 12%,

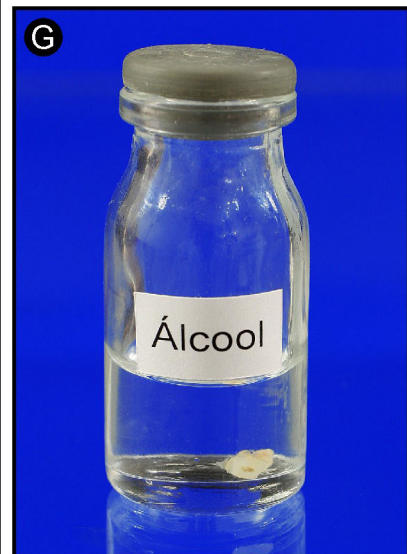
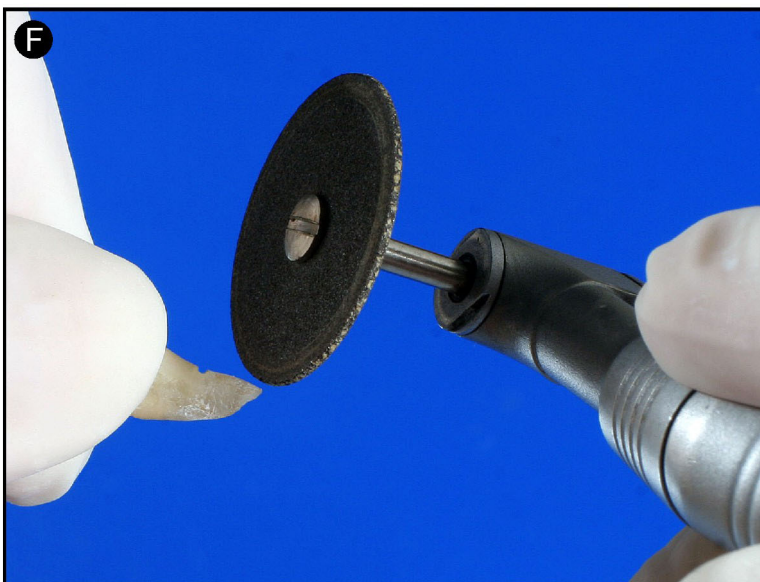
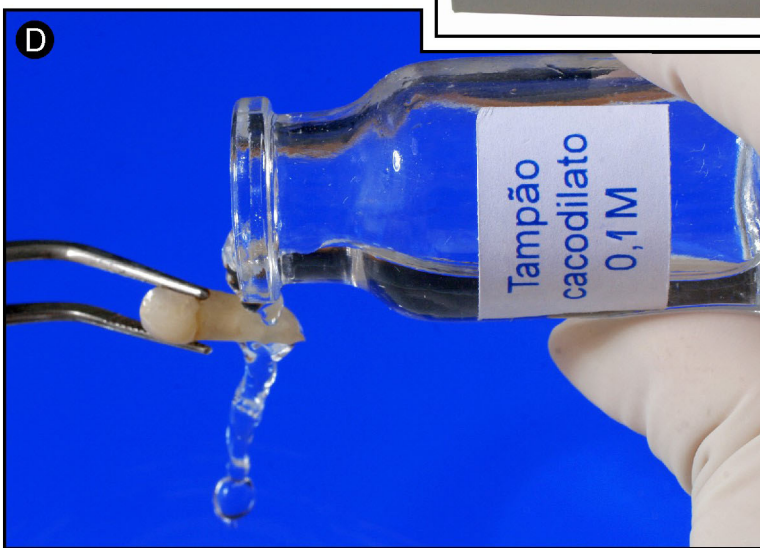
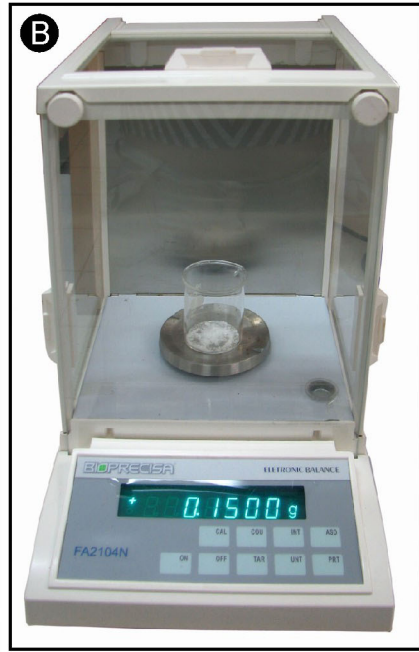
cacodilato de sódio 0,2M pH 7,2-7,4) para fixação, por um período mínimo de 5 dias (Figura 1E).

Decorrido esse período, com o auxílio de um disco de carborundum acionado em baixa rotação, foi efetuado um sulco perpendicular ao sentido do longo eixo da raiz, a uma distância de 3mm do ápice radicular (Figura 1F), o qual serviu de guia para a introdução de um cinzel cirúrgico que, com o auxílio de um martelo cirúrgico, promoveu a secção do remanescente radicular, destacando-se a porção apical. Essas manobras foram efetuadas em câmara de fluxo laminar, com o cuidado de não afetar a porção radicular apical.

No caso dos molares, a raiz menos acometida pelo processo de rizólise foi escolhida para análise, satisfazendo os critérios de inclusão previamente estabelecidos.

### **Figura 1 – Preparo dos dentes**

- A.** Frasco de tripsina (Sigma–Aldrich).
- B.** Balança de alta precisão (Bioprecisa) empregada para pesar 0,15g da tripsina para o preparo da solução.
- C.** Dentes imersos em recipientes de vidro contendo 0,15g de tripsina adicionada a 5mL de água destilada, resultando numa concentração de 0,03g/mL.
- D.** Lavagem do espécime com solução tampão de cacodilato a 0,1M.
- E.** Fixação dos espécimes em solução de Karnovsky modificada.
- F.** Confecção de sulco a 3mm do ápice radicular com disco de carborundum e motor de baixa rotação.
- G.** Desidratação dos ápices radiculares em soluções crescentes de álcool a 70, 95 e 100%, realizando quatro trocas de cada solução a cada 15 minutos.

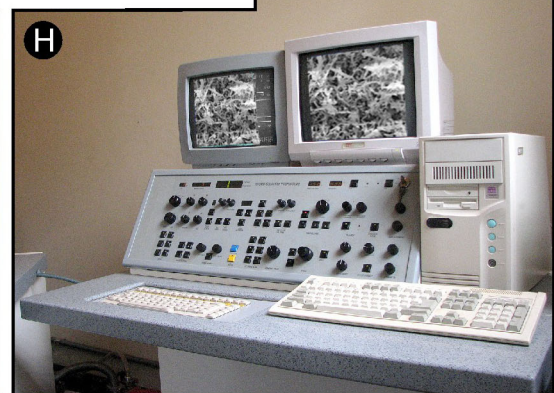
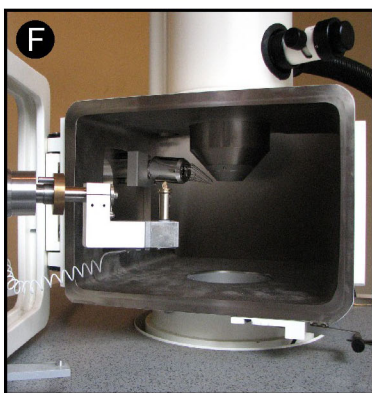


### **3.3 Processamento para Microscopia Eletrônica de Varredura**

Os ápices radiculares (3mm apicais) foram desidratados em solução crescente de etanol a 70, 95 e 100% (Figura 1G), sendo realizadas quatro trocas de cada solução a cada 15 minutos. Os espécimes foram submetidos à desidratação com CO<sub>2</sub> no ponto crítico em aparelho Bal-Tec CPD 030 (Fürstentum, Liechtenstein) (Figuras 2A e 2B). Em seguida, os espécimes foram cobertos com ouro puro, até a obtenção de uma espessura aproximada de 200µm, em metalizador Emitech K650 Spitter Coater (London, England) (Figuras 2C e 2D). Após metalização (Figura 2E), os espécimes foram avaliados em Microscópio Eletrônico de Varredura DSM 940A (Zeiss, Oberkochen, Germany) (Figuras 2F, 2G e 2H).

**Figura 2** – Preparo dos espécimes para análise em microscopia eletrônica de varredura

- A.** Ápices radiculares inseridos no dispositivo para serem levados à secagem no ponto crítico.
- B.** Dispositivo colocado no aparelho Bal-Tec CPD 030 para desidratação com CO<sub>2</sub> no ponto crítico.
- C e D.** Espécimes montados em "stubs" para serem submetidos à metalização em aparelho Emitech K650 Spitter Coater até obter uma espessura de 200 µm.
- E.** Espécime metalizado no "stub" armazenado em uma gaveta própria até o momento da análise.
- F.** "Stub" fixado no "porta-stub" contido no interior do microscópio eletrônico de varredura.
- G.** Microscópio eletrônico de varredura (DSM 940A).
- H.** Obtenção das eletromicrografias dos ápices radiculares de dentes decíduos, evidenciando ou não a presença de microrganismos sob a forma de biofilme.





### **3.4 Análise das amostras**

Durante a análise das amostras, inicialmente foi utilizado um aumento de 50 vezes para a localização da porção apical da raiz, permitindo uma visão geral da morfologia da superfície radicular apical e áreas adjacentes.

A área do forame apical principal foi observada com aumentos de 100, 200 e 500 vezes, tendo a região apical como referência.

Aumentos maiores (1000, 2000, 3000 e 5000 vezes) foram utilizados para identificar a presença do biofilme apical, observando microrganismos no cimento radicular e em áreas de reabsorção radicular (cimento e dentina) caracterizando a infecção extra-radicular. Os microrganismos encontrados foram caracterizados morfológicamente (cocos, bacilos, filamentosos e espiroquetas). A prevalência do biofilme apical nos diferentes grupos experimentais foi registrada em termos de porcentagem, sendo efetuadas eletromicrografias de espécimes representativos dos resultados obtidos.



## ***4 Resultados***

## 4 RESULTADOS

### GRUPO I – DENTES DECÍDUOS PORTADORES DE VITALIDADE PULPAR

A tabela 2 apresenta a caracterização das amostras dos dentes decíduos portadores de vitalidade pulpar (Grupo I).

**Tabela 2** – Caracterização das amostras dos dentes decíduos portadores de vitalidade pulpar

Dente	Motivo da Exodontia	Idade (anos)	Sexo	Microrganismos
Incisivo central (71)	Retenção prolongada	06	Feminino	Ausentes
Incisivo central (81)	Retenção prolongada	07	Feminino	Ausentes
Molar (84)	Retenção prolongada	07	Masculino	Ausentes
Incisivo central (71)	Retenção prolongada	07	Masculino	Ausentes
Incisivo central (51)	Retenção prolongada	06	Masculino	Ausentes

Neste grupo, em quatro das cinco raízes avaliadas (80%), pôde-se observar que a superfície radicular encontrava-se recoberta por intensa quantidade de fibras do ligamento periodontal, o que impedia a visualização direta do forame apical. Fibras colágenas, dispostas nos mais variados sentidos, partiam da superfície apical em espessos ou em delicados feixes entrelaçados entre si (Figura 3).

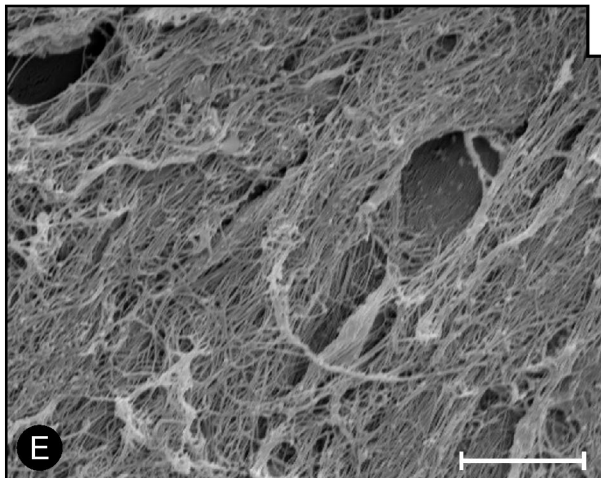
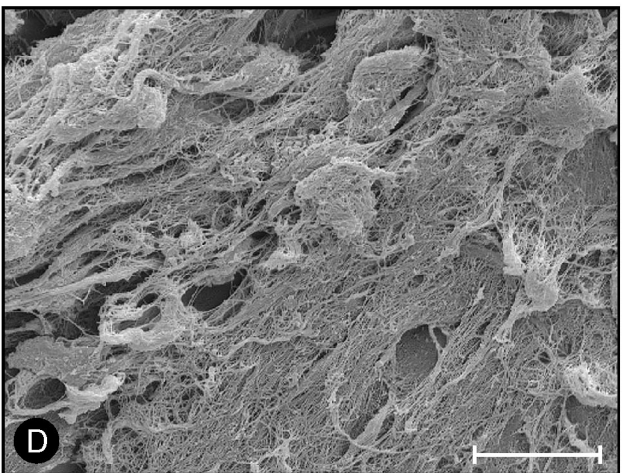
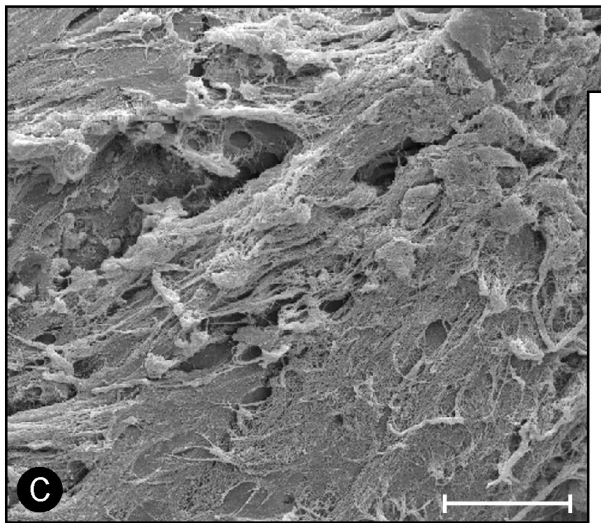
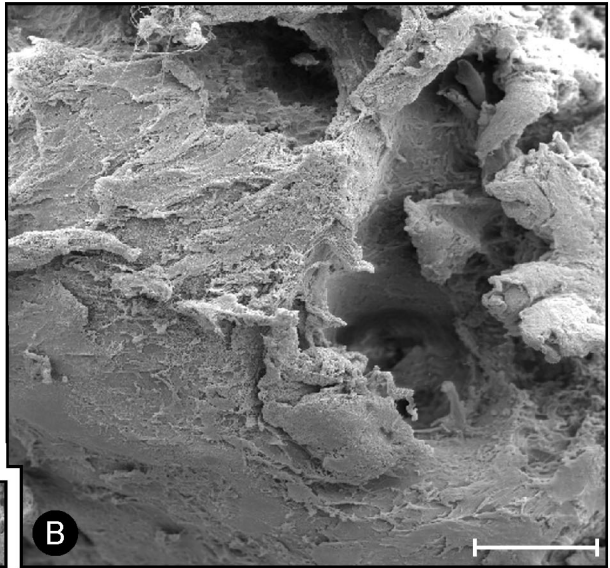
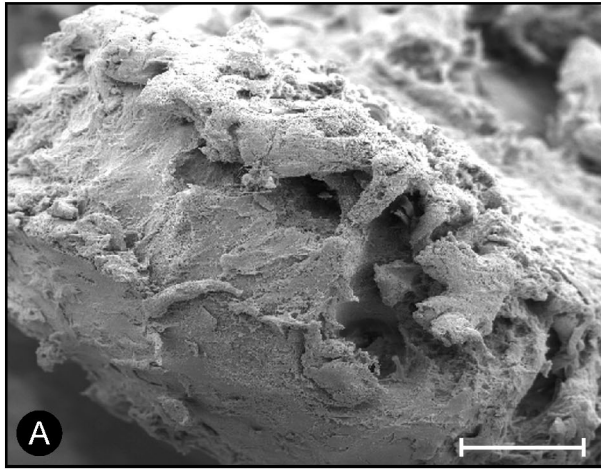
Em um espécime (20%), na área adjacente ao forame observou-se o processo fisiológico de reabsorção radicular dos dentes decíduos (rizólise). Nessa área, o cemento não estava recoberto por fibras colágenas, contrariamente ao observado no lado oposto da raiz, onde não havia o processo de reabsorção fisiológica, estando a superfície radicular recoberta por estas fibras dispostas em diferentes sentidos (Figura 4).

Em todos os espécimes desse grupo (100%), em aumentos maiores (1000X a 3000X), não foram observados microrganismos.

### **Figura 3**

#### **GRUPO I – DENTES DECÍDUOS PORTADORES DE VITALIDADE PULPAR**

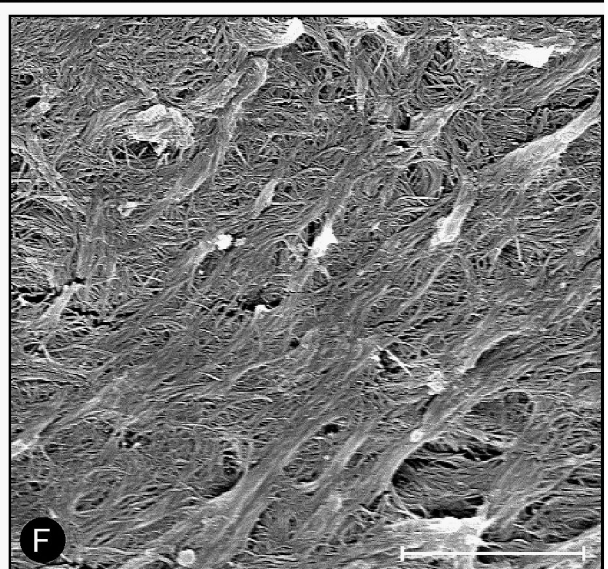
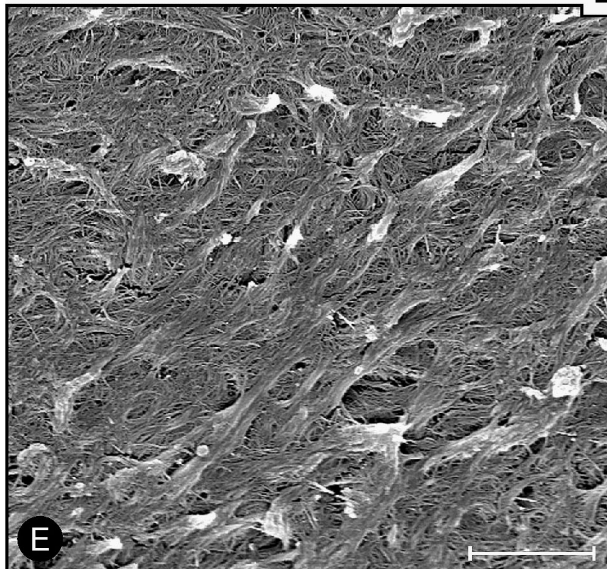
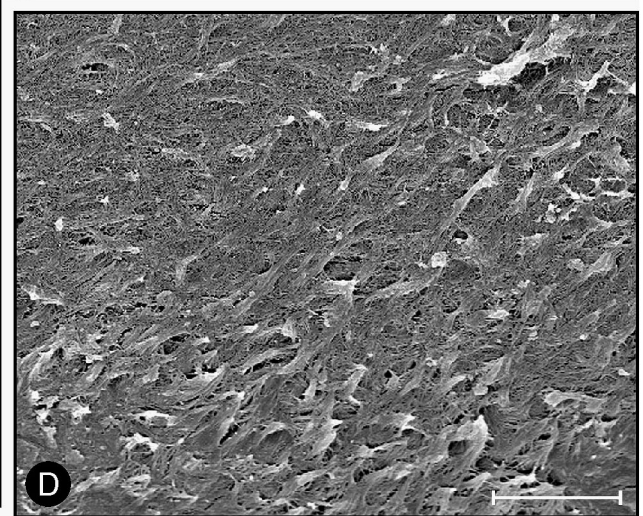
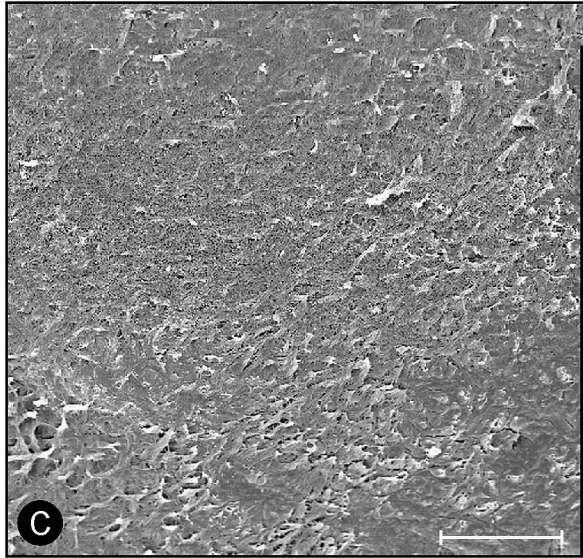
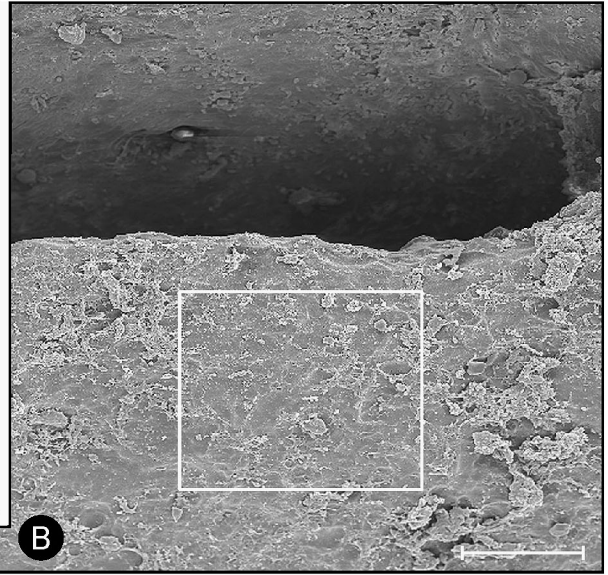
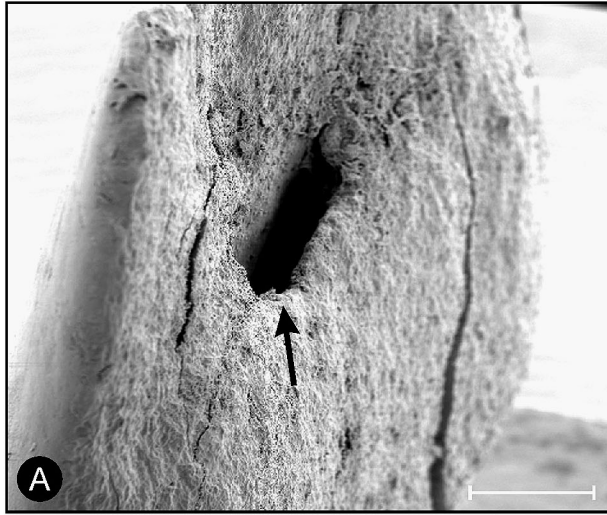
- A.** Visão panorâmica do ápice radicular íntegro (dente 71). Barra=400 $\mu$ m.
- B.** Maior aumento do ápice radicular recoberto por remanescentes do ligamento periodontal. Barra=200 $\mu$ m.
- C.** Superfície radicular recoberta por fibras do ligamento periodontal. Barra=40 $\mu$ m.
- D.** Maior aumento da Figura C. Barra=20 $\mu$ m.
- E.** Entrelaçamento de feixes de fibras colágenas na superfície radicular, sem a visualização de bactérias. Barra=10 $\mu$ m.
- F.** Radiografia do dente decíduo 71, com retenção prolongada e integridade da lâmina dura.



#### **Figura 4**

##### **GRUPO I – DENTES DECÍDUOS PORTADORES DE VITALIDADE PULPAR**

- A.** Visão panorâmica do ápice radicular evidenciando o forame pela seta. Barra= 400 $\mu$ m.
- B.** Adjacente ao forame apical pôde-se observar a ausência de fibras na superfície do cimento (área delimitada). Barra= 100 $\mu$ m.
- C, D e E.** Região apical evidenciando intensa quantidade de fibras colágenas dispostas em feixes. C, barra= 40 $\mu$ m; D, barra=20 $\mu$ m; E, barra=10 $\mu$ m.
- F.** Maior aumento da Figura E, evidenciando a ausência de microrganismos. Barra=10 $\mu$ m.



GRUPO II – DENTES DECÍDUOS PORTADORES DE NECROSE PULPAR, SEM LESÃO PERIAPICAL VISÍVEL RADIOGRAFICAMENTE

A tabela 3 apresenta a caracterização das amostras dos dentes decíduos portadores de necrose pulpar, sem lesão periapical visível radiograficamente (grupo II).

**Tabela 3** – Caracterização das amostras dos dentes decíduos portadores de necrose pulpar, sem lesão periapical visível radiograficamente

Dente	Motivo da Exodontia	Idade (anos)	Sexo	Microrganismos
Molar (65)	Extensa destruição coronária	05	Masculino	Ausentes
Incisivo lateral (52)	Extensa destruição coronária	05	Masculino	Ausentes
Incisivo central (61)	Extensa destruição coronária	05	Masculino	Ausentes
Molar (64)	Extensa destruição coronária	05	Feminino	Ausentes
Molar (85)	Extensa destruição coronária	08	Masculino	Ausentes
Molar (74)	Extensa destruição coronária	04	Masculino	Ausentes
Molar (64)	Extensa destruição coronária	08	Masculino	Ausentes

À semelhança do grupo anterior, na região próxima ao forame apical, assim como distante da mesma, o ápice radicular mostrava aspectos anatômicos de normalidade, estando o cemento recoberto por fibras colágenas dispostas nos mais variados sentidos, exceto junto às áreas de rizólise encontradas em 42,85% dos dentes (Figuras 5 e 6).

Assim como nos casos de dentes decíduos portadores de vitalidade pulpar, a visualização direta do forame apical foi freqüentemente dificultada, devido à presença de remanescentes do ligamento periodontal aderidos à superfície radicular de 4 ápices avaliados.

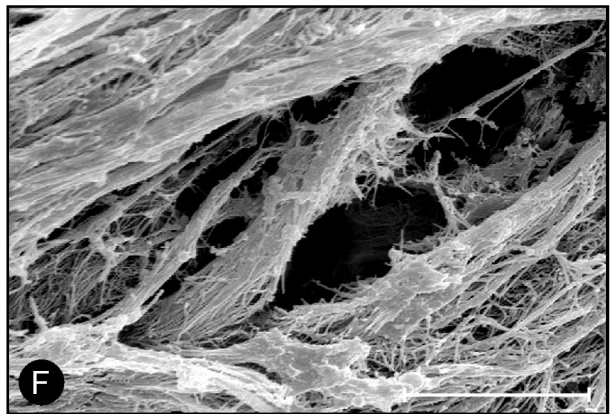
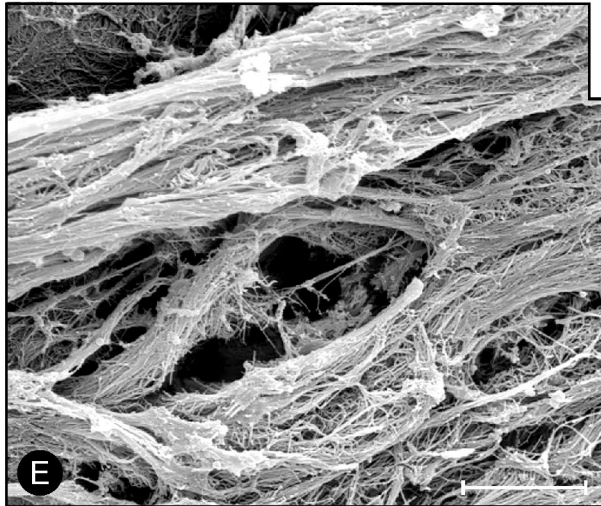
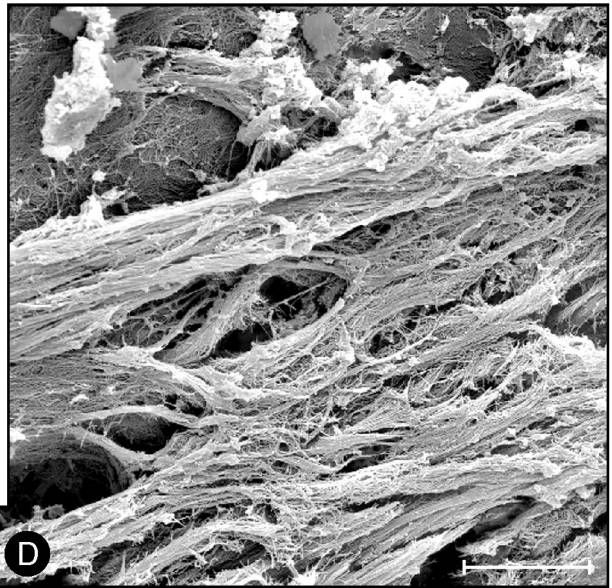
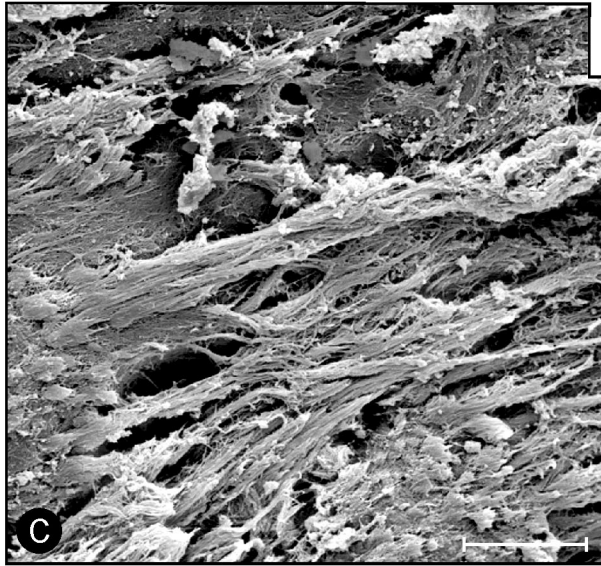
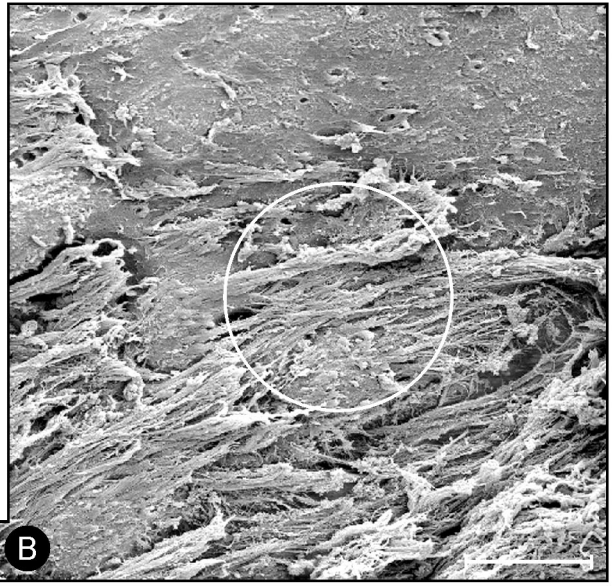
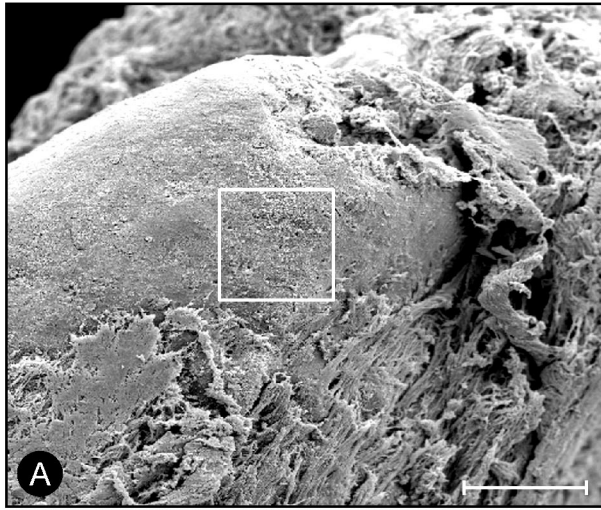


Diferentes aumentos (1000X a 3000X) foram empregados para verificar a presença de microrganismos. Nesse grupo, observou-se ausência de microrganismos em 100% dos casos (7 amostras).

### **Figura 5**

#### **GRUPO II – DENTES DECÍDUOS PORTADORES DE NECROSE PULPAR, SEM LESÃO PERIAPICAL VISÍVEL RADIOGRAFICAMENTE**

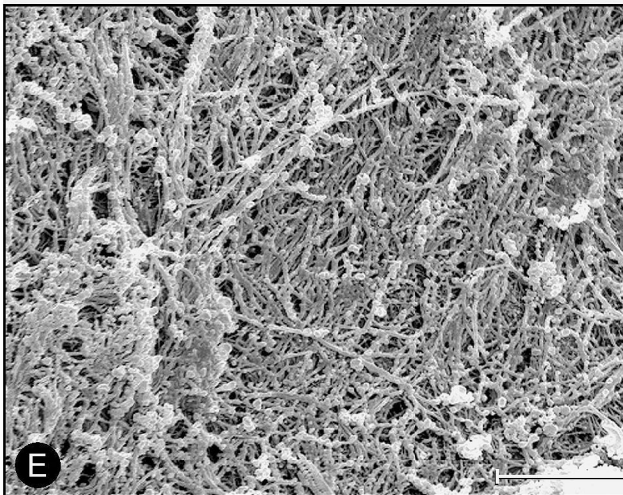
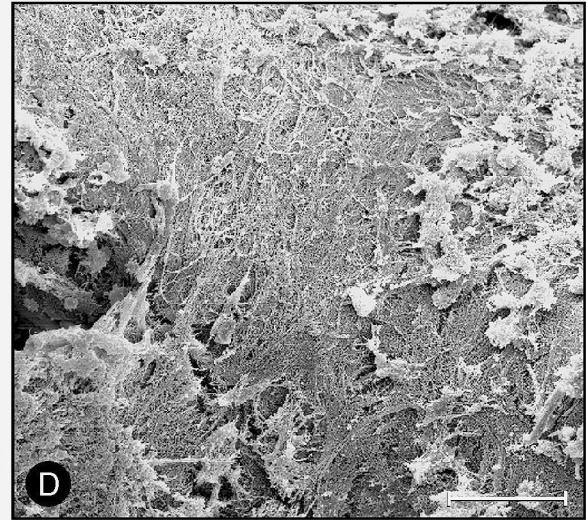
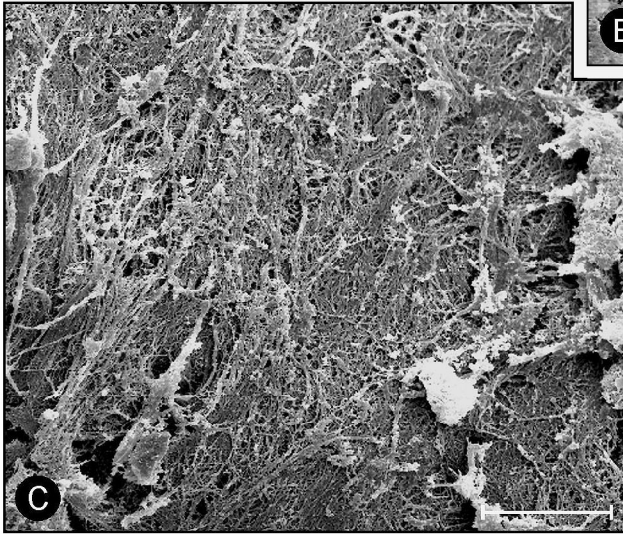
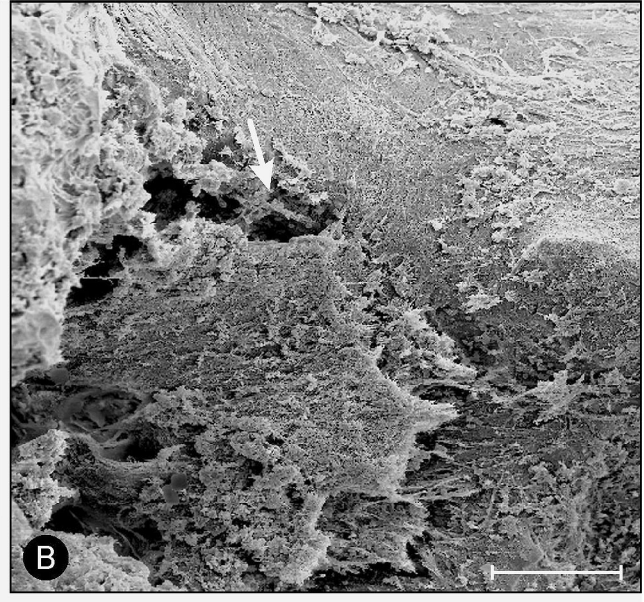
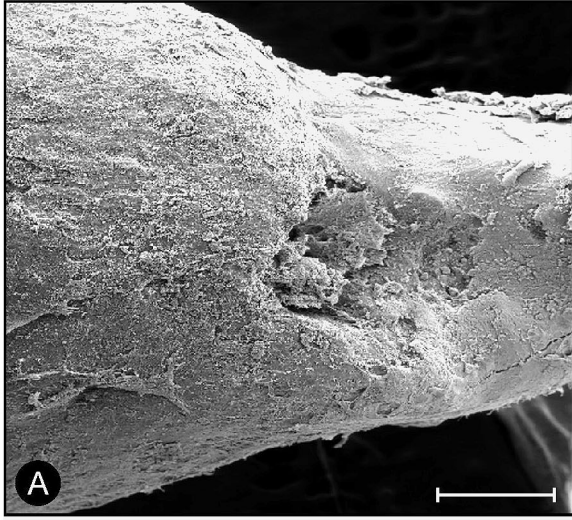
- A.** Ápice radicular evidenciando início do processo de rizólise em área próxima ao forame, com ausência de fibras na área delimitada. Barra=200 $\mu$ m.
- B.** Maior aumento da Figura A evidenciando área de cimento reabsorvido e área com fibras colágenas do ligamento periodontal inseridas na superfície cementária (área delimitada). Barra=100 $\mu$ m.
- C, D, E e F.** Espessos feixes de fibras colágenas com entrelaçamento em diferentes sentidos. C, barra=40 $\mu$ m; D, barra=20 $\mu$ m; E, barra=10 $\mu$ m; F, barra=10 $\mu$ m.



### **Figura 6**

#### **GRUPO II – DENTES DECÍDUOS PORTADORES DE NECROSE PULPAR, SEM LESÃO PERIAPICAL VISÍVEL RADIOGRAFICAMENTE**

- A.** Ápice com integridade da superfície radicular (dente 64). Barra=400 $\mu$ m.
- B.** Região apical evidenciando o forame pela seta. Barra=100 $\mu$ m.
- C.** Maior aumento da Figura B. Barra=40 $\mu$ m.
- D e E.** Fibras colágenas do ligamento periodontal evidenciando a ausência de microrganismos. D, barra=20 $\mu$ m; E, barra=10 $\mu$ m.
- F.** Radiografia do dente decíduo 64, com necrose pulpar e sem lesão periapical visível radiograficamente.



GRUPO III – DENTES DECÍDUOS PORTADORES DE NECROSE PULPAR E NÍTIDA LESÃO PERIAPICAL VISÍVEL RADIOGRAFICAMENTE

A caracterização das amostras dos dentes decíduos portadores de necrose pulpar e nítida lesão periapical visível radiograficamente está apresentada na tabela 4.

**Tabela 4** – Caracterização das amostras dos dentes decíduos portadores de necrose pulpar e nítida lesão periapical visível radiograficamente

Dente	Motivo da Exodontia	Idade (anos)	Sexo	Microrganismos
Molar (84)	Extensa destruição coronária	07	Masculino	Presentes
Molar (74)	Extensa destruição coronária	05	Feminino	Presentes
Molar (85)	Extensa destruição coronária	06	Masculino	Presentes
Incisivo lateral (52)	Extensa destruição coronária	06	Feminino	Presentes
Molar (55)	Extensa destruição coronária	06	Masculino	Presentes
Molar (55)	Extensa destruição coronária	05	Feminino	Presentes

Nos 6 dentes portadores de necrose pulpar e nítida lesão periapical visível radiograficamente (100%), a superfície do ápice radicular apresentava ausência de fibras e áreas de reabsorção patológica que, em aumentos maiores, mostravam em seu interior a presença de intensa quantidade de microrganismos sob a forma de biofilme (infecção extra-radicular).

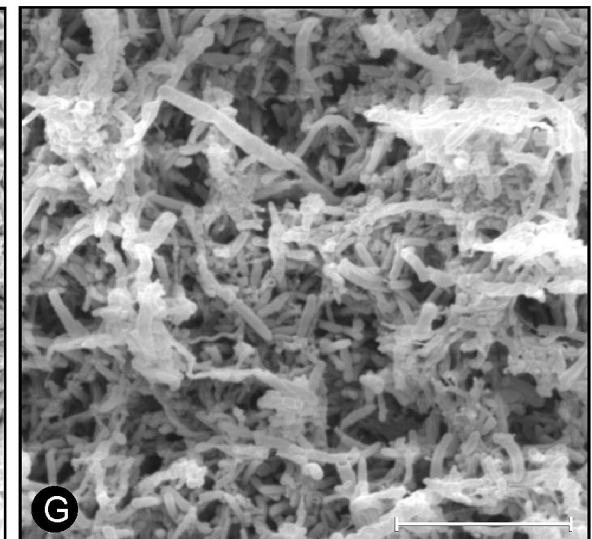
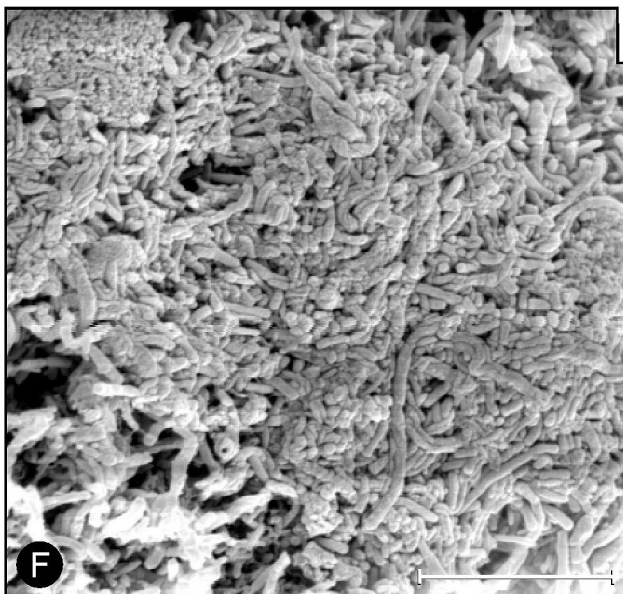
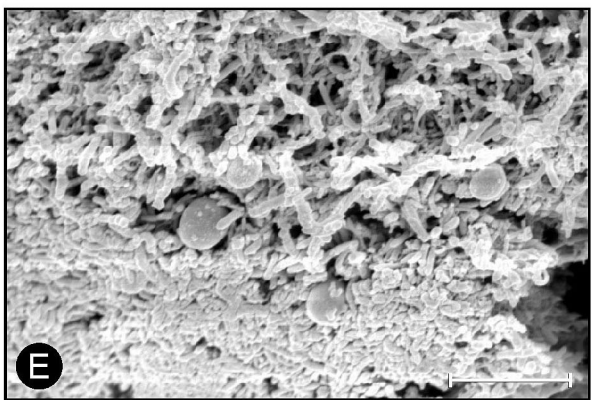
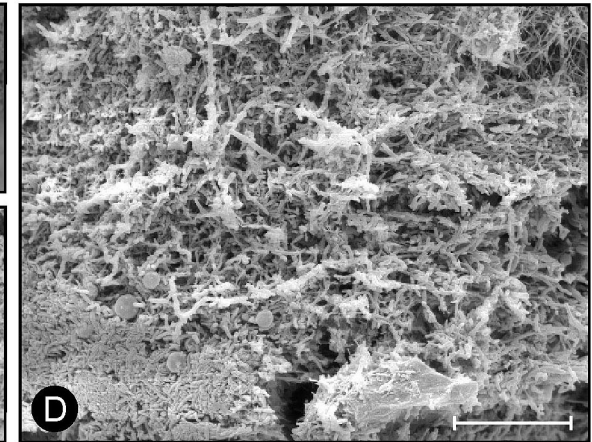
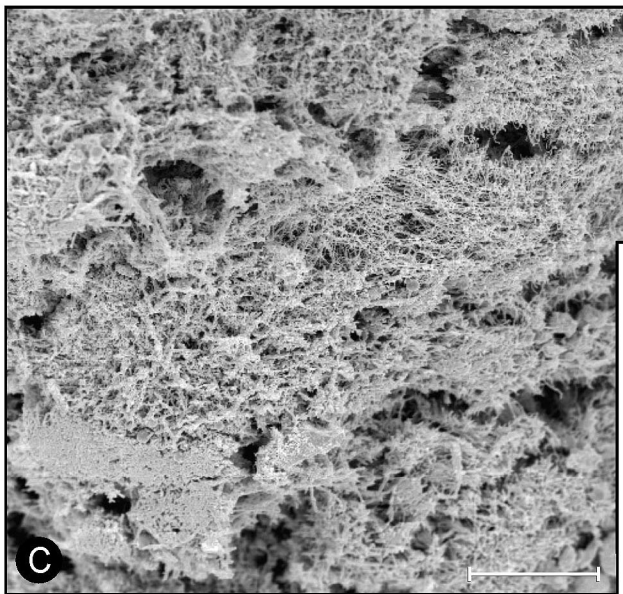
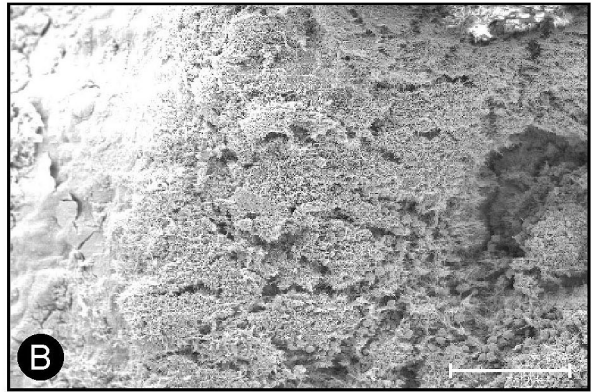
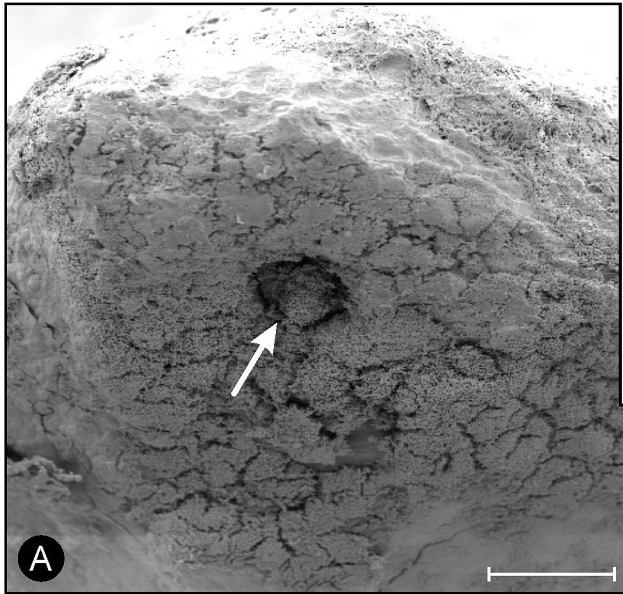
Um espécime deste grupo (dente 84) evidenciou presença de exuberante quantidade de microrganismos ao redor do forame apical principal. (Figura 7).

Os morfotipos bacterianos consistiam predominantemente de cocos e bacilos, porém filamentosos e espiroquetas também foram observados. Células mononucleares foram encontradas nas proximidades ou “inseridas” neste biofilme (Figura 8). Células fúngicas não foram evidenciadas nestes dentes.

**Figura 7**

**GRUPO III – DENTES DECÍDUOS PORTADORES DE NECROSE PULPAR E NÍTIDA LESÃO PERIAPICAL VISÍVEL RADIOGRAFICAMENTE**

- A.** Visão panorâmica do ápice radicular com forame indicado pela seta. Barra=400 $\mu$ m.
- B.** Maior aumento da Figura A evidenciando ausência de fibras. Barra=100 $\mu$ m.
- C, D, E, F e G** Diferentes áreas próximas ao forame, evidenciando a presença de microrganismos sob a forma de biofilme. C, barra=40 $\mu$ m; D, barra=20 $\mu$ m; E, barra= 10 $\mu$ m; F, barra=10 $\mu$ m; G, barra=10 $\mu$ m.

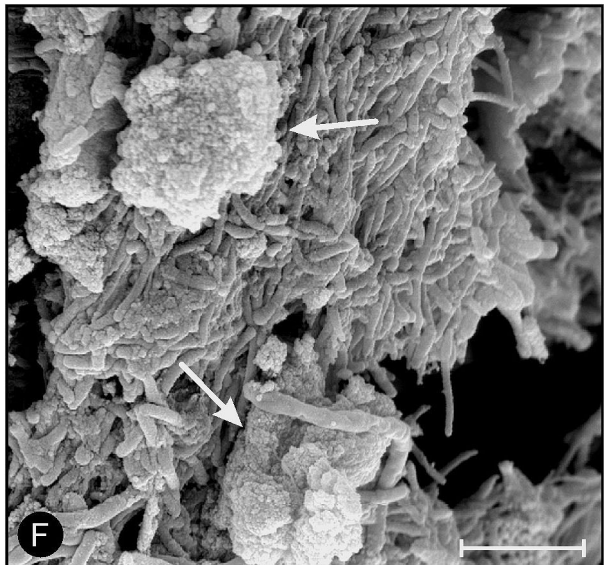
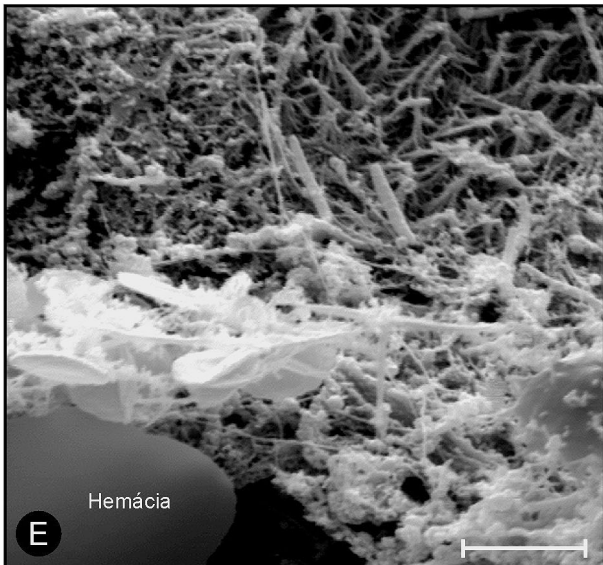
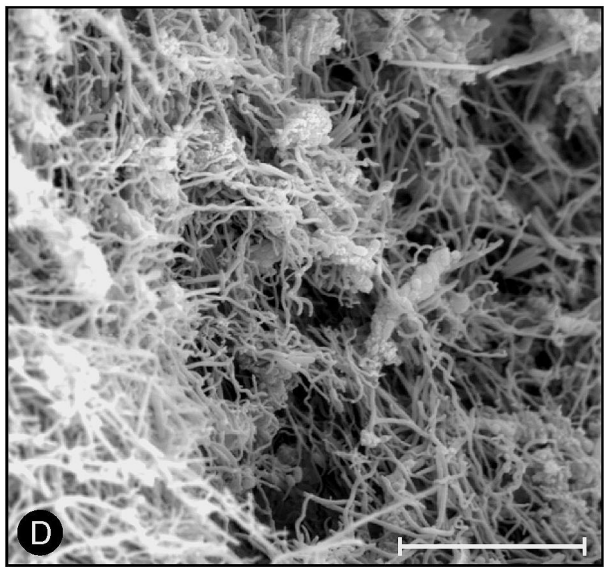
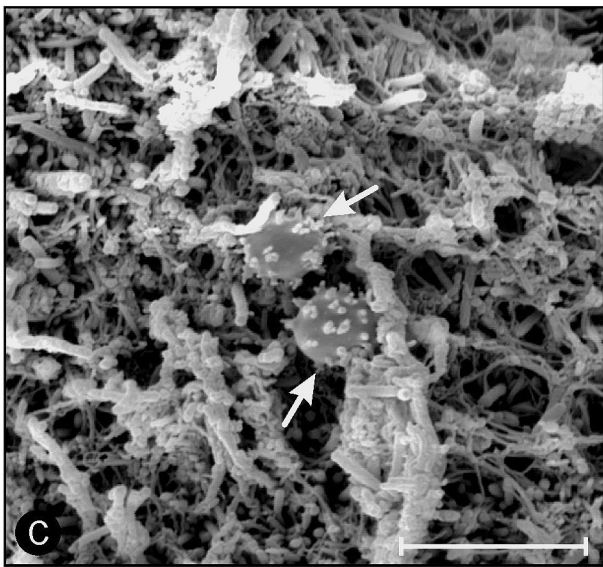
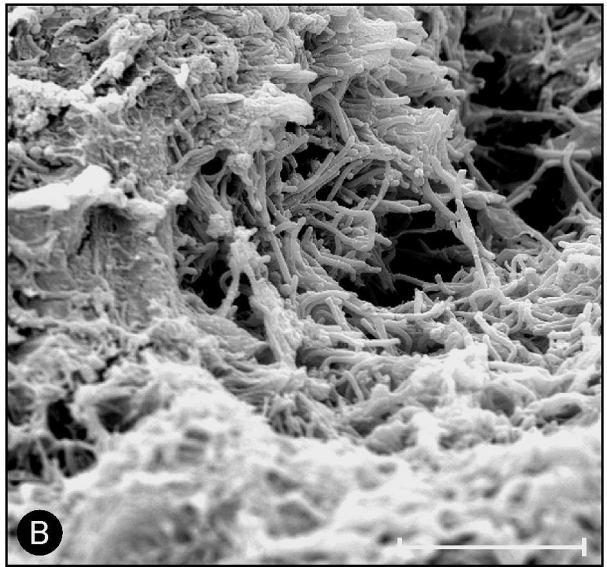
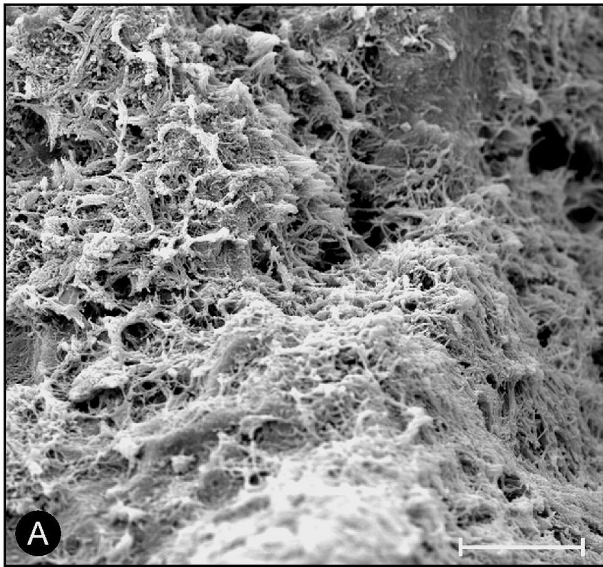




**Figura 8**

**GRUPO III – DENTES DECÍDUOS PORTADORES DE NECROSE PULPAR E  
NÍTIDA LESÃO PERIAPICAL VISÍVEL RADIOGRAFICAMENTE**

**A, B ,C, D, E, F.** Biofilme apical evidenciando morfotipos bacterianos diversos e com presença de células possivelmente mononucleares (indicadas pelas setas). A, barra=20 $\mu$ m; B, barra=10 $\mu$ m; C, barra=10 $\mu$ m; D, barra=10 $\mu$ m; E, barra=4 $\mu$ m; F, barra=4 $\mu$ m.





## **5 *Discussão***

## 5 DISCUSSÃO

### ***Do Grupo I (Dentes decíduos portadores de vitalidade pulpar)***

Os dentes pertencentes ao Grupo I encontravam-se clinicamente hígidos e, conseqüentemente, com ausência de contaminação bacteriana do tecido pulpar. Nossos resultados são concordantes com os obtidos por Lomçali et al. (1996) e Leonardo et al. (2002) que, em microscopia eletrônica de varredura, observaram ausência de microrganismos e grande quantidade de fibras no ápice de dentes permanentes clinicamente hígidos.

### ***Do Grupo II (Dentes decíduos portadores de necrose pulpar sem lesão periapical visível radiograficamente)***

Inúmeros estudos concluíram que os microrganismos desempenham um importante papel na gênese e na manutenção das alterações pulpares e periapicais em dentes permanentes (Takehashi et al., 1965; Möller et al., 1981; Fabricius et al., 1982a; Fabricius et al., 1982b; Sjögren et al., 1990; Lin et al., 1991; Kiryu et al., 1994; Tani-Ishii et al., 1994; Nair, 1997; Möller et al., 2004; Lin et al., 2006; Fabricius et al., 2006; Sabeti et al., 2006).

Como salientado por Leonardo (2005), nos casos de dentes permanentes com necrose pulpar e ausência de lesão visível radiograficamente, os microrganismos encontram-se localizados apenas na luz do canal principal, com presença de tecido vivo no restante do sistema de canais radiculares. Essas afirmativas foram comprovadas no presente estudo, em dentes decíduos, tendo em vista que, à semelhança do Grupo I, os espécimes do Grupo II não

apresentaram microrganismos nas áreas extra-radulares (Leonardo et al., 2002), evidenciando que os mesmos ainda encontravam-se restritos à luz do canal radicular principal.

Apesar de alguns autores questionarem se os procedimentos operatórios, basicamente aqueles realizados durante a exodontia, poderiam provocar contaminação dos espécimes (Walton et al., 1992; Nair, 1997; Sundqvist e Figdor, 1998; Siqueira e Lopes, 2001), nos ápices radulares dos dentes decíduos dos Grupos I e II não foram encontrados microrganismos.

***Do Grupo III (Dentes decíduos portadores de necrose pulpar e nítida lesão periapical visível radiograficamente)***

Apesar da educação e prevenção, no contexto da saúde bucal, sejam prioritárias na Odontologia Contemporânea, as alterações de ordem pulpar que acometem os dentes decíduos em função da progressão de lesões de cárie ainda são muito freqüentes (Assed, 2005). Paradoxalmente, poucos autores têm se preocupado em avaliar a microbiota de canais radulares de dentes decíduos. Estes estudos, empregando técnicas de cultura microbiana (Cohen et al., 1960; Marsh e Largent, 1967; Brook et al., 1991; Toyoshima et al., 1988; Onçag et al., 2003; Pazelli et al., 2003; Silva et al., 2006) e de biologia molecular (Matoba-Júnior, 2006; Ruvière et al., 2007), evidenciaram que a microbiota endodôntica é semelhante, em ambas as dentições, nos casos de lesão periapical, ou seja, trata-se de uma infecção polimicrobiana, com predominância de estreptococos e de bactérias anaeróbias. Entretanto, em MEV não foram encontrados, até o presente momento, estudos publicados avaliando a infecção extra-radicular (biofilme apical)

em dentes decíduos, tornando impossibilitada a comparação dos resultados do presente estudo com a literatura específica.

Como salientado por Molven et al. (1991) e Sen et al. (1995), a microscopia eletrônica de varredura é considerada um método adequado para a avaliação da presença de microrganismos sob a forma de biofilme, empregado rotineiramente em estudos envolvendo infecção extra-radicular em dentes permanentes não tratados endodonticamente (Tronstad et al., 1990a; Tronstad et al., 1990b; Lomçali et al., 1996; Gutiérrez et al., 1999; Leonardo et al., 2002).

Em nosso estudo, todos os espécimes do Grupo III (100%) apresentaram ausência de fibras e presença de microrganismos organizados sob a forma de biofilme, inclusive em áreas de reabsorção, na região apical. Esses resultados são discordantes dos relatados por Siqueira e Lopes (2001), que afirmaram que a infecção extra-radicular não é uma ocorrência comum em dentes permanentes não tratados endodonticamente. Esta diferença, possivelmente, se deve ao fato de que, em nosso estudo, os dentes foram imersos em solução de tripsina após a exodontia, como sugerido por Leonardo et al. (2002) e Ferreira et al. (2004), o que facilitou a visualização dos microrganismos.

Por outro lado, nossos resultados são concordantes com os obtidos por Godoy (1999) que, empregando a microscopia óptica, observou agregados bacterianos e biofilme na superfície radicular externa da região apical de dentes decíduos com necrose pulpar.

No presente estudo, os tipos bacterianos identificados nos dentes do grupo III consistiam predominantemente de cocos e bacilos, sendo observados também microrganismos filamentosos e espiroquetas, concordando com os

achados prévios descritos para dentes permanentes (Tronstad et al., 1990a; Leonardo et al., 2002). Esta variedade de morfotipos bacterianos talvez possa ser explicada pela interferência de fatores que influenciam na multiplicação e no desenvolvimento de determinadas espécies microbianas no biofilme apical, tais como a concentração de nutrientes, o pH e produtos tóxicos do metabolismo celular (Marsh e Martin, 2005), que podem ser diferentes até mesmo em locais próximos de um mesmo dente. Além disso, esta diversidade microbiana e a sua organização sob a forma de biofilme constituem uma estratégia de sobrevivência, pois os diferentes estados metabólicos contribuem para a resistência aos variados desafios do ambiente (Costerton et al., 1999; Potera, 1999).

Embora alguns autores tenham relatado a presença de células fúngicas na superfície radicular de dentes permanentes (Tronstad et al., 1987; Lomçali et al., 1996; Ferreira et al., 2004), no presente estudo estes tipos celulares não foram identificados.

Os resultados obtidos no Grupo III permitem inferir que, do ponto de vista clínico, é fundamental o combate aos microrganismos na área extra-radicular de dentes decíduos, por meio do emprego de procedimentos técnicos adequados e do uso ou não de curativo de demora entre sessões, uma vez que irá interferir diretamente no prognóstico do tratamento. Segundo Godoy (1999), nestes dentes as superfícies radiculares internas e externas são irregulares pela presença de lacunas de Howship e pela exposição dos túbulos dentinários, em decorrência do processo de reabsorção, criando áreas que favorecem o acúmulo e o desenvolvimento de microrganismos.

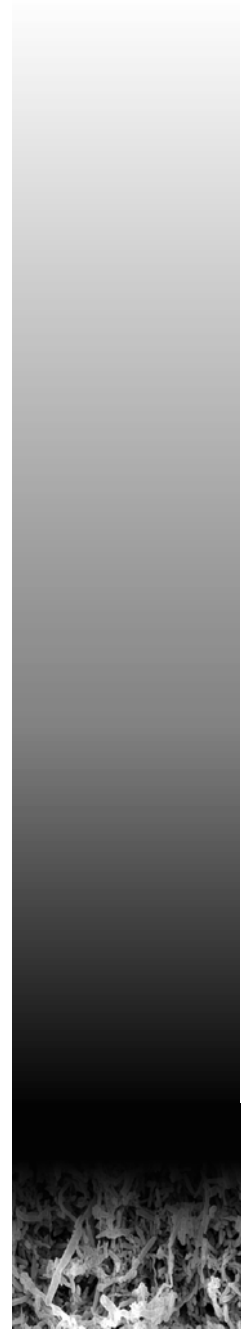
Nos casos onde o biofilme apical presente em dentes decíduos é mantido, haverá permanência de processo inflamatório, retardando ou impedindo o reparo da região periapical, o que pode ocasionar alterações no germe do dente permanente sucessor em desenvolvimento (Fanning, 1962; Binns e Escobar, 1967; Kaplan et al., 1967; Jerrel, 1982; Yamaka et al., 2002; Cordeiro e Rocha, 2005), alterações na saúde geral do paciente (Tomic-Karovic e Jelinek, 1971; Brook, 2000) e aceleração do processo de rizólise (Fanning, 1962; Oberstyn, 1963; Prove et al., 1992; Haralabakis et al., 1994). Esses fatores podem ocasionar a perda prematura destes dentes (Sahara, 2001; Leroy, 2003), com seqüelas funcionais e/ou estéticas, incluindo perda de espaço, perda da guia de erupção para o dente permanente sucessor, problemas fonéticos e instalação de hábitos deletérios (Camm e Schuler, 1990; Brothwell, 1997; Cuoghi, 1998; Kuramae et al., 2001).

Segundo Leonardo (2005), o tratamento endodôntico de dentes permanentes pode ser didaticamente classificado em: 1) Biopulpectomia (tratamento de dentes com vitalidade pulpar); 2) Necropulpectomia I (tratamento de dentes com necrose pulpar sem lesão periapical visível radiograficamente); e 3) Necropulpectomia II (tratamento de dentes com necrose pulpar e nítida lesão visível radiograficamente). Nos dois primeiros casos, os microrganismos se encontram restritos apenas à câmara pulpar e à luz do canal radicular, respectivamente. Porém, com a progressão da infecção, os microrganismos se disseminam por todo o sistema de canais radiculares, incluindo túbulos dentinários, forame apical e cemento, caracterizando os casos de lesão periapical crônica. Os resultados do presente estudo nos permitem inferir que esta classificação de tratamento (Biopulpectomia, Necropulpectomia I e



Necropulpectomia II) pode, também, ser aplicada aos dentes decíduos, tendo em vista que, à semelhança dos permanentes, o biofilme apical está presente apenas nos casos de lesão periapical.

Assim, frente aos diferentes graus de patologia pulpar e periapical em dentes decíduos, o profissional deve optar por condutas terapêuticas específicas. Sabendo-se que o biofilme apical é um dos responsáveis pela indução e manutenção da lesão periapical e que o mesmo é resistente aos agentes antimicrobianos e à ação do preparo biomecânico dos canais radiculares, estudos avaliando a eficácia de novos materiais e técnicas de tratamento são necessários, visando sua eliminação.



## **6 Conclusão**

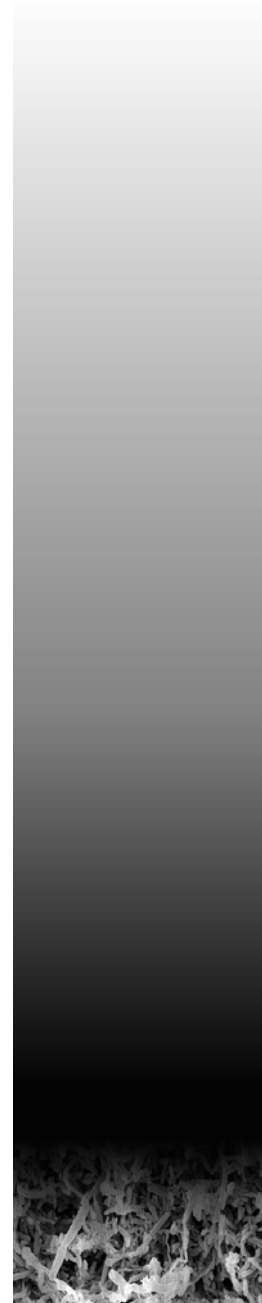
## 6 CONCLUSÃO

Com base na metodologia empregada (microscopia eletrônica de varredura) e nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- Nos ápices radiculares de dentes decíduos com vitalidade pulpar (Grupo I) e com necrose pulpar sem lesão periapical visível radiograficamente (Grupo II) não foram observados microrganismos em 100% dos casos.

- Em 100% das amostras dos dentes decíduos portadores de necrose pulpar e nítida lesão periapical visível radiograficamente (Grupo III) foram identificados microrganismos sob a forma de biofilme (infecção extra-radicular).

- Os morfotipos bacterianos encontrados no Grupo III consistiram predominantemente de cocos e bacilos, porém filamentosos e espiroquetas também foram observados.



## ***Referências***

**REFERÊNCIAS**

1. Akpata ES, Blechman H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall in vitro. *J Dent Res* 1982;61(2):435-8.
2. Assed S, Ito IY, Leonardo MR, Silva LA, Lopatin DE. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. *Endod Dent Traumatol* 1996;12(2):66-9.
3. Assed S. *Odontopediatria: Bases científicas para a prática clínica*. São Paulo: Artes Médicas, 2005.
4. Baumgartner JC, Falkler WA Jr. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod* 1991;17(8):380-3.
5. Bergenholtz G, Lekholm U, Liljenberg B, Lindhe J. Morphometric analysis of chronic inflammatory periapical lesions in root-filled teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983;55(3):295-301.
6. Binns WH, Escobar A. Defects in permanent teeth following pulp exposure of primary teeth. *J Dent Child* 1967;34(1):4-14.
7. Block RM, Bushell A, Rodrigues H, Langeland K. A histopathologic, histobacteriologic, and radiographic study of periapical endodontic surgical specimens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976;42(5):656-78.
8. Brook I. Anaerobic infections in children. *Adv Pediatr* 2000;47:395-437.
9. Brook J, Grimm S, Kielich RB. Bacteriology of acute periapical abscess in children. *J Endod* 1981;7:378-80.
10. Brothwell DJ. Guidelines on the use of space maintainers following premature loss of primary teeth. *J Can Dent Assoc* 1997;63(10):753, 757-60, 764-6.

11. Bystrom A, Happonen RP, Sjogren U, Sundqvist G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Endod Dent Traumatol* 1987;3(2):58-63.
12. Camm JH, Schuler JL. Premature eruption of the premolars. *ASDC J Dent Child* 1990;57(2):128-33.
13. Cohen MM, Jores SM, Calisti LP, Mass B. Bacteriologic study of infected deciduous molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1960;3:1382-6.
14. Consolaro A. Reabsorções Dentárias nas especialidades clínicas. 2ª ed. Maringá, PR: Dental Press, 2005. 616p.
15. Cordeiro MM, Rocha MJ. The effects of periradicular inflammation and infection on a primary tooth and permanent successor. *J Clin Pediatr Dent* 2005;29(3):193-200.
16. Costerton JW, Lashen ES. Influence of biofilm on efficacy of biocides on corrosion-causes bacteria. *Mater Perform* 1984;23:13-7.
17. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284(5418):1318-22.
18. Cuoghi OA, Bertoz FA, de Mendonca MR, Santos EC. Loss of space and dental arch length after the loss of the lower first primary molar: a longitudinal study. *J Clin Pediatr Dent* 1998;22(2):117-20.
19. Edwards S, Nord CE. Identification and characterization of microorganisms isolated from infected primary teeth. *J Int Ass Dent Child* 1971;3:15-8.
20. Fabricius L, Dahlen G, Holm AE, Moller AJ. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scand J Dent Res* 1982b;90:134-44.

21. Fabricius L, Dahlen G, Holm SE, Moller AJ. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* 1982a;90(3):200-6.
22. Fabricius L, Dahlen G, Sundqvist G, Happonen RP, Moller AJ. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *Eur J Oral Sci* 2006;114(4):278-85.
23. Fanning EA. Effect of extraction of deciduous molar on the formation and eruption of their successors. *Ang Orthod* 1962;32(1):44-53.
24. Ferreira FB, Ferreira AL, Gomes BP, Souza-Filho FJ. Resolution of persistent periapical infection by endodontic surgery. *Int Endod J* 2004;37(1):61-9.
25. Godoy VL. Distribuição de bactérias plactônicas, colônias bacterianas e biofilmes bacterianos em dentes decíduos com pulpite e/ou necrose pulpar. Bauru, 1999. 151 p. Tese [Doutorado] - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
26. Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Positive and negative associations between bacterial species in dental root canals. *Microbios* 1994;80(325):231-43.
27. Gutierrez JH, Brizuela C, Villota E. Human teeth with periapical pathosis after overinstrumentation and overfilling of the root canals: a scanning electron microscopic study. *Int Endod J* 1999;32(1):40-8.
28. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987;66:1375-9.
29. Haapasalo M, Ranta H, Ranta KT. Facultative gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. *Acta Odontol Scand* 1983;41(1):19-22.

30. Haapasalo M, Ranta K, Ranta H. Mixed anaerobic periapical infection with sinus tract. *Endod Dent Traumatol* 1987;3(2):83-5.
31. Haralabakis NB, Yiagtzis SC, Toutountzakis NM. Premature or delayed exfoliation of deciduous teeth and root resorption and formation. *Angle Orthod* 1994;64(2):151-7.
32. Hobson P. Pulp treatment of deciduous teeth. *Br Dent J* 1970;128(3):232-8.
33. Jerrel RG, Ronk SL. Developmental arrest of a succedaneous tooth following pulpectomy in a primary tooth. *J Period* 1982;6:337-42.
34. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.
35. Kaplan NL, Zach L, Goldsmith ED. Effects of pulpal exposure in primary dentition on the succedaneous teeth. *J Dent Child* 1967;34(4):237-42.
36. Kiryu T, Hoshino E, Iwaku M. Bacteria invading periapical cementum. *J Endod* 1994;20(4):169-72.
37. Kuramae M, Magnani, MBBA, Almeida, MHC, Vedovello, SAS, Lucato, AS. Perdas precoces de dentes decíduos - etiologia, conseqüências e conduta clinica. *J Bras Odontopediatr Odontol Bebê* 2001;4(21):411-8.
38. Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifacio KC. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *J Endod* 2002;28(12):815-8.
39. Leonardo MR. Endodontia: Tratamento de canais radiculares – princípios técnicos e biológicos. São Paulo: Artes Médicas, 2005.



40. Leroy R, Bogaerts K, Lesaffre E, Declerck D. Impact of caries experience in the deciduous molars on the emergence of the successors. *Eur J Oral Sci* 2003;111(2):106-10.
41. Lin LM, Di Fiore PM, Lin J, Rosenberg PA. Histological study of periradicular tissue responses to uninfected and infected devitalized pulps in dogs. *J Endod* 2006;32(1):34-8.
42. Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gangler P, Langeland K. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;71(5):603-11.
43. Lomcali G, Sen BH, Cankaya H. Scanning electron microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. *Endod Dent Traumatol* 1996;12(2):70-6.
44. Marsh P, Martin MV. *Microbiologia Oral*. São Paulo: Editora Santos, 2005.
45. Marsh SJ, Largent MD. A bacteriology study of the pulp canals of infected primaty molars. *J Dent Child* 1967;34:460-70.
46. Matoba-Júnoior F. Detecção da microbiota de canais radiculares de dentes decíduos humanos com necrose pulpar e lesão periapical pelo método *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* e pela cultura microbiana, antes e após preparo biomecânico e uso de curativo de demora à base de hidróxido de cálcio associado a clorexidina. Ribeirão Preto, 2006. 95 p. Dissertação [Mestrado] - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

47. Matsuo T, Shirakami T, Ozaki K, Nakanishi T, Yumoto H, Ebisu S. An immunohistological study of the localization of bacteria invading root pulpal walls of teeth with periapical lesions. *J Endod* 2003;29(3):194-200.
48. Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 1981;89(6):475-84.
49. Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Sundqvist G, Happonen RP. Apical periodontitis development and bacterial response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains. *Eur J Oral Sci* 2004;112(3):207-15.
50. Molven O, Olsen I, Kerekes K. Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1991;7(5):226-9.
51. Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990;16(12):580-8.
52. Nair, PN. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol 2000* 1997;13:121-48.
53. Noguchi N, Noiri Y, Narimatsu M, Ebisu S. Identification and localization of extraradicular biofilm-forming bacteria associated with refractory endodontic pathogens. *Appl Environ Microbiol* 2005;71(12):8738-43.

- 
54. Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endod* 2002;28(10):679-83.
  55. Obersztyn A. Experimental investigation of factors causing resorption of deciduous teeth. *J Dent Res*. 1963 Mar-Apr;42:660-74.
  56. Oncag O, Hosgor M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J* 2003;36(6):423-32.
  57. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990;6(4):142-9.
  58. Pazelli LC, Freitas AC, Ito IY, Souza-Gugelmin MC, Medeiros AS, Nelson-Filho P. Prevalence of microorganisms in root canals of human deciduous teeth with necrotic pulp and chronic periapical lesions. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(4):367-71.
  59. Perez F, Rochd T, Lodter JP, Calas P, Michel G. In vitro study of the penetration of three bacterial strains into root dentine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993;76(1):97-103.
  60. Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, van Winkelhoff AJ. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2001;27(2):76-81.
  61. Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. *Int Endod J* 2002;35(8):698-702.
  62. Pitt Ford TR. The effects on the periapical tissues of bacterial contamination of the filled root canal. *Int Endod J* 1982;15(1):16-22.

63. Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science* 1999;283(5409):1837, 1839.
64. Prove SA, Symons AL, Meyers IA. Physiological root resorption of primary molars. *J Clin Pediatr Dent* 1992;16(3):202-6.
65. Reader CM, Boniface M, Bujanda-Wagner S. Refractory endodontic lesion associated with *Staphylococci aureus*. *J Endod* 1994;20(12):607-9.
66. Ruviera D, Ito I, Leonardo M, Silva L, Nelson-Filho P. Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. *J Dent Child* 2007. In press.
67. Sabeti MA, Nekofar M, Motahhary P, Ghandi M, Simon JH. Healing of apical periodontitis after endodontic treatment with and without obturation in dogs. *J Endod* 2006;32(7):628-33.
68. Safavi KE, Spanberg LSW, Langeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. *J Endod* 1990;16:207-10.
69. Sahara N. Cellular events at the onset of physiological root resorption in rabbit deciduous teeth. *Anat Rec* 2001;264:387-96.
70. Sato T, Hoshino E, Uematsu H, Noda T. In vitro antimicrobial susceptibility to combinations of drugs on bacteria from carious and endodontic lesions of human deciduous teeth. *Oral Microbiol Immunol* 1993;8(3):172-6.
71. Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol* 1995;11(1):6-9.
72. Shovelton DS. The presence and distribution of micro-organisms within non-vital teeth. *Br Dent J* 1964;117:101-7.

73. Silva LA, Nelson-Filho P, Faria G, de Souza-Gugelmin MC, Ito IY. Bacterial profile in primary teeth with necrotic pulp and periapical lesions. *Braz Dent J* 2006;17(2):144-8.
74. Siqueira JF Jr, De Uzeda M, Fonseca ME. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod* 1996;22(6):308-10.
75. Siqueira JF Jr, Lopes HP. Bacteria on the apical root surfaces of untreated teeth with periradicular lesions: a scanning electron microscopy study. *Int Endod J* 2001;34(3):216-20.
76. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Lopes HP. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93(2):174-8.
77. Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997;30(5):297-306.
78. Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990;16(10):498-504.
79. Souza-Gugelmim MCM, Nelson-Filho P, Faria G, Palhares JC, Froner IC, Ito IY. Determinação da microbiota de canais radiculares de decíduos e permanentes portadores de necrose pulpar e lesão periapical, por meio da coloração de Gram. *Stoma* 2001;60:26-32.
80. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85(1):86-93.

81. Sundqvist G, Johansson E, Sjogren U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *J Endod* 1989;15(1):13-9.
82. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol*. 1992 Oct;7(5):257-62.
83. Tani-Ishii N, Wang C-T, Tanner A, Stashenko P. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1994;9:129-35.
84. Tani-Ishii N, Wang CY, Tanner A, Stashenko P. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1994;9(3):129-35.
85. Tomic-Karovic K, Jelinek E. Comparative study of the bacterial flora in the surroundings, the root canals and sockets of deciduous molars. *Int Dent J* 1971;21(3):375-88.
86. Toyoshima Y, Fukushima H, Inoue JI, Sasaki Y, Yamamoto K, Katao H, Ozaki K, Moritani Y, Saito T, Hieda T, Sagawa H. A bacteriology study of periapical pathosis on deciduous teeth. *JPN J Pedod* 1988;26:449-58.
87. Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endod Dent Traumatol* 1990a;6(2):73-7.
88. Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J. Extraradicular endodontic infections. *Endod Dent Traumatol* 1987;3(2):86-90.
89. Tronstad L, Kreshtool D, Barnett F. Microbiological monitoring and results of treatment of extraradicular endodontic infection. *Endod Dent Traumatol* 1990b;6(3):129-36.

90. Walton RE, Ardjmand K. Histological evaluation of the presence of bacteria in induced periapical lesions in monkeys. *J Endod* 1992;18(5):216-21.
91. Wayman BE, Murata SM, Almeida RJ, Fowler CB. A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. *J Endod* 1992;18(4):152-5.
92. Yawaka Y, Kaga M, Osanai M, Fukui A, Oguchi H. Delayed eruption of premolars with periodontitis of primary predecessors and a cystic lesion: a case report. *Int J Paediatr Dent* 2002;12(1):53-60.



**Anexo**



## ANEXO A- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Avenida do Café, s/nº - Telefone: (016) 3602-3963  
14040-904 - Ribeirão Preto - SP - Brasil  
Fax: (016) 3633-0999

OF.CEP/438/FORP/29112006

Prezado(a) Professor(a),

**Ref.: Processo n. 2006.1.1311.58.9**  
**Caae n. 0067.0.138.000-06**

De ordem da Senhora Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, informamos que o referido Comitê, em sua 73ª Sessão realizada no dia 29 de novembro de 2006, deliberou **aprovar** o Projeto de Pesquisa envolvendo seres humanos intitulado: **"MEV – Avaliação da presença ou não do biofilme apical em dentes decíduos de humanos, com e sem vitalidade pulpar"**, a ser desenvolvido por Vossa Senhoria na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, devendo o atestado para publicação final ser expedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa, após a entrega e aprovação do Relatório Final pelo referido Comitê.

Na oportunidade, lembramos da necessidade de entregar na Secretaria do Comitê, com o formulário preenchido pelo pesquisador responsável, o **Relatório Final** até o dia **30 de novembro de 2007**.

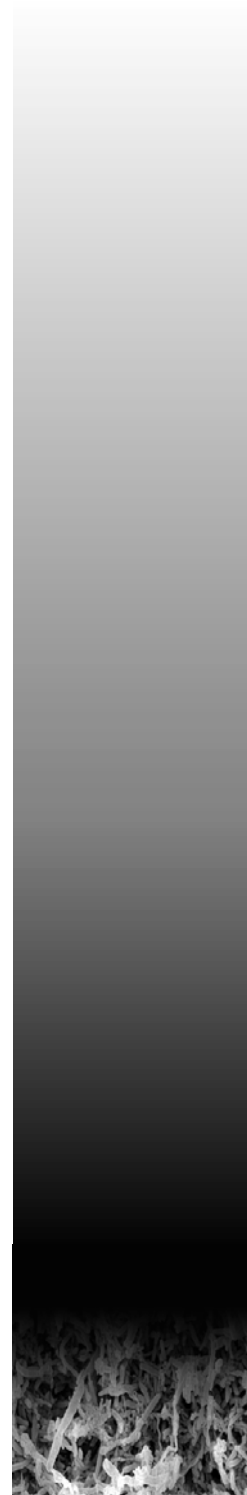
Atenciosamente,

**Glauce Della Rosa**  
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilma. Sra.

**Profa. Dra. LÉA ASSED BEZERRA DA SILVA**

Professora Titular do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social – FORP/USP



***Apêndice***

---

**APÊNDICE A – TRABALHO ENVIADO PARA INTERNATIONAL ENDODONTIC JOURNAL**

**ASSESSMENT OF APICAL BIOFILM IN VITAL AND NONVITAL HUMAN PRIMARY  
TEETH BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY**

Marcos A. ROSSI, MD, PhD<sup>1</sup>

Cristiane Tomaz ROCHA DDS<sup>2</sup>,

Mario Roberto LEONARDO, DDS, PhD<sup>2</sup>,

Léa Assed Bezerra da SILVA, DDS, PhD<sup>2</sup>,

Paulo NELSON-FILHO, DDS, PhD<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Pediatric, Preventive and Community Dentistry, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

**Corresponding Author:**

Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva

Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social,

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo,

Avenida do Café S/N, CEP: 14040-904 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Phone: +55-16-3602-3995. Fax: +55-16-3633-0999.

E-mail: [lea@forp.usp.br](mailto:lea@forp.usp.br)

**ABSTRACT**

The purpose of this study was to evaluate, by scanning electron microscopy (SEM), the presence of microorganisms organized as biofilms in the apical root third of vital and nonvital human primary teeth. Eighteen teeth were selected in three clinical situations: Group I - pulp vitality (n=5), Group II - pulp necrosis without periapical lesion (n=7) and Group III - pulp necrosis with well defined radiographically visible periapical lesion (n=6). After extraction, the teeth were washed with saline and immersed in 0.03 g/mL trypsin solution during 20 minutes. Next, the teeth were washed in sodium cacodilate buffer and stored in receptacles containing modified Karnovsky solution. After 5 days, the teeth were sectioned, dehydrated in an ethanol series, critical-point dried with CO<sub>2</sub>, sputter-coated with gold and examined by SEM. The results showed that in the teeth of Groups I and II, the root surface was covered by collagen fibers, without the presence of bacteria in all specimens (100%). In the teeth of Group III, the root apex showed no collagen fibers and presence of resorption areas containing microorganisms (cocci, bacilli, filaments and spirochetes) in all cases (100%). The presence of apical biofilm was detected only in the primary teeth with pulp necrosis and radiographically visible periapical lesion, which suggests the need for different clinical managements to increase the success rates of the endodontic treatment in both conditions of pulp vitality and pulp necrosis (with and without radiographically visible periapical lesion).

**Key Words:** apical biofilm, primary teeth, extraradicular infection, microorganism, periapical lesion, scanning electron microscopy.

**INTRODUCTION**

The major role of microorganisms in the pathogenesis of pulpal and periapical alterations has been described (Takehashi et al., 1965; Möller et al., 2004).

After pulp exposure due to deep carious lesion, the progression of the infection in the pulp tissue makes that microorganisms that initially occupied the pulp chamber and the root canal lumen, invade the root canal system, i.e., the dentinal tubules, lateral canals, accessory canals, secondary canals, apical delta ramifications, apical foramen and apical root cementum surface (Sen et al., 1995; Leonardo et al., 2002) as well as the periapical tissues (Byström et al., 1987; Nair et al., 1990), which leads to the development of a periapical lesion. The periapical or extra-radicular infection, is inaccessible to the biomechanical preparation and to action of interappointment intracanal

dressings, allowing the persistence and multiplication of microorganisms after conventional endodontic treatment (Tronstad et al., 1987; Tronstad et al., 1990a; Tronstad et al., 1990b; Ferreira et al., 2004). This justifies the low success rates observed after endodontic treatment of these teeth (Nair et al., 1990; Sjögren et al., 1997; Sundqvist et al., 1998).

Another key factor accounting for the persistence of periapical infections (Tronstad et al., 1987; Nair et al., 1990; Tronstad et al., 1990a) is the presence of a gelatinous matrix or extracellular matrix that wraps the microorganisms and aids their organization as a biofilm (Lomçali et al., 1996, Leonardo et al., 2002). The apical biofilm constitutes a mechanical barrier against the action of antimicrobial substances and the host's defense mechanisms (Costerton et al., 1999).

Several scanning microscopic studies have evaluated the presence of biofilm in the root apices of non-endodontically treated permanent teeth (Tronstad et al., 1990a; Tronstad et al., 1990b; Lomçali et al., 1996; Siqueira e Lopes, 2001; Leonardo et al., 2002). Nevertheless, the literature is scarce of studies investigating infections in the root canal system of primary teeth (Silva et al., 2006; Ruvieré et al., 2007), especially regarding extra-radicular infection. This fact, together with the high prevalence of primary teeth requiring pulpectomy and root canal therapy in the clinical practice, justifies the need for development of studies that evaluate the apical region of teeth with different degrees of pulpal and periapical pathologies in the primary dentition. Therefore, the purpose of this study was to evaluate, by scanning electronic microscopy, the presence of microorganisms organized as biofilms in the apical third of human primary teeth with pulp vitality and pulp necrosis (with and without radiographically visible periapical lesion).

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Specimen Selection**

This research proposal was reviewed by the Ethics in Research Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo (Process #2006.1.1311.58.9) and the study design was approved. The apical root third of recently extracted human primary teeth without any previous treatment were evaluated in three situations: teeth with pulp vitality (sound) (Group I; n=5), teeth with pulp necrosis without periapical lesion (Group II; n=7) and teeth with pulp necrosis and well-defined radiographically visible periapical lesion (Group III; n=6).

Eligible participants were selected from patients of both sexes aged 4 to 8 years who had been referred for dental treatment at the Pediatric Dentistry Clinic of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil. Children who had used antibiotics within the previous 3 months were excluded from the trial. The study purposes were fully explained to the parents/guardians, who signed a written informed consent form authorizing the enrollment of the children in the study. The patients were submitted to a clinical interview, review of dental/medical history and clinical/radiographic examination for tooth selection. Over-retained teeth with pulp vitality confirmed by pulp sensitivity tests should present intact crown, absence of fistula, less than 2/3 of physiological root resorption, periodontal probing depth <3 mm, normal periodontal ligament space and intact lamina dura. The teeth with pulp necrosis (with and without well-defined radiographically visible periapical lesion) should present pulp exposure due to carious lesion, presence/absence of fistula, less than 2/3 of root resorption, periodontal probing depth <3 mm and should have indication for extraction because of extensive crown destruction not amenable to restoration.

### **Specimen Preparation**

After tooth extraction, the roots were gently rinsed with sterile saline. Care was taken not to damage the root surface. In the teeth with pulp necrosis and apical periodontitis, the chronic periapical lesion was removed using a scalpel blade with care not to cause any damage to the root surface.

Thereafter, the teeth were placed in sterile glass receptacles during 20 minutes containing 0.15 g trypsin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) weighed in a precision analytical balance (model FA2104N, Bioprecisa, Curitiba, PR, Brazil) and diluted in 5 mL distilled water to reach a concentration of 0.03 g/mL. Next, the teeth were washed in 0.1 M sodium cacodylate buffer and placed in individual receptacles containing modified Karnovsky solution (8% glutaraldehyde, 12% paraformaldehyde, in 0.2 M sodium cacodylate, pH 7.2-7.4) during a minimum of 5 days.

After this period, using a carborundum disk mounted in a low-speed handpiece, a groove was made perpendicular to the long axis of the root at a distance of 3 mm from the root apex. This groove served as a guide for the placement of a surgical chisel that was used together with surgical hammer to sever the apical portion from the root remnant. All procedures were performed in a laminate flow chamber with care not to damage apical root portion.

### **Specimen Processing for SEM**

The root apexes (apical 3 mm) were dehydrated in an increasing ethanol series (70, 95 and 100%), each solution being changed at 15-minute intervals within 1 hour *per* solution. The specimens were critical-point dried with CO<sub>2</sub> (Bal-Tec CPD 030, Fürstentum, Liechtenstein), sputter-coated with gold to obtain an approximately 200-µm-thick layer (Emitech K650 Sputter Coater, London, UK) and examined with a scanning electron microscope operating at 940 A and 15 kV (Zeiss, Oberkochen, Germany).

### **Analysis of the Specimens**

For analysis of the specimens, it was first used an X50 magnification to locate the root apical third in order to obtain an overview of the apical root surface morphology and adjacent areas. The areas of the main apical foramen were examined under X100, 200 and 500 magnification, using the apical region as a reference point. Greater magnifications (X1000, 2000, 3000 and 5000) were used to identify the presence of apical biofilm, detecting microorganisms on root cementum and root resorption areas (cementum and dentin). The microorganisms were characterized morphologically as cocci, bacilli, filaments and spirochetes. The incidence of microorganisms in apical biofilm in the three experimental groups was recorded as percentages.

## **RESULTS**

Microorganisms were absent in 100% of the teeth with pulp vitality (Group I) and pulp necrosis without radiographically visible periapical lesion (Group II). In the teeth of these groups, the root surface was covered by a large amount of adhered periodontal ligament remnants, which hindered direct visualization of the apical foramen. Collagen fibers arranged in different directions extended from the apical surface in either thick or thin bundles interwoven to each other (Figure 1). Physiological root resorption was observed in 1 tooth of Group I (20%) and 3 teeth of Group II (42.85%).

On the other hand, all teeth in Group III (100%) presented microorganisms organized as biofilms. There were resorption areas on the apical surface of these teeth, which exhibited an intense number of microorganisms under greater magnifications (Figure 2). In this group, the bacterial morphotypes consisted primarily of cocci and bacilli, although spirochetes and filaments were found as well (Figure 3). Fungal cells were not observed.

Exuberant microbial aggregates were detected around the main apical foramen (Figure 4). Mononuclear cells were found in the surroundings or "within" this biofilm (Figure 5).

## **DISCUSSION**

Several studies (Takehashi et al., 1965; Möller et al., 2004) have demonstrated that microorganisms play an important role in the genesis and maintenance of pulpal and periapical pathologies in permanent teeth.

However, few authors have investigated the microbiota in the root canal system of primary teeth. Studies using conventional microbial culture (Silva et al., 2006) and molecular biology (Ruvieré et al., 2007) techniques have shown that, in cases of apical periodontitis, the endodontic microbiota is similar in both primary and permanent dentitions, consisting of a polymicrobial infection with predominance of streptococci and anaerobic bacteria. Nevertheless, as far as it could be ascertained, there are no current scanning electron microscopic studies evaluating the extra-radicular infection (apical biofilm) in primary teeth, which precludes the comparison of the findings of the present study to previously published data. As emphasized by Molven et al. (1991) e Sen et al. (1995), scanning electron microscopy is an accurate method to evaluate the presence of microbial biofilm and is a routinely employed method in studies investigating extra-radicular infection in non-endodontically treated permanent teeth (Tronstad et al., 1990a; Tronstad et al., 1990b; Lomçali et al., 1996;; Leonardo et al., 2002).

In the present study, the teeth in Group I were clinically sound and thus free of bacterial contamination of the pulp tissue. It has been previously confirmed by scanning electron microscopic studies (Lomçali et al. 1996; Leonardo et al. 2002) that found no microorganisms and presence of a large number of collagen fibers in the root apex of clinically healthy permanent teeth.

As pointed out by Leonardo (2005), in teeth with pulp necrosis but no radiographically visible periapical lesion, the microorganisms are lodged only in the lumen of the main root canal with presence of living tissue remnants in the remainder of the root canal system. The findings of the present study with primary teeth are in agreement with these statements given that the specimens in Group I and Group II did not exhibit microorganisms in the extra-radicular areas, which indicate that the microbial species were still restricted to the main root canal lumen (Leonardo et al., 2002). Although some authors have questioned whether the operative procedures, basically those related to



tooth extraction, would lead to contamination of the specimens (Sundqvist et al., 1998; Siqueira e Lopes, 2001), no microorganisms were found in the root apexes of the primary teeth in Groups I and II.

In the present study, all specimens in Group III (100%) showed absence of collagen fibers and presence of microorganisms organized as biofilms in the apical region, even in resorption areas. These findings do not agree with those of Siqueira & Lopes (2001), who stated that the occurrence of extra-radicular infection is not common in non-root-filled permanent teeth. This difference might be due to the fact that in the present study the teeth were immersed in trypsin after extraction, as recommended by Leonardo et al. (2002) and Ferreira et al. (2004), which facilitated the identification of the microorganisms.

In the present study, the bacterial types identified in the teeth of Group III consisted predominantly of cocci and bacilli, being observed filaments and spirochetes as well. These findings are consistent with the results of previous studies with permanent teeth (Tronstad et al., 1990a; Leonardo et al., 2002). Although some authors have reported the presence of fungal cells on the root surface of permanent teeth (Tronstad et al., 1987; Lomçali et al., 1996; Ferreira et al., 2004), in the present study these cell types were not identified.

Based on the results of Group III, it may be inferred that, from a clinical standpoint, the elimination of the microorganisms from the extra-radicular area of primary teeth by means of adequate technical procedures and placement of interappointment intracanal dressings is of paramount importance because these measures will interfere directly on the prognosis of the endodontic treatment.

Presence of apical biofilm in primary teeth leads to the persistence of the inflammatory process, delaying or even precluding periapical healing, which might cause alterations in the developing permanent successor germ (Cordeiro & Rocha, 2005), changes in the patient's general health status (Brook, 2000) and acceleration of the physiological root resorption process (Haralabakis et al., 1994). These factors may cause the premature loss of the primary teeth (Leroy, 2003), with important functional and/or esthetic sequelae, including loss of space in the dental arch, loss of eruption guide for the permanent successor, phonetic problems and development of deleterious habits (Cuoghi et al., 1998).

Therefore, in view of the different degrees of pulpal and periapical pathologies occurring in primary teeth, pediatric dentists should choose specific therapeutic conducts.

Given that the presence of apical biofilm is one of the key factors for induction and maintenance of apical periodontitis and that it is resistant to the action of antimicrobial agents and biomechanical preparation of the root canal system, further studies investigating the efficacy of new materials and techniques are required aiming at its effective elimination.

## **CONCLUSION**

The presence of microorganisms organized as biofilms in the root apex region was found only in the primary teeth with pulp necrosis and radiographically visible periapical lesion, which suggests the need for different clinical managements to increase the success rates of the endodontic treatment in both conditions of pulp vitality and pulp necrosis (with and without radiographically visible periapical lesion).

## **REFERENCES**

Bystrom A, Happonen RP, Sjogren U, Sundqvist G (1987) Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Endodontics & Dental Traumatology* 3, 58-63.

Brook I (2000) Anaerobic infections in children. *Advances in pediatrics* 47, 395-437.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-22.

Ferreira FB, Ferreira AL, Gomes BP, Souza-Filho FJ (2004) Resolution of persistent periapical infection by endodontic surgery. *International Endodontic Journal* 37, 61-9.

Haralabakis NB, Yiagtzis SC, Toutountzakis NM (1994) Premature or delayed exfoliation of deciduous teeth and root resorption and formation *Angle Orthodontist* 64, 151-7.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ (1965) The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* 20,340-9.

Cuoghi OA, Bertoz FA, de Mendonca MR, Santos EC (1998) Loss of space and dental arch length after the loss of the lower first primary molar: a longitudinal study. *Journal Clinical Pediatric Dentistry* 22,117-20.

Leonardo MR. Endodonzia: Tratamiento de conductos radiculares – princípios técnicos e biológicos. São Paulo: Artes Médicas, 2005.

Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifacio KC (2002) EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *Journal of Endodontics* 28,815-8.

Leroy R, Bogaerts K, Lesaffre E, Declerck D (2003) Impact of caries experience in the deciduous molars on the emergence of the successors. *European Journal of Oral Sciences* 111, 106-10.

Lomcali G, Sen BH, Cankaya H (1996) Scanning electron microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. *Endodontics & Dental Traumatology* 12, 70-6.

Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Sundqvist G, Happonen RP (2004) Apical periodontitis development and bacterial response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains. *European Journal of Oral Sciences* 112, 207-15.

Molven O, Olsen I, Kerekes K (1991) Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. *Endodontics & Dental Traumatology* 7, 226-9.

Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G (1990) Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *Journal of Endodontics* 16, 580-8.

Sen BH, Piskin B, Demirci T (1995) Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endodontics & Dental Traumatology* 11, 6-9.

Silva LA, Nelson-Filho P, Faria G, de Souza-Gugelmin MC, Ito IY (2006) Bacterial profile in primary teeth with necrotic pulp and periapical lesions. *Brazilian Dental Journal* 17, 144-8.

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

Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G (1997) Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal* 30, 297-306.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U (1998) Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 85, 86-93.

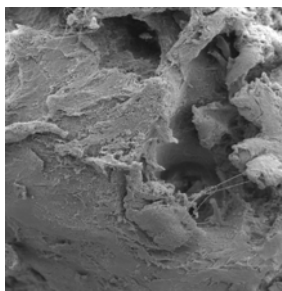
Tronstad L, Barnett F, Cervone F (1990a) Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endodontics & Dental Traumatology* 6, 73-7.

Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J (1987) Extraradicular endodontic infections. *Endodontics & Dental Traumatology* 3, 86-90.

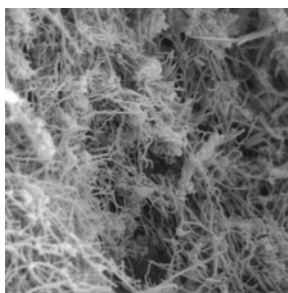
Tronstad L, Kreshtool D, Barnett F (1990b) Microbiological monitoring and results of treatment of extraradicular endodontic infection. *Endodontics & Dental Traumatology* 6, 129-36.

Cordeiro MM, Rocha MJ (2005) The effects of periradicular inflammation and infection on a primary tooth and permanent successor. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry* 29, 193-200.

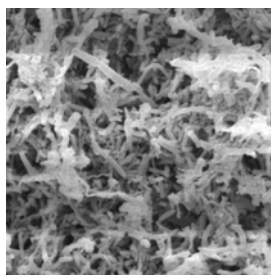
Ruvière D, Ito I, Leonardo M, Silva L, Nelson-Filho P (2007) Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Journal of Dentistry for Children*. In press.



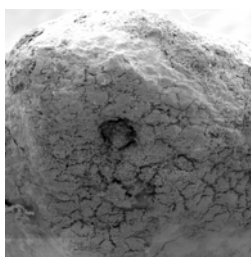
**Figure 1** - Collagen fibers arranged in different directions extended from the apical surface.



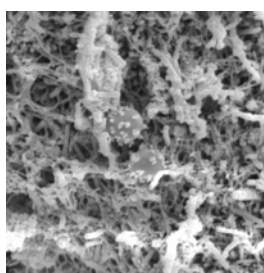
**Figure 2** - Resorption areas on the apical surface with an intense number of microorganisms under greater magnifications.



**Figure 3** - Bacterial morphotypes consisted primarily of cocci and bacilli.



**Figure 4** - Exuberant microbial aggregates around the main apical foramen.



**Figure 5** - Mononuclear cells in the surroundings or "within" this biofilm.

## AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

***Cristiane Tomaz Rocha***

*Universidade de São Paulo*

*Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto*

*Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social*

*Ribeirão Preto/Maio de 2007*

*Avenida do Café s/n CEP 14040-904*

*e-mail: cristianetomaz@hotmail.com*