

# **AVALIAÇÃO DA PRESENÇA E LOCALIZAÇÃO DE BACTÉRIAS NOS CANAIS RADICULARES E NAS LESÕES PERIAPICAIS CRÔNICAS PELO METODO DE COLORAÇÃO DE BROWN E BRENN\***

*EVALUATION OF THE PRESENCE AND LOCALIZATION OF BACTERIA IN ROOT CANALS AND CHRONIC PERIAPICAL LESIONS BY THE BROWN AND BRENN STAINING METHOD*

**Sonia del Pilar BOHORQUEZ**

*Aluna do curso de Pós-Graduação em Patologia Bucal, em nível de mestrado da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP.*

**Regina Stela Stilac ROCHA**

**Odila Pereira da Silva ROSA**

*Professoras Doutoradas da disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP.*

**Alberto CONSOLARO**

*Professor Doutor do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP.*

---

**P**ara avaliar a presença e localização de bactérias nos canais radiculares e nas lesões periapicais crônicas, foram examinados pela coloração de Brown e Brenn 17 dentes humanos extraídos, apresentando necrose pulpar e lesões firmemente aderidas ao ápice. Verificamos ser alta a frequência de bactérias nos canais, com predomínio de cocos e bacilos Gram positivos e de bacilos Gram negativos, detectados em 57(95%), 55(91,7%) e 51(85%) das 60 lâminas em estudo, respectivamente. Nas lesões periapicais as bactérias foram detectadas com graus de infecção leve e moderado, com predomínio de cocos e bacilos Gram positivos, presentes em 35(58,3%) e 27(45%) das lâminas examinadas, respectivamente. As bactérias foram localizadas preferencialmente entre o ápice e a lesão, nas imediações do forame.

---

\*Parte da dissertação de mestrado do curso de Pós-Graduação em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP.

**UNITERMOS:** Bacteriologia dos canais radiculares; Lesões periapicais; Coloração de Brown e Brenn.

---

## INTRODUÇÃO

Em meados de 1894 tiveram início as especulações em torno da possível relação entre bactérias e doença pulpar, fato documentado por MILLER<sup>7</sup>. A confirmação da associação entre infecção e inflamação pulpar e periapical, só foi estabelecida em 1965 por KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD<sup>13</sup>, ao verificarem que após a exposição da polpa de molares de ratos convencionais ao meio bucal ocorria necrose, com formação de abscessos e granulomas. Em animais livres de microrganismos a inflamação pulpar era moderada, e não havia evidência de reação periapical.

Antes de 1970 os estudos avaliando a microbiota dos canais radiculares demonstravam uma alta frequência de aeróbios e de anaeróbios facultativos, com elevada incidência de *Streptococcus* alfa e gama hemolíticos<sup>8,16,31,38</sup>. Graças aos avanços na tecnologia para a cultura de anaeróbios, a partir dessa década houve considerável mudança no entendimento das infecções pulpares e, atualmente tem sido possível constatar a presença marcante de microrganismos anaeróbios estritos em nível de polpas necrosadas, tais como: *Fusobacterium* sp., *Eubacterium*, *Bacteroides* sp., *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Wolinella* e outros<sup>2,3,4,23,30,31</sup>.

FABRICIUS et al.<sup>9,30</sup> verificaram experimentalmente que nos canais radiculares de dentes com polpas necrosadas ocorrem alterações da microbiota com o passar do tempo, refletindo-se num aumento das proporções de microrganismos anaeróbios estritos, principalmente no terço apical radicular.

As infecções endodônticas são polimicrobianas, e embora mais de 100 espécies diferentes tenham sido isoladas, em cada canal usualmente só estão presentes entre 1 a 12 espécies, ou por vezes mais, sendo que o número de células bacterianas é maior em dentes com lesões periapicais<sup>22,23,26</sup>.

Parece evidente que existem condições seletivas nos canais radiculares, provavelmente criadas pela necrose pulpar, que favorecem a infecção por bactérias anaeróbias às expensas dos aeróbios.

Estas alterações parecem estar na dependência do teor de oxigênio e do desenvolvimento de um baixo potencial de óxido-redução; da disponibilidade de nutrientes e das interações bacterianas<sup>22,23,26</sup>.

A análise do sistema de canais radiculares infectados por meio de microscopia óptica, de campo escuro e eletrônica, ampliou os horizontes dos estudos bacteriológicos, demonstrando a presença de uma microbiota

mista consistindo de cocos, bacilos, formas filamentosas e espiroquetas; com os microrganismos localizados na luz do canal, relacionados por vezes com PMN; ou formando agrupamentos, aderidos às paredes dentinárias<sup>16</sup>. Foi também evidenciado o aumento das formas bacilares, das filamentosas e das espiroquetas no terço apical radicular<sup>24</sup>.

WALTON; ARDJMAND<sup>27</sup> utilizaram um modelo experimental para induzir lesões periapicais em macacos e por meio da coloração de Brown e Brenn identificaram bactérias, predominantemente Gram positivas, em todos os canais, que na maioria das amostras não ultrapassavam o forame apical. Os microrganismos podem também persistir nos canalículos dentinários, fato comprovado experimentalmente por HAAPASALO; RSTAVIK<sup>12</sup>.

Quanto à presença de bactérias nas lesões periapicais crônicas, os resultados são controversos e antes de 1970 a utilização de cultura proporcionava resultados negativos para a maioria das amostras avaliadas e, quando os resultados eram positivos, era notória a detecção de *Streptococcus* e *Staphylococcus*<sup>31,36</sup>. Foi sugerido que a área periapical podia ser estéril apesar da presença maciça de microrganismos nos canais radiculares<sup>16</sup>.

Posteriormente surgiram os trabalhos utilizando a coloração de Brown e Brenn para avaliar a presença de bactérias nas periapicopatias crônicas. WINKLER; MITCHELL; HEALEY<sup>45</sup> estudaram 15 dentes extraídos com lesões periapicais aderidas ao ápice, observando que em 13 casos os microrganismos estavam uniformemente dispersos na lesão, em concentrações de leve a moderada.

ANDREASEN; RUD<sup>1</sup>, BLOCK et al.<sup>5</sup>, LANGE-LAND; BLOCK; GROSSMAN<sup>15</sup> e WALTON; ARDJMAND<sup>27</sup> detectaram bactérias em poucas amostras por eles avaliadas.

Relataram que as bactérias estavam presentes em áreas próximas ao forame apical e relacionadas com PMN.

NAIR<sup>18</sup>, por meio de microscopia óptica e eletrônica encontrou bactérias em 4 granulomas e em um cisto, em 31 lesões avaliadas. Observou cocos, bacilos, formas filamentosas e espiroquetas. Quando os microrganismos se estendiam a variadas profundidades dentro do corpo da lesão, havia reação por PMN e formação de abscessos.

Pela controvérsia na literatura consultada, decidimos avaliar a presença e localização de bactérias nos canais radiculares de dentes com polpas necrosadas e

nas lesões periapicais crônicas, por meio da coloração de Brown e Brenn por nós modificada.

## MATERIAL E MÉTODOS

De 15 indivíduos adultos de ambos os sexos, entre 17 e 55 anos de idade, foram selecionados 17 dentes que na exodontia apresentavam lesão periapical firmemente aderida ao ápice radicular. Todos os dentes apresentavam extensos processos cariosos com perda parcial ou total da estrutura coronária. No total foram obtidas 20 lesões periapicais, levando em consideração os dentes multiradiculares com mais de uma lesão.

Após a exodontia os dentes foram fixados em formol a 10%, por um período mínimo de 48 horas, desmineralizados em EDTA a 5%, pH 7.0, por um tempo médio de 2 meses e incluídos em parafina. Em seguida foram realizados cortes seriados de 5µm de espessura, que proporcionassem uma visão completa do canal radicular, através do seu longo eixo e em continuidade com a lesão periapical. Após a desparafinização as amostras foram coradas pela hematoxilina-eosina, para traçar o diagnóstico da lesão, e pela coloração de Brown e Brenn ligeiramente modificada, para pesquisar a presença, distribuição e localização de bactérias Gram positivas e Gram negativas nos canais radiculares e nas lesões periapicais crônicas.

A leitura das lâminas foi feita com microscópio Olympus CBA binocular, com objetivas de 40x e 100x. O grau de infecção em nível dos canais radiculares e das lesões periapicais crônicas recebeu um escore subjetivo de leve, moderado ou intenso.

## RESULTADOS

Foram avaliadas 3 lâminas de cada amostra, para cada método de coloração. A avaliação microscópica dos cortes de tecido corados pela hematoxilina-eosina revelou que as lesões consistiram de 11 granulomas periapicais, 4 cistos periodontais apicais instalados, 4 cistos periodontais apicais incipientes e 1 granuloma abscedido.

Foi alta a frequência de bactérias nos canais radiculares, particularmente de cocos e bacilos Gram positivos, detectados em 57(95%) e 55(91,7%) das lâminas, respectivamente. Os bacilos Gram negativos foram encontrados em 51(85%) dos cortes de tecido, e em menores proporções foram detectadas formas filamentosas Gram positivas e negativas e cocos Gram negativos.

Quanto à localização dos diferentes morfotipos bacterianos ao longo dos canais, encontrou-se na porção radicular próxima à embocadura dos canais um predomínio de cocos e bacilos Gram positivos, com grau de infecção intenso ou moderado. A presença de Gram negativos nessa área do canal foi sempre menor que a de Gram positivos.

No terço médio foi notória a diminuição de cocos Gram positivos, sendo menor a variação encontrada para bacilos Gram positivos, que a esse nível foram detectados em concentração mais elevada. Um achado de interesse foi a presença nessa porção radicular de formas filamentosas Gram positivas e de bacilos Gram negativos, com intensidade de leve a moderada.

No terço apical detectou-se uma diminuição do grau de infecção, relativo aos cocos e bacilos Gram positivos e em 8 amostras houve aumento das formas filamentosas Gram positivas e dos bacilos Gram negativos.

Em linhas gerais, as bactérias foram observadas distribuídas ao longo do canal radicular, por vezes associadas ao tecido necrosado ou à parede dentinária, formando agrupamentos. Dessa localização cocos e bacilos Gram positivos eram por vezes encontrados penetrando nos canalículos dentinários. No terço apical das amostras 16 (granuloma abscedido) e 20 (cisto periodontal apical incipiente) observaram-se macrófagos e PMN estreitamente associados a massas bacterianas e com evidência de fagocitose.

Nas lesões periapicais também foi alta a frequência de bactérias, detectadas em 18 casos. Os bacilos e cocos Gram positivos, tal como foi visto para os canais radiculares, foram os microrganismos preponderantes evidenciados em 35(58,3%) e 27(45%) dos cortes avaliados, respectivamente. Não foram observados filamentos Gram negativos.

Notou-se que a localização mais comum para os cocos, bacilos e filamentos Gram positivos e para os bacilos Gram negativos, na área periapical, foi na região compreendida entre o ápice e a lesão, nas imediações da saída do canal radicular. Em menores proporções cocos, bacilos e filamentos Gram positivos, bem como cocos e bacilos Gram negativos foram encontrados entre as células do infiltrado inflamatório. De importância para o estudo foi a detecção de cocos e bacilos Gram positivos, na superfície da lesão periapical próxima ao forame, estendendo-se para o interior do tecido e em estreita relação com células mononucleares tipo macrófago. Em duas amostras, cistos periodontais apicais instalados, verificou-se a presença de

cocos e bacilos Gram positivos na cavidade cística.

## DISCUSSÃO

A literatura consultada revelou que a microbiota dos canais radiculares infectados foi avaliada por diferentes métodos como a cultura<sup>2,9,16,21,23,28</sup>, microscopia de contraste de fase ou de campo escuro<sup>3,24</sup>, microscopia eletrônica<sup>14</sup>, técnica de imunofluorescência indireta<sup>3,9</sup> e microscopia óptica utilizando a coloração de Brown e Brenn<sup>9,10,21,27</sup>.

Os resultados diferentes apresentados pelos autores, relativos à microbiota dos canais radiculares, podem ser devidos à metodologia empregada e a diferenças na obtenção das amostras.

A coloração de Brown e Brenn surgiu da necessidade de examinar cortes de tecidos incluídos em parafina, para determinar a presença de bactérias Gram positivas e Gram negativas, em que a viabilidade dos microrganismos não representaria um requisito para a obtenção dos resultados.

No presente estudo introduzimos pequenas modificações na técnica original proposta por BROWN; BRENN<sup>6</sup> em 1931, com o propósito de obter resultados mais confiáveis ao trabalhar com tecidos duros. Uma importante modificação foi a utilização da solução de trabalho de fucsina aquosa numa concentração de 0,025%. Do cristal violeta foi retirado o bicarbonato de sódio, e além disso, foi adicionada à técnica a solução de Galleo, um diferenciador introduzido por BROWN; HOPPS<sup>7</sup>.

A coloração de Brown e Brenn levemente modificada nos permitiu detectar as bactérias Gram positivas coradas em roxo e as Gram negativas coradas em vermelho nos canais radiculares, nos canalículos dentinários e nas periapicopatias crônicas. É importante salientar que apesar da técnica ter sido padronizada, nem sempre uma diferenciação adequada das bactérias Gram negativas foi conseguida. Esse evento foi observado para espiroquetas, presentes no terço apical de 6 amostras, as quais mantiveram-se coradas em roxo.

As bactérias foram observadas em todas as amostras analisadas e concluímos ser alta a sua frequência em canais com polpas necrosadas e expostas ao ambiente bucal. Os cocos e os bacilos Gram positivos foram os morfotipos bacterianos predominantes, detectados em 57(95%) e 55(91,7%) das 60 lâminas avaliadas, respectivamente. WALTON; ARDJMAND<sup>27</sup> em estudo experimental também identificaram, pela coloração de Brown e Brenn, microrganismos em todos os canais,

com predomínio de Gram positivos, os quais não ultrapassavam o limite do forame apical.

Os estudos que utilizaram a cultura e a microscopia como métodos de avaliação, especialmente antes de 1970, registraram o predomínio de cocos e bacilos Gram positivos aeróbios e anaeróbios facultativos, nos canais radiculares com polpa necrosada<sup>4,28,31,28</sup>.

Os *Streptococcus* alfa e gama hemolíticos eram os microrganismos mais frequentemente encontrados. Com o desenvolvimento de técnicas adequadas para cultura de anaeróbios, os *Streptococcus*, invasores primários dos canais, passaram a ocupar um papel secundário na etiologia das alterações pulpares. Outros microrganismos, tanto Gram positivos como Gram negativos anaeróbios estritos passaram a ser valorizados. Dentre os cocos e bacilos Gram positivos anaeróbios estritos têm recebido maior atenção os *Peptococcus magnus*, *Peptostreptococcus micros*, *Actinomyces viscosus* e *A.israelii*, *Propionibacterium acnes* e *Eubacterium alactolyticum*<sup>3,14,23,30</sup>. Os bacilos Gram negativos anaeróbios estritos, também têm sido isolados com frequência dos canais radiculares, como: *Fusobacterium* sp., *Campylobacter sputorum*, *Wollinella recta*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis*<sup>3,14,19,23,30</sup>.

Neste estudo houve predomínio de cocos e bacilos Gram positivos nos canais radiculares de dentes com polpas necrosadas, mas existe a possibilidade que a coloração empregada, apesar das modificações por nós introduzidas, não tenha sido eficiente o bastante para demonstrar todas as bactérias Gram negativas presentes nos canais radiculares. Os microrganismos foram observados dentro do canal individualmente e/ou associados a restos necróticos e às paredes dentinárias, onde formavam agrupamentos que por vezes penetravam nos canalículos dentinários.

NAIR<sup>18</sup>, por microscopia óptica e eletrônica, evidenciou uma ou mais camadas de células bacterianas, com morfologia variada, relacionadas às paredes dentinárias. O autor sugeriu que nos canais é possível a ocorrência de fenômenos de aderência bacteriana e estabelecimento de comunidades entre os microrganismos.

Verificamos que a disposição dos morfotipos bacterianos sofriria alterações nos diferentes terços radiculares. Na porção próxima à embocadura dos canais, encontrou-se predomínio de cocos e bacilos Gram positivos, com grau de infecção intenso ou moderado.

Provavelmente esse fato possa ser explicado por

estar a amostra constituída por dentes afetados por extensos processos cariosos e com comunicação com o tecido pulpar.

No terço médio radicular os cocos Gram positivos foram notados em menores proporções, enquanto que os bacilos Gram positivos apresentavam níveis ligeiramente maiores que no terço coronário. As formas filamentosas Gram positivas e os cocos e bacilos Gram negativos a este nível foram visualizados com intensidade leve a moderada.

No terço apical havia uma diminuição considerável dos cocos e bacilos Gram positivos e em 8 amostras percebemos um aumento das formas filamentosas Gram positivas e dos bacilos Gram negativos. FABRICIUS et al.<sup>9,10</sup>, avaliando a distribuição das diferentes espécies bacterianas nos canais de dentes de macacos, em diferentes períodos após a exposição pulpar, concluíram que nas amostras finais havia um predomínio de bacilos Gram positivos e Gram negativos anaeróbios no terço apical, e que a microbiota sofria alterações com o tempo, verificando aumento dos anaeróbios estritos.

As alterações na microbiota, observadas nos diferentes terços dos canais podem ser explicadas pelas condições criadas pela necrose pulpar, tais como a diminuição do potencial de óxido-redução, a disponibilidade de nutrientes e as interações bacterianas<sup>1,2,3,36</sup>.

As bactérias representam os principais agentes etiológicos das alterações pulpares e em nosso trabalho foram detectadas tanto Gram positivas como Gram negativas nos canais radiculares com polpas necrosadas. A infecção dos canais pode disseminar-se para os tecidos periapicais<sup>20</sup>, e o tipo de resposta vai depender da virulência das bactérias presentes e dos mecanismos específicos e inespecíficos locais de defesa do hospedeiro.

Na tentativa de neutralizar e/ou destruir os agentes agressores de origem bacteriana, gera-se uma reação inflamatória. Da mesma forma, as bactérias e/ou seus produtos, podem comportar-se como antígenos, iniciando reações imunopatológicas no periápice. Se não for feita a remoção da polpa necrosada e dos microrganismos dos canais, a penetração de antígenos no periápice acaba por induzir o aparecimento das lesões periapicais crônicas<sup>20</sup>.

Considerando-se a íntima relação entre os tecidos pulpar e periapical era esperado o encontro de bactérias nas periapicopatias crônicas. Existem, porém, discordâncias entre os autores quanto à detecção dos

microrganismos nessas lesões, o que pode ser decorrente do método de amostragem e dos procedimentos de avaliação empregados<sup>4,5</sup>.

Nesta pesquisa as bactérias foram encontradas em 18 amostras, em nível dos tecidos periapicais. Para eliminar a possibilidade de contaminação externa foram utilizados os critérios expostos por WINKLER; MITCHELL; HEALEY<sup>29</sup>. As bactérias deviam ser observadas no mesmo plano dos elementos teciduais, apresentar uniformidade morfológica e com resposta consistente à coloração empregada.

Apesar de ser alta a frequência de bactérias nos canais radiculares, nas lesões seus níveis diminuíram notadamente, com grau de infecção leve e moderado.

WINKLER; MITCHELL; HEALEY<sup>29</sup> utilizando dentes extraídos, com polpa necrosada e lesão aderida ao ápice, observaram pela coloração de Brown e Brenn altas concentrações de bactérias nos canais, e em 13 lesões encontraram microrganismos uniformemente distribuídos nos tecidos, em concentrações de leve a moderada e com predomínio de cocos Gram positivos.

Detectamos as bactérias principalmente entre o ápice e a lesão, e em menores proporções entre as células do infiltrado inflamatório, nas imediações do ápice radicular.

Os níveis de bactérias por nós detectados são mais elevados que os relatados por outros autores, que empregaram a mesma coloração<sup>1,3,15,27</sup>, os quais foram concordes em concluir a localização das bactérias em áreas próximas ao forame e relacionadas aos PMN e macrófagos. É possível que os mecanismos locais de defesa do hospedeiro impeçam a passagem das bactérias presentes nos canais para os tecidos periapicais, não invalidando a possibilidade da presença de fragmentos microbianos que não seriam detectados pela coloração de Brown e Brenn.

Segundo ANDREASEN; RUD<sup>1</sup> é provável que as lesões periapicais sejam estéreis, mas quando presentes, as bactérias encontram-se próximas ao forame apical ou aderidas ao cimento radicular. NAIR<sup>16</sup> detectou bactérias em todos os canais de 31 amostras examinadas, mas só em 4 granulomas e em um cisto notou microrganismos intra e extracelularmente.

Em duas amostras, de cistos periodontais apicais instalados, verificamos a presença de cocos e bacilos Gram positivos na cavidade das lesões, próximos ao revestimento. NAIR<sup>16</sup>, observou no interior da cavidade cística PMN com fagolisossomos que continham bactérias. Esse fato não foi observado por nós, todavia, detectamos cocos e bacilos Gram positivos em estreita

relação com células tipo macrófago, na superfície da lesão próxima ao forame apical.

Na opinião de TRONSTAD<sup>26</sup> na fase inicial do desenvolvimento das lesões periapicais os mecanismos de defesa do hospedeiro, específicos e inespecíficos, eliminarão as bactérias invasoras; mas a medida que a infecção dos canais progredisse essas defesas tornar-se-iam menos eficientes, podendo então ocorrer a entrada de microrganismos na intimidade das lesões.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir da avaliação de dentes com polpas necrosadas e com lesões periapicais crônicas, permite-nos concluir, pela coloração de Brown e Brenn modificada, que é alta a frequência de bactérias nos canais radiculares, detectadas em todas as amostras, com predomínio de cocos e bacilos Gram positivos e de bacilos Gram negativos, presentes em 57(95%), 55(91,7%) e 51(85%) das lâminas avaliadas, respectivamente. As bactérias se distribuem ao longo dos canais, isoladamente ou em grupos, por vezes aderidos às paredes de dentina e/ou penetrando nos canalículos dentinários. Nas lesões periapicais crônicas as bactérias, detectadas em 18 amostras, estão presentes com graus de infecção leve e moderado, com predomínio de cocos e bacilos Gram positivos, evidenciados em 35(58,3%) e 27(45%) das lâminas examinadas.

As bactérias encontram-se preferencialmente entre o ápice e a lesão periapical, nas imediações da saída do canal. Nos cistos periodontais apicais instalados podem estar presentes, por vezes, cocos e bacilos Gram positivos na cavidade cística.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the presence and localization of bacteria in the root canals and in chronic periapical lesions by the Brown and Brenn staining method. Seventeen extracted teeth with pulpal necrosis and lesions firmly attached to the apex were used. By the modified Brown and Brenn staining was noticed to be high the frequency of bacteria in the root canals, with predominance of Gram positive cocci and bacilli and Gram negative bacilli, detected in 57(95%), 55(91,7%) and 51(85%) respectively, of the examined slides. In chronic periapical lesions the bacteria were detected with mild to moderate degrees of infection,

with predominance of Gram positive bacilli and cocci, detected in 35(58,3%) and 27(45%) slides, respectively, often localized between the apex and the periapical lesion, near the foramen.

**UNITERMS:** Root canals bacteriology; Periapical lesions; Brown and Brenn staining method.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ANDREASEN, J. O.; RUD, J. A. A histobacteriology study of dental and periapical structures after endodontic surgery. *Int. J. oral Surg.*, v.1, p. 278-81, 1972.
- 2- ASSED, S. **Prevalência de microrganismos em canais radiculares de dentes humanos com reação periapical crônica. Efeito do preparo biomecânico e do curativo de demora. Imunofluorescência indireta e cultura.** Ribeirão Preto 1993. 110p. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- 3- BAUMGARTNER, J. C.; FALKLER JR., W. A. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J. Endod.*, v.17, n.8, p.380-3, Aug. 1991.
- 4- BIRCH, R. H.; MELVILLE, T. H.; NEUBERT, E. W. A. comparison of root-canal and apical lesion flora. Problems of direct bacteriological sampling of the periapical lesion. *Brit. dent. J.*, v.116, n. 8, p.350-2, Apr. 1964.
- 5- BLOCK, R. M. et al. A histopathologic, histobacteriologic, and radiographic study of periapical endodontic surgical specimens. *Oral Surg.*, v.42, n.5, p.656-77, Nov. 1976.
- 6- BROWN, J. H.; BRENN, L. A method for the differential staining of Gram-positive and Gram-negative bacteria in tissue sections. *Bull. Johns Hopk. Hosp.*, v.48, n.2, p.69-73, 1931.
- 7- BROWN, R. C.; HOPPS, H. Staining of bacteria in tissue sections: a reliable Gram stain method. *Amer. J. clin. Path.*, v.59, n. 2, p.234-40, Aug. 1973.
- 8- BROWN JR., L. R.; RUDOLPH, JR., C. E. Isolation and identification of microorganisms from unexposed canals of pulp-involved teeth. *Oral Surg.*, v.10, n.10, p.1094-9, Oct. 1957.

- 9- FABRICIUS, L. et al. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. **Scand. J. dent. Res.**, v.90, n.2, p.134-44, Apr. 1982.
- 10- FABRICIUS, L. et al. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. **Scand. J. dent. Res.**, v.90, n.3, p.200-6, June 1982.
- 11- GROSSMAN, L. I. Bacteriologic status of periapical tissue in 150 cases of infected pulpless teeth. **J. dent. Res.**, v.38, n.1, p.101-4, Jan./Feb. 1959.
- 12- HAAPASALO, M.; RSTAVIK, D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. **J. dent. Res.**, v.66, n.8, p.1375-9, Aug. 1987.
- 13- KAKEHASHI, S.; STANLEY, M. R.; FITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg.**, v.20, n.3, p.340-9, Sept. 1965.
- 14- KANTZ, W. E.; HENRY, C. A. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non-vital teeth in man. **Arch. oral Biol.**, v.19, n.1, p.91-6, Jan. 1974.
- 15- LANGELAND, K.; BLOCK, R. M.; GROSSMAN, L. I. A histopathologic and histobacteriologic study of 35 periapical endodontic specimens. **J. Endod.**, v.3, n.1, p.8-23, Jan. 1977.
- 16- MELVILLE, T. H.; BIRCH, R. H. Root canal and periapical floras of infected teeth. **Oral Surg.**, v.23, n.1, p.93-8, Jan. 1967.
- 17- MILLER, W. D. **Microorganisms of human mouth.** Philadelphia, SS white Dental Mfg, 1890 apud ANTHONY, L. P.; GROSSMAN, L. I. A brief history of root-canal therapy in the United States. **J. Amer. dent. Ass.**, v.32, n.1, p.43-50, Jan. 1931.
- 18- NAIR, P. N. R. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. **J. Endod.**, v.13, n.1, p.29-39, Jan. 1987.
- 19- PANTERA JR., E. A.; ZAMBON, J. J.; SHIH-LEVINE, M. Indirect immunofluorescence for the detection of *Bacteroides* species in human dental pulp. **J. Endod.**, v.14, n.5, p.218-23, May 1988.
- 20- REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J. J. **Patologia bucal. Correlações clinicopatológicas.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. p.288-91.
- 21- SULITZEANU, A.; BEUTNER, E. H.; EPSTEIN, L. I. Bacteriologic studies of pulp-involved teeth by cultural and microscopic methods. **J. Amer. dent. Ass.**, v.69, n.3 p.300-7, Sept. 1964.
- 22- SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. **J. Endod.**, v.18, n.9, p.427-30, Sept. 1992.
- 23- SUNDQVIST, G. Associations between microbial species in dental root canal infections. **Oral microbiol. immunol.**, v.7, n.5, p.257-62, Oct. 1992.
- 24- THILO, B. E.; BAEHNI, P.; HOLZ, J. Dark-field observation of the bacterial distribution in root canals following pulp necrosis. **J. Endod.**, v.12, n.5, p.202-5, May 1986.
- 25- TORABINEJAD, M.; EBY, W. C.; NAIDORF, I. J. Inflammatory and immunological aspects of the pathogenesis of human periapical lesions. **J. Endod.**, v.11, n.11, p.479-88, Nov. 1985.
- 26- TRONSTAD, L. Recent development in endodontic research. **Scand. J. dent. Res.**, v.100, n.1, p.52-9, Feb.1992.
- 27- WALTON, R. E.; ARDJMAND, K. Histological evaluation of the presence of bacteria in induced periapical lesions in monkeys. **J. Endod.**, v.18, n.5, p.216-21, May 1992.
- 28- WINKLER, K. C.; VAN AMERONGEN, J. Bacteriologic results from 4000 root canal cultures. **Oral Surg.**, v.12, n.7, p.857-75, July 1959.
- 29- WINKLER, T. F.; MITCHELL, D. F.; HEALEY, H. J. A bacterial study of human periapical pathosis employing a modified Gram tissue stain. **Oral Surg.**, v.34, n.1, p.109-16, July 1972.
- 30- WITTGOW, W. C.; SABISTON, C. B. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. **J. Endod.**, v.1, n.5, p.168-71, May 1975.
- 31- ZAVISTOSKI, J. et al. Quantitative bacteriology of endodontic infections. **Oral Surg.**, v.49, n.2, p.171-4, Feb. 1980.