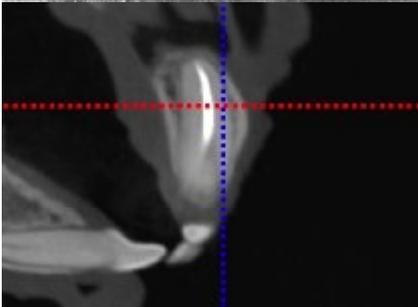
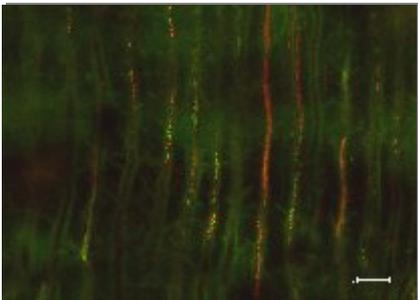


Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

**PERIODONTITE APICAL INDUZIDA EM CÃES. EFEITO DO TRATAMENTO
ENDODÔNTICO. ESTUDO MICROBIOLÓGICO, TOMOGRÁFICO E DE
MICROSCOPIA CONFOCAL.**

」 」



**Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia de Bauru da
Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Odontologia
área de Endodontia**

**Aluno: Ronald Ordinola Zapata
Orientador: Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante**

**Bauru
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

RONALD ORDINOLA ZAPATA

Periodontite apical induzida em cães. Efeito do tratamento endodôntico. Estudo microbiológico, tomográfico e de microscopia confocal.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Endodontia
Orientador: Prof. Dr. Clóvis Monteiro Bramante

Bauru
2009

M276a Ordinola-Zapata, Ronald
Periodontite apical induzida em cães. Efeito do
tratamento endodôntico. Estudo microbiológico,
tomográfico e de microscopia confocal/ Ronald Ordinola
Zapata -- Bauru, 2009.
151p. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Clóvis Monteiro Bramante

Autorizo, exclusivamente pra fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta tese, por processo
fotocopiadores e/ou meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo n.º: 08/2007

Data: 25/09/2009

Dados Curriculares

Ronald Ordinola Zapata

21 de Maio de 1976

Nascimento

Lima-Peru

Filiação

Luciano A. Ordinola Rueda

Paula R. Zapata Velit

1993-2000

Graduação na Universidade Inca

Garcilaso de La Vega Lima-Peru

2002

Curso de aperfeiçoamento em Endodontia

Sociedade Peruana de Endodontia

2005

Prêmio Grunenthal em Odontologia

Colegio Odontologico del Peru

2007-2009

Curso de pós-graduação, mestrado,

área de Endodontia pela

Faculdade de Odontologia de Bauru

Universidade de São Paulo

Associação

SBPQO

COP-Peru

DEDICATÓRIA

A Deus, pela vida, saúde e oportunidades.

Pessoalmente, dedico este trabalho a meus pais Luciano e Paula, e a minha irmã Daisy, por seu exemplo de constante esforço e estudo.

Este trabalho é dedicado aos futuros alunos de Odontologia, para que aproveitem e multipliquem seus talentos.

AGRADECIMENTOS

Durante os últimos 30 meses, tive o privilégio de desenvolver os experimentos apresentados nesta Dissertação nos Departamentos de Endodontia, Biologia Oral, Estomatologia, Centro Integrado de Pesquisa e Biotério central da Faculdade de Odontologia de Bauru. Meus sinceros agradecimentos a todos os que contribuíram para a realização do estudo.

AGRADECIMENTOS

Deus, obrigado pela vida, saúde e oportunidades, Muito Obrigado!

...Jesus respondeu: Tende fé em Deus. Em verdade vos digo, se alguém disser a este monte: ergue-te e lança-te ao mar, e não duvidar no coração, mas crer que o que diz se realiza, assim lhe acontecerá.

Marcos 11:12-14 e 11:20-26

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa do diretor, Prof. Dr. Luis Fernando Pegoraro.

À comissão de Pós-graduação na pessoa da Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Endodontia Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP, pela concessão de bolsa de estudo para a realização do trabalho

Ao programa Pró-Aluno- CAPES, pela ajuda com a disponibilização dos materiais utilizados nesta dissertação.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Clóvis Monteiro Bramante, por tudo que fez por mim. Pela confiança, amizade, oportunidade para poder seguir o curso de Mestrado, onde consegui desenvolver minha curiosidade. Obrigado pela liberdade, as palavras, o incentivo, a confiança, por tentar saber mais de computação, curioso igualmente; pela preocupação para que não falte nada na nossa biblioteca, mas principalmente pelo exemplo de dedicação e esforço que vejo no senhor diariamente. Muito Obrigado!!

Agradeço aos queridos professores da disciplina de Endodontia, Prof. Dr. Ivaldo Gomes de Moraes; Prof. Dr. Norberti Bernardineli, Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia; Prof. Dr. Marco Húngaro Duarte. A todos vocês obrigado pelo aprofundamento da biologia e ciência dos materiais dentários aplicada à Endodontia, pela dedicação, amizade, afino e perfeccionismo e por tratar-me com tanto respeito e carinho durante o curso de mestrado.

À Profa. Dra. Ana Paula Campanelli, pela competência, ajuda na revisão dos manuscritos e pela oportunidade de desenvolver parte deste trabalho no laboratório de Imunologia da FOB-USP.

À Profa. Dra. Ana Lúcia Álvares Capellozza, pela disponibilização do tomógrafo i-CAT do departamento de Estomatologia.

Ao Professor Dr. Vinicius Carvalho Porto, Diretor do Centro Integrado de Pesquisa FOB-USP pela disponibilização do microscópio confocal utilizado nesta pesquisa.

Muito obrigado...

AGRADECIMENTOS

Agradeço de todo coração a enorme ajuda de Marcia SZ Graeff, pelo grande tempo dedicado para me explicar, fazer e refazer muitas partes deste trabalho no microscópio confocal e, principalmente pela grande amizade e exemplo de esforço que deu para mim. Obrigado por tudo!

Agradeço a André da Silva pela competência, paciência e bom humor para me explicar toda a metodologia do processo microbiológico.

Aos funcionários do Biotério Erasmo, Luiz Carlos, Elias e Richard que me receberam abertamente, sempre prontos a ajudar e ensinar os cuidados com os animais.

A Edimauro de Andrade, pelos bons momentos, os dentes, o microscópio, as conversas, as visitas dos carneiros e tudo mais..muito obrigado!

A meus professores de Endodontia da graduação e da Sociedade Peruana de Endodontia por me iniciarem na pesquisa e confiarem no meu trabalho Carlos Ortiz Franco, Carlos Mendiola Aquino, Martin Vargas Acevedo, Javier Zubiata, Arturo Lopez Begazo, Rony Hidalgo, Hernan Villena, Christian Nole, Uwe Arroyo.

Aos Doutores Luis Chavez de Paz pela carta de recomendação; James Gutmann pela ajuda e sugestões na preparação dos artigos; Gilberto Debelian, pelo incentivo e auxílio com equipamentos e materiais durante o desenvolvimento das pesquisas; Mario Tanomaru Filho e Juliane, pela constante palavra de apoio.

Ao professor Luis Cabrejos da Faculdade de Estomatologia UIGV pela oportunidade na docência.

À família Paes da Silva Ramos Fernandes: Odila, Lourdes, Maria Eugênia, José Carlos e Ecila pelo apoio e companhia durante meus estudos e à minha namorada Luciana pelo bom sentido do humor, apoio, paciência e carinho.

Aos amigos do Mestrado e Doutorado: obrigado pela convivência e aprendizado...levo de cada um de vocês muitas lembranças e carinhos. Muitos Sucesso a vocês!

Ericson, Fabiana, Natasha, Marcela, Melina, Paulo, Rodrigo e Tatiana.

Agradeço a todos os colegas da pós-graduação, seja do Mestrado ou Doutorado, pela ajuda sempre que foi necessária, especialmente a: Thais H. Gasparoto, Carla R. Sipert, Tatiana Salles, Rosalyn Chidiak, Lourdes Chiof, Hayana, Fernando Orosco, Paulo Mauricio, Ronan Delgado, Fausto Victorino, Jarcio Baldi, Lívia, Bethania, Augusto Bodanezi.

*A meus amigos da nova turma de mestrado de Endodontia:
Aldo, Bruno, Clarissa, Elaine, Marina, Paloma, Raquel,
Marcelo e Thais. Muito obrigado pelo carinho!*

*A todos os professores do curso de Pós-graduação durante o
mestrado.*

*Aos funcionários da Pós – graduação e da Biblioteca por todo
apoio para a realização deste trabalho, especialmente Teca,
Letícia, Rita e Gianne.*

*Aos funcionários da disciplina de Endodontia: Sueli, D. Neide,
Edimauro, Patrícia e Cleide sempre prontos a me atenderem.
Obrigado pela grande ajuda e pelo trabalho que desempenham na
Endodontia.*

*Aos cães utilizados nesta pesquisa, pelos quais foram obtidos
conhecimentos em benefício da ciência.*

*“Aquele que possui a beleza sem vaidade, a força sem insolência,
a coragem sem ferocidade e todas as virtudes do homem sem os
seus vícios.” L. Byron.*

*In pulp biology, or in endodontology, opinions may differ, but
only cells distinguish between facts and fiction.*

Kaare Langeland.

R*ESUMO*

RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de avaliar a capacidade da bactéria *Enterococcus faecalis* em induzir periodontite apical no modelo experimental canino; verificar se o preparo químico-mecânico afeta a sobrevivência dessa bactéria no sistema de canais radiculares e avaliar o reparo desses dentes por meio de radiografia periapical e tomografia computadorizada *cone beam*. Dentes com e sem tratamento endodôntico foram avaliados por meio de microscopia confocal de varredura a laser. Para tal, foram utilizados 2 cães. A bactéria *Enterococcus faecalis* foi inoculada nos canais de 4 pré-molares superiores, 11 pré-molares inferiores e 9 incisivos superiores. As câmaras pulpares foram seladas e, após 60 dias, os canais das raízes distais dos pré-molares e de 7 incisivos superiores foram submetidos a tratamento endodôntico em sessão única e os canais das raízes mesiais dos pré-molares e 2 incisivos superiores foram deixados sem tratamento (controle). Amostras microbiológicas foram feitas antes e após o preparo químico-mecânico. O reparo foi avaliado após 6 meses do tratamento mediante radiografias periapicais e por tomografia computadorizada *cone beam*. A comparação entre as imagens obtidas após o período experimental pelos 2 métodos foi feita por medições da área em mm² de cada lesão encontrada, utilizando o software ImageTool. Os resultados mostraram que a presença de periodontite apical crônica foi verificada em todos os dentes inoculados, independentemente da colonização pela bactéria *Enterococcus faecalis* ou pela flora mista. O preparo químico-mecânico reduziu significativamente o número de bactérias no interior dos canais radiculares ($p < 0.05$). Os resultados radiográficos e tomográficos demonstraram lesões de menor diâmetro nos dentes tratados endodonticamente em comparação ao grupo controle ($p < 0.05$). A comparação entre os métodos demonstrou diferença estatística entre eles sendo evidenciadas áreas radiolúcidas maiores utilizando a tomografia *cone beam* em comparação com a radiografia periapical ($p < 0.05$). Concluiu-se que a bactéria *Enterococcus faecalis* induziu periodontite apical crônica similarmente à flora mista; o tratamento endodôntico reduziu o número de bactérias cultiváveis significativamente embora sem relação com o reparo radiográfico. Os dentes tratados em sessão única apresentavam lesões menores em comparação aos não-tratados e as áreas das lesões observadas na TC *cone beam* foram maiores do que as áreas encontradas nas radiografias periapicais. A microscopia confocal e o método proposto neste estudo se mostraram eficazes para determinar, qualitativamente, a viabilidade bacteriana e a distribuição de ácidos nucleicos bacterianos dentro dos túbulos dentinários. Houve diferença entre a dentina

infectada *in vitro* com o padrão de infecção *in vivo*, caracterizada pela presença de biofilmes aderidos à parede do canal radicular.

Palavras chave: *Enterococcus faecalis*. Necrose pulpar. Periodontite apical. Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico. Microscopia confocal

***A*bstract**

ABSTRACT

The aims of this study were to evaluate the *Enterococcus faecalis*' ability to induce apical periodontitis in dog's root canals, to verify the bacteria's ability to survive to the cleaning and shaping procedures and to assess the healing of the induced apical periodontitis by periapical radiograph and cone beam computed tomography. Also, endodontically treated and non-treated teeth were evaluated by confocal laser scanning microscope. Two mongrel dogs were used in the experiment. *Enterococcus faecalis* strain was inoculated into the root canals of 4 maxillary premolars, 11 mandibular premolars and 9 maxillary incisors. After 60 days the root canals of the distal roots of the mandibular and maxillary pre-molars and 7 maxillary incisors were endodontically treated. The premolars' mesial root canal and 2 maxillary incisors were used as control (no treatment). Microbiologic samples were done after and before the cleaning and shaping procedure. The healing was evaluated after 6 months by periapical radiographs and cone beam computed tomography. The comparison between obtained images after the experimental period by the two methods was done using measures of the lesion area in mm² with ImageTool software. The results showed the presence of chronic apical periodontitis in every inoculated teeth, with *Enterococcus faecalis* or mixed infection. The cleaning and shaping procedures reduced the number of bacteria of the root canals (p<0.05). The radiographic and tomographic results showed the lower diameter lesion in endodontically treated teeth than in the control group (p<0.05). The comparison between the methods showed statistical difference and greater radiolucent areas were evident in cone beam computed tomography images (p<0.05). It is possible to conclude that the bacteria *Enterococcus faecalis* induced chronic apical periodontitis as well as the mixed microflora; the endodontic treatment reduced the number of cultivable bacteria in a significant way, but with no relation to the radiographic healing. The treated teeth in only one session presented smaller lesions in comparison to the non-treated teeth and the lesions area in cone beam computed tomography were bigger than the areas found in periapical radiograph. The confocal microscopy and the proposed method of this study showed to be efficient to determine the bacterial ability and the distribution of bacterial nucleic acids inside the dentin tubules. There was difference between *in vitro* infected dentin with the *in vivo* infection pattern, which presents biofilm attached to the root canal walls.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, pulp necrosis, apical periodontitis, cone beam tomography, confocal microscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

- Figura 1. (A) Imagem radiográfica dos incisivos e pré-molares superiores e inferiores antes dos procedimentos..... 61
- Figura 2. (A-C) Procedimentos de desinfecção utilizando peróxido de hidrogênio 30% e tintura de iodo 10%. (D) Abertura coronária utilizando ponta diamantada esférica estéril e irrigação com soro fisiológico. (E-F) Lima Hedstroen utilizada para remover o tecido pulpar e contaminação com solução de BHI contendo a bactéria *Enterococcus faecalis*. (G-I) Restauração com ionômero de vidro. 61
- Figura 3. (A) Procedimentos clínicos realizados nas raízes distais dos pré-molares inferiores. Observar instrumento rotatório 40.10 no comprimento de trabalho, odontometria (B) e obturação dos canais radiculares (C). 67
- Figura 4. (A) Ágar de bile esculina no qual se observam colônias de *Enterococcus faecalis*. A reação a esculina é positiva. (B) Jarra de anaerobiose utilizada para a incubação das amostras. (C) Placa de ágar Brucella contendo diversidade de colônias bacterianas caracterizando infecção do tipo mista..... 67
- Figura 5. (A) Tomógrafo computadorizado *cone beam* i-CAT utilizado no estudo. (B) Imagem periapical do terceiro pré-molar inferior. Reconstrução multiplanar (MPR) do terceiro pré-molar inferior. A imagem está orientada para coincidir, em angulação, com a imagem presente na radiografia periapical correspondente (C-D). Corte sagital utilizado para medir a radiodensidade óssea das áreas radiolúcidas da raiz com tratamento (vermelho) e da raiz sem tratamento (azul). Adicionalmente foi medida uma área de osso sem afecção periodontal (verde). Os valores da radiodensidade são expressos em unidades HU (Hounsfield) pelo programa i-CAT Vision..... 73
- Figura 6. (A) Cilindros de dentina bovina incubados em BHI. (B) Teste bioquímico de Bilis esculina para confirmar a pureza da cepa. (C-D) Diagrama do modelo utilizado e fotografia mostrando o posicionamento das amostras no microscópio confocal. (E) Células de *Enterococcus faecalis* coradas com laranja de acridina e (F) fluoresceína diacetato/iodeto de propídio..... 79
- Figura 7. Fase laboratorial do experimento 2. (A) Dentes de cão tratados endodonticamente. (B) Amostra fixada em placa de acrílico utilizando godiva. (C) Máquina de corte tipo Isomet utilizada para a secção da amostra. (D) Segmento de dentina corado com laranja de acridina. (E) Microscópio confocal de varredura a laser utilizado durante a pesquisa. (F) Fatia corada com laranja de acridina: observar a presença do material obturador e de um vazio na obturação (seta). (H) Fatia corada com laranja de acridina correspondente a dente necrótico sem tratamento: observar a presença de matéria orgânica aderida às paredes do canal radicular. (H-I) Microscopia confocal de varredura a laser de dente sem tratamento e dente obturado mostrando bactérias nos túbulos dentinários (*). 81
-

Figura 8. (A) Raízes distais tratadas endodonticamente correspondentes aos 2 ^o ., 3 ^o . e 4 ^o . pré-molares inferiores. Imagem de radiografia periapical não mostra radiolusciência nos dentes tratados. (B-D) TCCB evidencia presença de periodontite apical na raiz distal do 2 ^o . e 4 ^o . pré-molares inferiores. Raízes mesiais apresentam nítida imagem de periodontite apical crônica.....	97
Figura 9. (A) Radiografia periapical mostrando raiz mesial do 3 ^o . pré-molar sem tratamento; raiz distal do 2 ^o . pré-molar com tratamento endodôntico e raiz mesial do 2 ^o . pré-molar sem tratamento. Observar a dificuldade para delimitar a extensão das lesões periapicais. (B) TCCB dos dentes observados na imagem periapical: a presença de periodontite apical crônica é evidente em todas as raízes.	97
Figura 10. (A) Imagem tomográfica de incisivo superior sem tratamento endodôntico; observar a extensa lesão periapical (seta). (B) Dente contralateral com tratamento evidencia discreta presença de lesão (seta). (C-D) Corte sagital de incisivos superiores com e sem tratamento endodôntico; observar os diferentes aspectos das lesões.	99
Figura 11. (A, C) Imagens de radiografia periapical da raiz distal dos 3 ^o . e 4 ^o . pré-molares inferiores tratados endodonticamente. A presença de periodontite apical crônica não é evidente nos 3 ^o s pré-molares. (B-D) Imagens de TCCB mostrando rarefação apical nas 4 raízes distais observadas.	99
Figura 12. O efeito adverso da sobreposição óssea na interpretação da presença de periodontite apical na radiografia periapical pode ser visto neste exemplo. (A) Observar a raiz distal do 3 ^o . pré-molar (seta), na qual não há evidência de lesão periapical. (B) TCCB indica presença de lesão periapical. A imagem em C representa ausência de lesão a nível da cortical lingual. Em D e E, a presença das lesões é visível. (F) A nível da cortical vestibular, não há evidência de lesão periapical.	101
Figura 13. (A-B) Controle negativo. (C) Microscopia confocal de varredura a laser de dentina infectada após o 21 ^o . dia: observar a fluorescência dos tubulos infectados. (D) As células bacterianas (vermelhas) na parede do canal radicular (seta) penetram nos túbulos dentinários. As fluorescências verde e vermelha são vistas no interior dos túbulos dentinários infectados. (E) Imagem de alguns túbulos dentinários infectados evidenciando fluorescência vermelha, indicando a presença de RNA, sinal de atividade metabólica bacteriana. As células com fluorescência verde indicam a presença de DNA. Microorganismos no interior dos túbulos dentinários são identificáveis por sua estrutura cocoidal.....	103

-
- Figura 14. (A) Microscopia confocal de varredura a laser de dentina infectada após o 21^o. dia, corada com diacetato de fluoresceína/ iodeto de propídio. A e C representam 2 campos microscópicos consecutivos, de aproximadamente 350µm do interior da dentina radicular da parede do canal radicular. (C) Bactérias vivas (em verde) são vistas em túbulos dentinários próximos à parede do canal radicular. Entretanto, ambas bactérias vivas e mortas (em vermelho) são mais numerosas no segundo campo microscópico (A), aproximadamente 350µm do interior da dentina radicular. Uma magnificação desta área é vista em B. Todos os túbulos dentinários estão infectados. Um único túbulo dentinário com grande quantidade de células mortas (em vermelho) é visto (seta). Tais células mortas não são diferenciáveis por sua estrutura celular, que é amorfa. A discriminação entre bactérias vivas (em verde) e mortas (em vermelho) no interior de outros túbulos dentinários é claramente possível. O aumento de 630 vezes, de alta resolução, com zoom adicional de 3 (D) mostra células cocoidais vivas (em verde) juntamente com células mortas (em vermelho) no interior de um único túbulo dentinário. 105
- Figura 15. (A) Corte transversal a nível do terço médio de incisivo necrótico de cão, corado com laranja de acridina. Observar a camada de tecido orgânico aderida ao redor das paredes do canal radicular (seta). Imagem de microscopia confocal mostrando em detalhe o que aparenta ser uma grande colônia bacteriana embebida em uma matriz (B-C). As imagens em (D-F) mostram em detalhe a relação entre a suposta colônia bacteriana e a pré-dentina. Observar em detalhe a estrutura marcada (*) mostrando prolongações que penetram na pré-dentina e dentina. A infecção dos túbulos dentinários adjacentes a esta estrutura pode ser confirmada na figura (G). Outra imagem em (E) mostra uma colônia evidenciando corpos celulares bacterianos (seta) aderido à estrutura maior: observar a textura da superfície. Embora corpos celulares bacterianos não possam ser identificados na maior parte desta estrutura, a infecção dos túbulos dentinários adjacentes confirma a natureza infecciosa do conteúdo orgânico nas paredes do canal radicular. 107
- Figura 16. (A) Corte transversal a nível do terço médio de incisivo necrótico de cão, corado com laranja de acridina. Observar a estrutura orgânica aderida na parede do canal radicular (*) e a relação com a infecção dos túbulos dentinários adjacentes (seta). (B-C) Secções ópticas de 0,3µm da estrutura orgânica mostra bactérias no interior (*) e nos túbulos dentinários adjacentes (seta), observam-se nitidamente corpos bacterianos. 109
- Figura 17. Secção transversal de canal radicular obturado de cão pela técnica de condensação lateral corada com laranja de acridina (B). Detalhe da interface guta-percha, cimento e dentina pode ser visto em (A). Observar a afinidade do corante com o cimento radicular. Detalhe da dentina adjacente em (C): observar a presença de bactérias no interior dos túbulos dentinários que apresentam-se infectados. 111
-

GRÁFICOS

Gráfico 1. Valores, em mm ² , das áreas radiolúcidas periapicais associadas aos dentes com e sem tratamento endodôntico observados nas imagens de RP e nas de TCCB.....	91
Gráfico 2. Valores individuais em mm ² , das áreas radiolúcidas periapicais associadas aos dentes com e sem tratamento endodôntico observados nas imagens de RP (n=17).....	91
Gráfico 3. Valores individuais em mm ² , das áreas radiolúcidas periapicais associadas aos dentes com e sem tratamento endodôntico (raiz contralateral) observados nas imagens de TCCB (n=17).....	92
Gráfico 4. Valores em HU (Hounsfield) da radiodensidade óssea das áreas radiolúcidas periapicais associadas aos dentes com e sem tratamento endodôntico, observadas nas imagens de TCCB.....	93
Gráfico 5. Valores individuais em HU da radiodensidade óssea de áreas radiolúcidas periapicais associada aos dentes com e sem tratamento endodôntico e as áreas de osso normal observadas nas imagens de TCCB. Observar como os casos 1, 3, 4, 5, 7, 11, 12 e 13 apresentam uma leve maior radiodensidade em comparação aos contralaterais sem tratamento, porém sem alcançar a radiodensidade da zona sem afecção. Os casos 2, 6, 8, 9, 10, 14, 15, 16 e 17 apresentam similar ou menor radiodensidade que o contralateral sem tratamento.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos dentes e raízes utilizados nos animais experimentais.....	59
Tabela 2. Resultados microbiológicos e o efeito do tratamento sobre a microbiota do canal. Pré-instrumentação (S1), pós-instrumentação (S2).....	88
Tabela 3. Estado periapical após os procedimentos de inoculação de acordo com a análise radiográfica subjetiva.	89
Tabela 4. Média, mediana e desvio padrão, em mm ² , da área radiolúcida periapical associada aos dentes com e sem tratamento endodôntico, observadas nas imagens de RP e nas de TCCB.....	90
Tabela 5. Valores de média, mediana e desvio padrão em Hounsfield (HU) da zona periapical dos grupos experimentais e controle.	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
+	mais
x	vezes
<	menor
=	igual
ATCC	<i>american type culture collection</i>
BHI	<i>brain heart infusion</i>
cm	centímetro (s)
EDTA	ácido etileno diaminotetracético
g	grama (s)
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i>
LPS	lipopolissacarídeo (endotoxina)
min	minuto (s)
s	segundo (s)
mL	mililitro (s)
mm	milímetro (s)
µL	microlitro (s)
µm	micrômetro
nº	número
°C	grau Celsius
p	significância estatística
PCR	reação de cadeia de polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
MEV	microscopia eletrônica de varredura
TSB	<i>trypticase soy broth</i>
UFCs	unidades formadoras de colônias
TCCB	tomografia computadorizada <i>cone beam</i>
HU	unidades Hounsfield
MPR	reconstrução multiplanar
FOV	<i>field of view</i>
PAI	índice periapical (<i>periapical index</i>)
RP	radiografia periapical
CLSM	Microscopia confocal de varredura a laser

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	31
2.1 Infecção endodôntica em humanos e infecção induzida experimentalmente em animais.....	33
2.2 Relação do <i>Enterococcus faecalis</i> com insucesso do tratamento endodôntico.....	37
2.3 <i>Enterococcus faecalis</i> e o status do tratamento endodôntico.....	41
2.4 Uso da microscopia confocal de varredura a laser.....	44
2.5 Estudos clínicos e radiográficos sobre o tratamento em sessão única.....	46
2.6 Uso da tomografia computadorizada <i>cone beam</i> (TCCB) no diagnóstico endodôntico.....	49
3 PROPOSIÇÃO.....	53
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	57
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	59
4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS.....	60
4.3 ISOLAMENTO DO CAMPO OPERATÓRIO.....	60
4.4 ABERTURA CORONÁRIA.....	60
4.5 PREPARO DA SUSPENSÃO BACTERIANA E INOCULAÇÃO NOS CANAIS RADICULARES NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	63
4.6 TRATAMENTO ENDODÔNTICO DOS CANAIS INFECTADOS E COLETA MICROBIOLÓGICA.....	63
4.7 MÉTODO DE AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA SEMIQUANTITATIVO.....	64
4.8 CONTROLE RADIOGRÁFICO.....	69
4.9 MORTE DOS ANIMAIS E REMOÇÃO DOS TECIDOS.....	70
4.10 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DOS RESULTADOS RADIOGRÁFICOS. USO DA TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA <i>CONE BEAM</i> (TCCB).....	70
4.11 MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER.....	75
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	83
5 RESULTADOS.....	85
6 DISCUSSÃO.....	113
7 CONCLUSÕES.....	127
REFERÊNCIAS.....	131
ANEXOS.....	145

1 ***INTRODUÇÃO***

1 INTRODUÇÃO

A infecção do tecido pulpar como consequência de cárie ou trauma determina a posterior necrose da polpa dentária. Essas alterações levam à inflamação crônica do tecido ósseo de suporte dentário, desenvolvendo um processo patológico denominado periodontite apical crônica. O papel fundamental dos microorganismos na etiopatogenia da periodontite apical crônica foi claramente demonstrado pelo estudo de (KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1965). Eles concluíram que a presença de bactérias no interior dos canais radiculares era determinante para o desenvolvimento das lesões endodônticas. Estudos em cães e macacos demonstraram a capacidade das bactérias em induzir periodontite apical crônica, individualmente ou em combinação (DAHLEN, *et al.*, 1982; FABRICIUS, *et al.*, 1982a; ALLARD; STROMBERG; STROMBERG, 1987; WALTON; ARDJMAND, 1992). Esses estudos provêm evidência da importância da infecção do sistema de canais radiculares para o desenvolvimento da periodontite apical. Esses conceitos têm sido aplicados atualmente aos dentes obturados com periodontite apical persistente. De acordo com os resultados de SJOGREN, *et al.*, 1997; FABRICIUS, *et al.*, 2006 existe uma relação entre a presença de bactérias em dentes obturados e a persistência da periodontite apical crônica.

A comunidade científica tem assumido que a completa erradicação das bactérias não é sempre viável na prática clínica. Certas limitações como a complexidade da anatomia endodôntica, com a presença de ramificações, deltas apicais e istmos podem oferecer condições para a sobrevivência microbiana. Esta afirmação foi confirmada em diversos ensaios clínicos, nos quais demonstrou-se que os canais radiculares contêm bactérias mesmo após uma meticulosa desinfecção químico-mecânica. (BYSTROM; SUNDQVIST, 1985; SHUPING, *et al.*, 2000; MCGURKIN-SMITH, *et al.*, 2005). Apesar de haver sido encontrada uma variedade de espécies bacterianas nos canais radiculares necróticos, somente um pequeno grupo de microorganismos tem sido isolado e cultivado dos canais com insucesso de tratamento endodôntico. Os gêneros frequentemente isolados de canais obturados são: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Enterococcus* e em menor quantidade, bacilos gram negativos anaeróbios estritos (MOLANDER, *et al.*, 1998; CHAVEZ DE PAZ, *et al.*, 2003). Infelizmente, nos estudos de fracassos endodônticos geralmente a informação do *status* microbiológico no início do tratamento não é conhecida, portanto, o agente causador da

infecção tem que ser estudado retrospectivamente, sem saber se o agente causal da doença é do tipo de infecção primária ou secundária.

Recentemente houve um aumento do número de estudos que tentam explicar a etiologia dos fracassos do tratamento endodôntico. Uma conclusão comum desses estudos é a presença da bactéria *Enterococcus faecalis* nos casos de periodontite apical persistente (MOLANDER, *et al.*, 1998; SUNDQVIST, *et al.*, 1998; HANCOCK, *et al.*, 2001; PINHEIRO, *et al.*, 2003a; SIQUEIRA; ROCAS, 2004; SEDGLEY, C., *et al.*, 2006; ZOLETTI; SIQUEIRA; SANTOS, 2006). De maneira interessante, ENGSTROM (1964) citado por SPANGBERG, (2006) descreve a presença de *Enterococcus faecalis* em dentes com tratamento endodôntico. Esta bactéria é um coco gram positivo e possui alta resistência ao pH alcalino, como o presente nas medicações de hidróxido de cálcio. Em virtude de sua alta incidência nos canais obturados e sua resistência aos medicamentos, *Enterococcus faecalis* tem sido proposto como um patógeno endodôntico (PINHEIRO, *et al.*, 2003b).

Entre as características de uma bactéria patogena é que deve essencialmente ser capaz de se aderir, provocar uma resposta no hospedeiro e, nos casos de canais tratados endodonticamente, ser capaz de sobreviver em meio hostil, tal como o canal com obturação radicular. Com somente a observação da presença do *Enterococcus faecalis* associado aos casos de insucesso de tratamento endodôntico, não há uma clara evidência de que essa bactéria é totalmente ou parcialmente responsável por esse insucesso, devido ao fato de que se desconhece se sua eliminação está relacionada ao término da doença (SPANGBERG, 2006). Apesar do desconhecimento do papel de *Enterococcus faecalis* no insucesso do tratamento endodôntico, diversos métodos têm sido desenvolvidos para sua eliminação *ex vivo*. Muitas dessas técnicas incluem o uso de antibióticos (MOLANDER; DAHLEN, 2003), laser Er, Cr:YSGG (JHA, *et al.*, 2006), terapia fotodinâmica (GARCEZ, *et al.*, 2008) e aplicação de produtos naturais (FERREIRA, *et al.*, 2007), ignorando-se, muitas vezes, o efeito da interação desses componentes sobre os tecidos periapicais e sua relevância clínica.

Dentre os métodos para o estudo da infecção dentinária podem-se nomear o microbiológico, o histológico e o por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. A habilidade da bactéria para penetrar nos túbulos dentinários pode ser determinada por meio da análise microbiológica, pelo número de unidades formadoras de colônia (UFCs) (HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987), pelo número de túbulos dentinários infectados na amostra histológica (LOVE; JENKINSON, 2002) e pela presença da bactéria nas paredes do

canal radicular observado, por exemplo, com uso da microscopia eletrônica de varredura (BERGMANS, *et al.*, 2008). Cada um desses métodos tem suas vantagens e desvantagens. O método microbiológico pode estimar o número de UFCs das bactérias cultiváveis na dentina infectada e uma análise quantitativa pode ser realizada. No entanto, este método não dá uma ideia clara da distribuição bacteriana no interior da dentina. O método histológico mostra a distribuição das bactérias dentro da dentina infectada mas não oferece informação sobre a viabilidade das mesmas. Os métodos microbiológico e histológico são normalmente utilizados para determinar a capacidade antimicrobiana de diversos materiais dentários em pesquisas clínicas e de laboratório (HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987; RICUCCI; LANGELAND, 1998; MCGURKIN-SMITH, *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, esforços têm sido realizados por diversos pesquisadores para determinar a viabilidade bacteriana utilizando marcadores fluorescentes sobre dentina infectada, principalmente o microscópio de fluorescência e a microscopia confocal de varredura a laser (GEORGE; KISHEN; SONG, 2005; KISHEN; GEORGE; KUMAR, 2006). No entanto, a distribuição e determinação da viabilidade microbiana bem como a distribuição de material nucléico microbiano dentro dos túbulos dentinários em amostras clínicas sem descalcificação são ainda iniciais ou desconhecidas (WEIGER, *et al.*, 2002). Uma outra limitação durante o estudo de dentes obturados utilizando a metodologia histológica é a perda dos materiais obturadores durante o processamento laboratorial, o que não permite fazer uma relação entre falhas de obturação e presença de bactérias no canal radicular.

Em relação aos métodos diagnósticos para determinar a presença ou ausência de periodontite apical em dentes tratados endodonticamente, resultados promissores têm sido revelados nos 2 últimos anos. A radiografia periapical (RP) tem sido usada para o diagnóstico, preservação e determinação do sucesso do tratamento endodôntico de muitos estudos (TROPE; DELANO; ORSTAVIK, 1999; ORSTAVIK; QVIST; STOLTZE, 2004; MOLANDER, *et al.*, 2007). No entanto, a radiografia é uma imagem bidimensional de uma estrutura tridimensional. O uso da tomografia computadorizada *cone beam* (TCCB) tem revelado resultados promissores como método diagnóstico da periodontite apical em comparação à radiografia periapical (LOW, *et al.*, 2008; PATEL, 2009). ESTRELA, *et al.*, (2008b) observaram uma maior prevalência de periodontite apical em dentes analisados por TCCB em comparação ao uso de radiografias periapicais. Adicionalmente, BARTHEL; ZIMMER; TROPE, (2004) e TANOMARU-FILHO, *et al.*, (2009) não encontraram correlação entre a ausência de imagem sugestiva de periodontite apical em radiografia

periapical e o diagnóstico histológico.

A interação entre os fatores microbiológicos e imunológicos pode ser estudada em animais *in vivo* e ser correlacionada com o tratamento endodôntico clínico (LEONARDO, *et al.*, 1994). Para estudar a importância das bactérias remanescentes nos canais radiculares no processo de perpetuação da periodontite apical após o tratamento endodôntico, é preciso desenvolver experimentos, em condições de inoculação asséptica e controlada, com a inserção de cepas bacterianas conhecidas, e com as similares condições presentes nos canais radiculares com tratamento endodôntico desenvolvendo, portanto, um modelo experimental clinicamente relevante. Deste modo, parece viável realizar um estudo no modelo experimental canino, avaliando a capacidade da bactéria *Enterococcus faecalis* em induzir periodontite apical crônica, bem como observando a sobrevivência da bactéria aos procedimentos químico-mecânicos, e o efeito do tratamento endodôntico no reparo dos dentes tratados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura é apresentada de forma cronológica, onde se procurou abordar os estudos mais relevantes para o desenvolvimento desta pesquisa. Inicialmente foram revisados os trabalhos pertinentes à infecção dentinária e periodontite apical crônica. Em seguida, foram revistos trabalhos sobre a relação do *Enterococcus faecalis* com o insucesso do tratamento endodôntico, em sessão única e alguns trabalhos recentes sobre uso da tomografia computadorizada *cone beam* e microscopia confocal de varredura a laser na pesquisa endodôntica.

2.1 Infecção endodôntica em humanos e infecção induzida experimentalmente em animais.

KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, (1965), confirmaram o papel dos microrganismos na etiologia e perpetuação de lesões pulpares e perirradiculares. O trabalho desses pesquisadores consistiu em expor polpas de molares de ratos convencionais e *germ-free* ao meio bucal. Observaram que nos ratos convencionais desencadeou-se um processo inflamatório crônico, culminando em necrose do tecido pulpar e posteriores lesões periapicais, enquanto nos animais *germ-free* o tecido pulpar mostrou-se com uma discreta inflamação e posterior deposição de dentina neoformada na região exposta, demonstrando o papel decisivo que os microrganismos desempenham na instalação e perpetuação de infecções endodônticas.

MOLLER, *et al.*, (1981) pesquisaram, em 9 macacos, as polpas de 78 dentes assepticamente necrosadas. Vinte e seis câmaras pulpares foram fechadas assepticamente enquanto 52 canais foram infectados pela própria flora oral do animal. Os resultados foram analisados clínica, radiográfica e microbiologicamente ao início do experimento e depois de 6 e 7 meses. A análise final incluiu a avaliação histopatológica. Os canais inicialmente não infectados estiveram estéreis nas amostras finais, indicando que o risco de contaminação do modelo animal é baixo. Foi demonstrado que o tecido pulpar não infectado não induz reação

inflamatória nos tecidos apicais, ao contrário dos dentes com as polpas infectadas, que apresentaram reações clínicas e radiográficas de inflamação apical.

FABRICIUS, *et al.*, (1982b) estudou as polpas de 24 canais radiculares de macacos, que foram mecanicamente desvitalizadas e deixadas expostas ao meio bucal por 1 semana e, então, fechadas. Amostras microbiológicas foram levadas em 16 dentes depois de 7 dias do selamento da câmara pulpar. Observações foram feitas aos 90, 180 e 1060 dias. Ao final de cada período de observação, foram coletadas amostras, as quais mostraram a predominância de bactérias anaeróbias não esporuladas em 85-98% dos canais. As mais frequentes espécies foram *Bacteroides* e bacilos gram negativos. Uma menor proporção de bactérias facultativas foi encontrada.

FABRICIUS, *et al.*, (1982a), avaliou a capacidade de 11 cepas bacterianas, em variadas combinações, de indução de reações apicais em macacos. As bactérias foram originalmente isoladas de um caso de periodontite apical experimental em 1 macaco. Oito dessas bactérias eram de uma coleção completa isoladas de um único canal, e foram inoculadas em 12 canais, assim como 73 canais foram inoculados com outras combinações ou cepas isoladas. Ao final do período experimental, a cepa *Bacteroides oralis* predominou na maior parte dos canais. Em contraste, a cepa de *Bacteroides* não foi isolada em nenhum dos 9 canais onde havia sido inoculada em cultura pura. As infecções mistas mostraram a maior capacidade de induzir periodontite apical mais pronunciada. Os *Streptococcus* facultativos induziram apenas reações inexpressivas.

DAHLEN, *et al.*, (1982), induziram infecções experimentais em canais radiculares com *Streptococcus faecalis* ss. liquefaciens (Strep-MC4). *Actinomyces bovis* (Act-MC6) e *Bacteroides oralis* (Bact-MC3). Foram estudados em 4 macacos imunizados e 5 não-imunizados. A imunização foi feita com uso de antígenos de cepas homólogas. O nível de anticorpo foi verificado por meio de difusão de gel, em 56 canais radiculares dos animais imunizados e em 60 canais radiculares de animais não- imunizados. As células viáveis de 3 cepas bacterianas foram inoculadas em quantidades iguais de várias combinações. Após 6 meses, amostras dos canais radiculares foram submetidas a análises bacteriológicas qualitativa e quantitativa e a área apical foi examinada radiográfica e histologicamente. As análises não revelaram diferença significativa entre os dois grupos de macacos, embora a recuperação das células viáveis tenha sido ligeiramente mais alta na maioria dos canais dos macacos não-

imunizados. Infecções mistas apresentaram reação periapical mais severa do que infecções com cepas únicas em ambos grupos de animais.

NAIR, *et al.*, (1990), realizaram uma análise da microbiota de dentes com periodontite apical crônica persistente por meio de biópsia, uso de microscópio de luz e microscópio eletrônico. Foram avaliados 9 casos, os quais apresentavam lesões periapicais entre 4 e 10 anos após tratamento de canal. Em 6 deles, observou-se a presença de microorganismos no terço apical do canal. Quatro desses casos apresentaram bactérias, e em 2 se evidenciaram organismos similares a fungos. Somente 1 dos casos apresentou características histopatológicas sugestivas de uma resposta de corpo estranho a nível do periápice.

MOLLER, *et al.*, (2004), demonstraram o papel dos microrganismos na formação de lesões periapicais crônicas após a inoculação de canais radiculares de dentes de macacos com as espécies *Streptococcus milleri*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Prevotella oralis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Enterococcus faecalis*. Todas as cepas foram novamente isoladas dos canais radiculares após o período de 8 e 12 meses, quando foi constatada também a ocorrência de reabsorção óssea visível radiograficamente. Foi possível observar a formação de lesão periapical crônica em mais de 96% dos canais radiculares. O tratamento endodôntico desses casos foi realizado sem o uso de curativo de demora, e após o tratamento, foi observado que o preparo biomecânico reduziu, mas não eliminou a infecção dos canais radiculares. Além disso, de acordo com os resultados, os microrganismos anaeróbios facultativos foram mais resistentes que as bactérias anaeróbias à ação do preparo biomecânico.

FABRICIUS, *et al.*, (2006), determinaram a influência no reparo dos tecidos periapicais de um grupo de bactérias e suas combinações, quando estas permaneceram nos canais radiculares após o tratamento endodôntico em 175 canais de macacos, previamente infectados e tratados endodonticamente, bacteriologicamente controlados e permanentemente obturados. Após 2 anos, as regiões periapicais foram radiografadas e histologicamente avaliadas. Dentre esses dentes, 48 canais foram examinados quanto a presença de bactérias após a eliminação do material obturador. Quando a bactéria permaneceu, após o tratamento endodôntico, 79% dos canais radiculares mostraram lesões periapicais persistentes em comparação após 28% onde a bactéria não foi encontrada. Combinações de bactérias residuais foram mais frequentemente relacionadas a casos sem reparo em comparação às bactérias

encontradas no canal isoladamente. Quando a bactéria não foi encontrada, ocorreu reparo independentemente da qualidade da obturação do canal radicular.

FERREIRA, *et al.*, (2006) avaliaram a composição microbiológica de canais radiculares de dentes de cães infectados experimentalmente por 2 métodos: canais abertos *versus* canais fechados. Dentes do primeiro grupo (n=16) foram deixados abertos por uma semana, e depois fechados com resina composta por 120 dias. Os dentes do segundo grupo (n=16) foram deixados abertos pelo mesmo período. Amostras microbiológicas foram coletadas e processadas anaerobicamente para a identificação dos microorganismos depois de estabelecida a reação periapical. Foram feitos 74 isolamentos no grupo I. Os anaeróbios estritos estiveram em 64,9% de todas as espécies isoladas. Os gêneros microbianos mais frequentemente isolados foram *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*. Nos canais abertos foi feito um total de 58 isolamentos sendo que 19% foram anaeróbios estritos e 81% bactérias facultativas, predominantemente gram positivas (75,8%). Os gêneros mais frequentemente isolados foram *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Neisseria* e *Prevotella*. Os autores concluíram que o método para induzir inflamação periapical por exposição oral intencional produz microbiota nos canais radiculares semelhante às encontradas nos humanos.

SIQUEIRA, *et al.*, (2008) compararam os perfis de comunidades bacterianas da microbiota do canal radicular associada a periodontite apical crônica de pacientes brasileiros e noruegueses com uso de eletroforese e análise de espaço intergênico ribossômico. O DNA foi extraído das amostras dos canais radiculares com *primers* apropriados. Os padrões resultantes representativos das estruturas das bactérias da comunidade em amostras de 2 localidades foram comparadas. Os dados mostraram uma variabilidade individual grande nos perfis das bactérias da comunidade, sem importar a localização geográfica do paciente. Entretanto, similaridades entre as comunidades bacterianas revelaram a existência de padrão relacionado à geografia.

RICUCCI, *et al.*, (2009) examinaram histologicamente dentes tratados endodonticamente com evidência de lesões de periodontite apical e correlacionaram aos achados de observações clínicas. Os espécimes foram obtidos de 24 pacientes (12 sem sintomatologia e 12 com sintomatologia) por extração ou cirurgia endodôntica e consistiu de raízes ou partes de raízes e de suas lesões patológicas associadas. Os espécimes foram processados para análise histológica e cortes seriados foram avaliados. Os achados foram

correlacionados com as observações clínicas de acordo com a presença ou ausência de sintomas. O período médio decorrido do tratamento do grupo assintomático é de 7,5 anos em comparação a 2,2 anos do grupo sintomático. Todos os espécimes exibiram inflamação perirradicular. Bactérias foram visualizadas em todos os casos, exceto para 1 espécime do grupo assintomático, no qual a reação de corpo estranho ao material extravasado foi a provável razão para doença emergente em um caso previamente vital. Independente da presença de sintomas, bactérias foram sempre localizadas no interior do sistema de canais radiculares, apesar de também terem sido observadas nos tecidos perirradiculares em 1 dente assintomático e em 4 sintomáticos. Em geral, a colonização bacteriana intraradicular foi maior em dentes com falha e sintomatologia. Os achados presentes são concordes com o papel de infecções perirradiculares, geralmente em forma de biofilme, como causa primária para falha de tratamento endodôntico.

2.2 Relação do *Enterococcus faecalis* com insucesso do tratamento endodôntico.

Enterococcus faecalis são cocos gram-positivos, anaeróbios facultativos, possuindo a capacidade de crescer na presença ou ausência de oxigênio. Os *Enterococcus faecalis* possuem certos fatores de virulência que auxiliam na sua sobrevivência. Dentre esses fatores podemos citar: citolisinas, enzimas líticas como gelatinase e hialuronidase (que estão envolvidas com a destruição tecidual), substâncias de agregação (responsáveis pela união aos leucócitos e à matriz extracelular), ferormônios (pequenos peptídeos envolvidos na transferência de plasmídeos e que promovem atração química para os neutrófilos) e ácido lipoteicóico (promove a adesão do microorganismo aos tecidos do hospedeiro e estimula a produção de citocinas pelos monócitos (KAYAOGLU; ORSTAVIK, 2004)

A persistência de sinais clínicos ou radiográficos após o tratamento endodôntico indica a permanência de uma infecção associada ao sistema de canais radiculares (SIQUEIRA; ROCAS, 2008). A causa dessas infecções pode microorganismos que sobreviveram aos procedimentos intracanaís de desinfecção (infecção persistente) ou que vieram a infectar o canal radicular durante ou após o tratamento endodôntico (infecção secundária). A presença de infecção dentro do sistema de canais radiculares associada a uma

lesão periapical representa um problema que pode indicar o fracasso do tratamento. Estudos têm relatado que bactérias facultativas em monoinfecção ou infecções mistas podem ser a causa de infecções persistentes (MOLANDER, *et al.*, 1998; CHAVEZ DE PAZ, *et al.*, 2003). Dentro deste grupo bacteriano, os *Enterococcus faecalis* são os microorganismos mais comumente isolados de casos em que a terapia endodôntica fracassou (KAYAOGLU; ORSTAVIK, 2004).

ENGSTROM 1964 citado por SPANGBERG, (2006), descreveu a presença de *Enterococcus faecalis* na cavidade oral, com especial ênfase no canal radicular. Foi reportado que frequentemente se podia encontrar esta bactéria em canais radiculares obturados, ainda que nenhuma imagem periapical tivesse se desenvolvido até então. Também foi observado que existia uma associação de *Enterococcus faecalis* nas culturas de canais radiculares com sua presença em outras áreas da cavidade oral, como zonas interproximais e amígdalas.

MOLANDER, *et al.*, (1998), analisaram o estado microbiológico de 100 dentes tratados endodonticamente com periodontite apical visível radiograficamente. Os dentes estudados apresentavam-se assintomáticos, e com a obturação do canal a uma distância máxima de 5 mm aquém do ápice radiográfico. A remoção do material obturador foi realizada utilizando brocas de Gates-Glidden e limas endodônticas, e em 21 casos, foi utilizado clorofórmio como material solvente da guta-percha. Os resultados mostraram que bactérias estavam presentes em 68 dentes, porém o uso do clorofórmio foi considerado um fator influente, diminuindo o crescimento bacteriano. Dos 21 casos nos quais foi utilizado o clorofórmio, houve crescimento bacteriano em apenas 10 casos (47,3%), enquanto nos 79 dentes restantes o crescimento foi detectado em 58 canais (73,4%). Um total de 117 cepas microbianas foi isolado, com 114 bactérias e 3 fungos. A maioria dos canais continha 1 ou 2 espécies bacterianas (85% dos casos). As bactérias anaeróbias facultativas Gram-positivas predominaram, constituindo 69% das espécies isoladas. Os microorganismos isolados foram: *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Actinomyces* spp., bacilos Gram-positivos anaeróbios, bacilos Gram-negativos facultativos, *Veillonella* spp., *Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp. e *Candida* spp. *Enterococcus* foi o gênero bacteriano mais frequentemente isolado, presente em 47% dos canais com bactérias. Os autores concluíram que a microbiota dos dentes tratados endodonticamente variava, tanto quantitativa quanto qualitativamente, nos dentes com polpas necrosadas.

SUNDQVIST, *et al.*, (1998), avaliaram 54 dentes com tratamento de canal e lesão periapical persistente, os quais foram selecionados para repetição do tratamento 5 anos depois. Os resultados apontaram que a microflora, na maioria dos casos, consistiu-se de uma só espécie: microorganismos predominantemente Gram-positivos com aproximadamente igual proporção de anaeróbios facultativos e estritos. Os autores concluíram que a microbiota nos canais radiculares depois do fracasso endodôntico diferencia-se drasticamente da microbiota detectada em dentes não tratados.

HANCOCK, *et al.*, (2001) estudaram a composição da microbiota presente em 54 dentes com insucesso do tratamento endodôntico. O crescimento bacteriano foi detectado em 34 casos. A microbiota era composta principalmente por 1 ou 2 espécies de microrganismos predominantemente Gram-positivos (80,4%). Os gêneros mais isolados foram: *Enterococcus*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces* e *Streptococcus*. *Candida albicans* foi detectada em 1 caso. *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana mais frequente, isolada em 30% dos canais radiculares que apresentavam presença de bactérias. Embora os autores tenham mostrado a presença do *Enterococcus faecalis* em 30% dos casos estudados, relatam que a presença dessa bactéria nos dentes obturados parece estar mais relacionada com assepsia inadequada, pobre isolamento do campo operatório durante o tratamento ou infiltração coronária.

LOVE, (2001), relatou que os fluidos teciduais provenientes do ligamento periodontal e do osso alveolar localizados ao redor da raiz podem servir como nutrição para as bactérias aprisionadas no interior dos túbulos dentinários ou no interior dos canais radiculares. Os *Enterococcus faecalis* apresentam a capacidade de sobreviver a longos períodos sem nutrientes, até que uma fonte nutricional adequada se torne disponível.

SIQUEIRA, *et al.*, (2002), verificaram a microbiota de canais radiculares infectados. Cinquenta e cinco dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical foram incluídos neste estudo, dos quais 26 casos eram assintomáticos e 27 foram diagnosticados como abscesso dento-alveolar agudo. Após a abertura coronária, os canais foram preenchidos com soro e as amostras foram obtidas do interior dos canais, com o auxílio de pontas de papel absorvente. As espécies bacterianas foram determinadas por meio da biologia molecular. Os resultados demonstraram que todos os canais apresentaram bactérias. Nas lesões assintomáticas, as espécies mais encontradas foram: *Enterococcus faecalis* (11,5%) e *Streptococcus intermedius* (11,5%) e nas lesões sintomáticas (abscessos) as espécies *Streptococcus constellatus* (25,9%) e *Actinomyces gerencseriae* (14,8%).

PINHEIRO, *et al.*, (2003a) pesquisaram a microbiota dos canais radiculares de 60 dentes que apresentavam insucesso no tratamento endodôntico. Para isso, foram selecionados dentes que apresentavam lesão periapical. Após a abertura coronária, a obturação dos canais foi removida, os canais foram preenchidos com soro e as amostras foram obtidas do interior dos canais, com o auxílio de pontas de papel absorvente. As espécies bacterianas foram isoladas e determinadas por meios de culturas específicas. Os microorganismos foram encontrados em 51 dentes (85%), sendo que 28 dentes (46,7%) apresentavam um único microorganismo, 8 (13,3%) dois microorganismos e 15 (25%) apresentavam infecção polimicrobiana, com três ou mais espécies de microorganismos. O *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana mais encontrada, sendo detectado em 27 dos 51 canais, sendo que em 18 casos apresentava-se como o único microorganismo presente.

CHAVEZ DE PAZ, *et al.*, (2003) realizaram um estudo a fim de determinar se há um padrão para a persistência de colonização bacteriana após o preparo biomecânico de canais radiculares de dentes com lesões periapicais. Foram colhidas amostras de 200 canais radiculares, nos quais especialistas e clínicos gerais já haviam realizado a primeira sessão do tratamento endodôntico. Todos os dentes incluídos no estudo apresentavam evidências clínicas e/ou radiográficas de periodontite apical. Um total de 248 espécies foi isolado, e houve crescimento bacteriano em 107 amostras, com predomínio de microorganismos Gram-positivos (85%), *Lactobacillus* spp. (12%), *Streptococcus* (18%) e *Enterococcus* spp. (12%), sugerindo os resultados que as espécies Gram-positivas sobrevivem mesmo após o preparo biomecânico.

SIQUEIRA; ROÇAS, (2004) investigaram a ocorrência de 19 espécies microbianas, pela análise por PCR (reação de cadeia de polimerase), em 22 amostras de canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico. Todas as amostras foram positivas a pelo menos uma das seguintes bactérias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis*, *Pseudoramibacter alactolyticus* ou *Propionibacterium propionicum*. *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais prevalente, detectada em 77% dos casos. As outras espécies mais detectadas foram: *Pseudoramibacter alactolyticus* (52%), *Propionibacterium propionicum* (52%), *Dialister pneumosintes* (48%) e *Filifactor alocis* (48%). *Candida albicans* foi isolada em 9% das amostras.

ROÇAS; SIQUEIRA; SANTOS, (2004) investigaram a prevalência do *Enterococcus faecalis* em diferentes periapicopatias, através da técnica de PCR. As amostras foram obtidas dos seguintes espécimes: dentes sem tratamento endodôntico e com lesão periapical crônica; dentes com periodontite apical aguda, dentes com abscesso periapical agudo e dentes com tratamento endodôntico e lesão periapical crônica. Os *Enterococcus faecalis* foram detectados com maior frequência em lesões assintomáticas que em lesões sintomáticas e mais encontrados em casos de falhas de tratamento endodôntico do que em infecções primárias.

SEDGLEY, C.M.; LENNAN; APPELBE, (2005), relataram que após a obturação dos canais radiculares, as bactérias que foram confinadas pelo material obturador geralmente morrem, mas que algumas espécies podem sobreviver por períodos relativamente longos, utilizando nutrientes dos tecidos remanescentes. Verificaram que os *Enterococcus faecalis* podem permanecer viáveis no interior dos canais radiculares obturados de dentes extraídos por um período de 1 ano, sem a presença de nutrientes adicionais.

2.3 *Enterococcus faecalis* e o status do tratamento endodôntico.

A incidência de *Enterococcus faecalis* em casos que apresentavam insucesso no tratamento endodôntico é diversa (STUART, *et al.*, 2006): Sundqvist (38%), Molander (47%), Hancock (30%), Pinheiro (53%), Siqueira (77%), Gomes (32%). Esta ideia de relação estrita entre *Enterococcus faecalis* como causa do insucesso do tratamento tem aumentado devido à resistência desta bactéria ao pH alcalino encontrado, por exemplo, em estudos de laboratório que utilizaram a medicação de hidróxido de cálcio, na qual foi possível constatar a sobrevivência da bactéria (HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987). No entanto, existem detalhes interessantes definidos por alguns autores que tornam o tema controverso (FIGDOR; SUNDQVIST, 2007).

Um dos pontos controversos encontrados na literatura é que não existe discriminação nos estudos microbiológicos para determinar se o tratamento de canais radiculares dos dentes avaliados microbiologicamente foi realizado dentro do padrão ideal de tratamento (ZEHNDER; GUGGENHEIM, 2009). Embora as terminologias “falha do

tratamento endodôntico” ou “insucesso do tratamento endodôntico” sejam comumente utilizadas nos artigos que descrevem a relação de *Enterococcus faecalis* em dentes com tratamento endodôntico, muitos estudos incluem dentro da análise dentes com qualidade de tratamento inadequadas. Esta falta de detalhe na terminologia leva à dificuldade de compreensão se a relação *Enterococcus faecalis*/insucesso, envolve os dentes com qualidade de tratamento endodôntico que atinjam o padrão ideal. Sem esta discriminação é difícil concluir se o insucesso do tratamento foi devido à persistência da bactéria *Enterococcus faecalis* ao tratamento inicial ou pela baixa qualidade do tratamento, que tenha facilitado a contaminação secundária do canal radicular (ZEHNDER; GUGGENHEIM, 2009).

HANCOCK, *et al.*, (2001), avaliando a microbiota de 54 dentes tratados endodonticamente com persistência de periodontite apical encontraram que 12 dentes se apresentaram com obturação dos canais radiculares inadequada e 33 dentes apresentaram restauração coronária inadequada. Os autores mostraram a presença de *Enterococcus faecalis* em 30% dos casos estudados e concluíram que a presença da bactéria nos dentes obturados parece estar mais relacionada com a assepsia inadequada, isolamento ineficaz durante o tratamento ou infiltração coronária.

PINHEIRO, *et al.*, (2003a) avaliaram a microbiota de 60 dentes com insucesso de tratamento endodôntico. Os casos estudados incluíam dentes com diversas qualidades de restauração coronária, sendo: boa restauração (15 casos), restauração deficiente (21 casos), restauração temporária (10 casos) e ausência de restauração (14 casos). Adicionalmente, 38 casos dos 60 apresentavam uma qualidade da obturação inadequada. Os autores encontraram a bactéria *Enterococcus faecalis* em 45% dos casos.

SIQUEIRA; ROÇAS, (2004), avaliaram, mediante PCR, 22 amostras de canais radiculares obturados. Os autores encontraram uma prevalência de *Enterococcus faecalis* em 77% dos casos. Dos 22 casos, 6 apresentavam obturação do canal radicular entre 0,5 -1 do forame apical e 16 possuíam uma obturação curta em >2mm.

GOMES, *et al.*, (2006) em um estudo similar de prevalência de *Enterococcus faecalis* em 50 dentes com insucesso de tratamento, relataram que 33 dentes apresentavam pobre obturação do canal radicular e 38 dentes apresentavam infiltração coronária.

GOMES, *et al.*, (2008) analisaram, mediante a técnica de PCR, a microbiota de dentes com tratamento endodôntico. Foram avaliadas 45 amostras de pacientes com

necessidade de retratamento. Os casos estudados incluíam dentes com diversas qualidades de restauração coronária: boa restauração (10 casos), restauração deficiente (16 casos), restauração temporária (10 casos) e ausência de restauração (9 casos). Adicionalmente, 31 casos dos 54 apresentavam qualidade da obturação inadequada. Os autores relataram a presença de *Enterococcus faecalis* em 77,8% dos casos estudados.

O fato de que a maior parte dos dentes utilizados nos estudos que descrevem a microbiota dos dentes com tratamento endodôntico e lesão periapical apresentem pobre qualidade do tratamento e ausência de restauração denota uma dificuldade para relacionar o insucesso do tratamento endodôntico com a persistência de *Enterococcus faecalis*. Estes resultados podem ser ainda mais controvertidos se forem considerados os estudos de PCR, que realizam o controle microbiológico do campo operatório mediante métodos de cultura e não mediante a técnica de PCR (SPANGBERG, 2006; NAIR, 2008). A falta de dados referentes à ausência de DNA bacteriano ou descontaminação oligonucleotida no campo operatório nos estudos de biologia molecular levanta a dúvida de se as bactérias recuperadas são do interior do sistema de canais radiculares ou da porção coronária próxima à cavidade oral (NAIR, 2007). Este fato deve ser considerado na interpretação dos resultados levando em conta que grande número de dentes avaliados nas pesquisas apresentavam infiltração coronária.

É interessante observar que somente 1 estudo clínico (SJOGREN, *et al.*, 1997) controlou o *status* microbiológico antes e durante o tratamento endodôntico e, com uma adequada preservação dos casos, demonstrou uma microbiota diferente dos casos com insucesso de tratamento. Sjorgen avaliou microbiologicamente o tratamento endodôntico de 55 dentes. Após o final do preparo químico-mecânico, 40% dos dentes (22 canais) ainda possuíam bactérias no interior dos canais radiculares. Apenas 1 cepa bacteriana de *Enterococcus faecalis* foi encontrada após o preparo químico-mecânico. Outras bactérias que sobreviveram foram espécies de *Streptococos*, *Peptostreptococos*, *Eubacterium*, *Actynomices*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Campylobacter*. Após 5 anos, 9 casos foram catalogados como insucesso, sendo 7 destes casos pertencentes ao grupo obturado em presença bacteriana e 2 casos ao grupo obturado em ausência bacteriana. Em nenhum dos 9 fracassos foi encontrada a bactéria *Enterococcus faecalis*. As bactérias presentes nos casos de insucesso foram do gênero *Eubacterium*, *Actynomices*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium* e *Campylobacter*.

2.4 Uso da microscopia confocal de varredura a laser.

A técnica de microscopia confocal laser utiliza uma combinação de recursos de microscopia óptica reunida a princípios de físico-química e computação para a aquisição e processamento de imagens. O sistema utiliza uma fonte de laser para promover a excitação de fluoróforos. Os feixes de luz laser podem se difundir através da dentina, esmalte ou biofilmes, detectando sua estrutura interior e formando várias imagens em 2D (KAGAYAMA, *et al.*, 1999). Todas as imagens em 2D podem ser sobrepostas, e fotografias em 3D são produzidas. O uso dos fluoróforos em Biologia, acontece quando se quer localizar uma área específica da amostra (como uma proteína, ácido nucléico, membrana ou núcleo celular por exemplo). Estes marcadores fluorescentes podem ser adicionados para detectarem e identificarem microrganismos, assim como podem ser usados para determinar aspectos fisiológicos, tais como a atividade de enzimas intracelulares, além de diferenciar microrganismos Gram-positivos dos Gram-negativos ou determinar sua vitalidade.

KISHEN; GEORGE; KUMAR, (2006) investigaram a interação entre o *Enterococcus faecalis* e o substrato dentinário. Blocos de dentina foram incubados com *Enterococcus faecalis* durante intervalos de 2, 4 e 6 semanas. O meio de cultura era trocado a cada 48 horas. Após o período de incubação, a composição química do biofilme foi analisada por meio da difração de Raios X. Outro grupo de amostras foi incubado durante 6 semanas com *Enterococcus faecalis* e a morfologia e a ultra-estrutura do biofilme foram examinadas usando o microscópio eletrônico de varredura (MEV), microscópio óptico, e microscópio confocal. Por meio do MEV, os autores observaram a formação do agregado celular na superfície dentinária e características de dissolução da matriz dentinária após 1 semana de incubação. Após 2 semanas, os agregados tendem a coalescer formando agregados maiores na superfície dentinária que, a partir desse momento, passa a apresentar típica aparência de corrosão. Após 3, 4 e 6 semanas, o biofilme apresenta-se mais estruturado e com dimensões mais altas. A microscopia confocal demonstrou áreas de células mortas e vivas no interior do biofilme.

GEORGE; KISHEN; SONG, (2005) estudaram o efeito de diferentes condições de crescimento nas características do biofilme de *Enterococcus faecalis*, e a penetração desses microrganismos nos túbulos dentinários. A cultura do biofilme foi feita sobre blocos de

dentina em aerobiose, anaerobiose, com riqueza de nutrientes e com deficiência de nutrientes por um período de 21 dias. A análise dos biofilmes foi realizada com microscopia eletrônica de varredura, microscopia confocal e Raios X de energia dispersiva (EDX). A penetração das bactérias nos túbulos dentinários foi observada por meio da microscopia óptica com coloração de Gram. O EDX mostrou um aumento significativo dos níveis de cálcio (Ca^{++}) na estrutura do biofilme formado sob condições anaeróbicas e com deficiência de nutrientes. A profundidade de penetração das bactérias foi maior quando o ambiente era rico em nutrientes.

ROLLAND, *et al.*, (2006) observaram a formação de biofilme na superfície de adesivos dentinários aplicados à superfície de blocos de dentina. Uma das superfícies não recebeu aplicação dos adesivos. Os espécimes foram incubados em saliva colhida de voluntários a 37°C durante 9 dias. O meio de cultura era renovado a cada 24 horas. O biofilme foi observado no microscópio confocal após ser corado com o *Live: Dead BacLight Bacterial Viability Stain* (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Imagens foram capturadas a cada 2 µm de profundidade do biofilme e a análise do percentual de células vivas e mortas foi realizada em três diferentes profundidades do biofilme. Os autores afirmam que a coloração fluorescente de bactérias viáveis e não-viáveis e o microscópio confocal permitem a observação e a quantificação eficazes dos microrganismos presentes no biofilme.

KHEMALEELAKUL; BAUMGARTNER; PRUKSAKOM, (2006) utilizaram o microscópio confocal para observação do biofilme formado por bactérias isoladas de infecções endodônticas agudas quanto à sua auto-agregação celular. Toda possível combinação de 2 espécies bacterianas da mesma amostra clínica também foi avaliada quanto à coagregação. De 10 amostras clínicas foram isoladas 62 espécies bacterianas, e a auto-agregação foi verificada em 56,45% das espécies. A co-agregação foi verificada em 29 dos 183 pares avaliados. Os autores afirmam que a microscopia confocal é um método bastante sensível para detectar agregação bacteriana.

2.5 Estudos clínicos e radiográficos sobre o tratamento em sessão única.

SJOGREN, *et al.*, (1997), estudaram o papel dos microorganismos persistentes no resultado e prognóstico do tratamento endodôntico. Esse trabalho revelou que o *status* microbiológico do sistema de canais radiculares no momento da obturação é um fator crítico na determinação do resultado do tratamento. A porcentagem de sucesso em casos de obturação com cultura negativa foi de 94%, o que foi considerado estatisticamente significativo em comparação a 68% de sucesso em casos com cultura positiva.

TROPE; DELANO; ORSTAVIK, (1999) avaliaram, radiograficamente, o processo de reparo de dentes humanos com lesão periapical, tratados em 1 ou 2 sessões, sendo que o grupo 1 foi tratado em sessão única, o grupo 2 foi preparado e permaneceu sem medicação por 1 semana e o grupo 3 recebeu curativo intracanal à base de hidróxido de cálcio por 7 dias. O método da contagem de índice periapical (PAI) foi utilizado para comparar as diferenças quanto à reparação durante 52 semanas. No maior período de avaliação, o grupo onde foi empregada a medicação obteve os melhores resultados (81% de índices 1 e 2), seguido do grupo de sessão única (80% de índices 1 e 2). O grupo que permaneceu vazio durante 1 semana apresentou claramente os piores resultados (54% de índices 1 e 2).

KVIST, *et al.*, (2004) avaliaram a eficácia antimicrobiana de procedimentos endodônticos realizados em sessão única (incluindo 10 minutos de aplicação de 5% de iodeto-potássico-iodado) em comparação ao procedimento realizado em 2 sessões (incluindo medicação de hidróxido de cálcio). Dentes diagnosticados com periodontite apical (n = 96) foram aleatoriamente distribuídos para cada grupo. Uma amostra do canal radicular foi feita antes e após a instrumentação dos canais radiculares e após a medicação. As amostras iniciais mostraram a presença de microorganismos em 95% dos dentes. As amostras pós-instrumentação mostraram redução da microbiota cultivável. Nas amostras pós-medicação microorganismos residuais foram recuperados em 29% dos casos no grupo de sessão única e 36% dos casos no grupo de 2 sessões. Não houve diferença significativa entre os grupos. Os autores concluíram que desde o ponto de vista microbiológico, o tratamento dos dentes com periodontite apical realizado em 2 sessões não foi mais efetivo que o procedimento realizado em sessão única.

SATHORN; PARASHOS; MESSER, (2007) realizaram uma meta-análise no que se refere ao emprego ou não de medicação em casos de necrose associada a lesão periapical. O estudo foi realizado por meio de avaliações clínico-radiográficas de dentes tratados em uma única sessão comparativamente a tratamentos que receberam medicação de hidróxido de cálcio por 1 semana. Segundo os autores, o grupo dos tratamentos realizados em sessão única apresentou melhores resultados, entretanto não houve diferença no reparo observado.

SATHORN; PARASHOS; MESSER, (2008) realizaram uma meta-análise envolvendo artigos indexados na base de dados Medline que avaliaram a frequência e a severidade da dor no pós-operatório de tratamentos endodônticos realizados em uma ou mais sessões. Foram incluídos, de acordo com os critérios de seleção, 16 artigos com amostra variando de 60 a 1012. A incidência de dor no pós-operatório variou de 3% a 58%. Como os dados eram muito distantes, os autores mencionaram que a meta-análise era inviável, entretanto, afirmaram que existem diferenças entre os atendimentos realizados em 1 ou mais sessões.

MOLANDER, *et al.*, (2007) acompanharam resultados clínicos e radiográficos por 2 anos de tratamentos endodônticos feitos em sessão única ou em 2 sessões e estudaram a significância da amostra bacteriológica encontrada. Um procedimento de randomização foi utilizado para estabelecer os grupos, dentre os quais 53 dentes foram tratados em sessão única e 48 dentes tratados em 2 sessões. Decorrido o período experimental, 32 dentes (65%) no grupo de sessão única e 30 dentes (75%) no grupo de 2 sessões foram classificados como sucesso, sem diferença significativa entre os grupos. Quarenta e nove dentes (80%) dos 61 dentes que foram obturados após cultura negativa foram classificados como sucesso. Dentes obturados após uma amostra positiva tiveram sucesso em 44% dos casos. Os autores concluíram que um índice similar de sucesso pode ser obtido utilizando 1 ou 2 sessões.

PENESIS, *et al.*, (2008) realizaram pesquisa com o objetivo principal de comparar a evidência radiográfica de cura apical após o tratamento de canais radiculares realizados em sessão única e em 2 sessões com medicação intra-canal de hidróxido de cálcio como curativo de demora. Noventa e sete pacientes estiveram dentro do critério de inclusão e consentiram em participar da pesquisa. Eles foram aleatoriamente colocados em grupos de sessão única ou de 2 sessões, e a terapia endodôntica foi realizada com protocolo padronizado. Sessenta e três pacientes, 33 do grupo de sessão única e 30 do grupo de 2 sessões foram avaliados por 12 meses. A principal medida de avaliação de resultado foi a mudança na densidade do osso

apical por meio do índice periapical (PAI). Medidas secundárias de avaliação foram proporção de dentes curados ou melhorados em cada grupo. Ambos os grupos exibiram cura periapical favorável aos 12 meses, com ausência de diferença estatística significativa entre os 2 grupos.

WU; SHEMESH; WESSELINK, (2009) identificaram as limitações de prévias revisões sistemáticas de literatura e estudos clínicos sobre a avaliação de resultados do tratamento de canais radiculares. Tradicionalmente, a radiografia periapical tem sido usada para avaliar o resultado de tratamento endodôntico com a ausência de radiolusência periapical, sendo considerada a confirmação de saúde periapical. Entretanto, uma alta porcentagem de casos confirmados como saudáveis por radiografias revelaram periodontite apical por meio de imagens de tomografia computadorizada *cone beam* (TCCB) e histologia. Em dentes nos quais radiografias revelavam diminuição de tamanho de imagens radiolúcidas e considerava-se, portanto, cura periapical, o aumento da lesão frequentemente era confirmado por TCCB. Em estudos clínicos, 2 fatores adicionais podem ter contribuído para a estimativa de sucesso após o tratamento de canais radiculares: extrações e retratamentos raramente apontados como falhas. Como conclusão, as sérias limitações de estudos longitudinais clínicos restringem a correta interpretação do resultado de tratamento de canais radiculares. Revisões sistemáticas com relato de taxas de sucesso de tratamento endodôntico sem referência a essas limitações podem confundir os leitores. Os resultados de tratamento endodôntico devem ser reavaliados em estudos longitudinais por meio de TCCB e critérios de avaliação mais rigorosos.

2.6 Uso da tomografia computadorizada *cone beam* (TCCB) no diagnóstico endodôntico.

A nova tecnologia utilizada para o diagnóstico por imagens em Odontologia é a tomografia computadorizada de feixe cônico ou *cone beam*, que provê reprodução de imagens tridimensionais dos tecidos mineralizados da região dento-maxilo-facial, com mínima distorção e dose de radiação significativamente reduzida em comparação à TC tradicional.

ESTRELA, *et al.*, (2008b) avaliaram a precisão dos métodos de imagem para detecção de periodontite apical (PA). Registros de imagem de uma amostra de 888 exames por imagens com infecção endodôntica (1508 dentes), entre TCCB radiografias panorâmicas e periapicais foram selecionadas. Sensibilidade, especificidade, valores presuntivos e acurácia das radiografias panorâmicas e periapicais foram calculados. A prevalência de PA foi significativamente maior com a TCCB. A presença de PA foi corretamente identificada com métodos convencionais quando se apresentavam em estágio avançado. A TCCB provou ser precisa e confiável para identificação de PA.

BRAMANTE *et al.*, (2007) avaliaram a precisão da imagem radiográfica convencional, digital e da tomografia helicoidal, na localização e visualização de defeitos ósseos produzidos experimentalmente. Foram selecionadas mandíbulas humanas secas, com boa integridade óssea nas regiões avaliadas, realizando-se defeitos ósseos no fundo dos alvéolos dos dentes posteriores, com brocas esféricas números 2, 6 e 10. As mandíbulas foram radiografadas com filme Insight Plus IP-21, da Kodak, placa óptica do sistema Digora e tomógrafo médico helicoidal. Nas radiografias convencionais e tomografias helicoidais, as imagens foram analisadas ao negatoscópio, com o auxílio de uma lupa; as imagens digitais foram analisadas na tela do computador, com o recurso do programa Digora para Windows. Conclui-se que as imagens obtidas com a tomografia helicoidal foram superiores às radiografias convencionais e digitais, na detecção dos defeitos ósseos confinados ao osso medular.

ESTRELA, *et al.*, (2008a) avaliaram um novo índice periapical baseado em TCCB para identificação de periodontite apical. O índice periapical proposto por este estudo foi desenvolvido com base em critério estabelecido por medidas correspondentes à radiolucência periapical interpretada em imagens de TCCB. Imagens radiolúcidas sugestivas de lesões periapicais foram medidas por meio de ferramentas do *software* Planimp em imagens de

TCCB em 3 dimensões: vestibulo-palatina, méso-distal e diagonal. O índice foi determinado pela maior extensão da lesão. Um escore de 6 pontos (0 a 5) foi utilizado com 2 variáveis adicionais (expansão de osso cortical e destruição de osso cortical). O total de 1014 imagens (radiografias periapicais e TCCB) obtidas de 596 pacientes foram avaliadas por 3 observadores por meio do escore. A presença de PA foi identificada em 39,5% e 60,9% dos casos por radiografia e TCCB, respectivamente ($P < 0,1$). O índice oferece método acurado de diagnóstico para uso com imagens de alta-resolução, o que pode reduzir a incidência de diagnóstico falso-negativo, minimizar a interferência do observador e aumentar a confiabilidade em estudos epidemiológicos, principalmente os que se referem à prevalência e severidade de PA.

JORGE, *et al.*, (2008) estudaram o desenvolvimento de lesões periapicais induzidas experimentalmente usando radiografia convencional e tomografia computadorizada. Para isso, canais radiculares de dentes de cães foram expostos a ambiente oral por 7 dias e selados por: 7 dias (GI), 15 dias (GII), 30 dias (GIII) e 60 dias (GIV). Imediatamente após cada período experimental, radiografias e imagens tomográficas foram obtidas a fim de se detectar a ocorrência de reabsorção de osso periapical. As radiografias periapicais foram digitalizadas e as áreas de reabsorção óssea foram medidas. Os escores nas imagens tomográficas foram atribuídos com base na progressão da reabsorção do osso periapical. Os espécimes foram avaliados por examinadores calibrados e cegos em relação aos grupos. A avaliação radiográfica não revelou lesões periapicais no controle de 7 dias. As lesões foram visíveis radiograficamente aos 15 e 30 dias em 47,7% e 77,8% dos casos, respectivamente, e apresentaram dimensões similares. No período de 60 dias, as lesões foram detectadas em todos os espécimes, apresentando dimensões maiores que as de períodos mais curtos. A avaliação tomográfica detectou lesões em 7 e 15 dias (32,5% e 83,3% dos casos, respectivamente). As lesões foram detectadas em todos os espécimes nos períodos de 30 a 60 dias, quando os valores maiores de reabsorção óssea foram observados. Como conclusão, os autores apontaram que a tomografia foi capaz de detectar o desenvolvimento de lesão periapical em sua fase inicial, mesmo quando as lesões não eram detectáveis radiograficamente.

TANOMARU-FILHO, *et al.*, (2008) avaliaram a dinâmica de desenvolvimento de lesões periapicais. Para isso, canais radiculares de dentes de cães foram expostos ao ambiente oral e selados por 7 dias (Grupo A), 15 dias (Grupo B), 30 dias (Grupo C) e 60 dias (Grupo D). Após cada período experimental, radiografias foram tomadas a fim de detectar a

reabsorção óssea periapical. Além disso, cortes microscópicos da região periapical foram preparados. Os resultados radiográficos e histológicos foram analisados por testes estatísticos de ANOVA, Tukey, Wilcoxon e Pearson. O nível de significância foi de 5%. Como resultado, foi obtido que lesões eram radiograficamente visíveis após 15 e 30 dias e apresentavam tamanho similar nesses períodos. Em 60 dias, as lesões eram maiores do que em outros períodos. Reabsorção óssea foi detectada histologicamente em 7 dias. Os maiores valores de reabsorção óssea foram observados em períodos de 30 a 60 dias. Os resultados dos métodos de avaliação foram similares apenas no período de 30 dias. Não houve correlação entre os resultados radiográficos e histológicos. Os autores concluíram que a radiografia periapical não provê detecção de lesão periapical em fase inicial. As lesões periapicais se tornaram mais evidentes radiograficamente quando a área de reabsorção óssea aumentou.

DE PAULA-SILVA, *et al.*, (2009) compararam o resultado do tratamento de canais radiculares determinado por radiografias periapicais e TCCB. Noventa e seis dentes de cães foram usados para formar 4 grupos (n=24). No grupo 1, o tratamento dos canais radiculares foi executado em dentes saudáveis. Os canais radiculares dos grupos 2 a 4 foram infectados até que a periodontite apical fosse confirmada radiograficamente. Os dentes com periodontite apical foram tratados em sessão única no grupo 2, em duas sessões no grupo 3 e sem tratamento no grupo 4. A área radiolúcida nas radiografias periapicais e o volume das lesões periapicais nas imagens de TCCB foram medidos antes e após 6 meses do tratamento. Nos grupos 1, 2 e 3 um resultado favorável (ausência ou diminuição de lesão) foi evidenciado em 57 (79%) dos canais usando radiografias periapicais mas apenas em 25 canais (35%) usando TCCB. Resultados desfavoráveis ocorreram mais frequentemente após terapia em sessão única do que em 2 sessões quando determinados por imagens de TCCB.

GARCIA DE PAULA-SILVA, *et al.*, (2009A) avaliaram a acurácia de 2 métodos de imagem no diagnóstico de periodontite apical por meio de achados histopatológicos. Para isso, o periápice de 83 raízes de dentes de cães tratadas e não-tratadas foram examinadas usando radiografia periapical, TCCB e avaliação histológica. Sensibilidade, especificidade, valores presuntivos e acurácia de radiografia periapical e TCCB para diagnóstico foram calculados. Como resultado, obtiveram que a radiografia periapical detectou periodontite apical em 71% das raízes e a TCCB detectou em 84%; a periodontite apical foi histologicamente diagnosticada em 93% dos casos. A sensibilidade foi de 0,77 e 0,91 para RP e TCCB, respectivamente. A especificidade foi de 1 para cada. Valor presuntivo negativo foi de 0,25 e 0,46 para RP e TC cone beam, respectivamente. Valor presuntivo positivo foi 1 para

cada. A acurácia do diagnóstico foi de 0,78 e 0,92 para RP e TCCB, respectivamente. Como conclusão, os autores apontaram que a TCCB foi mais sensível em detectar periodontite apical em comparação a RP, a qual foi mais propensa a não detectar periodontite apical quando esta ainda estava presente.

3 **P**ROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Considerando a importância dos microorganismos na etiopatogenia da periodontite apical crônica e os questionamentos levantados durante a revisão da literatura, este trabalho propõe-se a:

3.1 - Avaliar a capacidade de indução de periodontite apical crônica da bactéria *Enterococcus faecalis* quando inoculada experimentalmente em dentes de cães em cultura pura;

3.2 - Determinar se o preparo químico-mecânico tem algum efeito na sobrevivência da bactéria *Enterococcus faecalis* nos canais radiculares;

3.3 - Avaliar radiográfica e tomograficamente a capacidade de reparo de dentes tratados endodonticamente em sessão única infectados pela bactéria *Enterococcus faecalis* ou pela microbiota mista;

3.4 - Descrever um método para determinar a presença, viabilidade e distribuição de ácidos nucléicos bacterianos em dentina infectada utilizando microscopia confocal de varredura a laser;

3.5 - Analisar a distribuição das bactérias e dos ácidos nucléicos bacterianos nas estruturas dos tecidos radiculares mineralizados de dentes de cão com e sem tratamento endodôntico por microscopia confocal de varredura a laser.

4 MATERIAL E

MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 2 cães sem raça definida, com aproximadamente 1 – 1 ½ anos de idade. Os animais foram mantidos por um período de quarentena antes das intervenções endodônticas sob cuidados relacionados à dieta, vacinas e medicações sistêmicas. Durante esta fase e em todo o período experimental, os mesmos foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru USP. Previamente ao início do experimento, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA – Protocolo nº 08/2007) e aprovado em 17/04/2007 (ANEXO A).

Radiografias de diagnóstico dos dentes foram realizadas com a finalidade de observar as condições de normalidade radicular e suporte ósseo (Figura 1). Todas as radiografias realizadas no experimento foram padronizadas. O mesmo aparelho radiográfico foi utilizado em condições padronizadas de tempo de exposição, miliamperagem e kilovoltagem. O processamento radiográfico foi realizado em processadora automática sob as mesmas condições para todos os filmes. O posicionamento dos filmes na boca do animal foi obtido com o auxílio de posicionadores para filmes radiográficos do tipo *O ring*. Os dentes selecionados para o estudo estão listados no Tabela 1. Os critérios de seleção foram: dentes em boas condições periodontais e ausência de cárie ou lesão periapical.

Tabela 1. Distribuição dos dentes e raízes utilizados nos animais experimentais.

	Pré-molar superior	Pré-molar inferior	Incisivo	Total Dentes	Total Raízes
Cão 1	4	5	3	12	21
Cão 2	-	6	6	12	18
Total	4	11	9	24	39

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS

Os procedimentos experimentais foram realizados sob anestesia geral. Os animais inicialmente receberam uma medicação pré-anestésica de Neozine (cloridrato de levomepromazina, Aventis Pharma, São Paulo, SP, Brasil), a qual foi administrada por via intramuscular, utilizando-se seringa de 1ml (insulina). Após um período de 15 minutos, os animais foram anestesiados pela injeção intramuscular de uma associação de Tiletamina e Zolazepam (Zoletil 100, Virbac, São Paulo, Brasil) 0,10 mL/Kg, complementando sempre que necessário por metade desta dose.

4.3 ISOLAMENTO DO CAMPO OPERATÓRIO

Em cada sessão do tratamento, os dentes em estudo receberam limpeza coronária, com a finalidade da remoção de cálculos e depósitos presentes na superfície dentária. Foram então isolados com lençol de borracha preso ao arco de Young e fixado aos dentes com auxílio de grampos e cianoacrilato (Super Bonder, Loctite Brasil Ltda, Itapevi, SP, Brasil). A anti-sepsia do campo operatório, incluindo dentes e dique de borracha, foi executada com peróxido de hidrogênio 30 vol., e tintura de iodo 10% de acordo com MOLLER (1966). (Ver Figura 2.)

4.4 ABERTURA CORONÁRIA

Foi realizada a abertura coronária dos dentes utilizando pontas diamantadas esféricas 1012 e tronco-cônicas 3083 (KG Sorensen, São Paulo, Brasil) movimentadas em alta rotação e refrigeradas a ar / água. Todos os instrumentos utilizados nos procedimentos operatórios foram previamente esterilizados em autoclave (Figura 2).

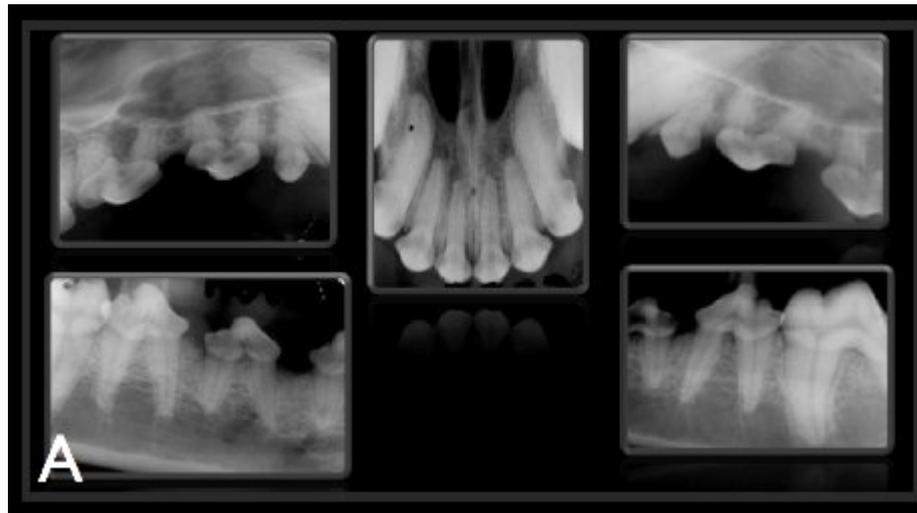


Figura 1. (A) Imagem radiográfica dos incisivos e pré-molares superiores e inferiores antes dos procedimentos.

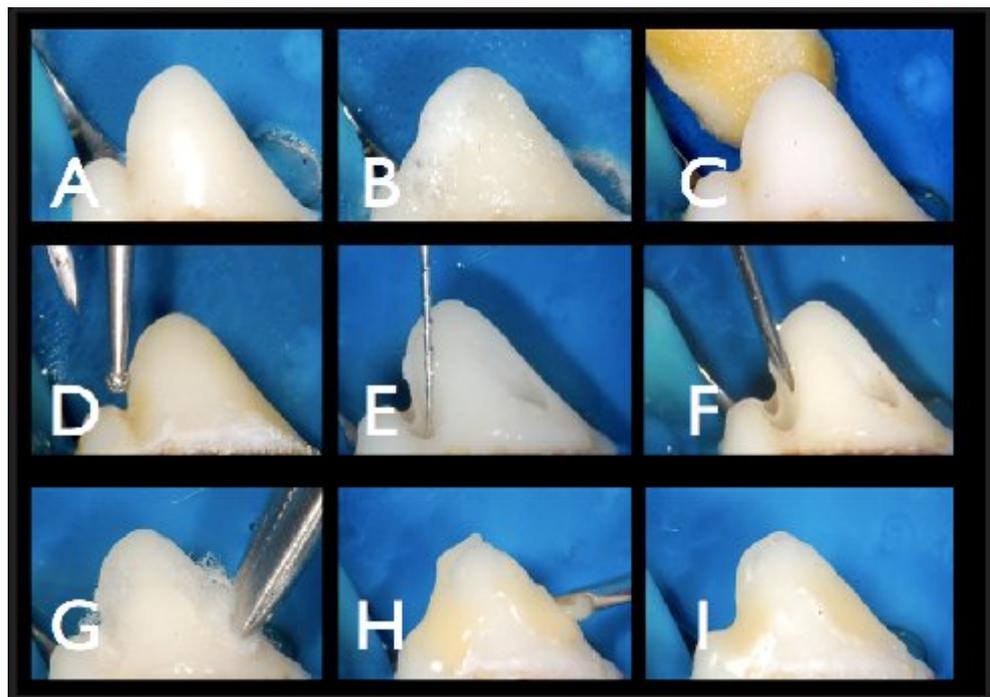


Figura 2. (A-C) Procedimentos de desinfecção utilizando peróxido de hidrogênio 30% e tintura de iodo 10%. (D) Abertura coronária utilizando ponta diamantada esférica estéril e irrigação com soro fisiológico. (E-F) Lima Hedstroen utilizada para remover o tecido pulpar e contaminação com solução de BHI contendo a bactéria *Enterococcus faecalis*. (G-I) Restauração com ionômero de vidro.

4.5 PREPARO DA SUSPENSÃO BACTERIANA E INOCULAÇÃO NOS CANAIS RADICULARES NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

O método de indução de periodontite apical crônica em cães foi realizado de acordo com ALLARD; STROMBERG; STROMBERG, (1987) e SILVEIRA, *et al.*, (2007) . Culturas frescas da bactéria *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foram obtidas em ágar sangue 48 horas antes dos procedimentos de inoculação. Foi preparada uma solução *overnight* de *Enterococcus faecalis* e 100µl da suspensão foi inoculado com ajuda de uma seringa de insulina nos canais das raízes de 4 pré-molares superiores, 11 pré-molares inferiores e 9 incisivos superiores. A seguir o conteúdo foi homogeneizado no interior do canal radicular com ajuda de uma lima tipo Hedstroen. Os dentes foram restaurados com ionômero de vidro fotopolimerizável (Resiglass R, Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil) por 60 dias para permitir o estabelecimento e multiplicação das bactérias.

4.6 TRATAMENTO ENDODÔNTICO DOS CANAIS INFECTADOS E COLETA MICROBIOLÓGICA

Transcorrido o período de 60 dias, os animais foram anestesiados para nova intervenção. O material restaurador foi removido e as raízes distais dos pré-molares e de 7 incisivos superiores foram tratadas endodonticamente, totalizando 22 raízes. As raízes mesiais dos pré-molares e de 2 incisivos superiores foram deixadas sem tratamento e serviram como controle.

Após o isolamento do campo operatório, este foi desinfetado de acordo com o protocolo de Möller (peróxido de hidrogênio 30vol + tintura de iodo 10%). Os resíduos de tintura de iodo foram inativados com uma solução de tiosulfato de sódio 5% e uma amostra pré-operatória foi obtida utilizando o fluido de caldo de tioglicolato pré-reduzido contendo ágar, dextrose e indicador (CARLSSON; SUNDQVIST, 1980; MANZUR, *et al.*, 2007). O cimento temporário foi removido com o auxílio de alta rotação sem irrigação seguido da aplicação de peróxido de hidrogênio 30vol + tintura de iodo 10% e inativação com tiosulfato de sódio 5%. Uma amostra do canal radicular foi feita após irrigação com 0,1ml do meio de

tioglicolato. Em seguida, limas tipo Hedstroen nº 15 – 20 foram utilizadas com movimentos de limagem na zona apical. Com o auxílio de cones de papel absorventes esterilizados nº 30, introduzidos no canal radicular, o mais apicalmente possível permanecendo por 60 segundos, procedeu-se a coleta da amostra. Em seguida, os cones foram transferidos para tubos contendo 4,0 ml do meio de transporte caldo de tioglicolato.

A seguir, os canais radiculares foram instrumentados pela técnica *crown-down* utilizando-se instrumentos rotatórios RaCe (FKG, Suíça) 35.08 e 40.10 a 500 rpm, intercaladamente até atingir o platô apical. Os canais foram alargados posteriormente utilizando-se limas tipo K nº 45 e 50 com 2 ml de hipoclorito de sódio a 2,5% para irrigação com uma cânula Navitip (Ultradent, EUA) a cada instrumento rotatório e lima usada (Figura 3). Posteriormente, os resíduos de hipoclorito de sódio foram inativados com uma solução de tiosulfato de sódio 5% e uma amostra pós-operatória foi tomada com ajuda de uma lima tipo Hedstroen nº 25 e fluido tioglicolato, que foi absorvido com pontas de papel absorvente (CARLSSON; SUNDQVIST, 1980). Em seguida, os canais radiculares foram lavados com 2ml de hipoclorito de sódio para eliminar o meio de transporte do interior dos canais e finalmente 2ml de EDTA 17% por 3 minutos e uma irrigação final de solução salina. Posteriormente, foram secos com pontas de papel. Finalmente, os canais foram obturados com cones de guta-percha e cimento Sealer 26 (Dentsply, Brasil) pela técnica de condensação lateral. A cavidade de acesso foi restaurada com cimento de ionômero de vidro fotopolimerizável.

4.7 MÉTODO DE AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA SEMIQUANTITATIVO

A avaliação microbiológica do tratamento endodôntico foi feita no laboratório de Microbiologia da FOB, no interior da cabine de fluxo laminar. O tubo contendo caldo de tioglicolato e os cones de papel absorvente com as amostras pré e pós-operatória foram agitados utilizando-se um vortex por 60 segundos. A seguir, foi inoculado 100µL da amostra não diluída, em placas contendo *bilis esculine agar* (Hi-media) e 100µl em ágar Brucella 5% de sangue e Vitamina K. As placas foram incubadas em uma jarra de anaerobiose Oxoid utilizando o sistema Anaerogen (Oxoid, Inglaterra) a 37°C por 5-7 dias. As colônias

bacterianas foram semi-quantificadas de acordo ao seguinte critério (MOLANDER, *et al.*, 1998; CHAVEZ DE PAZ, *et al.*, 2003):

+ 1- 10 unidades formadoras de colônias (UFCs)

++11 – 100 unidades formadoras de colônias (UFCs)

+++101 a 1000 unidades formadoras de colônias (UFCs)

++++1001 a 10000 unidades formadoras de colônias (UFCs)

+++++Mais de 10000 unidades formadoras de colônias (UFCs)

A avaliação da redução do número de UFCs bacteriana após o tratamento endodôntico foi realizada mediante a metodologia de cultura utilizando ágar para anaeróbios Brucella suplementado com 5% de sangue e vitamina K em ambiente de anaerobiose (anaerogen-oxid). Ágar de bile esculina e as provas de gram e catalase foram utilizados adicionalmente para a verificação da presença da bactéria *Enterococcus faecalis* (Figura 4).

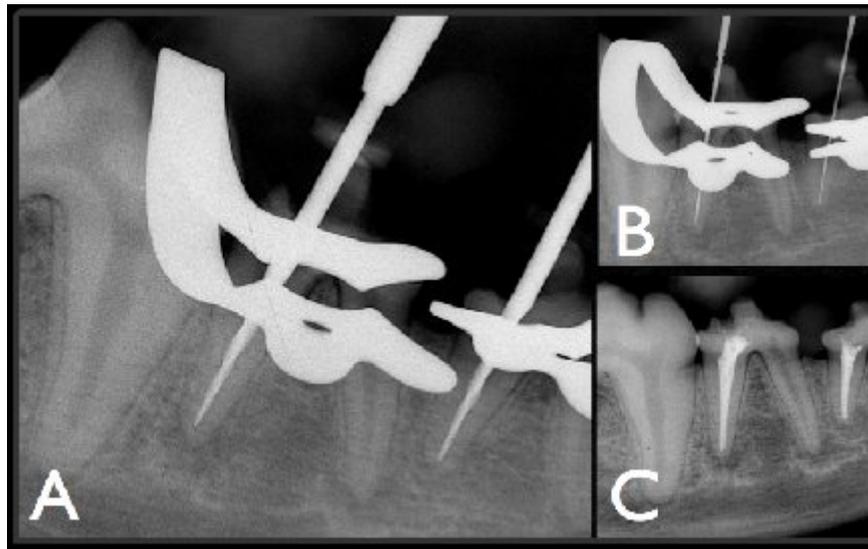


Figura 3. (A) Procedimentos clínicos realizados nas raízes distais dos pré-molares inferiores. Observar instrumento rotatório 40.10 no comprimento de trabalho, odontometria (B) e obturação dos canais radiculares (C).

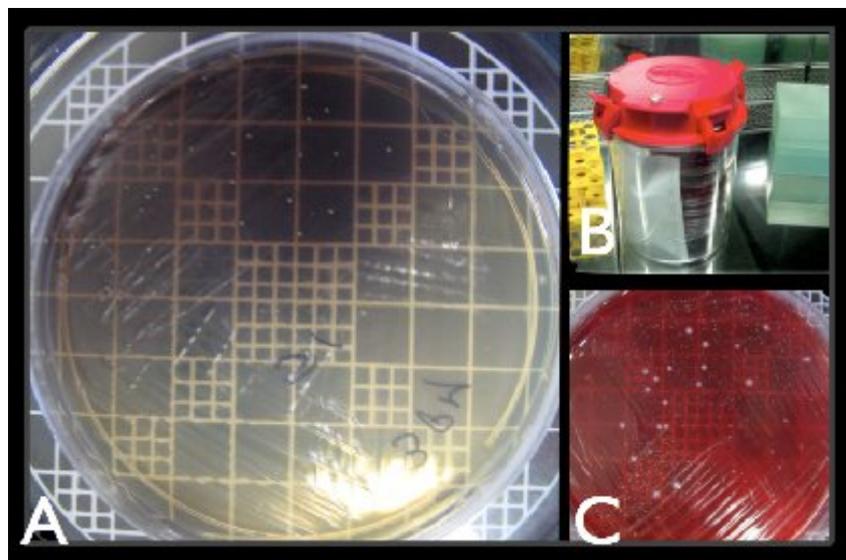


Figura 4. (A) Ágar de bile esculina no qual se observam colônias de *Enterococcus faecalis*. A reação a esculina é positiva. (B) Jarra de anaerobiose utilizada para a incubação das amostras. (C) Placa de ágar Brucella contendo diversidade de colônias bacterianas caracterizando infecção do tipo mista.

4.8 CONTROLE RADIOGRÁFICO.

Com a finalidade de confirmar a análise da região periapical nos grupos experimentais, foram avaliadas as radiografias iniciais e após a contaminação dos canais radiculares (60 dias). Desta forma, foi possível constatar a situação da região periapical nos períodos iniciais e o desenvolvimento da periodontite apical. Posteriormente, foi avaliado o padrão radiográfico após o tratamento endodôntico. As radiografias foram obtidas com um aparelho de raios-X odontológico modelo Heliodont (Siemens, Finlândia) com 60 kVp, 10mA e 0,4 segundo de exposição. Para cada tomada radiográfica foram utilizados filmes radiográficos Insight (Kodak), as imagens foram digitalizadas utilizando-se um scanner (HP-Scanjet v4050) e uma régua milimetrada foi utilizada como escala. As imagens foram armazenadas sob o formato TIFF.

Avaliação Subjetiva:

Para a análise radiográfica após os procedimentos de inoculação foram atribuídos escores de acordo com o aspecto da região periapical dos dentes inoculados (TROPE; DELANO; ORSTAVIK, 1999; HUUMONEN, *et al.*, 2003):

- 1: aspecto normal;
- 2: pequenas mudanças na estrutura óssea;
- 3: mudanças na estrutura óssea com perda de tecido mineralizado;
- 4: reabsorção óssea periapical bem definida;
- 5: periodontite severa com elementos indicativos de expansão da lesão.

As imagens foram avaliadas por 2 examinadores, sendo 1 endodontista e 1 radiologista para determinar a presença ou ausência de imagem compatível com periodontite apical nos dentes inoculados e após o período de preservação de 6 meses. Um estudo piloto

com uso do programa MedCalc (Software, Mariakerke, Bélgica) demonstrou que os avaliadores estiveram calibrados ($Kappa=0,79$). O endodontista era familiarizado com a anatomia radiográfica de cães, com tempo de formado de 8 anos e a radiologista tinha experiência de 2 anos diagnosticando periodontite apical crônica mediante radiografias periapicais e tomografia computadorizada tipo *cone beam*. Em casos de dúvida entre os 2 avaliadores durante as análises subjetivas, um terceiro avaliador endodontista avaliou e determinou o escore (CHUGAL; CLIVE; SPANGBERG, 2003).

4.9 MORTE DOS ANIMAIS E REMOÇÃO DOS TECIDOS

Decorrido o período experimental de 6 meses, a morte de cada animal foi induzida com uma dose letal de cloridrato de ketamina (anestésico). Em seguida, as mandíbulas e maxilas foram removidas e fixadas utilizando-se uma solução de formalina *buffer* 10%.

4.10 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DOS RESULTADOS RADIOGRÁFICOS. USO DA TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA *CONE BEAM* (TCCB)

Devido à natureza subjetiva do exame radiográfico, foi realizada a medição de áreas das imagens radiolúcidas correspondentes à presença de periodontite apical crônica. Radiografias periapicais das mandíbulas e maxilas foram tomadas com auxílio de posicionador radiográfico e uma escala milimetrada (*grade*). Posteriormente, as mandíbulas e maxilas foram submetidas a escaneamento pelo tomógrafo computadorizado i-CAT (Imaging Sciences, EUA). O protocolo utilizado para o escaneamento foi com *field of view* (FOV) de 13 cm, com tempo de 40 segundos e 0,2 de voxel. Para avaliação das imagens foi utilizado o programa i-CAT Vision.

Para a quantificação das lesões observadas na radiografia periapical, as imagens foram digitalizadas com um scanner HP Scanjet G4050 e importadas no programa Image Tool (UTHSCA, San Antonio, TX, EUA). Foram estudados 15 pré-molares com as raízes distais tratadas endodonticamente e os controles (raízes mesiais) e 2 incisivos superiores tratados

endodonticamente, que tiveram o respectivo incisivo contralateral sem tratamento, totalizando 17 raízes com tratamento endodôntico e 17 raízes sem tratamento (controle). Cinco incisivos tratados endodonticamente não foram avaliados devido a ausência de incisivo contralateral sem tratamento endodôntico. A zona radiolúcida das raízes com e sem tratamento endodôntico foram observadas por 1 endodontista e 1 radiologista. Os avaliadores tinham liberdade para modificar ou aumentar o tamanho da imagem, além dos valores de brilho e contraste. A seguir, foram delimitadas as áreas radiolúcidas correspondentes à lesão periapical dos dentes com e sem tratamento endodôntico. As áreas foram medidas e quantificadas em mm^2 (DE ROSSI, *et al.*, 2007; TANOMARU-FILHO, *et al.*, 2009). É importante destacar que as medidas foram feitas pelo avaliador endodontista e radiologista separadamente e uma análise estatística utilizando a prova de T-student foi realizada para verificar a calibração dos avaliadores. Em casos de dúvida entre os dois avaliadores, um terceiro avaliador endodontista avaliou e delimitou a área da lesão (CHUGAL; CLIVE; SPANGBERG, 2003).

As imagens tomográficas em formato DICOM foram salvas em um CD e instaladas em um notebook com sistema operacional Windows XP. Foram feitas análises das lesões nos planos sagital, axial e coronal na janela de MPR (*multiplanar reconstruction*) utilizando o programa i-CAT Vision, de tal maneira que o alinhamento no plano sagital dos dentes com tratamento correspondesse exatamente à imagem e angulação da imagem obtida na radiografia periapical (Figura 5). Uma vez alinhada a imagem, a lesão foi explorada em sentido vestibulo-lingual na tentativa de encontrar a área com a maior destruição óssea. A sequência de cortes transversais ao arco foi ajustada para que os mesmos tivessem 200 μm de intervalo de corte. Uma vez delineada a área de análise, foi inserida uma escala de 10mm utilizando a ferramenta *rule* e as imagens de cada raiz foram exportadas em formato JPEG. A seguir, foram medidas as áreas radiolúcidas periapicais correspondentes aos dentes com e sem tratamento endodôntico no programa Image Tool, com ajuda da escala proporcionada pelo tomógrafo. Os valores foram expressos em mm^2 (Figura 5).

Medição da radiodensidade óssea da zona periapical dos dentes com e sem tratamento endodôntico.

Para esta avaliação foi utilizada a ferramenta HU (Hounsfield) do programa i-CAT Vision, a qual mede a radiodensidade óssea por meio da escala Hounsfield. A escala é definida em unidades Hounsfield (HU), sendo o valor mínimo correspondente ao ar (-1000 HU), passando pelo valor da água (0 HU) e do osso cortical (+1000 HU). Sobre os ápices das raízes com e sem tratamento endodôntico foi medida a radiodensidade em uma área de $0,5\text{mm}^2$ em 3 secções sagitais, as quais estavam a intervalos de 0,2mm. Desses 3 valores foi feita uma média, a qual foi utilizada como valor final. Como controle foi medida a radiodensidade em uma área de $0,5\text{mm}^2$ de lâmina dura do terço médio, a qual não esteve envolvida pela lesão periapical (usualmente entre o terço médio e coronal das raízes). (Figura 5E).

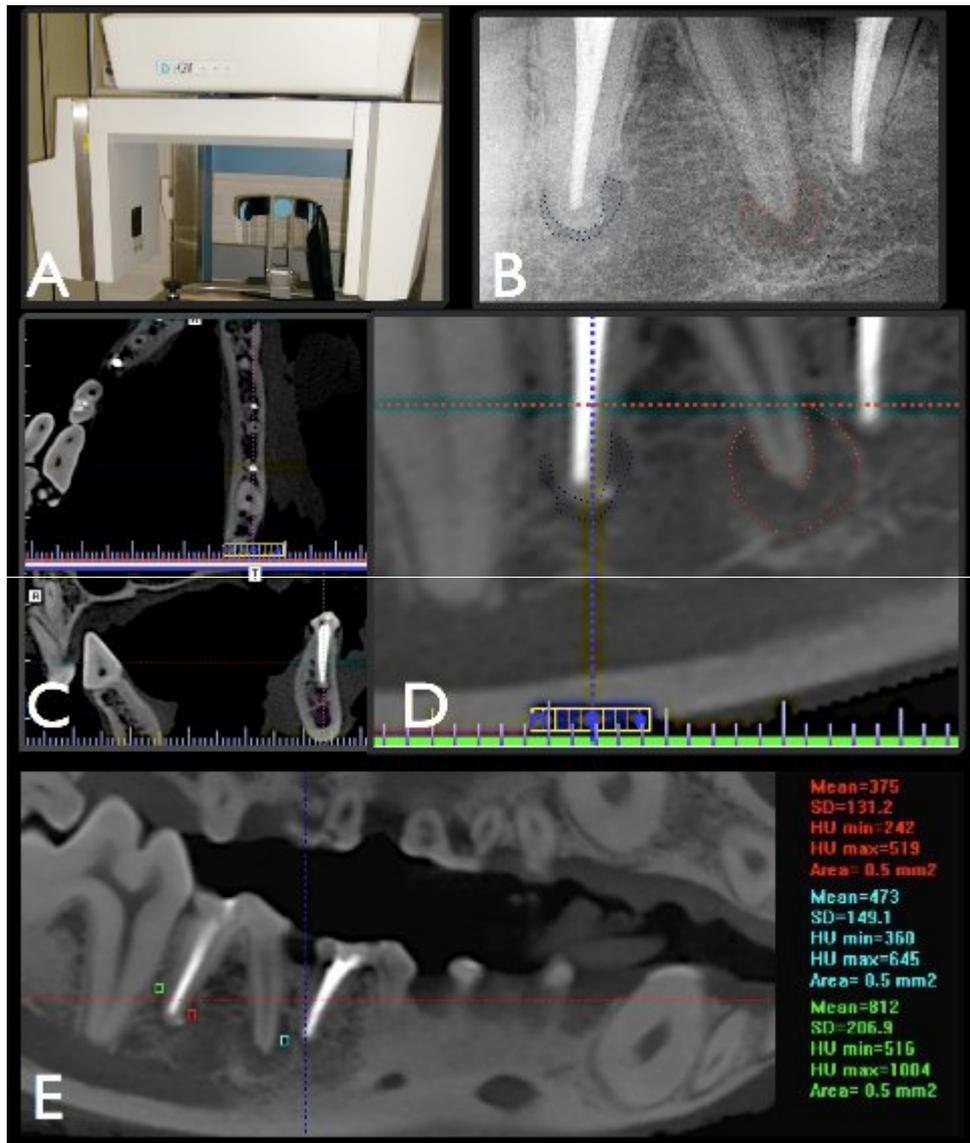


Figura 5. (A) Tomógrafo computadorizado *cone beam* i-CAT utilizado no estudo. (B) Imagem periapical do terceiro pré-molar inferior. Reconstrução multiplanar (MPR) do terceiro pré-molar inferior. A imagem está orientada para coincidir, em angulação, com a imagem presente na radiografia periapical correspondente (C-D). (E) Corte sagital utilizado para medir a radiodensidade óssea das áreas radiolúcidas da raiz com tratamento (vermelho) e da raiz sem tratamento (azul). Adicionalmente foi medida uma área de osso sem afecção periodontal (verde). Os valores da radiodensidade são expressos em unidades HU (Hounsfield) pelo programa i-CAT Vision.

4.11 MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER

Com a finalidade de confirmar e descrever o padrão de infecção dos canais radiculares foram observadas amostras representativas mediante o uso da microscopia confocal de varredura a laser.

Experimento 1. Teste utilizando marcadores de viabilidade celular e ácidos nucléicos em amostras clivadas.

Devido à ausência de estudos prévios utilizando o microscópio confocal para a análise dos túbulos dentinários infectados, foi realizado um estudo piloto com a finalidade de estabelecer um protocolo de trabalho, bem como observar a afinidade de diversos corantes com as estruturas estudadas. Dez dentes bovinos não cariados foram selecionados. Os dentes estiveram armazenados em solução tampão de 10% de formalina. Após a remoção do agente fixador mediante lavagem em água corrente por 4 horas, foram preparados segmentos radiculares de comprimento de 7-8mm, por meio de secção da porção apical e coronária da raiz. Cada canal radicular foi alargado até o diâmetro de uma broca de Gates-Glidden número 5 (1,30mm) utilizando irrigação com hipoclorito de sódio a 1%. A *smear layer* foi removida com uso de banho ultrassônico com EDTA a 17% por 4 minutos. Um espécime foi visualizado utilizando o microscópio eletrônico de varredura a 750X (Jeol JSM T220, Japão) para confirmar a habilidade desta técnica em remover a *smear layer*. A seguir, os dentes foram lavados com água destilada por 10 minutos e armazenados em água estéril por 1 semana para remover qualquer componente químico residual. Os espécimes foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121°C. A esterilização foi confirmada por meio de incubação de cada espécime em 5mL de caldo de infusão cérebro-coração (BHI) a 37°C, por 24 horas.

Infecção dentinária por *Enterococcus faecalis*

A bactéria *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foi utilizada durante os procedimentos de infecção dentinária. Para criar o inóculo bacteriano, colônias isoladas de 24 horas foram suspensas em 3mL de BHI. A suspensão foi padronizada com a escala 0,5 de McFarland. Para o procedimento de infecção dentinária, 8 blocos de dentina foram colocados individualmente em tubos inoculados com 200 µL da suspensão bacteriana de *Enterococcus faecalis* por 21 dias. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. Após o período de incubação, os blocos de dentina foram lavados com 1mL de solução fosfato *buffer* para remoção das bactérias não aderidas à superfície do canal radicular. Foram confeccionados 2 sulcos longitudinais na superfície bucal e lingual dos blocos para facilitar o procedimento de fratura das amostras.

Após a fratura dos blocos, um segmento dentinário foi lavado utilizando 100µl de PBS e em seguida, corado com 50 µL de diacetato de fluoresceína e 50 µL de iodeto de propídio. O diacetato de fluoresceína é um corante celular não fluorescente, permeável, o qual é convertido em fluoresceína pelas esterases intracelulares produzidas pelos microorganismos metabolicamente ativos (NETUSCHIL, *et al.*, 1998; ZAURA-ARITE; VAN MARLE; TEN CATE, 2001; AUSCHILL, *et al.*, 2005; HANNIG, *et al.*, 2007) . Iodeto de propídio é uma molécula fluorescente impermeável à membrana celular e geralmente excluída das células vivas. Assim, as células vivas são observadas na cor verde enquanto as células com membrana celular alterada são observadas na cor vermelha (VITKOV, *et al.*, 2005).

O segmento dentinário contralateral foi lavado com 100 µL de PBS e corado com 50µL de laranja de acridina 0,01%. Este corante é utilizado comumente como marcador de ácidos nucleicos em células vitais ou fixadas. O corante se une ao RNA bacteriano emitindo fluorescência vermelha, e se une ao DNA bacteriano emitindo fluorescência verde (MASON; LLOYD, 1997; RAPPOSCH; ZANGERL; GINZINGER, 2000). Diversos autores tem descrito que esta informação permite avaliar o metabolismo bacteriano, devido a que as células na fase logarítmica emitem fluorescência vermelha e aquelas na fase estacionária emitem fluorescência verde (KEPNER; PRATT, 1994; MASON; LLOYD, 1997; RAPPOSCH; ZANGERL; GINZINGER, 2000; GEORGE; KISHEN; SONG, 2005; VITKOV, *et al.*, 2005). Em ambas técnicas de coloração, a dentina foi incubada com os corantes a temperatura ambiente por 10 minutos em um ambiente escuro e em seguida lavadas

com PBS por 10 minutos. Após os procedimentos de coloração, as amostras foram imediatamente analisadas utilizando um microscópio confocal de varredura a laser. Duas raízes estéreis foram também coradas com o mesmo protocolo e serviram como controle negativo (Figura 6).

Experimento 2. Teste utilizando marcadores de ácidos nucléicos em amostras seccionadas.

Foram utilizados 2 primeiros pré-molares superiores e 2 incisivos superiores sem tratamento endodôntico. Adicionalmente foram observados 3 incisivos superiores com tratamento endodôntico realizado em sessão única. Os dentes pertenciam a 1 cão utilizado durante o experimento piloto do presente estudo. Os dentes foram inoculados com a bactéria *Enterococcus faecalis* por 60 dias. O objetivo foi descrever um protocolo para análise de amostras de segmentos de dentina infectada seccionados a partir de uma máquina metalográfica tipo ISOMET (Buehler, Alemanha) modificado de LAN, et al., 1986; GONÇALVES, et al., 2007 e observar a distribuição bacteriana em amostras preservadas em formalina 10% *buffer*, para assim, poder confirmar a infecção no interior dos canais radiculares infectados *in vivo*. Os dentes avaliados foram mantidos em formol por um período de 7 dias para o início da fase laboratorial. Posteriormente, foram realizadas lavagens das amostras em água corrente por 24 horas. Em seguida, eliminou-se o tecido periodontal adjacente em excesso com auxílio de cureta periodontal. Os dentes foram fixados com godiva a uma placa acrílica adaptada para o uso na máquina de corte tipo ISOMET. Duas fatias de 500µm correspondentes aos terços médio e apical foram obtidas utilizando um disco de 300 µm de espessura (Buehler, Alemanha), lavadas com PBS e coradas com 50 µl de laranja de acridina por 1 hora em ambiente livre de luz. As amostras foram observadas utilizando o microscópio confocal para observar a distribuição bacteriana nos tecidos dentinários infectados (Figura 7). Adicionalmente, foram observados 2 incisivos inferiores fixados, com polpa vital, para fins de controle.

Análise no microscópio confocal

Os segmentos de dentina do experimento piloto 1 e 2, foram examinados utilizando um microscópio confocal invertido Leica TCS-SPE (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha). Os respectivos comprimentos de onda de absorção e emissão foram 494 / 518 nm para o diacetato de fluoresceína e 536/617 nm para o iodeto de propídio. Para o corante laranja de acridina, os comprimentos de onda de absorção e emissão foram 460 e 650 nm para RNA; e 500 e 526 nm para o DNA respectivamente. Os espécimes foram observados utilizando as lentes de 40X e 63X, ambas com óleo de imersão. As imagens capturadas em 40X foram obtidas usando 20-30 secções de 1 µm utilizando o formato de 1024 X 1024 pixels. As imagens capturadas em 63X foram obtidas usando 10-50 secções de 0,3 µm utilizando o formato de 1024 X 1024 pixels. As imagens foram adquiridas utilizando o programa Leica Application Suite-Advanced Fluorescence *software* (LAS AF, Leica Mannheim, Alemanha).

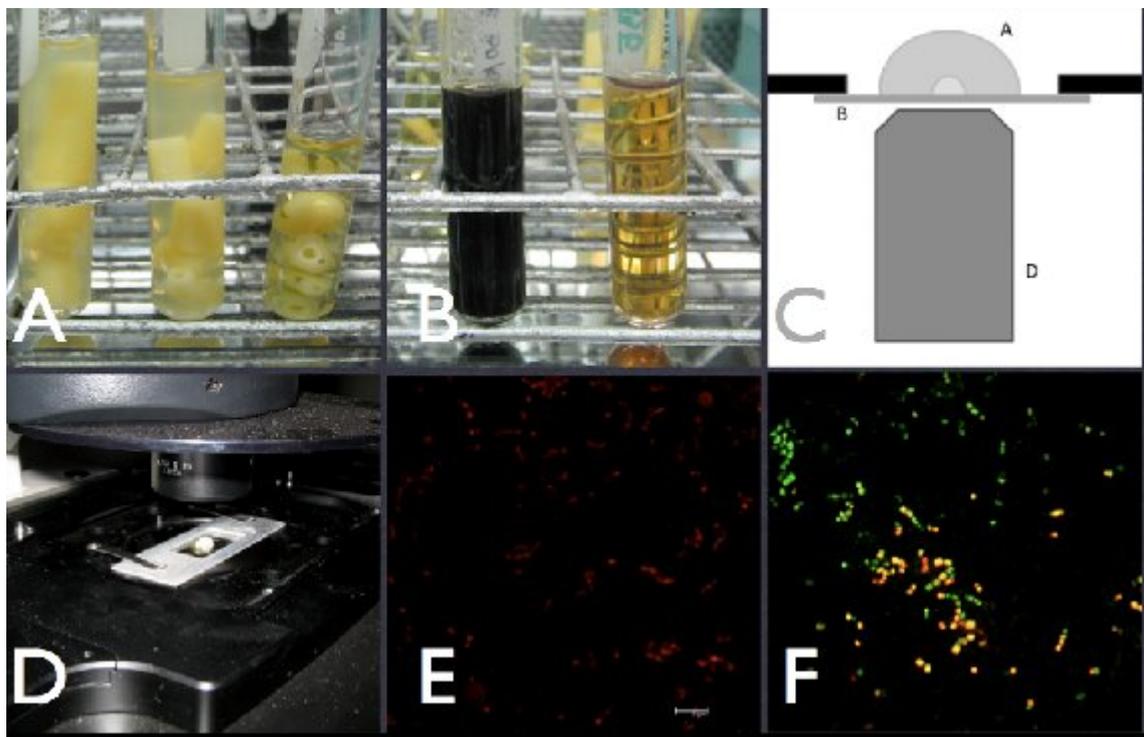


Figura 6. (A) Cilindros de dentina bovina incubados em BHI. (B) Teste bioquímico de Bilis esculina para confirmar a pureza da cepa. (C-D) Diagrama do modelo utilizado e fotografia mostrando o posicionamento das amostras no microscópio confocal. (E) Células de *Enterococcus faecalis* coradas com laranja de acridina e (F) fluoresceína diacetato/iodeto de propídio.

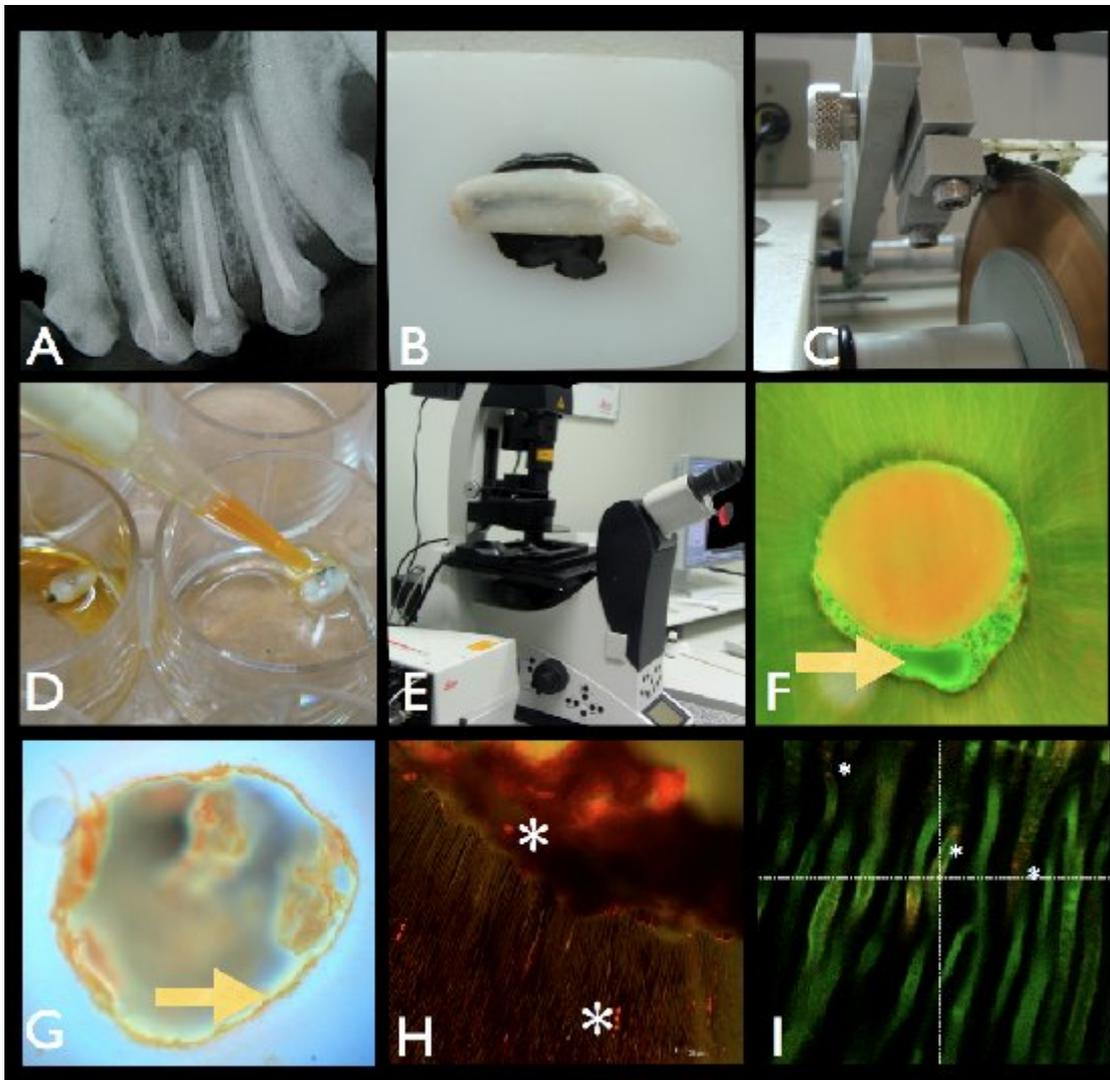


Figura 7. Fase laboratorial do experimento 2. (A) Dentes de cão tratados endodonticamente. (B) Amostra fixada em placa de acrílico utilizando godiva. (C) Máquina de corte tipo Isomet utilizada para a secção da amostra. (D) Segmento de dentina corado com laranja de acridina. (E) Microscópio confocal de varredura a laser utilizado durante a pesquisa. (F) Fatia corada com laranja de acridina: observar a presença do material obturador e de um vazio na obturação (seta). (H) Fatia corada com laranja de acridina correspondente a dente necrótico sem tratamento: observar a presença de matéria orgânica aderida às paredes do canal radicular. (H-I) Microscopia confocal de varredura a laser de dente sem tratamento e dente obturado mostrando bactérias nos túbulos dentinários (*).

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças entre os escores das UFCs das amostras pré e pós-instrumentação foram determinadas utilizando o teste de U-mann Whitney. As diferenças entre as análises radiográficas subjetivas foram determinadas utilizando a prova de U-mann Whitney. As diferenças entre as áreas dos dentes com e sem tratamento e entre os métodos (radiográficos e tomográficos) foram submetidas a análise de variância a 2 critérios (2-way ANOVA). As diferenças entre as unidades Hounsfield da zona periapical dos dentes com e sem tratamento endodôntico foram feitas utilizando a análise de variância e o teste de Tukey. Todas as provas estatísticas foram realizadas utilizando um nível de significância de 5%.

5 ***RESULTADOS***

5 RESULTADOS

-Periodontite apical induzida e efeito do tratamento endodôntico - Resultados microbiológicos.

Foram avaliados 15 pré-molares e 9 incisivos superiores totalizando 24 dentes. O tratamento endodôntico foi realizado em 15 raízes distais dos pré-molares e em 7 incisivos superiores. Dois incisivos superiores e 15 raízes mesiais foram deixados sem tratamento e serviram como controle. Os dados após as análises microbiológicas dos espécimes estão descritos na Tabela 2. Dez dentes foram colonizados pela bactéria inicialmente inoculada. Durante a avaliação foi constatada a presença de pequenas fraturas no material restaurador em 14 dentes, pelo que os dentes contaminados foram colonizados basicamente pela flora mista da cavidade bucal. Nesses dentes não foi encontrada a presença da bactéria *Enterococcus faecalis* inicialmente inoculada. Após os procedimentos de preparo químico-mecânico, houve uma redução significativa do número de UFCs em comparação ao número de UFCs encontrados inicialmente. U-Mann Whitney test ($P < 0.05$).

-Periodontite apical induzida e efeito do tratamento endodôntico - Resultados da avaliação radiográfica utilizando o índice periapical.

Os escores das raízes avaliadas estão listados na Tabela 3. Em todos os casos, os avaliadores concordaram no valor do escore atribuído a cada raiz durante a análise. Não houve diferença entre os escores atribuídos para os dentes sem tratamento endodôntico no período inicial e após o período de 6 meses ($P > 0.05$). Após o tratamento endodôntico, a média dos escores dos dentes tratados diminuiu significativamente ($P < 0.05$). Três raízes foram catalogadas como o escore 1, 8 raízes foram catalogadas como escore 2. Em 11 raízes foi observada a presença nítida de periodontite apical crônica (escores 3 e 4) Dos 11 casos com presença nítida de patologia periapical, 4 correspondiam a casos diagnosticados inicialmente como infecção mista e 7 a casos de infecção por *Enterococcus faecalis*.

Tabela 2. Resultados microbiológicos e o efeito do tratamento sobre a microbiota do canal. Pré-instrumentação (S1), pós-instrumentação (S2).

	Cão 1	Resultado Microbiológico	Raiz Mesial	Raiz Distal/Incisivo	
			controle	Pré (S1)	Pós (S2)
1	pmsup	<i>I. mista</i>	++	++	-
2	pmsup	<i>I. mista</i>	+++	++++	-
3	pmsup	<i>E. faecalis</i>	++++	++++	-
4	pmsup	<i>E. faecalis</i>	+	++++	-
5	pminf	<i>I. mista</i>	+	++	-
6	pminf	<i>I. mista</i>	+++	++	-
7	pminf	<i>E. faecalis</i>	++	+	+
8	pminf	<i>E. faecalis</i>	+	+	-
9	pminf	<i>E. faecalis</i>	+	+	-
10	Incisivo sup.	<i>E. faecalis</i>		+++	-
11	Incisivo sup.	<i>E. faecalis</i>		++	-
12	Incisivo sup.	<i>I. mista</i>		++	controle
	Cão 2				
13	pminf	<i>I. mista</i>	+	+++	-
14	pminf	<i>I. mista</i>	+++	++	-
15	pminf	<i>I. mista</i>	++	+++	-
16	pminf	<i>E. faecalis</i>	+	+	-
17	pminf	<i>I. mista</i>	+	+	-
18	pminf	<i>I. mista</i>	++	+++	-
19	Incisivo sup.	<i>I. mista</i>		++++	++
20	Incisivo sup.	<i>I. mista</i>		++++	-
21	Incisivo sup.	<i>E. faecalis</i>		+	-
22	Incisivo sup.	<i>E. faecalis</i>		+	-
23	Incisivo sup.	<i>I. mista</i>		++	-
24	Incisivo sup.	<i>I. mista</i>		++	controle

+ 1- 10 unidades formadoras de colônias (UFC) ++11 – 100 unidades formadoras de colônias (UFC) +++101 a 1000 unidades formadoras de colônias (UFC) ++++1001 a 10000 unidades formadoras de colônias (UFC) +++++Mais de 10000 unidades formadoras de colônias (UFC).

Tabela 3. Estado periapical após os procedimentos de inoculação de acordo com a análise radiográfica subjetiva.

	Cão 1	Resultado Microbiológico	Escore radiográfico			
			Controle		Tratamento	
			60 dias Pós-infecção	6-meses	60 dias Pós-infecção	6-meses
1	pmsup	I. mista	3	3	3	2
2	pmsup	I. mista	4	4	3	2
3	pmsup	<i>E. faecalis</i>	3	3	3	3
4	pmsup	<i>E. faecalis</i>	4	4	3	2
5	pminf	I. mista	4	4	4	2
6	pminf	I. mista	4	4	4	2
7	pminf	<i>E. faecalis</i>	2	2	2	2
8	pminf	<i>E. faecalis</i>	3	4	4	2
9	pminf	<i>E. faecalis</i>	3	3	4	1
10	Incisivo sup.	<i>E. faecalis</i>	-	-	4	1
11	Incisivo sup.	<i>E. faecalis</i>	-	-	3	3
12	Incisivo sup.	I. mista	4	4	-	-
	Cão 2					
13	pminf	I. mista	5	5	4	2
14	pminf	I. mista	4	5	4	1
15	pminf	I. mista	3	5	4	2
16	pminf	<i>E. faecalis</i>	4	5	4	3
17	pminf	I. mista	3	5	4	2
18	pminf	I. mista	3	3	3	3
19	Incisivo sup.	I. mista	-	-	3	2
20	Incisivo sup.	I. mista	-	-	4	3
21	Incisivo sup.	<i>E. faecalis</i>	-	-	4	4
22	Incisivo sup.	<i>E. faecalis</i>	-	-	3	4
23	Incisivo sup.	I. mista	-	-	3	4
24	Incisivo sup.	I. mista	2	5	-	-

- Escore 1: aspecto normal;
- Escore 2: pequenas mudanças na estrutura óssea;
- Escore 3: mudanças na estrutura óssea com perda de tecido mineralizado;
- Escore 4: reabsorção óssea periapical bem definida;
- Escore 5: periodontite severa com elementos indicativos de expansão da lesão.

Efeito do tratamento endodôntico: resultados radiográficos versus tomográficos.

Foram estudados 15 pré-molares com as raízes distais tratadas endodonticamente e os controles (raízes mesiais) e 2 incisivos superiores tratados endodonticamente, que tiveram o respectivo incisivo contralateral sem tratamento, totalizando 17 raízes com tratamento endodôntico e 17 raízes sem tratamento (controle). A Tabela 4 apresenta os valores em mm² das áreas radiolúcidas de 17 dentes tratados endodonticamente e das respectivas raízes contralaterais sem tratamento (controle), avaliadas mediante radiografias periapicais e tomografia computadorizada *cone beam* (TCCB). Os valores representam a média das áreas mensuradas pelos 2 avaliadores. Não houve diferença significativa entre estas médias das medidas dos avaliadores. A prova estatística de análise de variância a 2 critérios foi utilizada para ver a influência do tratamento endodôntico e do método de avaliação. A análise mostrou que as áreas radiolúcidas avaliadas mediante TCCB apresentaram maiores valores em comparação com as áreas avaliadas em radiografia periapical ($p < 0.05$). Os dentes que não foram tratados endodonticamente apresentaram os valores mais altos de radioluscência em mm² em comparação aos dentes tratados endodonticamente ($p < 0.05$). Ver gráficas 1-3. Imagens radiográficas e tomográficas representativas dos dentes avaliados estão apresentadas nas Figuras 8 a 12.

Tabela 4. Média, mediana e desvio padrão, em mm², da área radiolúcida periapical associada aos dentes com e sem tratamento endodôntico, observadas nas imagens de RP e nas de TCCB.

Grupos	Amostras (N)	Média	Mediana	Desvio Padrão
Tratamento endodôntico, RP	17	1,65	1,27	1,67
Tratamento endodôntico, TCCB	17	4,32	3,8	2,57
Controle, RP	17	5,50	4,26	2,89
Controle, TCCB	17	8,90	7,72	3,69

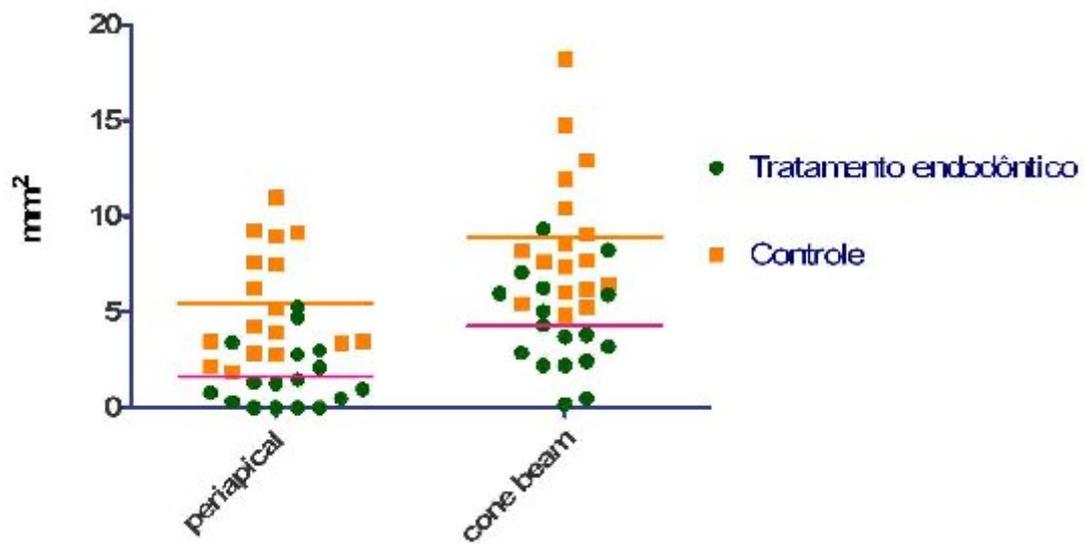


Gráfico 1. Valores, em mm^2 , das áreas radiolúcidas periapicais associadas aos dentes com e sem tratamento endodôntico observados nas imagens de RP e nas de TCCB.

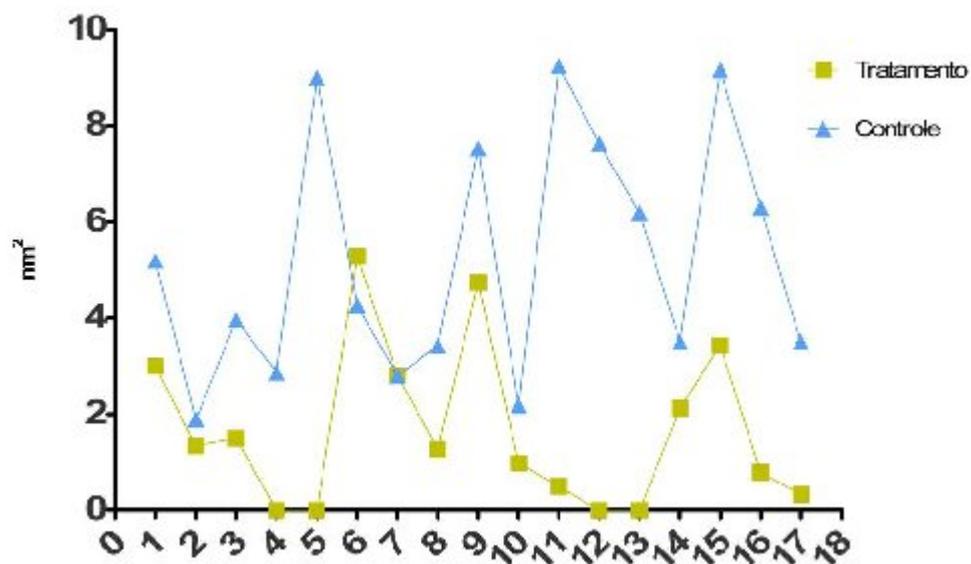


Gráfico 2. Valores individuais em mm^2 , das áreas radiolúcidas periapicais associadas aos dentes com e sem tratamento endodôntico observados nas imagens de RP ($n=17$).

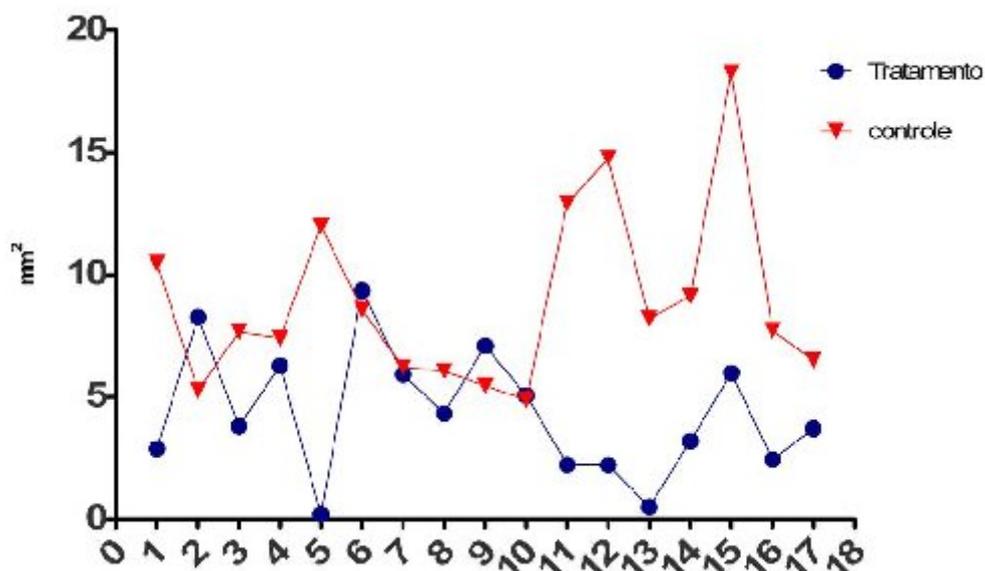


Gráfico 3. Valores individuais em mm², das áreas radiolúcidas periapicais associadas aos dentes com e sem tratamento endodôntico (raiz contralateral) observados nas imagens de TCCB (n=17).

Análise da radiodensidade óssea por escala Hounsfield.

A Tabela 5 mostra os valores em Hounsfield (HU) de 17 dentes tratados endodonticamente, das 17 raízes contralaterais sem tratamento (controle) e das áreas de lâmina dura sem alteração periodontal. As áreas de osso normal apresentaram os maiores valores de radiodensidade (1017,49HU), seguido dos dentes que apresentaram tratamento endodôntico (550,84HU). Os dentes que não foram tratados endodonticamente apresentaram os valores mais baixos (444,59HU). (Gráficos 4 e 5).

A análise estatística dos valores em Hounsfield demonstrou que a área de osso sem alteração apresentou, significativamente, os valores mais altos de radiodensidade ($p < 0.05$). Não houve diferenças nos valores de radiodensidade óssea entre o grupo com tratamento endodôntico e o grupo sem tratamento ($p > 0.05$) Anova-Tukey test.

Tabela 5 – Valores de média, mediana e desvio padrão em Hounsfield (HU) da zona periapical dos grupos experimentais e controle.

Grupos	Amostras (N)	Média	Mediana	Desvio Padrão
Tratamento endodôntico	17	550,84	537,67	163,02
Controle	17	444,59	510,67	172,42
Lâmina dura sem alteração periodontal	17	1017,49	971	259,57

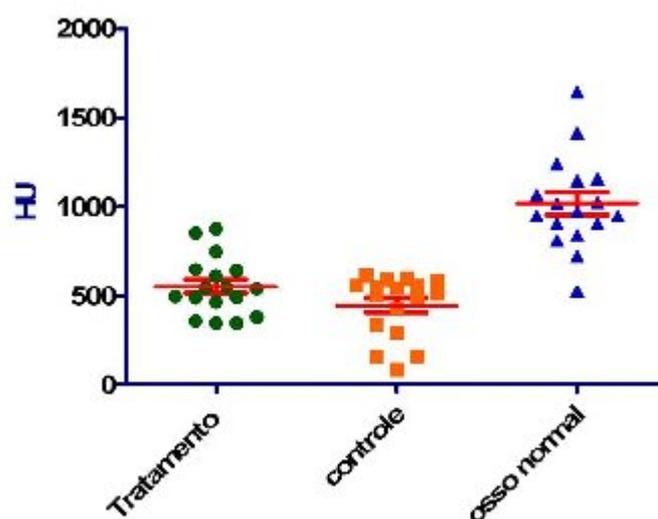


Gráfico 4. Valores em HU (Hounsfield) da radiodensidade óssea das áreas radiolúcidas periapicais associadas aos dentes com e sem tratamento endodôntico, observadas nas imagens de TCCB.

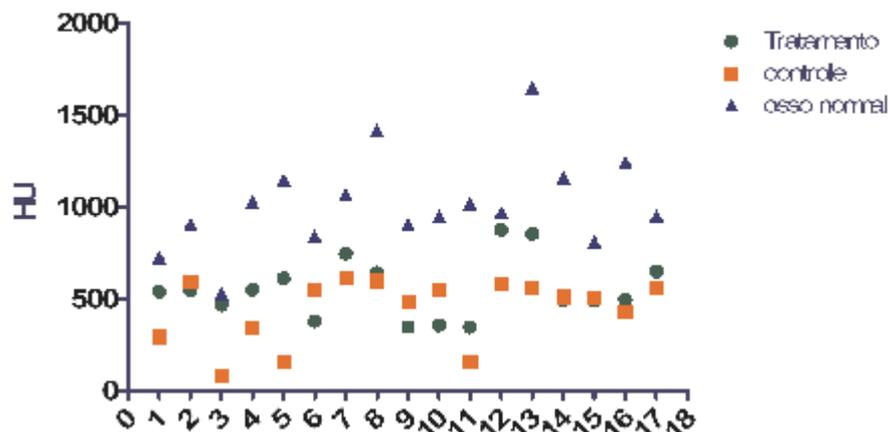


Gráfico 5. Valores individuais em HU da radiodensidade óssea de áreas radiolúcidas periapicais associada aos dentes com e sem tratamento endodôntico e as áreas de osso normal observadas nas imagens de TCCB. Observar como os casos 1, 3, 4, 5, 7, 11, 12 e 13 apresentam uma leve maior radiodensidade em comparação aos contralaterais sem tratamento, porém sem alcançar a radiodensidade da zona sem afecção. Os casos 2, 6, 8, 9, 10, 14, 15, 16 e 17 apresentam similar ou menor radiodensidade que o contralateral sem tratamento.

Microscopia confocal de varredura a laser

-Estudo microscópico dos dentes infectados *in vitro* - Experimento 1

A fim de avaliar se a análise por microscopia confocal é um método adequado para identificação *in situ* de bactérias nos túbulos dentinários, dentina estéril foi corada previamente a fim de servir como controle durante os procedimentos microscópicos. A análise mostrou que, após a coloração com laranja de acridina ou diacetato de fluoresceína, túbulos não-infectados podiam ser visualizados. Existiu uma predileção dos corantes para marcar a dentina peritubular (Figura 13).

Após vinte e um dias da infecção dentinária *in vitro*, os dentes foram examinados utilizando a lente de 40X em óleo de imersão. Os espécimes corados com laranja de acridina ou FDA/PI mostraram que os túbulos dentinários de todos os dentes estudados estavam

infectados pela bactéria *Enterococcus faecalis*. Os túbulos infectados foram claramente diferenciados dos não-infectados por sua fluorescência. Entretanto, a identificação morfológica das bactérias viáveis e não-viáveis foi de difícil identificação nesse aumento. Nenhuma colonização ou pouca colonização das paredes dos canais radiculares puderam ser observadas em alguns espécimes. A penetração bacteriana nos túbulos dentinários foi variável entre 100µm a 400µm, embora fosse observada, em algumas secções, presença bacteriana próxima ao cimento radicular.

O corante laranja de acridina mostrou a presença de RNA (fluorescência vermelha) nos túbulos dentinários infectados, evidenciando atividade metabólica das células bacterianas. Os microorganismos no interior dos túbulos dentinários puderam ser identificados por sua estrutura cocóide com o uso da lente de 63X, com zoom adicional de 3 utilizando óleo de imersão (Figura 13).

A técnica de coloração FDA/PI apresentou diferença na viabilidade das bactérias. Um único túbulo dentinário, apresentando ambas bactérias viáveis e não-viáveis, foi o achado mais freqüente, enquanto a presença de túbulos unitários com bactérias não-viáveis foi o achado menos freqüente. A perda de viabilidade estava frequentemente associada com a perda da intensidade da fluorescência e com a perda da morfologia celular. Foi evidente que o diâmetro do túbulo dentinário pôde conter um grande número de células bacterianas (Figura 14).

Estudo microscópico dos dentes infectados *in vivo* - Experimento 2

A análise dos dentes infectados, *in vivo*, incluiu a observação de 2 dentes de cão com polpa vital, os quais estiveram fixados em formalina para procedimentos de controle. O interior dos túbulos dentinários exibiu presença de fluorescência vermelha, provavelmente devido a prolongamentos odontoblásticos. A maior parte dos túbulos dentinários apresentavam-se vazios e a marcação do corante esteve limitada à dentina peritubular. Os dentes inoculados com a bactéria *Enterococcus faecalis* apresentaram diferentes padrões de infecção nos túbulos dentinários e nas paredes do canal radicular. Em geral, os canais radiculares apresentaram grande conteúdo necrótico e colonização bacteriana na luz dos

canais radiculares (Figuras 15 e 16). Esta presença de conteúdo necrótico nas paredes do canal radicular marcou uma diferença com os dentes do experimento desenvolvido *in vitro*. Os tecidos necróticos estiveram associados sempre a colonização bacteriana. Estas colônias bacterianas tiveram aparência clássica da estrutura denominada “biofilmes bacterianos” (Figura 15). Em todos os dentes obturados avaliados foram encontradas bactérias no interior dos túbulos dentinários (Figura 17).

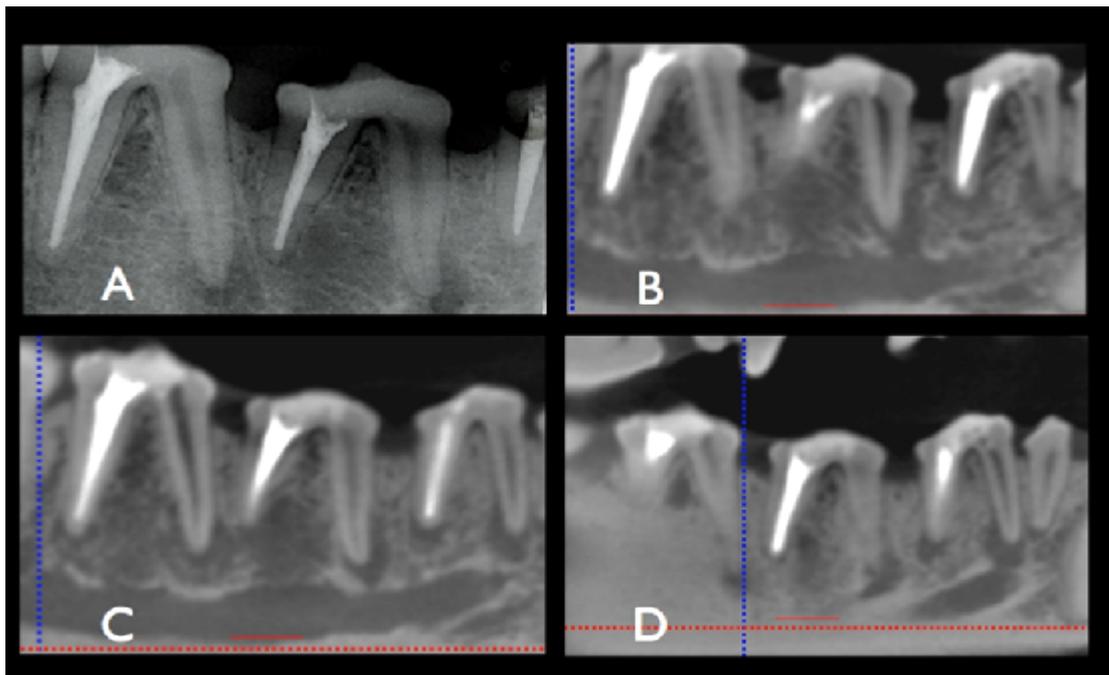


Figura 8. (A) Raízes distais tratadas endodonticamente correspondentes aos 2º., 3º. e 4º. pré-molares inferiores. Imagem de radiografia periapical não mostra radiolusciência nos dentes tratados. (B-D) TCCB evidencia presença de periodontite apical na raiz distal do 2º. e 4º. pré-molares inferiores. Raízes mesiais apresentam nítida imagem de periodontite apical crônica.

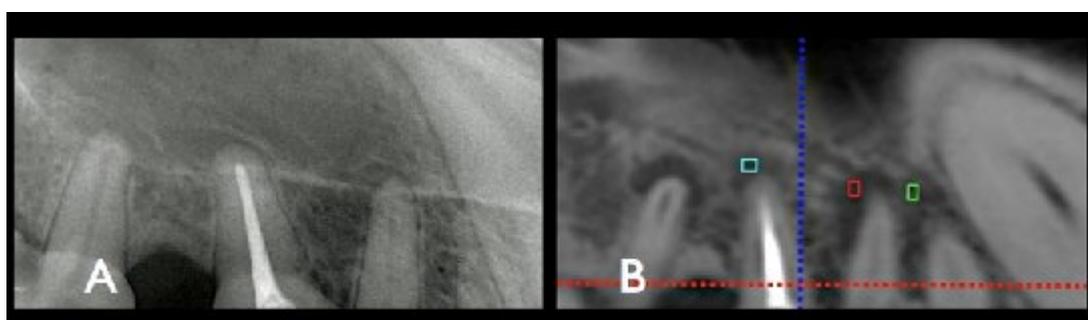


Figura 9. (A) Radiografia periapical mostrando raiz mesial do 3º. pré-molar sem tratamento; raiz distal do 2º. pré-molar com tratamento endodôntico e raiz mesial do 2º. pré-molar sem tratamento. Observar a dificuldade para delimitar a extensão das lesões periapicais. (B) TCCB dos dentes observados na imagem periapical: a presença de periodontite apical crônica é evidente em todas as raízes.

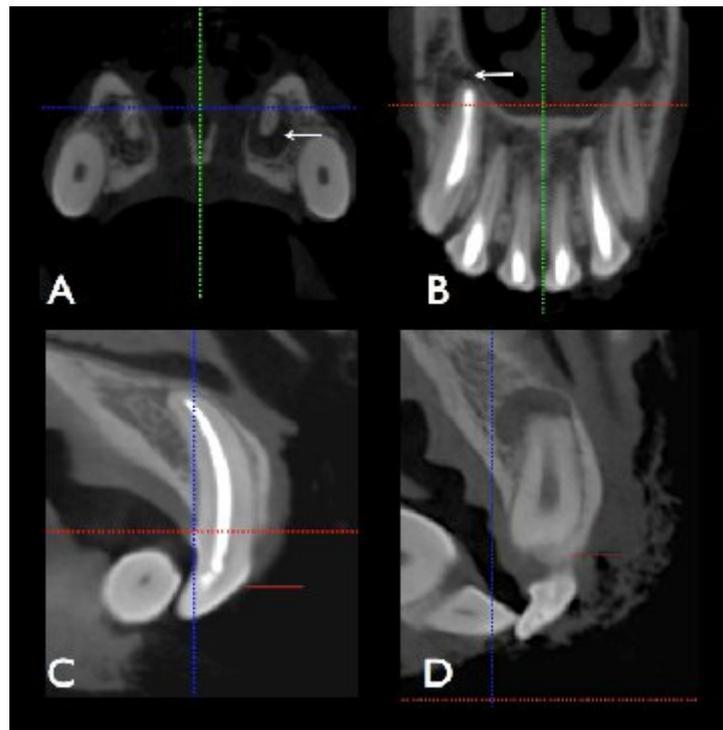


Figura 10. (A) Imagem tomográfica de incisivo superior sem tratamento endodôntico; observar a extensa lesão periapical (seta). (B) Dente contralateral com tratamento evidencia discreta presença de lesão (seta). (C-D) Corte sagital de incisivos superiores com e sem tratamento endodôntico; observar os diferentes aspectos das lesões.

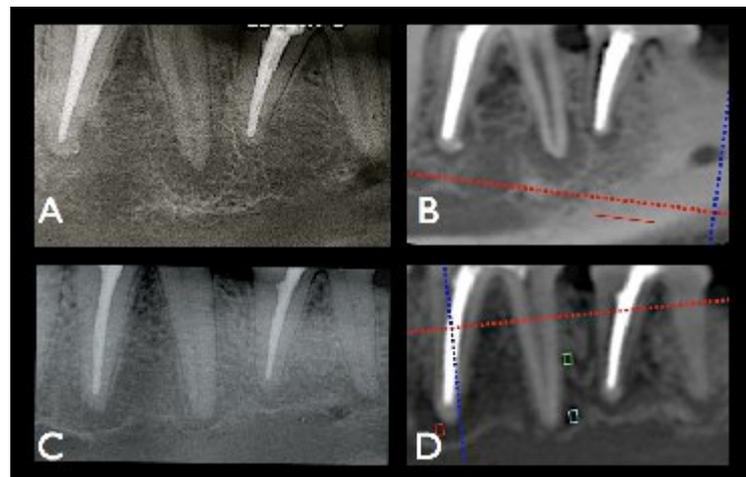


Figura 11. (A, C) Imagens de radiografia periapical da raiz distal dos 3^o. e 4^o. pré-molares inferiores tratados endodonticamente. A presença de periodontite apical crônica não é evidente nos 3^os pré-molares. (B-D) Imagens de TCCB mostrando rarefação apical nas 4 raízes distais observadas.

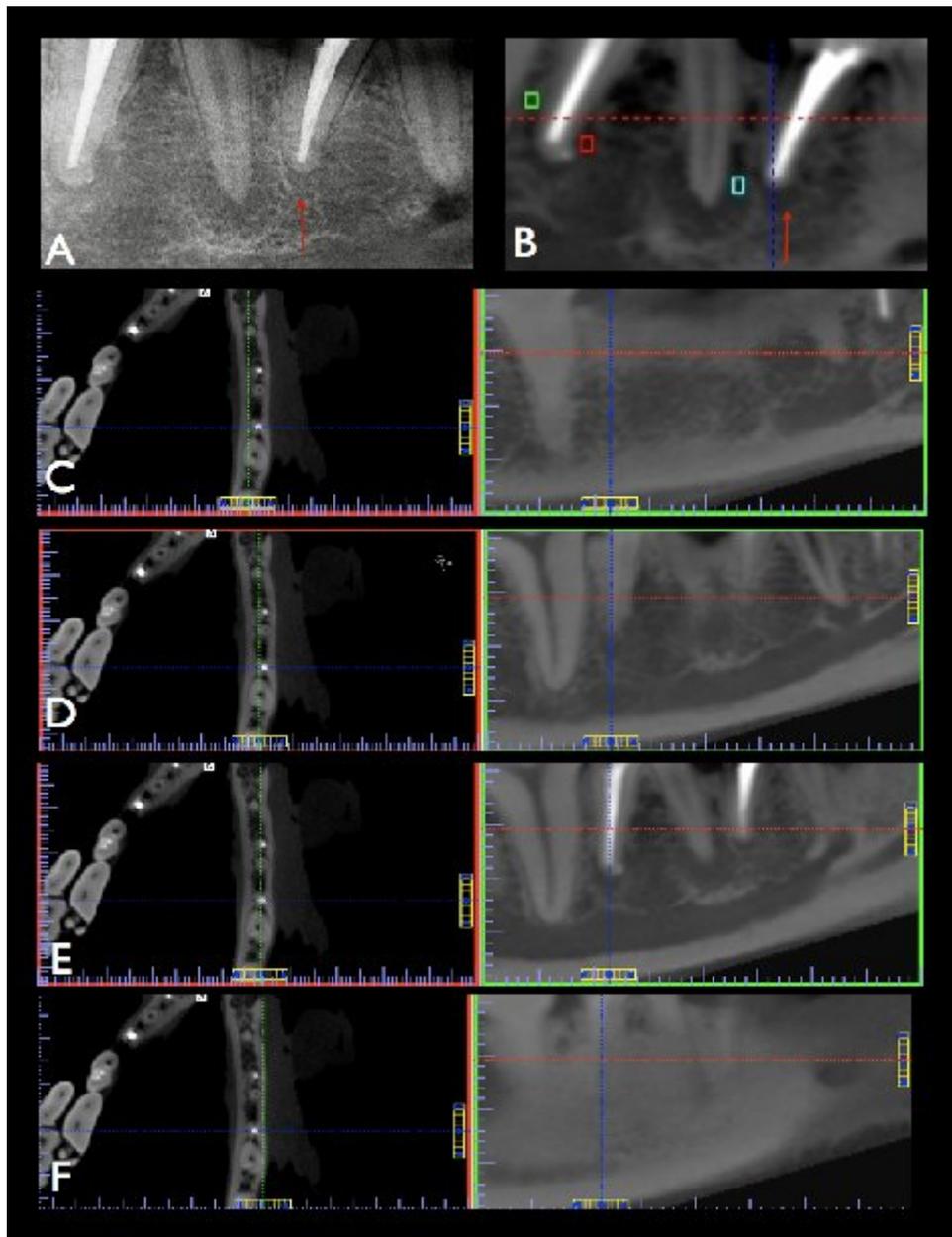


Figura 12. O efeito adverso da sobreposição óssea na interpretação da presença de periodontite apical na radiografia periapical pode ser visto neste exemplo. (A) Observar a raiz distal do 3°. pré-molar (seta), na qual não há evidência de lesão periapical. (B) TCCB indica presença de lesão periapical. A imagem em C representa ausência de lesão a nível da cortical lingual. Em D e E, a presença das lesões é visível. (F) A nível da cortical vestibular, não há evidência de lesão periapical.

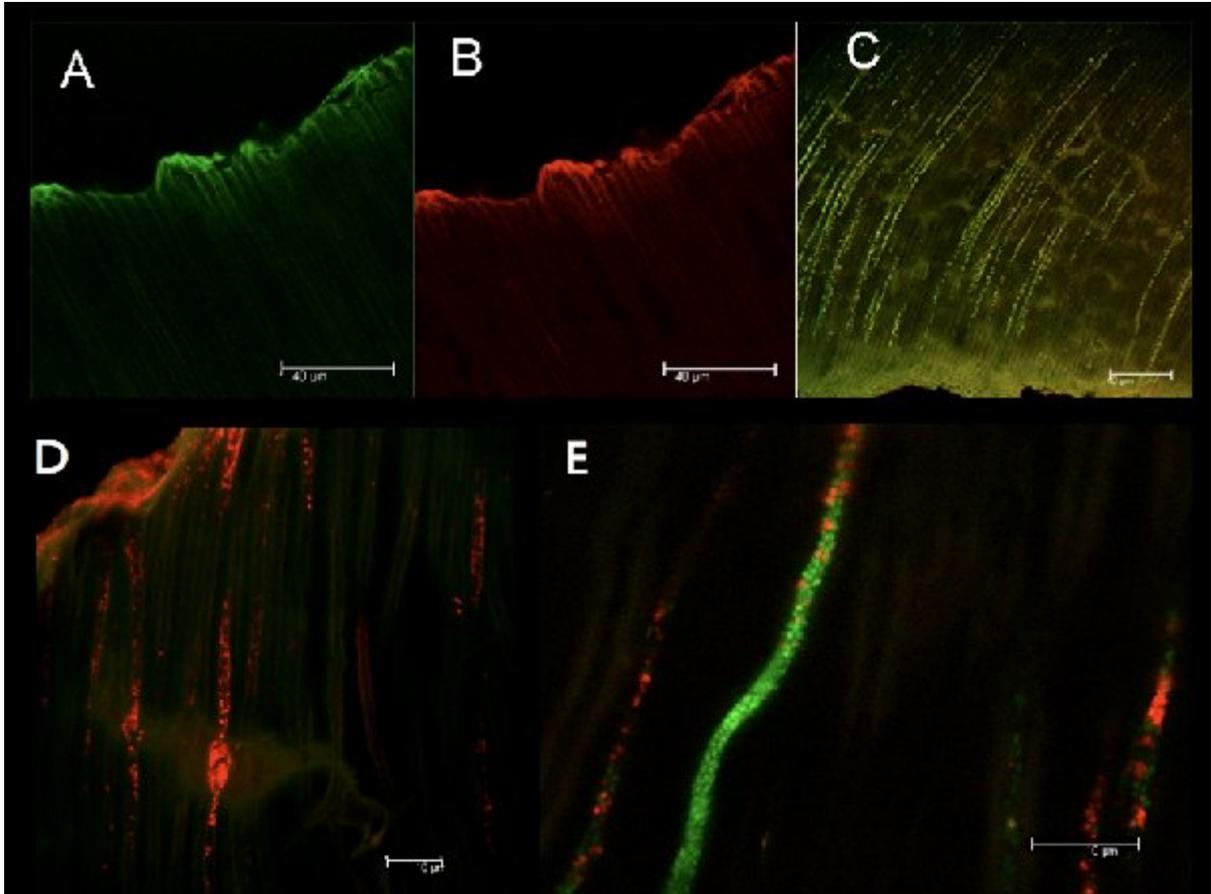


Figura 13. (A-B) Controle negativo. (C) Microscopia confocal de varredura a laser de dentina infectada após o 21^o. dia: observar a fluorescência dos tubulos infectados. (D) As células bacterianas (vermelhas) na parede do canal radicular penetram nos túbulos dentinários. (E) Imagem de alguns túbulos dentinários infectados evidenciando fluorescência vermelha, indicando a presença de RNA, sinal de atividade metabólica bacteriana. As células com fluorescência verde indicam a presença de DNA. Microorganismos no interior dos túbulos dentinários são identificáveis por sua estrutura cocoidal.

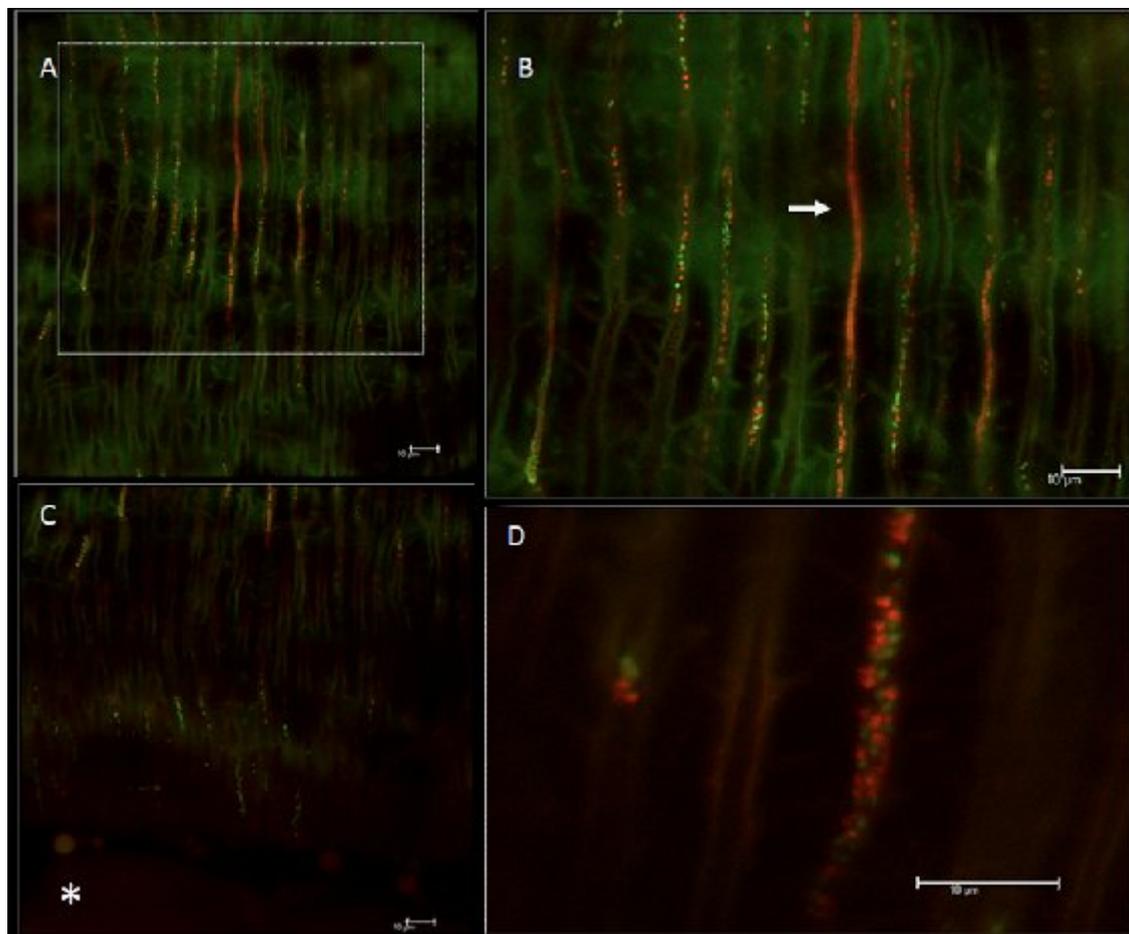


Figura 14. (A) Microscopia confocal de varredura a laser de dentina infectada após o 21^o dia, corada com diacetato de fluoresceína/ iodeto de propídio. A e C representam 2 campos microscópicos consecutivos, de aproximadamente 350 μ m do interior da dentina radicular da parede do canal radicular. (C) Bactérias vivas (em verde) são vistas em túbulos dentinários próximos à parede do canal radicular. Entretanto, ambas bactérias vivas e mortas (em vermelho) são mais numerosas no segundo campo microscópico (A), aproximadamente 350 μ m do interior da dentina radicular. Uma magnificação desta área é vista em B. Todos os túbulos dentinários estão infectados. Um único túbulo dentinário com grande quantidade de células mortas (em vermelho) é visto (seta). Tais células mortas não são diferenciáveis por sua estrutura celular, que é amorfa. A discriminação entre bactérias vivas (em verde) e mortas (em vermelho) no interior de outros túbulos dentinários é claramente possível. O aumento de 630 vezes, de alta resolução, com zoom adicional de 3 (D) mostra células cocoidais vivas (em verde) juntamente com células mortas (em vermelho) no interior de um único túbulo dentinário.

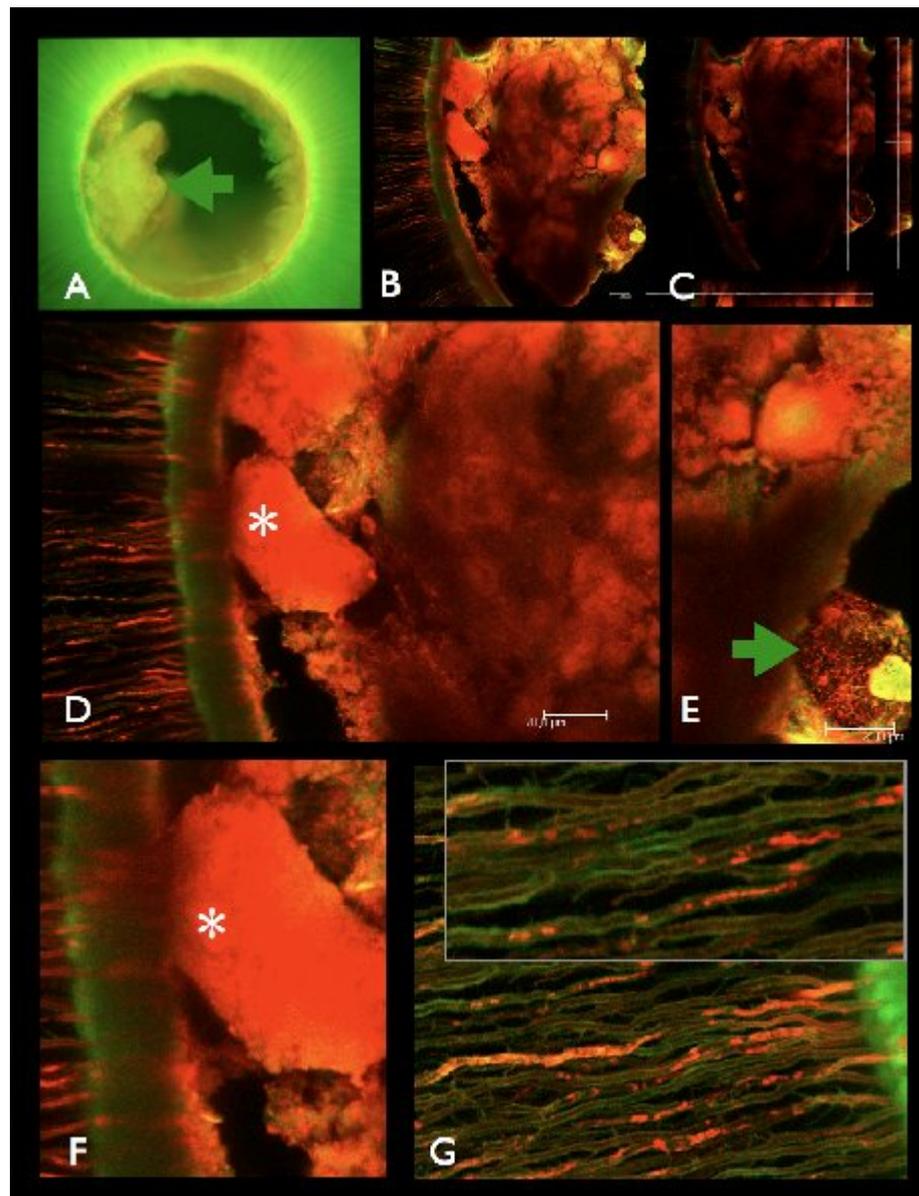


Figura 15. (A) Corte transversal a nível do terço médio de incisivo necrótico de cão, corado com laranja de acridina. Observar a camada de tecido orgânico aderida ao redor das paredes do canal radicular (seta). Imagem de microscopia confocal mostrando em detalhe o que aparenta ser uma grande colônia bacteriana embebida em uma matriz (B-C). As imagens em (D-F) mostram em detalhe a relação entre a suposta colônia bacteriana e a pré-dentina. Observar em detalhe a estrutura marcada (*) mostrando prolongações que penetram na pré-dentina e dentina. A infecção dos túbulos dentinários adjacentes a esta estrutura pode ser confirmada na figura (G). Outra imagem em (E) mostra uma colônia evidenciando corpos celulares bacterianos (seta) aderido à estrutura maior: observar a textura da superfície. Embora corpos celulares bacterianos não possam ser identificados na maior parte desta estrutura, a infecção dos túbulos dentinários adjacentes confirma a natureza infecciosa do conteúdo orgânico nas paredes do canal radicular.

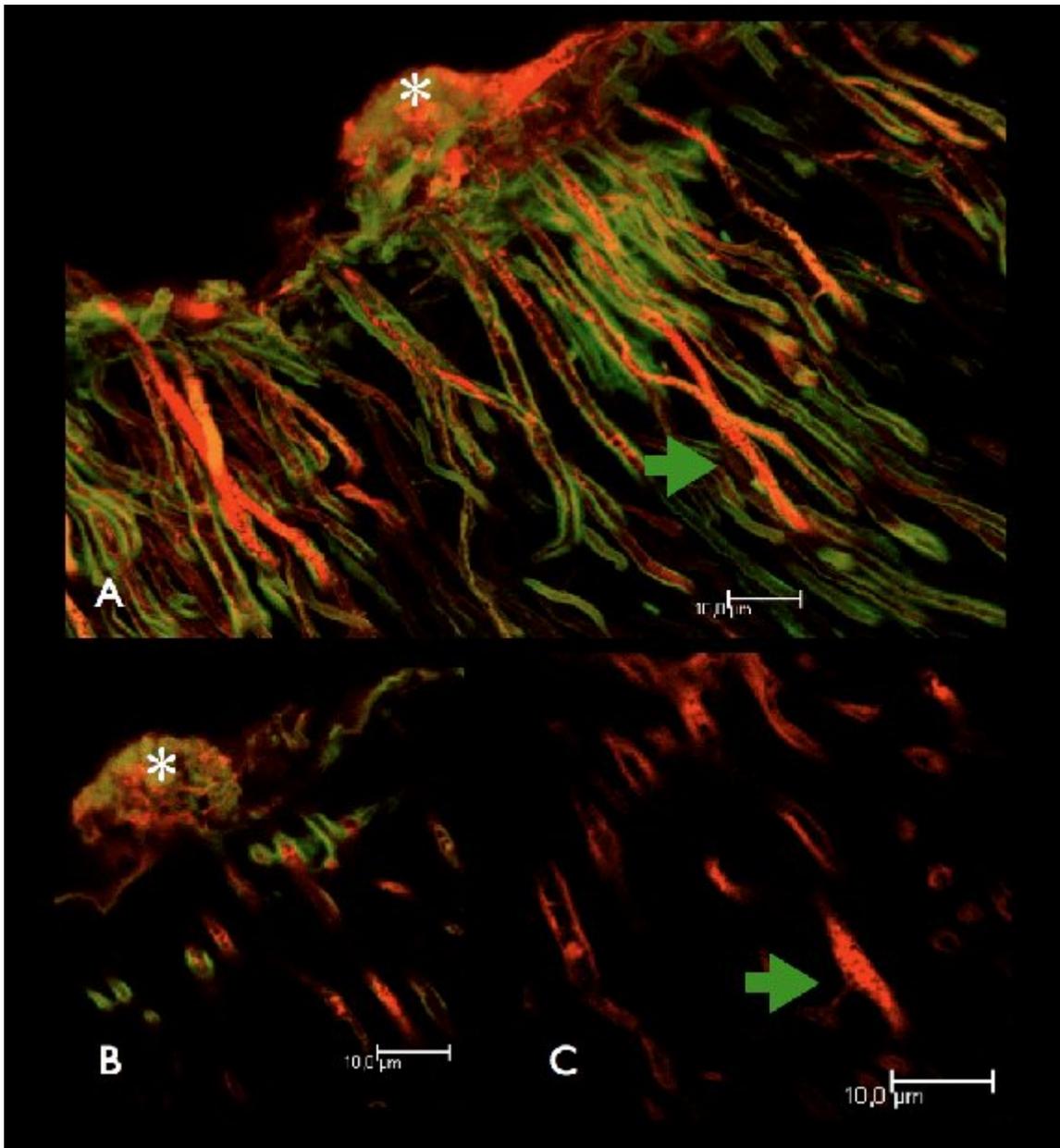


Figura 16. (A) Corte transversal a nível do terço médio de incisivo necrótico de cão, corado com laranja de acridina. Observar a estrutura orgânica aderida na parede do canal radicular (*) e a relação com a infecção dos túbulos dentinários adjacentes (seta). (B-C) Secções ópticas de $0,3\mu\text{m}$ da estrutura orgânica mostra bactérias no interior (*) e nos túbulos dentinários adjacentes (seta), observam-se nitidamente corpos bacterianos.

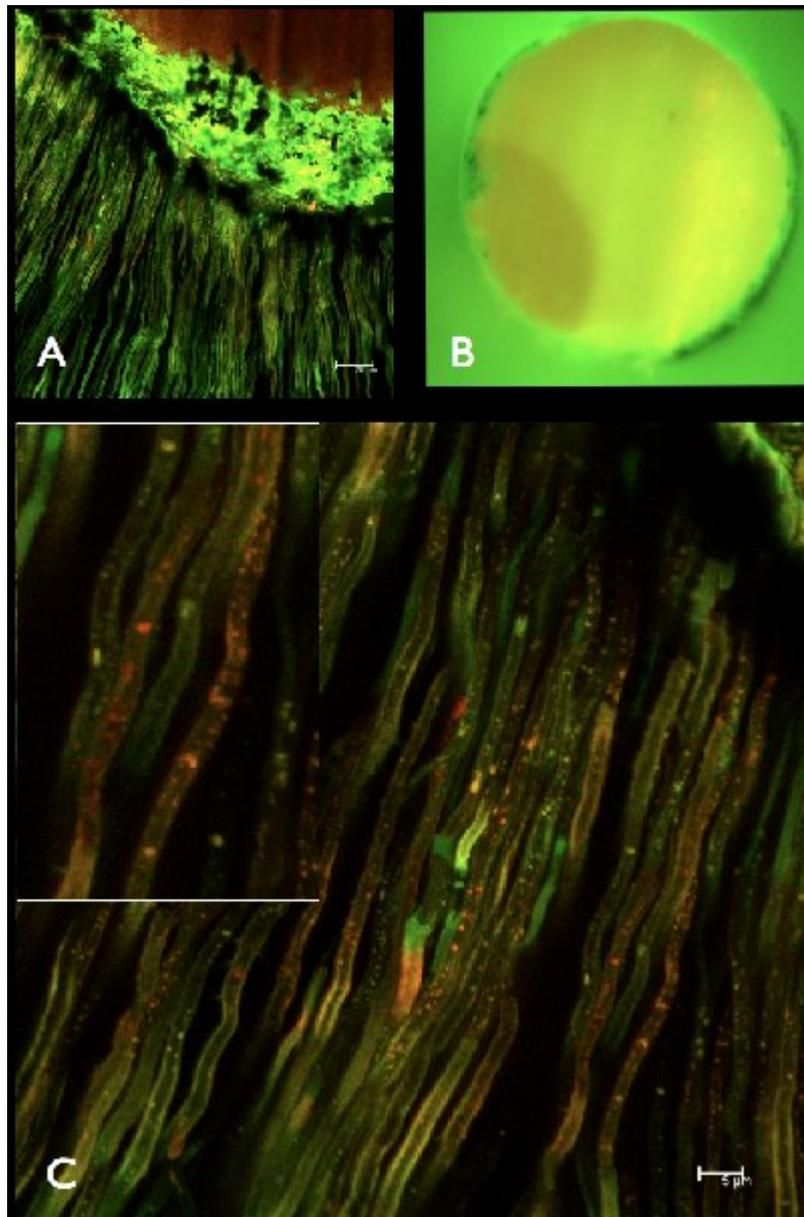


Figura 17. Secção transversal de canal radicular obturado de cão pela técnica de condensação lateral corada com laranja de acridina (B). Detalhe da interface guta-percha, cimento e dentina pode ser visto em (A). Observar a afinidade do corante com o cimento obturador. Detalhe da dentina adjacente em (C): observar a presença de bactérias no interior dos túbulos dentinários que apresentam-se infectados.

6 **D***ISCUSSÃO*

6 DISCUSSÃO

O estudo dos processos que determinam o sucesso ou o fracasso do tratamento endodôntico envolve diferentes tipos de variáveis, tais como o preparo químico-mecânico, soluções irrigadoras e obturação dos canais radiculares. As pesquisas que envolvem isoladamente estas variáveis podem ser catalogadas dentro da área de Materiais Dentários, caracterizadas fundamentalmente por uso de métodos laboratoriais diversos, pelos quais se estudam as propriedades físico-químicas dos materiais bem como as técnicas para sua utilização.

A anatomia dentária é outra variável fundamental dentro da pesquisa dos fatores etiológicos da periodontite apical, envolvendo a natureza da dentina e o sistema de canais radiculares. As pesquisas de Materiais Dentários incluem os testes de infiltração marginal, distribuição de guta-percha e de cimento obturador, relacionados com as técnicas de obturação e sua interface, cimento obturador/dentina.

Para melhor compreensão dos fenômenos que envolvem os procedimentos endodônticos, é preciso considerar a variável biológica como, por exemplo, os microorganismos. Estas são citadas como o principal agente etiológico da periodontite apical (KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1965). Os métodos de infiltração bacteriana (BROSCO, *et al.*, 2008) e o do bloco de dentina (HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987) são exemplos de modelos experimentais que envolvem o teste de um material dentário (hidróxido de cálcio ou material obturador). Como a dentina pode ser infectada nesses modelos experimentais, a variável microbiológica também está presente. Estes tipos de modelos experimentais brindam a possibilidade de estudar com maior precisão o desempenho de materiais e técnicas endodônticas pela inclusão do agente etiológico da periodontite apical.

Outra variável que pode afetar o resultado do tratamento de dentes com periodontite apical é o fator imunológico responsável pelos fenômenos de reparo dos tecidos. O modelo experimental que utiliza o tecido subcutâneo de pequenos animais tem a capacidade de demonstrar a interação entre os materiais dentários e o sistema imunológico do animal (HOLLAND, *et al.*, 2002), mas carece dos elementos anatômicos e microbiológicos encontrados em outros modelos experimentais.

A interação das variáveis material dentário (instrumentos, soluções irrigadoras e cimentos), técnica, anatomia dental (sistema de canais radiculares), fator etiológico (bacteriano) e imunológico são as que definem o sucesso ou insucesso do tratamento endodôntico. O efeito biológico das técnicas e procedimentos endodônticos ocorre principalmente pela resposta dos tecidos apicais e periapicais (NAIR, 2004). O reparo dos tecidos apicais e periapicais frente aos procedimentos de indução e tratamento experimental somente pode ser avaliado utilizando o modelo animal, devido a que envolve todas as variáveis do tratamento endodôntico mencionadas. O método de avaliação dessa resposta pode ser registrado clinicamente mediante a presença de sinais tais como presença de fístula, além da avaliação do aspecto radiográfico, tomográfico ou microscópico (TANOMARU-FILHO, *et al.*, 2009).

O cão, como modelo animal de experimentação, tem sido empregado em muitos estudos para avaliação do tratamento endodôntico de dentes com lesão periapical induzida, como os realizados por LEONARDO, *et al.*, (1994); LEONARDO, *et al.*, (2006); LEONARDO, *et al.*, (2008); GARCIA DE PAULA-SILVA, *et al.*, (2009a), sendo eles animais com resistência a prolongados períodos de anestesia, além de possuir uma taxa de crescimento rápido, o suficiente para permitir a obtenção de resultados em curtos períodos de tempo.

Os segundos, terceiros e quartos pré-molares inferiores; segundos e terceiros pré-molares superiores e incisivos superiores são os dentes geralmente selecionados por apresentarem semelhança anatômica, igual número de raízes e canais radiculares amplos e retos, permitindo uma padronização dos procedimentos técnicos durante o tratamento endodôntico (HOLLAND, *et al.*, 2005). No entanto, os canais radiculares dos dentes de cães apresentam um delta apical com várias ramificações, diferindo do ápice radicular do dente humano, o qual possui normalmente um forame principal e algumas foraminas (DUGGAN, *et al.*, 2009).

Modelo Experimental de indução de lesão

A metodologia utilizada para indução experimental das lesões periapicais em dentes de cães tem apresentado diferente variabilidade nos diversos estudos. Podem ser citados os métodos de abertura do dente com exposição ao meio oral com ou sem selamento coronário (TANOMARU-FILHO, *et al.*, 2005), a contaminação por inoculação de microorganismos (ALLARD; STROMBERG; STROMBERG, 1987), (SILVEIRA, *et al.*, 2007) ou a placa bacteriana (KATEBZADEH; HUPP; TROPE, 1999). A presença de arrombamento do forame também tem sido descrito dentro das metodologias de indução (TANOMARU-FILHO, *et al.*, 2005).

No presente estudo foi escolhido o método utilizado por ALLARD; STROMBERG; STROMBERG, (1987) e SILVEIRA, *et al.*, (2007) com o objetivo de padronizar o volume e a espécie bacteriana contaminante. Em similaridade aos resultados encontrados por esses autores, houve contaminação por bactérias do meio oral em 12 dos 22 casos inicialmente inoculados com a bactéria *Enterococcus faecalis*. O fato pode ser devido a falhas no selamento coronário proporcionado pelo material restaurador provisório utilizado. O presente estudo não utilizou o arrombamento da zona apical por ser uma variável que poderia aumentar a presença de inflamação periapical (HOLLAND, *et al.*, 2005). TANOMARU-FILHO, *et al.*, (2005) destacam que o selamento da abertura coronária, após a contaminação dos canais radiculares reduz o tempo necessário para o desenvolvimento das lesões periapicais, confirmadas pelo exame radiográfico, sendo o período necessário de, aproximadamente, 45 a 60 dias após selamento coronário, conforme descrito por LEONARDO, *et al.*, (1994). Quanto à lesão periapical induzida, os resultados desta pesquisa foram semelhantes aos já relatados na literatura que utilizaram *Enterococcus faecalis* ou placa bacteriana (FRIEDMAN, *et al.*, 1997; KATEBZADEH; HUPP; TROPE, 1999) para induzir periodontite apical crônica, uma vez que a técnica experimental avaliada conduziu ao desenvolvimento de lesão periapical no período de 60 dias. As lesões tiveram como principal característica a perda radiográfica da lâmina dura e, em muitos casos, apresentaram margens pouco definidas, embora o presente estudo não tenha utilizado a tomografia computadorizada *cone beam* nos períodos iniciais. Foi observado após o período experimental de 6 meses que dentes, aparentemente sem lesão periapical ou com lesões pouco definidas, na realidade, possuíam lesões bem definidas quando foram avaliadas mediante o método tomográfico de

diagnóstico por imagem.

Em um estudo em macacos, DAHLEN, *et al.*, (1982) inocularam experimentalmente a bactéria *Enterococcus faecalis* em canais radiculares de macacos imunizados e não imunizados contra a bactéria. Um fato interessante nos macacos não imunizados foi a presença de reabsorção apical leve em 12 dos 15 dentes analisados microscopicamente e a presença de inflamação leve em 8 casos e inflamação pronunciada em 7 casos. Os autores concluíram que a habilidade das bactérias para sobreviver dentro do sistema de canais radiculares pode não ser congruente com sua capacidade para afetar os tecidos periapicais e que as infecções mistas tem maior potencial para causar inflamação que as monoinfecções.

A presença de lesões periapicais após a contaminação pulpar foi um fato esperado devido que, diferentemente dos tecidos gengivais, nos quais existe certo equilíbrio entre a microbiota oral e a defesa do hospedeiro, o tecido pulpar é basicamente estéril em condições naturais. Na ausência de polpa dentária pela necrose induzida são eliminadas também as células responsáveis pelo mecanismo de defesa do canal radicular. Sob essas circunstâncias, é natural que as bactérias inoculadas encontrem um ambiente propício para seu desenvolvimento, não existindo possibilidade de o sistema imunológico eliminar os microorganismos do interior do sistema de canais radiculares ou de formar dentina terciária, como se encontra nos casos de dentes cariados com envolvimento pulpar.

A análise na microscopia confocal dos dentes extraídos demonstrou a presença de restos necróticos aderidos às paredes do canal radicular colonizados por bactérias e infecção dos túbulos dentinários, respectivamente, quando o canal radicular esteve infectado pela flora mista ou pelo *Enterococcus faecalis*. Embora se desconheça a existência de um estudo histológico que determine, em porcentagem, a superfície do canal radicular coberta por tecido necrótico ou biofilmes, a técnica utilizada no presente estudo mostrou que grandes colônias bacterianas e tecido necrótico preenchem o lúmen dos canais radiculares dos dentes sem tratamento.

As limitações do presente método de indução estão relacionadas a alguns fatores. Um deles é o uso de monoinfecção por *Enterococcus faecalis*, o que pode não corresponder à microbiota encontrada nos canais necróticos, nos quais diversos gêneros bacterianos são encontrados. Outro fato importante é que *Enterococcus faecalis* são geralmente encontrados

em dentes obturados, nos quais as medidas de desinfecção são mais difíceis e ineficientes pela dificuldade das técnicas endodônticas em eliminar completamente o material obturador para conseguir uma apropriada limpeza e modelagem (BRAMANTE; BETTI, 2000).

Dos resultados do tratamento – limitações da radiografia periapical

Nos últimos 2 anos tem sido questionada a validade da radiografia periapical para a determinação da presença de periodontite apical crônica (DE ROSSI, *et al.*, 2007; ESTRELA, *et al.*, 2008b; JORGE, *et al.*, 2008). Esse fato foi confirmado pelos resultados do presente estudo, no qual se encontraram áreas maiores de reabsorção óssea utilizando a TCCB em comparação à radiografia periapical. Embora essa limitação das radiografias periapicais pareça ter tomado força nos últimos anos, ela já havia sido observada na década de 60 por BENDER; SELTZER, (2003) quando concluíram que lesões no osso medular com ausência de perfuração da cortical não podem ser evidenciadas; desse modo, grande destruição óssea pode estar presente ainda sem evidência de imagem compatível com lesão na radiografia periapical. O uso cada vez mais frequente dos tomógrafos computadorizados *cone beam* tem feito com que essas afirmações possam ser comprovadas mais continuamente na Odontologia.

As limitações da radiografia periapical para detectar periodontite apical crônica tem envolvido também a interpretação dos estudos sobre sucesso ou insucesso do tratamento endodôntico, WU; SHEMESH; WESSELINK, (2009) apontaram as limitações da radiografia periapical como ferramenta para determinar os índices de sucesso, a saber :

1. alta porcentagem de casos confirmados como sucesso podem apresentar periodontite apical em exames tomográficos;
 2. em dentes nos quais pode-se observar uma redução do tamanho da imagem radiolúcida existente em radiografias periapicais, pode-se demonstrar um aumento da lesão quando se analisa por TCCB.
-

Essas limitações nos levaram a incluir o estudo tomográfico como método de avaliação, principalmente por estar menos sujeito a subjetividade, que é a principal característica dos estudos que utilizam radiografias periapicais. ESTRELA, *et al.*, (2008b) demonstraram que a sensibilidade da tomografia incrementou os valores de prevalência de periodontite apical crônica em uma amostra de 1508 dentes; de 35,3% quando foi utilizada a radiografia periapical para 63,3% quando foi utilizada a TCCB. Os resultados do presente estudo concordam com os achados de ESTRELA, *et al.*, (2008b); JORGE, *et al.*, (2008); DE PAULA-SILVA, *et al.*, (2009) a respeito da superioridade da tomografia para detectar a presença de periodontite apical. O valor das áreas das imagens de lesões dos dentes sem tratamento encontradas nas radiografias periapicais após 8 meses no presente estudo foi de $5,50\text{mm}^2$, sendo similar aos valores encontrados por outros estudos, que foram de $4,35\text{mm}^2$ (TANOMARU-FILHO, *et al.*, 2009) e de 4mm^2 após 60 dias da contaminação da polpa dentária (DE ROSSI, *et al.*, 2007). Já GARCIA DE PAULA-SILVA, *et al.*, (2009b) encontraram áreas radiográficas de 7mm^2 após período de 6 meses sem tratamento. Estes dados demonstram que o método empregado pode ser reproduzido por outros pesquisadores. Já nos dentes tratados endodonticamente em sessão única, os resultados desta pesquisa mostraram uma média de $4,32\text{mm}^2$ quando foi utilizada a TCCB e $1,65\text{mm}^2$ quando foi utilizada a radiografia periapical, os quais são inferiores as medidas de TCCB de 7mm^2 , quando o tratamento foi realizado em sessão única e de 5mm^2 quando foi utilizado o curativo de hidróxido de cálcio (GARCIA DE PAULA-SILVA, *et al.*, 2009b). A explicação para a diferença nos resultados pode ser o diferente método de indução utilizado neste último estudo, no qual os dentes são deixados abertos ao meio oral por 7 dias e, posteriormente, a cavidade é selada. Outro fator pode estar relacionado à microbiota predominante. No trabalho de GARCIA DE PAULA-SILVA, *et al.*, 2009b pode ter ocorrido predominância de microorganismos Gram-, que possuem em sua estrutura a endotoxina, que possui um grande potencial no estímulo da reabsorção óssea.

Um outro fato importante em relação às áreas dos dentes sem tratamento encontradas na TCCB ($8,90\text{mm}^2$) que foram maiores que as áreas encontradas na radiografia periapical ($5,50\text{mm}^2$), é a possibilidade de explorar com o programa do tomógrafo (i-CAT Vision) a zona periapical dos dentes avaliados em sentido vestibulo-lingual a cada $0,2\text{mm}$. A partir dessas imagens, foi obtida a imagem que apresentava a área com maior destruição, fato impossível de ser realizado na radiografia periapical, na qual a imagem final representa a somatória de muitas estruturas ósseas sobrepostas.

Dentre as ferramentas de avaliação fornecidas pelo programa, há a escala HU (Hounsfield) para medir a radiodensidade óssea das lesões periapicais e áreas sem envolvimento patológico. Embora a ferramenta HU tenha sido desenvolvida com base no tipo de escaneamento realizado pela tomografia linear, tem sido demonstrado que existe uma alta correlação entre as medidas HU proporcionadas pela TCCB e a tomografia linear (ARANYARACHKUL, *et al.*, 2005). Foi utilizado arbitrariamente o valor de análise de 0,5 mm², pela facilidade de medição, principalmente das lesões de menor diâmetro. O uso de uma área de análise maior como, por exemplo de 1mm², pode incluir áreas de osso normal quando se analisam pequenas lesões e isso levaria a uma alteração da média do valor em HU, não demonstrando a real radiodensidade da lesão. O uso da ferramenta HU, embora pouco utilizada nas pesquisas endodônticas, é muito comum na área de Implantodontia, para a qual se pode prever a qualidade do osso prévia à realização do procedimento cirúrgico (TURKYILMAZ, *et al.*, 2006; TURKYILMAZ; TOZUM; TUMER, 2007; TURKYILMAZ, *et al.*, 2007).

Os resultados da radiodensidade óssea mostraram dados interessantes, principalmente, de que houve, em um mesmo dente, uma diferença significativa entre as áreas sem envolvimento periodontal (geralmente do terço médio radicular) em comparação com a zona periapical onde se delimitava o processo inflamatório. Esse dado permitiu estabelecer um controle adequado da radiodensidade, na qual se utilizaram as áreas sem envolvimento de um mesmo dente como controle. Sob esta lógica, esperávamos que dentes com tratamento endodôntico estivessem em processo de reparo e conseqüentemente, apresentassem aumento da mineralização da zona periapical e aumento da radiodensidade óssea, similar à encontrada nas zonas do terço médio radicular onde não existia envolvimento periodontal, o qual indicaria que o reparo ainda não estivesse completo. No entanto, os resultados tomográficos demonstraram que o tamanho das lesões era menor nos dentes tratados endodonticamente. A análise da radiodensidade óssea não mostrou diferença entre a radiodensidade dos dentes tratados endodonticamente e dos dentes sem tratamento. Este dado pode levar a concluir que o reparo dos dentes tratados endodonticamente foi insuficiente para permitir a regeneração da lâmina dura em nível do ápice e que a natureza dos tecidos das áreas periapicais em ambos os grupos pode ser similar entre os dentes com tratamento endodôntico e os não tratados, com presença de periodontite apical crônica.

Outro fato importante foi a presença de áreas periapicais menores nos dentes com tratamento em sessão única em comparação aos dentes sem tratamento. Embora um resultado

por escores tenha sido utilizado no início do presente estudo, os resultados finais mostraram que as lesões periapicais dos dentes sem tratamento tendem a aumentar de tamanho com o tempo. Os dentes sem tratamento endodôntico completaram 8 meses no total. Os dentes tratados em sessão única, em sua maioria, iniciaram o experimento com valores de índice periapical de 3 e 4. Os resultados tomográficos, ao final dos 6 meses de preservação indicam que o tratamento endodôntico restringe a área das lesões a $4,32\text{mm}^2$ em comparação aos $8,90\text{mm}^2$ encontrados nos dentes sem tratamento. Uma possível explicação a esses resultados é a grande quantidade de eliminação de bactérias e de produtos necróticos da maior parte do canal radicular, a qual leva à diminuição da intensidade de agressão aos tecidos periapicais. No entanto, foi observado na análise de microscopia confocal que dentes obturados possuíam bactérias nos túbulos dentinários. Esse detalhe pode ser importante, principalmente na zona apical do canal radicular, onde comumente existem áreas de reabsorção cementária. Essa exposição de dentina na zona apical pode deixar as bactérias e seus produtos em contato com os tecidos periodontais, mantendo constante a agressão ou interferindo no processo de reparo. O fato de os dentes tratados endodonticamente possuírem lesões de menor diâmetro pode indicar que a agressão da microbiota residual é menos intensa do que a microbiota primária, na qual o volume bacteriano e as toxinas encontram-se em maior quantidade. De fato, a análise microbiológica demonstrou uma cultura negativa após instrumentação com hipoclorito de sódio a 2,5%, exceto em 2 casos. No entanto, esses dados devem ser tomados com cautela devido a que, embora tenha se utilizado o inativador tiosulfato de sódio para evitar o efeito residual do hipoclorito de sódio, antes da tomada das amostras, é possível que o agente desinfetante estivesse ainda em concentrações que impedissem a recuperação da microbiota residual no laboratório.

Uma outra possibilidade para explicar o alto índice de resultados microbiológicos negativos após a instrumentação dos canais infectados é que as bactérias, ao serem desorganizadas no interior do canal radicular, passem a um estado viável porém não cultivável. Este fato pouco descrito na literatura pode ser observado principalmente nos resultados microbiológicos de estudos de retratamento de dentes com antecedentes de tratamento químico-mecânico. MOLANDER, *et al.*, (1998), analisando 100 casos de retratamento encontraram crescimento bacteriano em 68 casos e resultado negativo em 32 casos, embora todos os casos possuísem sinais clínicos e radiográficos de lesão periapical. CHAVEZ DE PAZ, *et al.*, (2003), analisando 200 casos com antecedentes sintomáticos de periodontite apical crônica, somente recuperaram bactérias em 107 casos, obtendo cultivos

negativos em 93 casos, quando estes possuíam indícios clínicos de contaminação bacteriana. Esses dados, ao serem analisados criticamente, demonstram a dificuldade da técnica microbiológica para reproduzir, por métodos de laboratório, o crescimento bacteriano de amostras provenientes do canal radicular levando, em alguns casos, a resultados falsos negativos. Esses dados podem ser contrastados com o estudo de RICUCCI, *et al.*, (2009) onde analisaram, microscopicamente, 24 casos de insucesso que tinham sido previamente tratados por especialistas em Endodontia, encontrando como resultado infecção intraradicular persistente em 23 casos.

Um fato importante relacionado ao baixo índice de sucesso encontrado no presente estudo é o tempo de preservação empregado. A literatura apresenta 2 trabalhos realizados em dentes de cães com lesões periapicais, nos quais foram empregados períodos de até 9 meses (LEONARDO *et al.* 1994, CINTRA, 2009). Períodos de observação mais longos são importantes na análise do sucesso do tratamento endodôntico junto ao periápice dentário. No presente estudo, o pós-operatório de 6 meses adotado para a observação radiográfica e tomográfica mostrou um baixo índice de sucesso, os quais são similares aos resultados de (GARCIA DE PAULA-SILVA, *et al.*, 2009a).

Outra explicação do baixo índice de sucesso pode ser a falta de uso de medicação intracanal. CINTRA (2009), em um estudo em cães, encontrou que a medicação intracanal de hidróxido de cálcio aumentou os percentuais de sucesso histológico e radiográfico em canais tratados com hipoclorito de sódio 2,5%, clorexidina em gel 2% ou clorexidina líquida 2%. De fato, o objetivo do tratamento endodôntico não é apenas eliminar as bactérias, mas também as suas toxinas. MARTINHO; GOMES, 2008 demonstraram a inabilidade do hipoclorito de sódio a 2,5% para eliminar as endotoxinas de canais radiculares necróticos. Estudos de NELSON-FILHO, *et al.*, (2002); SILVA, *et al.*, (2002); TANOMARU, *et al.*, (2003) têm demonstrado, em cães, a capacidade do hidróxido de cálcio para inativar os efeitos da endotoxina bacteriana. Um dado interessante foi a observação, mediante microscopia confocal, de que o conteúdo dos túbulos dentinários dos dentes necróticos não esteve limitado somente à presença de bactérias. Foi observado que o conteúdo dos túbulos dentinários está preenchido por material orgânico, o qual poderia conter matriz extracelular, toxinas ou conteúdo antigênico.

A presença do biofilme apical ou de infecção extraradicular pode, também, ser outro fator que tenha contribuído ao insucesso do tratamento. No entanto, a presença de

infecção extrarradicular como causa de fracasso em si pode ter fundamentos ainda iniciais. Muitos dos estudos que determinaram a presença do biofilme apical foram feitos sobre dentes humanos sem tratamento endodôntico (LEONARDO, *et al.*, 2002; LEONARDO, *et al.*, 2007; ROCHA, *et al.*, 2008). No entanto, uma visão diferente do insucesso endodôntico pode ser encontrada nos resultados histológicos de dentes tratados com alto padrão de atendimento que apresentaram insucesso, cujo diagnóstico histopatológico foi de presença de periodontite apical persistente por infecção intraradicular (NAIR, *et al.*, 1990; LIN, *et al.*, 1991; RICUCCI, *et al.*, 2009).

A respeito da microscopia confocal

A necessidade de validar a presença de necrose pulpar e infecção no sistema de canais radicular nos levou a experimentar outras possibilidades microscópicas. O uso da microscopia confocal de varredura a laser tem sido adotado paulatinamente na pesquisa endodôntica nos últimos anos. Embora a captura de imagens do tipo confocal utilizando aumentos de até 100X seja relativamente simples, o uso de maiores aumentos gera dificuldades técnicas na aquisição das imagens, principalmente a dificuldade para obter foco adequado. Este problema foi solucionado utilizando uma lamínula e óleo de imersão entre a lente e o corpo de prova, apoiados em uma base de alumínio adaptado para os propósitos. Esta adaptação permitiu a aquisição de imagens de elevada resolução óptica, a qual é indispensável para a pesquisa envolvendo bactérias, considerando que a quantidade de fluoróforos absorvidas por estas é muito pequena, devido a seu pequeno tamanho (1 μ m). Outro dado interessante foi a marcação de ácidos nucléicos nos canais radiculares necróticos. Foi observada uma grande distribuição de DNA/RNA bacteriano dentro dos canais radiculares e túbulos dentinários, inclusive em dentes tratados endodonticamente. Estes fatos nos levaram a refletir sobre a interpretação dos resultados que utilizam a técnica de PCR, na qual pequenas quantidade de células podem ser detectadas. O presente estudo demonstrou que em um pequeno campo operatório, como de 400 μ m², pode-se encontrar abundante material nucléico.

Apesar dos benefícios mostrados pela microscopia confocal de varredura a laser, certos inconvenientes podem ser citados, como a dificuldade para analisar fatias menores, como as utilizadas no método histológico. Esta limitação restringe o uso do número de cortes

a serem avaliados em zonas de vital importância como, por exemplo, o terço apical da raiz. Outra limitação é a característica irreversível do processo de aquisição das imagens. Diferentemente do método histológico, no método de microscopia confocal, a energia é gerada pela interação do laser com os fluoróforos da amostra e este processo é irreversível, resultando em perda paulatina da fluorescência e conseqüentemente, a perda da amostra. Para evitar estes problemas, este trabalho sugere que a análise de amostras seja paralelamente feita por microscopia óptica utilizando, por exemplo, uma metade do corpo de prova para microscopia óptica e a outra metade para microscopia confocal, pela qual as amostras podem ser avaliadas melhor quantitativamente.

Outro detalhe importante relacionado ao uso da laranja de acridina para a identificação bacteriana é a afinidade do corante pela dentina peritubular, restos necróticos ou DNA extracelular. É importante salientar que 85% da composição de um biofilme é matriz extracelular e DNA extracelular (BRANDA, *et al.*, 2005; STEINBERGER; HOLDEN, 2005; SIQUEIRA; ROÇAS, 2009). Esta matriz, ao ser corada, dificulta a visualização dos corpos bacterianos, principalmente no interior do canal radicular, onde grande conteúdo orgânico está presente. Já a diferenciação bacteriana se facilita nos túbulos dentinários onde os corpos bacterianos são facilmente identificados. Uma solução a este fato pode ser o uso da técnica FISH (*fluorescence in situ hybridization*) utilizando a sonda bacteriana EUB 338 (SCHAUDINN, *et al.*, 2009). Estas limitações da laranja de acridina como corante nos levam a afirmar que a identificação bacteriana em dentina por meio de microscopia confocal deve ser confirmada utilizando aumentos maiores a 630X, onde os corpos celulares podem ser facilmente diferenciados de outras estruturas ou de precipitações do corante na dentina. Com uma adequada resolução óptica, a microscopia confocal pode ser utilizada para melhor compreensão do metabolismo microbiano e da distribuição do material nucléico dentro do canal radicular. Os resultados do nosso trabalho mostraram que, com uma óptica adequada, a futura identificação de espécies bacterianas no interior dos canais radiculares mediante métodos moleculares por microscopia confocal bem como a determinação da sua viabilidade é promissora.

Assim, pode-se concluir que a bactéria *Enterococcus faecalis* é capaz de induzir periodontite apical crônica em cães e que os novos métodos diagnósticos utilizados no presente estudo podem levar, num futuro imediato, a mudanças nos procedimentos clínicos. Novos procedimentos microscópicos aplicados à pesquisa endodôntica levarão a uma melhor compreensão do metabolismo das bactérias no interior dos canais radiculares e a uma visão

melhorada da distribuição e viabilidade dos biofilmes bacterianos. Tais observações contribuem para o esclarecimento do papel da terapia endodôntica na eliminação das bactérias e de seus produtos do interior dos canais radiculares.

7 **C***ONCLUSÕES*

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos e respeitando-se as limitações da metodologia empregada, pôde-se verificar que:

1 – A bactéria *Enterococcus faecalis* induz periodontite apical crônica quando inoculada em canais radiculares de cães similarmente a dentes que sofreram contaminação pela microbiota oral.

2 - Os procedimentos de preparo químico-mecânico convencional diminuem significativamente o número de bactérias cultiváveis, embora sem relação com a presença de reparo periapical.

3 – A tomografia computadorizada *cone beam* foi o método de diagnóstico por imagem mais eficaz para evidenciar lesões periapicais em dentes com e sem tratamento endodôntico em comparação à radiografia periapical. Os dentes infectados pela bactéria *Enterococcus faecalis* apresentam a mesma probabilidade de insucesso radiográfico e tomográfico que os dentes infectados pela flora mista.

4 – A microscopia confocal e o método proposto neste estudo se mostraram eficazes para determinar, qualitativamente, a viabilidade bacteriana e a distribuição de ácidos nucléicos bacterianos dentro dos túbulos dentinários.

5 - Houve diferença entre a dentina infectada *in vitro* com o padrão de infecção *in vivo*, caracterizado pela presença de biofilmes aderidos à parede do canal radicular.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Allard U, Stromberg U, Stromberg T. Endodontic treatment of experimentally induced apical periodontitis in dogs. *Endod Dent Traumatol*. 1987;3(5):240-4.
- Aranyarachkul P, Caruso J, Gantes B, Schulz E, Riggs M, Dus I, et al. Bone density assessments of dental implant sites: 2. Quantitative cone-beam computerized tomography. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20(3):416-24.
- Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo M, Sculean A, Arweiler NB. Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. *J Clin Periodontol*. 2005;32(2):147-52.
- Barthel CR, Zimmer S, Trope M. Relationship of radiologic and histologic signs of inflammation in human root-filled teeth. *J Endod*. 2004;30(2):75-9.
- Bender IB, Seltzer S. Roentgenographic and direct observation of experimental lesions in bone: II. 1961. *J Endod*. 2003;29(11):707-12; discussion 1.
- Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. *Int Endod J*. 2008;41(3):227-39.
- Bramante AS, Bramante CM, Bernardineli N, Garcia RB, Moraes IG. *Revista Portuguesa de Estomatologia e cirurgia maxilofacial*. 2007;48:15-21.
- Bramante CM, Betti LV. Efficacy of Quantec rotary instruments for gutta-percha removal. *Int Endod J*. 2000;33(5):463-7.
- Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*. 2005;13(1):20-6.
- Brosco VH, Bernardineli N, Torres SA, Consolaro A, Bramante CM, de Moraes IG, et al. Bacterial leakage in root canals obturated by different techniques. Part 1: microbiologic evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;105(1):e48-53.
- Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J*. 1985;18(1):35-40.
-

Carlsson J, Sundqvist G. Evaluation of methods of transport and cultivation of bacterial specimens from infected dental root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1980;49(5):451-4.

Chavez De Paz LE, Dahlen G, Molander A, Moller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J.* 2003;36(7):500-8.

Chugal NM, Clive JM, Spangberg LS. Endodontic infection: some biologic and treatment factors associated with outcome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96(1):81-90.

Cintra L. Análise histológica e radiográfica da influência de substâncias químicas auxiliares e medicação intracanal no processo de reparo periapical em dentes de cães. 2008. 228p. – (Doutorado em Odontologia)- Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas., Piracicaba, 2008.

Dahlen G, Fabricius L, Heyden G, Holm SE, Moller AJ. Apical periodontitis induced by selected bacterial strains in root canals of immunized and nonimmunized monkeys. *Scand J Dent Res.* 1982;90(3):207-16.

de Paula-Silva FW, Wu MK, Leonardo MR, da Silva LA, Wesselink PR. Accuracy of periapical radiography and cone-beam computed tomography scans in diagnosing apical periodontitis using histopathological findings as a gold standard. *J Endod.* 2009;35(7):1009-12.

De Rossi A, De Rossi M, Rocha LB, da Silva LA, Rossi MA. Morphometric analysis of experimentally induced periapical lesions: radiographic vs histopathological findings. *Dentomaxillofac Radiol.* 2007;36(4):211-7.

Duggan D, Arnold RR, Teixeira FB, Caplan DJ, Tawil P. Periapical inflammation and bacterial penetration after coronal inoculation of dog roots filled with RealSeal 1 or Thermafil. *J Endod.* 2009;35(6):852-7.

Estrela C, Bueno MR, Azevedo BC, Azevedo JR, Pecora JD. A new periapical index based on cone beam computed tomography. *J Endod.* 2008a;34(11):1325-31.

Estrela C, Bueno MR, Leles CR, Azevedo B, Azevedo JR. Accuracy of cone beam computed tomography and panoramic and periapical radiography for detection of apical periodontitis. *J Endod.* 2008b;34(3):273-9.

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.

Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Moller AJ. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scand J Dent Res.* 1982b;90(2):134-44.

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.

Ferreira FB, Campos Rabang HR, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Root canal microbiota of dogs' teeth with periapical lesions induced by two different methods. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(4):564-70.

Ferreira FB, Torres SA, Rosa OP, Ferreira CM, Garcia RB, Marcucci MC, et al. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104(5):709-16.

Figdor D, Sundqvist G. A big role for the very small--understanding the endodontic microbial flora. *Aust Dent J.* 2007;52(1 Suppl):S38-51.

Friedman S, Torneck CD, Komorowski R, Ouzounian Z, Syrtash P, Kaufman A. In vivo model for assessing the functional efficacy of endodontic filling materials and techniques. *J Endod.* 1997;23(9):557-61.

Garcez AS, Nunez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod.* 2008;34(2):138-42.

Garcia de Paula-Silva FW, Hassan B, Bezerra da Silva LA, Leonardo MR, Wu MK. Outcome of root canal treatment in dogs determined by periapical radiography and cone-beam computed tomography scans. *J Endod.* 2009a;35(5):723-6.

Garcia de Paula-Silva FW, Junior MS, Leonardo MR, Consolaro A, da Silva LA. Cone-beam computerized tomographic, radiographic, and histologic evaluation of periapical repair in dogs' post-endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009b.

George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2005;31(12):867-72.

Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod.* 2008;34(5):537-40.

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

Gonçalves SB, Dong Z, Bramante CM, Holland GR, Smith AJ, Nor JE. Tooth slice-based models for the study of human dental pulp angiogenesis. J Endod 2007;33(7):811-4.

Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. J Dent Res. 1987;66(8):1375-9.

Hancock HH, 3rd, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001;91(5):579-86.

Hannig C, Hannig M, Rehmer O, Braun G, Hellwig E, Al-Ahmad A. Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. Arch Oral Biol. 2007;52(11):1048-56.

Holland R, de Souza V, Nery MJ, Bernabe FE, Filho JA, Junior ED, et al. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. J Endod. 2002;28(3):173-6.

Holland R, Sant'Anna Junior A, Souza V, Dezan Junior E, Otoboni Filho JA, Bernabe PF, et al. Influence of apical patency and filling material on healing process of dogs' teeth with vital pulp after root canal therapy. Braz Dent J. 2005;16(1):9-16.

Huumonen S, Lenander-Lumikari M, Sigurdsson A, Orstavik D. Healing of apical periodontitis after endodontic treatment: a comparison between a silicone-based and a zinc oxide-eugenol-based sealer. Int Endod J. 2003;36(4):296-301.

Jha D, Guerrero A, Ngo T, Helfer A, Hasselgren G. Inability of laser and rotary instrumentation to eliminate root canal infection. J Am Dent Assoc. 2006;137(1):67-70.

Jorge EG, Tanomaru-Filho M, Goncalves M, Tanomaru JM. Detection of periapical lesion development by conventional radiography or computed tomography. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008;106(1):e56-61.

Kagayama M, Sasano Y, Sato H, Kamakura S, Motegi K, Mizoguchi I. Confocal microscopy of dentinal tubules in human tooth stained with alizarin red. Anat Embryol (Berl). 1999;199(3):233-8.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulps in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;20:340-9.

Katebzadeh N, Hupp J, Trope M. Histological periapical repair after obturation of infected root canals in dogs. *J Endod.* 1999;25(5):364-8.

Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(5):308-20.

Kepner RL, Jr., Pratt JR. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol Rev.* 1994;58(4):603-15.

Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakom S. Autoaggregation and coaggregation of bacteria associated with acute endodontic infections. *J Endod.* 2006;32(4):312-8.

Kishen A, George S, Kumar R. *Enterococcus faecalis*-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2006;77(2):406-15.

Kvist T, Molander A, Dahlen G, Reit C. Microbiological evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized, clinical trial. *J Endod.* 2004;30(8):572-6.

Lan WH, Kwan HW, Sunada I. Slicing technique for tooth specimens in histological preparation. *Bull Tokyo Med Dent Univ* 1986;33(4):129-36.

Leonardo MR, Almeida WA, Ito IY, da Silva LA. Radiographic and microbiologic evaluation of posttreatment apical and periapical repair of root canals of dogs' teeth with experimentally induced chronic lesion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;78(2):232-8.

Leonardo MR, Flores DS, de Paula ESW, de Toledo Leonardo R, da Silva LA. A comparison study of periapical repair in dogs' teeth using RoekoSeal and AH plus root canal sealers: a histopathological evaluation. *J Endod.* 2008;34(7):822-5.

Leonardo MR, Hernandez ME, Silva LA, Tanomaru-Filho M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(5):680-5.

Leonardo MR, Rossi MA, Bonifacio KC, da Silva LA, Assed S. Scanning electron microscopy of the apical structure of human teeth. *Ultrastruct Pathol.* 2007;31(4):321-5.

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.

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.

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

Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001;34(5):399-405.

Low KM, Dula K, Burgin W, von Arx T. Comparison of periapical radiography and limited cone-beam tomography in posterior maxillary teeth referred for apical surgery. *J Endod.* 2008;34(5):557-62.

Manzur A, Gonzalez AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. *J Endod.* 2007;33(2):114-8.

Martinho FC, Gomes BP. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod.* 2008;34(3):268-72.

Mason DJ, Lloyd D. Acridine orange as an indicator of bacterial susceptibility to gentamicin. *FEMS Microbiol Lett.* 1997;153(1):199-204.

McGurkin-Smith R, Trope M, Caplan D, Sigurdsson A. Reduction of intracanal bacteria using GT rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca(OH)₂. *J Endod.* 2005;31(5):359-63.

Molander A, Dahlen G. Evaluation of the antibacterial potential of tetracycline or erythromycin mixed with calcium hydroxide as intracanal dressing against *Enterococcus faecalis* in vivo. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96(6):744-50.

Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998;31(1):1-7.

Molander A, Warfvinge J, Reit C, Kvist T. Clinical and radiographic evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of asymptomatic necrotic teeth with apical periodontitis: a randomized clinical trial. *J Endod.* 2007;33(10):1145-8.

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.

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.

Moller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth: methodological studies. Thesis. *Odontol Tidskr* 1966; 74: 1-380.

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.

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

Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(6):348-81.

Nair PN. Strength of evidence in current endodontic microbial research. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;105(1):8-10.

Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LA, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod*. 2002;28(10):694-6.

Netuschil L, Reich E, Unteregger G, Sculean A, Brex M. A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. *Arch Oral Biol*. 1998;43(4):277-85.

Orstavik D, Qvist V, Stoltze K. A multivariate analysis of the outcome of endodontic treatment. *Eur J Oral Sci*. 2004;112(3):224-30.

Patel S. New dimensions in endodontic imaging: Part 2. Cone beam computed tomography. *Int Endod J*. 2009;42(6):463-75.

Penesis VA, Fitzgerald PI, Fayad MI, Wenckus CS, BeGole EA, Johnson BR. Outcome of one-visit and two-visit endodontic treatment of necrotic teeth with apical periodontitis: a randomized controlled trial with one-year evaluation. *J Endod*. 2008;34(3):251-7.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003a;36(1):1-11.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol.* 2003b;18(2):100-3.

Rapposch S, Zangerl P, Ginzinger W. Influence of fluorescence of bacteria stained with acridine orange on the enumeration of microorganisms in raw milk. *J Dairy Sci.* 2000;83(12):2753-8.

Ricucci D, Langeland K. Apical limit of root canal instrumentation and obturation, part 2. A histological study. *Int Endod J.* 1998;31(6):394-409.

Ricucci D, Siqueira JF, Jr., Bate AL, Pitt Ford TR. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. *J Endod.* 2009;35(4):493-502.

Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004;30(5):315-20.

Rocha CT, Rossi MA, Leonardo MR, Rocha LB, Nelson-Filho P, Silva LA. Biofilm on the apical region of roots in primary teeth with vital and necrotic pulps with or without radiographically evident apical pathosis. *Int Endod J.* 2008;41(8):664-9.

Rolland SL, McCabe JF, Robinson C, Walls AW. In vitro biofilm formation on the surface of resin-based dentine adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(3):243-9.

Sathorn C, Parashos P, Messer H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* 2007;40(1):2-10.

Sathorn C, Parashos P, Messer H. The prevalence of postoperative pain and flare-up in single- and multiple-visit endodontic treatment: a systematic review. *Int Endod J.* 2008;41(2):91-9.

Schaudinn C, Carr G, Gorur A, Jaramillo D, Costerton JW, Webster P. Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/cLSM - SEM). *J Microsc.* 2009;235(2):124-7.

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

Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J*. 2005;38(10):735-42.

Shuping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod*. 2000;26(12):751-5.

Silva L, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod*. 2002;28(2):94-8.

Silveira AM, Lopes HP, Siqueira JF, Jr., Macedo SB, Consolaro A. Periradicular repair after two-visit endodontic treatment using two different intracanal medications compared to single-visit endodontic treatment. *Braz Dent J*. 2007;18(4):299-304.

Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Debelian GJ, Carmo FL, Paiva SS, Alves FR, et al. Profiling of root canal bacterial communities associated with chronic apical periodontitis from Brazilian and Norwegian subjects. *J Endod*. 2008;34(12):1457-61.

Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. *Actinomyces* species, streptococci, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. *J Endod*. 2002;28(3):168-72.

Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*. 2008;34(11):1291-301 e3.

Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(6):870-8.

Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;97(1):85-94.

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.

Spangberg LS. Infatuated by *Enterococci*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102(5):577-8.

Steinberger RE, Holden PA. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(9):5404-10.

Stuart C, Schwartz S, Beeson T, Owatz C. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. *J Endod.* 2006;32(2):93-98.

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.

Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J.* 2003;36(11):733-9.

Tanomaru-Filho M, Jorge EG, Duarte MA, Goncalves M, Guerreiro-Tanomaru JM. Comparative radiographic and histological analyses of periapical lesion development. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(3):442-7.

Tanomaru-Filho M, Jorge EG, Tanomaru JM, Goncalves M. Evaluation of the radiopacity of calcium hydroxide- and glass-ionomer-based root canal sealers. *Int Endod J.* 2008;41(1):50-3.

Tanomaru-Filho M, Poliseli-Neto A, Leonardo MR, Silva LA, Tanomaru JM, Ito IY. Methods of experimental induction of periapical inflammation. Microbiological and radiographic evaluation. *Int Endod J.* 2005;38(7):477-82.

Trope M, Delano EO, Orstavik D. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single vs. multivisit treatment. *J Endod.* 1999;25(5):345-50.

Turkyilmaz I, Tozum TF, Tumer C, Ozbek EN. Assessment of correlation between computerized tomography values of the bone, and maximum torque and resonance frequency values at dental implant placement. *J Oral Rehabil.* 2006;33(12):881-8.

Turkyilmaz I, Tozum TF, Tumer C. Bone density assessments of oral implant sites using computerized tomography. *J Oral Rehabil.* 2007;34(4):267-72.

Turkyilmaz I, Tumer C, Ozbek EN, Tozum TF. Relations between the bone density values from computerized tomography, and implant stability parameters: a clinical study of 230 regular platform implants. *J Clin Periodontol.* 2007;34(8):716-22.

Vitkov L, Hannig M, Krautgartner WD, Herrmann M, Fuchs K, Klappacher M, et al. Ex vivo gingival-biofilm consortia. *Lett Appl Microbiol.* 2005;41(5):404-11.

Walton RE, Ardjmand K. Histological evaluation of the presence of bacteria in induced periapical lesions in monkeys. *J Endod.* 1992;18(5):216-27.

Weiger R, de Lucena J, Decker HE, Lost C. Vitality status of microorganisms in infected human root dentine. *Int Endod J.* 2002;35(2):166-71.

Wu MK, Shemesh H, Wesselink PR. Limitations of previously published systematic reviews evaluating the outcome of endodontic treatment. *Int Endod J.* 2009;42(8):656-66.

Zaura-Arite E, van Marle J, ten Cate JM. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res.* 2001;80(5):1436-40.

Zehnder M, Guggenheim B. The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. *Int Endod J.* 2009;42(4):277-87.

Zoletti GO, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. *J Endod.* 2006;32(8):722-6.

A***NEXOS***

Basic Research—Biology

Confocal Laser Scanning Microscopy Is Appropriate to Detect Viability of *Enterococcus faecalis* in Infected Dentin

Ronald Ordínola Zapata, DDS,* Clovis M. Bramante, DDS, PhD,*
 Ivaldo Gomes de Moraes, DDS, PhD,* Norberti Bernardtneit, DDS, PhD,*
 Thais Helena Gasparoto, DDS,[†] Marcia S. Z. Graeff, MS,[‡] Ana Paula Campanelli, PhD,[‡]
 and Roberto Brandão Garcia, DDS, PhD*

Abstract

The purpose of this study was to explore the potential of confocal laser scanning microscopy (CLSM) for in situ identification of live and dead *Enterococcus faecalis* in infected dentin. Eight cylindrical dentin specimens were infected with *Enterococcus faecalis* in BHI for 21 days. After the experimental period, the specimens were stained with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) or acridine orange (0.01%) and analyzed by CLSM. Two noninfected dentin specimens were used as negative controls. CLSM analysis shows that the discrimination between viable (green) and dead (red) bacteria in infected dentinal tubules could be observed after staining with FDA/PI. Acridine orange was able to show metabolic activity of the *E. faecalis* cells inside the dentinal tubules showed by its red fluorescence. The viability of bacteria in infected dentin can be determined in situ by CLSM. FDA/PI and acridine orange are useful for this technique. (*J Endod* 2008;34:1198–1201)

Key Words

Confocal laser scanning microscopy, dentin, *Enterococcus faecalis*, viability

From the *Department of Endodontics, †Department of Biological Sciences, and ‡Integrated Research Center Bauru Dental School of Bauru, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Supported by FAPESP (2007/01838-7).
 Address requests for reprints to Dr Ronald Ordínola Zapata, Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, Al. Octávio Rinhelro Brisola, 9-75 -CEP 17012-901, Bauru, São Paulo, Brazil. E-mail address: ronaldordinola@usp.br.
 0099-2399/08 - see front matter
 Copyright © 2008 American Association of Endodontists.
 doi:10.1016/j.joen.2008.07.001

Bacterial invasion of the dentin caused by caries or fracture results in inflammation, necrosis of the dental pulp, root canal infection, and apical periodontitis (1). Procedures such as histologic sections, scanning electron microscope observation, and microbiological analyses at different levels of the root canal can be routinely done. The bacteria's ability to penetrate into the dentin can be determined through microbiological analyses by the number of colony-forming units (CFUs) (2, 3), the number of tubules infected in the histologic sample (4), or the presence of bacteria in the root canal walls (5).

Each one of these methods has its advantages and disadvantages. Microbiological sampling techniques can estimate the number of colony-forming units of cultivable bacteria and the quantitative analysis of the dentin infection can be done. However, this method does not give clear information about the spatial distribution of bacteria inside the dentin. Histologic sections show the distribution of the bacteria in infected dentin but do not give information about the viability of the bacteria. Both techniques are often used to determine the antibacterial activity of dental materials and for clinical research.

Transmission electron microscope has been used for visualization of infected tubules in carious lesions and in root canal infection on clinical specimens (6, 7), providing high resolution images of the bacteria inside dentinal tubules. However, this technique spends time and requires multiple steps for specimen preparation.

In the last years efforts have been done to show viability of bacteria using fluorescent labels on infected dentin (8–13). However, the distribution of live and dead bacteria inside the dentinal tubules of unprocessed specimens in a high optical resolution which allows the differentiation of the bacterial cells is not described.

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) allows getting a series of optical sections as thin as 0.3 μm of intact undisturbed biological samples. A CLSM analysis is used commonly with vital staining techniques to determine the viability profile, architecture, and spatial distribution in microbial biofilms (14).

The aim of this study was to explore the potential of CLSM for in situ identification of live and dead bacteria inside infected dentinal tubules and to describe the distribution and vitality of the bacteria *Enterococcus faecalis* in infected dentin of bovine origin.

Materials and Methods

Specimen Preparation

Ten noncarious bovine teeth were selected and stored in 5% formalin buffer. A root segment with a length of about 7 to 8 mm was prepared by sectioning the root tip and after the crown was removed at 2 to 3 mm below the cemento-enamel junction (9). Each root canal was enlarged to a size of a Gates Glidden bur #5 (1.30 mm) under 1% sodium hypochlorite irrigation. The smear layer was removed using an ultrasonic bath of 17% EDTA for 4 minutes. One specimen was visualized by standard electron microscopy (Jeol JSM T220; Jeol, Tokyo, Japan) to confirm the ability of this technique in removing the smear layer. The teeth were washed with sterile water for 10 minutes and stored in sterile water for 1 week (15) to remove any residual chemical compound. The specimens were sterilized by autoclave for 20 minutes at 121°C. Then, sterility was checked by incubating of each specimen in 5 mL of brain heart infusion (BHI) broth at 37°C for 24 hours.

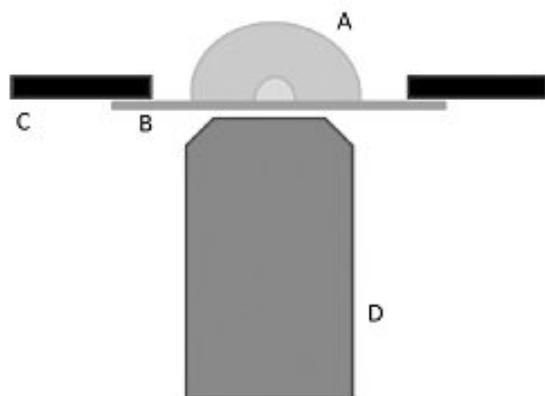


Figure 1. Schematic diagram of the experimental design. (A) Dentin segment on (B) glass coverslip glued to a (C) modified chamber device. (D) Objective lens.

Dentin Infection with *E. faecalis*

The strain *E. faecalis* (ATCC 29212) from the American Type Culture Collection was used in this study. To create the bacterial inoculum, isolated colonies (24 hours) of pure cultures of *E. faecalis* grown aerobically on BHI agar plates were suspended in 3.0 ml BHI. The cell suspension was spectrophotometrically adjusted to match the turbidity equivalent to 0.5 McFarland standard. For dentin infection, under laminar flow, eight blocks were transferred individually into 3 ml BHI inoculated with 200 μ l of the *E. faecalis* suspension for 21 days. BHI was continuously changed every 48 hours, and the purity of the broth was verified to avoid contamination. After the incubation period (21 days), the root canals of dentin blocks were washed with 1 ml phosphate-buffered saline (PBS) to remove nonadherent bacteria of the root canal walls. Superficial longitudinal grooves were made in the buccal and lingual surface to facilitate the fracture of the specimens. Preventing contamination from the outer surface, the radicular cement was exposed to a gas flame and ultraviolet light for 10 minutes.

The Determination of Bacterial Viability

After the root was fractured, one dentin segment was washed with 100 μ l PBS and then stained with 50 μ l fluorescein diacetate (FDA; Sigma, St. Louis, MO) and 50 μ l propidium iodide (PI, Sigma). FDA is a nonfluorescent cell permeable dye that is converted to fluorescein (green) by intracellular esterases produced by metabolically active microorganisms (14, 16–18). PI is a fluorescent molecule impermeable to the cellular membrane and generally excluded from viable cells; thus, live bacterial cells are fluorescent green, whereas dead bacteria with damaged membranes are fluorescent red (19).

The other dentin segment was washed with 100 μ l PBS and stained with 50 μ l 0.01% acridine orange; such dye has the ability to bind with bacterial RNA-emitting red fluorescence and to bind with bacterial DNA-emitting green fluorescence (20, 21). This information allows analysis of the bacterial metabolism because cells in the log phase emit red fluorescence and those in the stationary phase emit a green fluorescence (11, 19–22). For both techniques, the dentin was incubated with the dyes at room temperature for 10 minutes in a dark environment and then rinsed with PBS for 1 minute. The specimens were immediately analyzed by the CLSM technique. Another two sterile roots were stained with the same protocol and used as the negative control.

CLSM Analysis

The dentin segments were examined on an inverted Leica TCS-SPE confocal microscope (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Germany; Fig. 1). The respective absorption and emission wavelengths were 494/518 nm for fluorescein diacetate and 536/617 nm for PI. For the acridine orange staining, the excitation and emission for RNA was 460 and 650 nm; the excitation and emission for DNA was 500 and 526 nm, respectively. The sequential frame scan mode was used to prevent crosstalk. The mounted specimens were observed using a 40 \times oil lens and a 63 \times oil lens with an additional zoom of 3 \times . The 40 \times pictures were obtained by using 23 sections of 1- μ m step size in a format of 1,024 \times 1,024 pixels. The 63 \times zoom 3 pictures were taken by using 10 sections with a 0.3- μ m step size and 1,024 \times 1,024 pixels. The images were acquired using the Leica Application Suite-Advanced Fluorescence software (LAS AF, Leica Microsystems GmbH).

Results

To evaluate whether CLSM analysis is an adequate method for *in situ* identification of live and dead bacteria inside dentinal tubules, first we analyzed the dentinal tubules staining before bacterial infection *in vitro*. CLSM analysis showed that after staining with acridine orange (Fig. 2A and B) or fluorescein diacetate (data not shown) noninfected dentinal tubules could be visualized with a predilection of the dyes to label the peritubular dentin.

At 21 days of dentin infection, the teeth were examined with the 40 \times oil lens, the specimens stained with acridine orange or FDA/PI showed that dentinal tubules of all the studied teeth were infected with *E. faecalis* (Fig. 2C). Infected tubules were clearly differentiated from noninfected ones by its fluorescence. However, morphologic identification of viable and nonviable bacteria was difficult at this magnification. No colonization or weak colonization of the root canal walls could be seen in some specimens. Bacterial penetration in dentinal tubules was variable between 100 μ m and 400 μ m (Fig. 2C).

The acridine orange dye showed the presence of RNA (red fluorescence) in the infected dentinal tubules showing metabolic activity of the bacterial cells (Fig. 3). Microorganisms inside the dentinal tubules could be well identified by its coccoidal structure using the 63 \times oil lens with an additional zoom of 3.

The FDA/PI (Fig. 4) staining technique showed difference in the viability of the bacteria. A single dentinal tubule presenting both viable and nonviable bacteria was the most frequent finding, whereas the presence of single tubules with nonviable bacteria was the less frequent finding. It was evident that the diameter of the dentinal tubules could contain a great number of bacterial cells.

Discussion

Dentin infection has particular significance for the study of dental caries and apical periodontitis (23). Microbiological, histologic, and

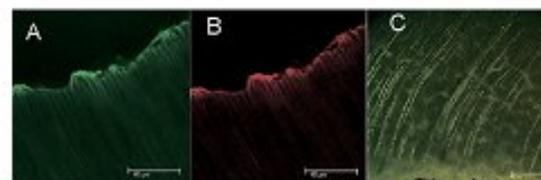


Figure 2. Acridine orange-negative control showing absence of bacteria in the dentinal tubules. (A) 526 nm and (B) 650 nm emission. (C) Twenty-one day-infected dentin stained with FDA/PI; infected tubules can be differentiated by their fluorescence.

Basic Research—Biology

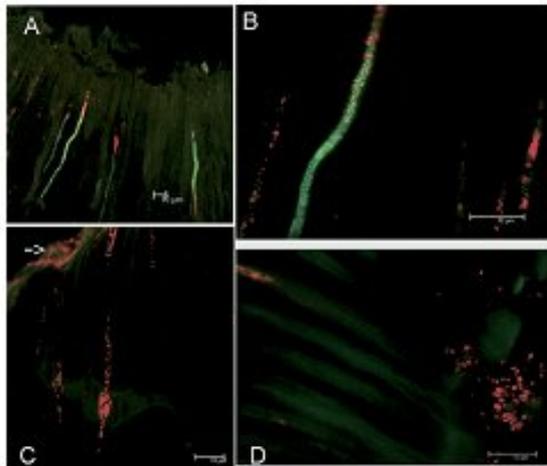


Figure 3. CLSM of 21 day-infected dentin stained with acridine orange. (A) Marked green and red fluorescence are seen inside the infected dentinal tubules. The magnification of some tubules shows red fluorescence indicating the presence of RNA, which is signal of bacterial metabolic activity. Fluorescent green cells represent the presence of DNA. (B) Microorganisms inside the dentinal tubules are well distinguished by its coccoidal structure. (C) Bacterial cells (red) in the root canal wall (arrow) penetrating dentinal tubules. A bacterial colony in the root canal wall is seen in (D) red fluorescent cells predominating in this structure and in an adjacent dentinal tubule indicating metabolic activity of the bacterial cells. All the bars represent 10 μm .

transmission electron microscopy techniques have been used to study the presence of bacteria inside the dentinal tubules (7).

Since the work of Haapasalo and Ørstavik (3), the bovine dentin block model and the bacterial strain *E. faecalis* are commonly used as a reference to test endodontic medications (24, 25). Bovine dentin has been shown to be similar to human dentin in structure, composition, and diameter of tubules (26). Additionally, the strain *E. faecalis* has shown ability to infect dentinal tubules (3), to tolerate high pH levels (27), and to survive in obturated root canals (28). Also, it is the most prevalent bacterial strain in endodontic cases with persistent endodontic lesions as shown by culture- or molecular methods-based studies (29, 30).

The use of fluorescent probes in order to determine bacterial viability in microbiological research on dentistry has increased in the last years (8, 10, 14, 16). Most previous analysis (2, 9) showed that the presence of viable and dead bacteria in dentin samples could be determined through staining a root dentin pellet and using appropriate fluorescent probes. Previous studies (31) showed that CLSM is able to detect bacteria in carious lesions samples by the use of the immunofluorescence technique or to detect the vitality of specific bacteria colonizing the root canal walls (8, 11–13). However, all the mentioned studies failed to show spatial distribution and viability of the bacteria inside dentinal tubules.

Nagayoshi et al. (10) showed that bacterial viability in dentinal tubules could be checked by using conventional fluorescence microscopy, but the high background haze originated from the out-of-focus planes decreased the contrast and made it impossible to distinguish between individual cells, stained dentin, and artifacts. Besides, conventional fluorescence microscopy required previous demineralization of the dentin samples creating an artificial condition. For these reasons, conventional fluorescence microscopy is not the best method to visualize the bacterial distribution in dentinal tubules.

In this context, better methodologies for the identification of bacterial viability in dentin are needed. The CLSM analysis used in this study has advantages over the conventional fluorescence microscopy to visualize bacteria in dentinal tubules such as better image resolution and the ability to eliminate scattered or out-of-focus light and to show individual bacterial cells inside dentinal tubules. In fact, our results confirm the ability of *E. faecalis* to infect dentin (3, 4, 15) and substantial improvements to show that the vitality of the bacteria in dentinal tubules was notorious when compared with conventional fluorescence and previous CLSM studies.

To our knowledge, we describe for the first time the visualization of live and dead as well as metabolically active bacterial cells in single dentinal tubules using confocal microscopy. It becomes evident that bacterial invasion of dentin by *E. faecalis* is an active process mediated by cell division. Additionally, the capacity to analyze thicker specimens with minimal preparation provides examination under near environmental conditions. This method gave information about the severity of the dentin infection, and the vitality of bacteria in the dentinal tubules could be determined in an effective way at the cellular level.

Despite the great advances of polymerase chain reaction (PCR) technology to detect culture-difficult species and uncultivable microorganisms (30, 32), PCR-based methods cannot distinguish between DNA from viable or dead cells (33, 34). This fact is important during the characterization of the microflora that survives the endodontic treatment. In situ detection of bacterial DNA and RNA by acridine orange and

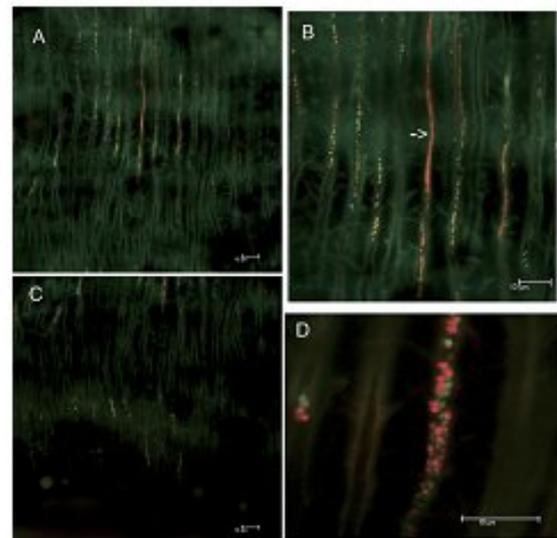


Figure 4. CLSM of 21 day-infected dentin stained with fluorescein diacetate/propidium iodide. A and C represent two consecutive microscope fields approximately 350 μm inside the radicular dentin from the root canal wall. (C) Vital bacteria (green) are seen in dentinal tubules near the root canal wall. However, both vital (green) and dead (red) bacteria are more numerous in the second microscopic field (A) approximately 350 μm inside the radicular dentin. A magnification of this area is seen in B. All dentinal tubules are infected. A single tubule with a great quantity of dead cells (red) is visible (arrow). Such dead cells are not differentiated by its cellular structure that is amorphous. Discrimination between vital (green) and dead (red) bacteria inside the other dentinal tubules are clearly differentiated. Numerous branches in the radicular dentin are observed. High-resolution 63 \times oil lens with additional zoom 3 (D) showing living coccoidal cells (green) together with red dead bacterial cells inside a single dentinal tubule. All the bars represent 10 μm .

determination of viability by the FDA/PI technique using confocal microscopy could be promising in elucidating the significance of the residual bacteria in uncultivable state or detectable only by PCR, especially after the use of sodium hypochlorite that efficiently destroys bacterial DNA (33, 35).

CLSM technique can be useful as a complement to the established microbiological, histologic, standard electron microscopy, and PCR-based techniques for the identification of viable bacteria (eg, during the *in vitro* evaluation of dental materials that would be in contact with infected dentin and for the study of the metabolic activity of bacterial cells during the process of dentin infection).

Conclusions

The present study has shown that the viability of bacteria in infected dentin can be determined *in situ* in an effective way by CLSM. FDA/PI and acridine orange are useful for this technique and have the potential for endodontic and cariology research.

Acknowledgments

The authors thank André da Silva and Edmundo de Andrade for their expert technical assistance.

References

- 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;20:340-49.
- Tandjung L, Waijima T, Hauser I, Heide P, Decker EM, Weiger R. Oxetidine in root canal and dentine disinfection *ex vivo*. *Int Endod J* 2007;40:845-51.
- Haapasalo M, Ostavik D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987;66:1375-9.
- Love RM. *Enterococcus faecalis*—a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001;34:399-405.
- Bergmans L, Motañés P, Hayhechts B, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens *ex vivo*. *Int Endod J* 2008;41:227-39.
- Lin L, Langland K. Light and electron microscopic study of teeth with carious pulp exposures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981;51:292-316.
- Langland K. Tissue response to dental caries. *Endod Dent Traumatol* 1987;3:149-71.
- Dixon JW, Hixon JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002;28:689-93.
- Weiger R, de Lucena J, Decker HE, Lost C. Viability status of microorganisms in infected human root dentine. *Int Endod J* 2002;35:166-71.
- Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuzumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod* 2004;30:778-81.
- George S, Nishan A, Sang KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005;31:867-72.
- Nishan A, George S, Kumar R. *Enterococcus faecalis*-mediated biomaterialized biofilm formation on root canal dentine *in vitro*. *J Biomed Mater Res A* 2006;77:406-15.
- Rimple JL, Fontana CR, Paschi F, et al. Photo-dynamic treatment of endodontic polymicrobial infection *in vitro*. *J Endod* 2008;34:728-34.
- Zaura-Arte E, van Marle J, ten Cate JM. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* 2001;80:1486-40.
- Love RM. Regional variation in root dentinal tubule infection by *Streptococcus gar-dinii*. *J Endod* 1996;22:290-3.
- Neuschil L, Reich E, Unteregger G, Sculean A, Brex M. Apilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and epigraphy. *Arch Oral Biol* 1998;43:277-85.
- Ausdill TM, Hein N, Hellwig E, Folio M, Sculean A, Arweiler NB. Effect of two antimicrobial agents on early *in situ* biofilm formation. *J Clin Periodontol* 2005;32:147-52.
- Hannig C, Hannig M, Rehner G, Braun G, Hellwig E, Al-Ahmad A. Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel *in situ*. *Arch Oral Biol* 2007;52:1048-56.
- Vidov L, Hannig M, Krausgartner WD, et al. *Ex vivo* gingival-biofilm consortia. *Letts Appl Microbiol* 2005;41:404-11.
- Rapposch S, Zangerl P, Gatzinger W. Influence of fluorescence of bacteria stained with acridine orange on the enumeration of microorganisms in raw milk. *J Dairy Sci* 2008;91:2753-58.
- Mason DJ, Lloyd D. Acridine orange as an indicator of bacterial susceptibility to gentamicin. *FEMS Microbiol Lett* 1997;153:199-204.
- Septoner RL Jr, Pratt JR. Use of microchromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol Rev* 1994;58:603-15.
- Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:171-83.
- Evans MD, Baumgartner JC, Khemaveekul SU, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide/diohexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod* 2005;29:388-9.
- Rosenthal S, Spangberg L, Safavi S. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98:488-92.
- Camargo CH, Siviero M, Camargo SE, de Oliveira SH, Curvalho CA, Vaiana MC. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *J Endod* 2007;33:422-6.
- Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Dahlén G, Svensson G. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. *Int Endod J* 2007;40:344-55.
- Shin SJ, Jee SW, Song JS, Jung IV, Cha JH, Kim E. Comparison of regrowth of *Enterococcus faecalis* in dentinal tubules after sealing with gutta-percha or Resilon. *J Endod* 2008;34:445-8.
- Chavez De Paz LE, Dahlén G, Molander A, Midler A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J* 2003;36:500-8.
- Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zala AA, Femar CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod* 2008;34:537-40.
- González-Cabezas C, Li Y, Gregory RL, Sedkey GK. Distribution of three cariogenic bacteria in secondary carious lesions around amalgam restorations. *Caries Res* 1999;33:357-65.
- Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, et al. A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infections. *J Endod* 2008;34:541-5.
- Young G, Turner S, Davies JK, Sundqvist G, Rådor D. Bacterial DNA persists for extended periods after cell death. *J Endod* 2007;33:1417-20.
- Cook J, Nandakumar R, Fouad AF. Molecular- and culture-based comparison of the effects of antimicrobial agents on bacterial survival in infected dentinal tubules. *J Endod* 2007;33:690-2.
- Schirmmeister JF, Liebenowal, Braun G, Wimmer A, Hellwig E, Al-Ahmad A. Detection and eradication of microorganisms in root-filled teeth associated with periradicular lesions: an *in vivo* study. *J Endod* 2007;33:536-40.



**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

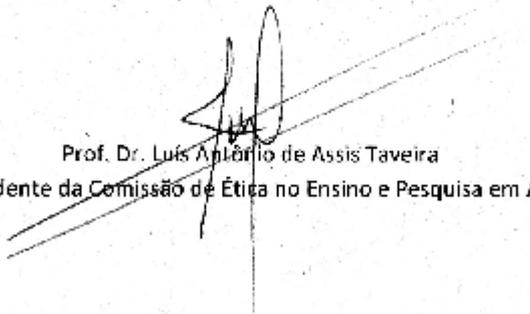
CEEPA-Proc. Nº 008/2007

Bauru, 25 de setembro de 2009.

Senhor Professor,

Aprovamos *“ad referendum”* desta Comissão, a solicitação de Vossa Senhoria para a alteração do título do projeto de pesquisa “Periodontite apical induzida por *Enterococcus faecalis* em canais radiculares de cães”, de autoria de Ronald Ordinola Zapata sob sua orientação, para **“Periodontite apical induzida em cães. Efeito do tratamento endodôntico. Estudo microbiológico, tomográfico e de microscopia confocal”**, considerando que não há impedimentos éticos.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Luis Antônio de Assis Taveira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante

Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)