



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Odontologia

Cinthyia Cristina Gomes

**Primeiro relato de isolamento e identificação taxonômica de fungos filamentosos em
infecções endodônticas**

Rio de Janeiro
2007

Cinthyia Cristina Gomes

Primeiro relato de isolamento e identificação taxonômica de fungos filamentosos em infecções endodônticas



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Endodontia.

Orientadores: Prof. Dr. Rivail Antônio Sergio Fidel
Prof^a.Dr^a. Maria Inez de Moura Sarquis

Rio de Janeiro
2007

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

G633 Gomes, Cinthya Cristina.
Primeiro relato de Isolamento e identificação taxonômica de fungos filamentosos em infecções endodônticas / Cinthya Cristina Gomes. – 2007. 105 f.

Orientadores: Rivail Antonio Sergio Fidel, Maria Inez de Moura Sarquis.
Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia.

1. Polpa dentária - Necrose. 2. Fungos – Isolamento. 3. Fungos - Classificação. 4. Doenças periapicais. I. Fidel, Rivail Antonio Sergio. II. Sarquis, Maria Inez de Moura. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

CDU
616.314

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

Assinatura

Data

Cinthyia Cristina Gomes

Primeiro relato de isolamento e identificação taxonômica de fungos filamentosos em infecções endodônticas

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Endodontia.

Aprovado em: 10 de julho de 2007.

Orientadores:

Prof. Dr. Rivail Antônio Sergio Fidel
Faculdade de Odontologia da UERJ

Prof^a Dr^a Maria Inez de Moura Sarquis
Instituto Oswaldo Cruz da FIOCRUZ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior
Faculdade de Ciências Médicas da UERJ

Prof^a Dr^a Izabel Coelho Gomes Camões
Faculdade de Odontologia da UFF

Prof^a Dr^a Verônica Viana Vieira
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da FIOCRUZ

Prof^a Dr^a Sandra Rivera Fidel
Faculdade de Odontologia da UERJ

Prof. Dr. Marcos Cesar Pimenta de Araújo
Faculdade de Odontologia da UFRJ

Rio de Janeiro
2007

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Jairo, pelo senso de responsabilidade e força para lutar que sempre me passou. Por, apesar de doente, ter me dado força para realização de mais esta etapa da minha vida.

A minha mãe, Maria Mazzarello, pelos ensinamentos de fé em Deus, simplicidade e dedicação à família.

Ao meu marido Gilberto que sempre se colocou na retaguarda para que eu pudesse realizar meus sonhos, me apoiando em todos os momentos. Pelo amor, carinho, harmonia e cumplicidade que temos vivido todos estes anos.

Aos meus filhos, Lara e Vinícius, que apesar da inocência sempre souberam esperar a mamãe e dizer uma palavra de carinho.

Às minhas irmãs, Maira e Janaina, por existirem e poderem compartilhar comigo de todos os momentos de alegria e tristeza apoiando uma a outra nos momentos mais marcantes de nossas vidas.

À dinda, Mônica, que sempre me ajudou na criação das crianças, e que nas horas que eu estive ausente, ela esteve tão presente. Aos meus sobrinhos Nayana, Caio, Marília e Mariana.

Ao meu sogro, Prof. Gilberto Vargas, pelas palavras de amizade e força que sempre soube dizer nas horas certas. Pelos ensinamentos de vida e humildade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais esta oportunidade que me concedeu. Pela minha profissão, a que me dedico com tanto carinho, e pelo amor ao magistério.

Ao Coordenador do Doutorado, Prof. Dr. Rivail Antônio Sergio Fidel, pela sua inteligência e capacidade de raciocínio. Pelo seu jeito sério de ser e ao mesmo tempo tão paizão. Muito obrigada.

À Prof^a. Sandra Fidel, sempre alegre e incentivadora, uma mãezona para todos nós. Muito obrigada.

À Prof^a. Dr^a. Maria Inez de Moura Sarquis, orientadora e responsável pela execução da parte de micologia desta pesquisa. Sua força e inteligência são contagiantes. Obrigada pela amizade, carinho e atenção sempre dispensados.

Aos professores Luciana Sassone, Paulo Egreja e Tereza Berlinck, pela dedicação e companheirismo.

Às minhas amigas Prof^a Dr^a. Isabel Coelho Gomes Camões e Prof^a LÍlian Ferreira Freitas, pelo companheirismo, confiança e oportunidade que sempre me deram de crescer com elas. Minhas fiéis companheiras de cursos e congressos, em busca de novos conhecimentos. Sempre foram para mim um exemplo de força e dedicação à profissão.

Aos fiéis amigos Henrique de Oliveira, Nelson Graça, Cristina Matuck e Adriana Therezinha, amigos certos das horas incertas. Sempre prontos a me ouvir, compartilhando comigo minhas vitórias e derrotas.

Às minhas companheiras de trabalho, Shirley Souza Pinto e Fernanda Loretti, por serem tão amigas e dividirem comigo, com tanto carinho, meus anseios profissionais do dia a dia.

Ao meu querido amigo Aristides Pinheiro, sempre me aconselhando nas horas mais difíceis da minha vida de magistério, com seu jeito positivo e sensato, apesar da distância entre nossos cargos, nunca deixou de estender-me as mãos.

Ao Prof. Ney Salgado de Almeida, grande amigo e a quem devo meus primeiros passos dentro da Endodontia, jamais esquecerei de tudo que fez por mim. Exemplo de dedicação, honestidade e simplicidade, sempre foi para mim um guia. Meu eterno agradecimento.

Em memória ao Prof. Dr. Orlando Chevitarese, meu nobre amigo, dedicação, simplicidade e extremo conhecimento são marcos de sua personalidade. Um exemplo de vigor e fé. A quem devo meus primeiros passos dentro da pesquisa odontológica. Minha eterna gratidão.

Ao Professor Marcus Freire, amigo e ex-professor e agora companheiro de trabalho, que também me ajudou nos primeiros passos dentro da Endodontia. Pelos seus ensinamentos, dedicação e amizade. Muito Obrigada.

Ao Prof. Dr. Mario Leonardo, exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa, e que apesar de todo o conhecimento e importância dentro da Odontologia mundial não perdeu o carisma e a simplicidade, estando sempre pronto a ouvir e a ajudar. Meus sinceros agradecimentos por tudo que fez por mim.

Ao Prof. Dr. Manuel Eduardo Machado, pelo apoio e ensinamentos durante o mestrado. Agradeço por ter convivido com você e poder desfrutar da sua inteligência.

Aos companheiros de consultório Reinaldo Ventura e Mario Cardoso, grandes incentivadores da minha carreira, acreditando em mim desde os meus primeiros passos. Nosso encontro estava escrito nas estrelas. Obrigada pela amizade, carinho e confiança.

Aos amigos do doutorado Patrícia Penina, Marco Aurélio Prado e Gustavo Ribeiro. Obrigada pela convivência, amizade e colaboração.

**Trabalho desenvolvido no setor de Micologia e
Coleção de Fungos e Departamento de
Biologia Celular e Genética
do Instituto Oswaldo Cruz.**

RESUMO

GOMES, Cinthya Cristina. *Primeiro relato de isolamento e identificação taxonômica de fungos filamentosos e infecções endodônticas*. 2007. 105 f. Tese (Doutorado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

A proposta deste trabalho foi demonstrar *in vivo*, por meio de técnicas específicas de isolamento, a presença de fungos filamentosos nos canais radiculares de dentes portadores de necrose pulpar e lesão periapical, relacionar sua presença a pacientes com resposta imunológica comprometida e realizar o estudo taxonômico dos isolados. Foram realizadas culturas de 60 canais radiculares com polpa necrosada e lesão periapical. Os pacientes responderam a um questionário de saúde e assinaram permissão para realização da pesquisa. Após isolamento absoluto e assepsia do campo operatório, as amostras foram coletadas utilizando-se 3 pontas de papel absorvente estéreis inseridas no canal radicular uma a uma, durante 1 minuto. Em campo isolado por duas lamparinas, o material coletado foi inoculado em um tubo de ensaio contendo meio de Saboraud Agar acrescido de Cloranfenicol. Próximo ao campo isolado pelas duas lamparinas, foi colocada uma placa de Petri aberta contendo o mesmo meio de cultura contido no tubo de ensaio, com o intuito de verificar a acuidade do isolamento do campo (controle negativo). Ao mesmo tempo foi efetuado um controle positivo, através de uma placa de Petri que permaneceu aberta durante a coleta, fora do campo isolado. Os tubos e placas de Petri foram mantidos em temperatura ambiente por um período de sete a quatorze dias observando o crescimento micelial. Aqueles que apresentaram crescimento foram semeados em meios específicos para microcultivo CYA Agar, Extrato de Malte Agar, ou Agar Batata. Com o auxílio de microscopia óptica, as colônias foram identificadas em gênero e espécie. Das 60 amostras coletadas, 17 apresentaram cultura positiva para fungos filamentosos, perfazendo um total de 28,3%. O gênero *Aspergillus* foi isolado, *in situ*, de 7 amostras (11,6%), sendo que a espécie *Aspergillus ustus* foi isolada de 3 pacientes (5%). O *Aspergillus granulatus*, *Aspergillus niger* e o *Aspergillus sydowii* foram isoladas de 3 pacientes respectivamente. A espécie *Emericella quadriluniata*, forma sexuada de *Aspergillus*, foi isolada de 1 paciente. O gênero *Penicillium* foi isolado, *in situ*, de 4 amostras (6,6%), sendo as espécies isoladas: *Penicillium implicatum*, *Penicillium micsynvisk*, *Penicillium lividum* e *Penicillium citrionigrum*. O gênero *Fusarium* foi isolado, *in situ*, de 2 amostras (3,3%), sendo as espécies identificadas como *Fusarium moniliforme*, *Fusarium melanochorum*, respectivamente. As espécies *Aureobasidium pullulans*, *Exophiala jeancelmei*, *Eurotium amstelodame* e *Cladosporium sphaerospermum* foram isoladas *in situ* de 4 amostras. Todas as amostras nas quais foi isolado fungo filamentoso pertenciam a pacientes com comprometimento da resposta imunológica. Nas placas de Petri empregadas no raio das duas lamparinas, não houve crescimento micelial. Entretanto nas placas controle positivo abertas para verificar a contaminação do meio ambiente houve crescimento de fungos ambientais que não eram compatíveis com os isolados dos canais radiculares, além de não apresentarem culturas puras. Pôde-se concluir que canais radiculares, com necrose pulpar e lesão periapical, podem apresentar cultura positiva para fungos filamentosos e que este resultado, neste estudo, apresentou relação direta com a deficiência da resposta imunológica do hospedeiro.

Palavras chave: Necrose pulpar. Fungos filamentosos. Lesão perirradicular.

ABSTRACT

The purpose of the present study was to evaluate *in vivo*, with specific techniques that isolates the presence of filament fungus in the root canal of teeth with necrotic pulp and periradicular disease, see the relationship between the presence of these fungus and patients with immunological deficiency and carry out a taxonomic study of the fungus isolated. It was fulfilled the culture of 60 root canals of teeth with necrotic pulp and periradicular disease. The patients answered a health questionnaire and signed a term to allow the research. After the absolute isolation and cleaning the operating field the samples were collected using three sterile paper points inserted into the root canal during 1 minute. In an isolated field by two lamps, the collected materials were inoculated in a tube with Saboraud Agar with Cloranfenicol. Nearby the isolated field with lamps it was placed an opened Petri plaque with the same culture material from the tubes with the purpose to verify the perceptiveness of the isolated field (negative control). At the same time it was carried out the positive control group with an opened Petri plaque that was maintained far from the isolated fields. The tubes and the Petri plaque were maintained in atmosphere temperature during seven to fourteen days to observe micelial growth. Those that showed growth were spread on specific environment for microcultivation CYA Agar, Extract of Agar Malt or Agar potato. With the help of an optic microscope the colonies were identified in genre and species. Among the 60 samples collected, 17 showed positive culture for filament fungus, making up a total of 28,3%. The genre *Aspergillus* was isolated, *in situ*, of 7 samples (11,6%), and the species *Aspergillus ustus* was isolated from 3 patients (5%). The *Aspergillus granulosis*, *Aspergillus niger* e o *Aspergillus sydowii* were isolated from 3 patients respectively. The species *Emericella quadriluniata*, sexual form of *Aspergillus*, was isolated from 1 patient. The genre *Penicillium* was isolated, *in situ*, from 4 samples (6,6%), where the species isolated were *Penicillium implicatum*, *Penicillium micsynvisk*, *Penicillium lividum* and *Penicillium citrionigrum*. The genre *Fusarium* was isolated, *in situ*, from 2 samples (3,3%), where the species identified were *Fusarium moniliforme*, *Fusarium melanochorum*, respectively. The species *Aureobasidium pullulans*, *Exophiala jeancelmei*, *Eurotium amstelodame* and *Cladosporium sphaerospermum* were isolated *in situ* from 4 samples. All the samples where it was isolated the filament fungus belonged to patients with the imunolgical response compromised. On the Petri plaques employed at the range of the two lamp, it was not seen micelial growth. Thereby, on the positive control plaques, opened to check the contamination of the environment showed the growth of ambiental fungus that were not compatible with the fungus isolated from the root canal, and did not shor pure culture. It was concluded that root canal with necrotic pulp and periapical disease, can show positive culture for filament fungus and these results were directly related to the deficiency of the immunological response of the hostess.

Keywords: Necrotic pulp. Filament fungus. Periradicular disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema de preparação do material para observação ao microscópio ótico: (A) Tubo de ensaio contendo cultura positiva, (B) remoção de fragmento da colônia, colocação sobre lâmina acrescida de uma gota do corante citoplasmático Lactofenol de Amann com azul-algodão e sobre esta, uma lamínula, (C) para observação ao M.O.	62
Figura 2- Tubo de ensaio apresentando cultura positiva.	76
Figura 3- <i>Aspergillus ustus</i> em meio de Extrato de Malte a 37 ⁰ C – frente.	77
Figura 4 - <i>Aspergillus ustus</i> em meio de Extrato de Malte a 37 ⁰ C – verso.	77
Figura 5- Imagem através de microscópio óptica de <i>Aspergillus ustus</i> .	78
Figura 6- Imagem através de microscópio óptica de <i>Aspergillus ustus</i> .	78
Figura 7- Imagem através de microscópio óptico de <i>Emericella quadriluniata</i> .	79
Figura 8- Imagem através de microscópio óptico de <i>Emericella quadriluniata</i> .	79
Figura 9- <i>Penicillium implicatum</i> em meio de CYA a 37 ⁰ C – frente.	80
Figura 10- <i>Penicillium implicatum</i> em meio de CYA a 37 ⁰ C – verso.	80
Figura 11- Imagem através de microscópio óptico de <i>Exophiala jeanselmei</i> .	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Fungos encontrados e deficiência na resposta imune dos pacientes.

72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Frequência de isolamento de cada gênero de fungo.

75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação entre presença de fungo e comprometimento da resposta imune.	73
Tabela 2- Frequência de isolamento de cada gênero de fungo.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - porcentagem

A. fumigatus- *Aspergillus fumigatus*

A. favus- *Aspergillus favus*

AH26 - cimento obturador

AHPlus - cimento obturador

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

A. niger - *Aspergillus niger*

ATCC – *American Type Culture Collection*

°C - grau centígrado

Ca²⁺ - ions cálcio

CA(OH)₂ - hidróxido de cálcio

C. albicans - *Candida albicans*

cm - centímetro

C. glabrata - *Candida glabrata*

C. guilliermondii - *Candida guilliermondii*

C. parapsilosis - *Candida parapsilosis*

CYA Ágar - meio de cultura Ágar Czapeck

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

EDTA – Ácido Diamino Tetracético

E. faecalis - *Enterococcus faecalis*

G. candidum - *Geotricum candidum*

g - grama

h - hora

HIV+ - Virus da Imunodeficiência Humana

IOC/FIOCRUZ - Instituto Oswaldo Cruz/ Fundação Oswaldo Cruz

PCR – Reação em Cadeia Polimerase

MARS - Substância Morfogenética Auto-reguladora.

MEV - Microscópio Eletrônico de Varredura

M.O - Microscópio Óptico

mg - miligramas

ml - mililitros

mm - milímetros

µm - micrômetros

PA – Pró -Análise

pH - potencial hidrogeniônico

q.s.p. - quantidade suficiente para

PDA - Potato Dextrose Agar

SDS-PAGE – Sulfato Dodecil Sódio - Electroforese em Gel de Poliacrilamida

S. cerevisiae - *Saccharomyces cerevisiae*

sp. - espécie

x - versus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1	A presença de fungos em infecções endodônticas	23
2.2	Vias de acesso e viabilidade dos fungos nos canais radiculares	36
2.3	Características dos Fungos	42
3	PROPOSIÇÃO	53
4	MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1	Material	55
4.2	Métodos	58
4.2.1	<u>Isolamento</u>	58
4.2.2	<u>Exame direto das colônias fúngicas</u>	61
4.2.3	<u>Repique em meio específico</u>	62
4.2.4	<u>Identificação macroscópica</u>	64
4.2.5	<u>Identificação microscópica</u>	65
4.2.6	<u>Identificação e Classificação segundo bibliografia</u>	66
4.2.7	<u>Preservação das linhagens</u>	66
4.2.8	<u>Análise estatística</u>	68
5	RESULTADOS	70
5.1	Cepas isoladas	70
5.2	Relação dos resultados com a resposta imune do hospedeiro	71
5.3	Tratamento estatístico dos dados	73
5.3.1	<u>Estimativa da proporção de presença de fungos nos canais radiculares</u>	73
5.3.2	<u>Teste de Independência</u>	73
5.3.3	<u>Distribuição amostral dos fungos</u>	74
6	DISCUSSÃO	83
7	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS	97
	ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecimento	104
	ANEXO B – Folha de aprovação do Conselho de Ética	105

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Existem, em nosso planeta, aproximadamente 70 mil espécies de fungos já descritas e 1,5 milhões de espécies ainda para serem identificadas e descritas. Por falta de adaptação ao organismo dos mamíferos, a grande maioria se revela incapaz de causar infecção em humanos. A temperatura interna, próxima a 37°C, é um eficiente mecanismo de defesa que nos protege da infecção por fungos não-termotolerantes. Entretanto, cerca de 200 espécies fúngicas conseguiram evolutivamente adaptar-se e sobreviver no ambiente hostil de nosso organismo sobrepujando diversos mecanismos de defesa, como fagocitose, sistema do complemento, imunidade celular e humoral, etc. Os fungos que mais se adaptaram e causam infecções em indivíduos aparentemente saudáveis são os dimórficos, como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, entre outros. Outros agentes de infecções fúngicas são oportunistas como as leveduras e os fungos filamentosos. Estes causam em hospedeiros imunocomprometidos as infecções invasivas que, durante as últimas duas décadas, vêm apresentando incidência significativa, com impacto notável na morbimortalidade em indivíduos suscetíveis (TELLES⁶⁹, 2004).

A biodiversidade da microbiota em dentes com necrose pulpar e lesão periapical, tem sido evidenciada nas últimas décadas por diversos autores, que buscam investigar a especificidade dos microrganismos que invadem e infectam os canais radiculares e o grau de patogenicidade dos organismos isolados em diferentes táxons. Embora as bactérias tenham sido as mais estudadas, os fungos também estão associados com as infecções de canais radiculares (BAUMGARTNER², 2000).

Os fungos são microrganismos eucariotes que podem fazer parte das infecções endodônticas e desse modo podem participar da etiologia de doenças periapicais. Possuem

atributos de virulência incluindo adaptação a condições ambientais diversas, adesão a diferentes superfícies, produção de enzimas hidrolíticas, transição morfológica, formação de biofilme, capacidade de invadir e ativar a resposta imune do hospedeiro podendo ter papel na patogenicidade da doença periapical (SIQUEIRA e SEN⁶³, 2004).

A *Candida albicans* é a espécie de fungo mais isolada dos canais infectados, e esta espécie foi considerada um microrganismo dentinofílico devido a sua afinidade de invadir a dentina (SEN *et al.*⁵³, 1997).

Os fungos filamentosos assim como as leveduras são considerados oportunistas (MARSH e MARTIN³¹, 1999). As infecções por fungos filamentosos invasores ocorrem quase exclusivamente em pacientes imunodeprimidos ou que apresentem condições basais propícias a infecção e desenvolvimento destes agentes. Portanto, o aumento de sua incidência acompanha o aumento da população de imunodeprimidos, incluindo pacientes com doenças hematológicas, AIDS, endocrinopatias, usuários de antibiótico de amplo espectro e corticosteróide em altas doses (TELLES⁶⁹, 2004). De acordo com DUNCAN e PITT FORD¹¹ (2006) os pacientes fumantes também podem apresentar alterações na resposta imune.

De acordo com relatos de SIQUEIRA *et al.*⁵⁹ (2002) as espécies mais comuns de fungos patogênicos, com caráter oportunista pertencem aos gêneros *Candida* e *Aspergillus*. Porém não existem relatos na literatura sobre a presença de fungos filamentosos infectando os canais radiculares apesar de serem detectados em infecções em outros locais do organismo.

Dessa maneira, assim como as leveduras são capazes de desenvolverem no interior dos canais radiculares, com necrose pulpar e lesão periapical, os fungos filamentosos possuem características de virulência que os capacitam de sobreviver neste ambiente, portanto uma investigação neste campo seria de grande relevância. Paralelamente, relacionar sua presença a pacientes com resposta imunológica comprometida, seria conveniente, uma vez que estes são considerados oportunistas.

Se comprovada sua presença, a classificação taxonômica dos organismos isolados é de fundamental importância, pois microrganismos diferem na susceptibilidade ao tratamento, portanto a identificação das espécies envolvidas poderá ser condutora do sucesso do tratamento endodôntico.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A presença de fungos em infecções endodônticas

Os primeiros relatos sobre a presença de fungos em infecções endodônticas foram descritos por GROSSMAN¹⁹ (1952). De acordo com este autor, 17% das infecções endodônticas contém fungos do gênero *Candida*.

SLACK⁶⁴ (1953) evidenciou a presença de leveduras num percentual de 5%, em canais radiculares com necrose pulpar e lesão periapical.

HOBSON²³ (1959), através da análise da microbiota dos canais radiculares de dentes infectados, constatou que as leveduras da espécie *C. albicans* eram os fungos isolados com maior frequência dos canais infectados, sendo, potencialmente patogênicas.

GROSSMAN¹⁸ (1967) relatou que um dos impedimentos para o sucesso da terapia endodôntica é a presença de fungos cuja eliminação torna-se necessária para restauração da saúde periapical.

NAIR *et al.*³⁸ (1987) observaram através da microscopia óptica e eletrônica de transmissão, 31 lesões de dentes extraídos que apresentavam necrose pulpar e lesão periapical. Foram visualizadas estruturas parecidas com hifas e suas ramificações, demonstrando a participação de fungos na infecção endodôntica primária, isto é, em casos em que não houve tratamento prévio dos canais radiculares. Os autores concluíram que a presença desses microrganismos decorre de invasão oportunista em canais radiculares infectados.

LEGENT *et al.*²⁷ (1989) associaram o desenvolvimento de sinusite maxilar causada por *Aspergillus* a materiais usados na obturação dos canais radiculares. Foram relatados 85 casos de Aspergilose do seio maxilar. Um corpo estranho radiopaco foi observado em 94% dos casos na região do seio maxilar, dos quais 85% foram relacionados a sobre-obturações dos canais radiculares de dentes superiores, particularmente pré-molares e molares. Uma imagem da pasta obturadora dentro do seio maxilar foi demonstrada em 12% dos casos como uma extensão direta do material obturador dos dentes afetados. Os autores alertaram para a importância da composição da pasta obturadora uma vez que a presença de zinco pode estimular o crescimento de *Aspergillus*. Ainda dentro deste mesmo trabalho, os pesquisadores realizaram um estudo *in vitro*, no qual demonstraram que o crescimento do *Aspergillus* pode ser estimulado na presença de baixa concentração de zinco.

De acordo com SAMARANAIKE e MAC FARLANE⁴⁹ (1990), alguns fungos constituem parte da microbiota normal da cavidade bucal e, a menos que estejam presentes fatores predisponentes locais e sistêmicos como pacientes que administram drogas ou medicamentos, portadores de endocrinopatias, desordens metabólicas, imunodeficiência, desordens leucocitárias, tumores malignos, deficiência nutricional, diminuição do fluxo salivar, pobre higiene oral, entre outros, podem viver harmonicamente na cavidade bucal. Portanto, as infecções fúngicas se desenvolvem quando o hospedeiro proporciona condições ambientais e nutricionais essenciais à adesão, ao crescimento e à reprodução destes microrganismos.

Por meio de microscopia óptica e eletrônica de transmissão, NAIR *et al.*³⁹ (1990), examinaram nove dentes tratados endodonticamente e portadores de lesões periapicais persistentes após 4 a 10 anos da conclusão do tratamento. Os dentes foram submetidos à cirurgia pararendodôntica, e os espécimes obtidos, processados para análise microscópica.

Foram observadas bactérias em quatro espécimes e fungos em duas. As bactérias foram encontradas no canal principal, canais acessórios e delta apical, e apresentavam-se ora isoladas, ora em colônias, livres ou aderidas à parede dentinária. Através de microscopia eletrônica, foram visualizadas células simples de forma oval, medindo de 3 – 5µm de diâmetro com parede celular distinta e núcleo denso, caracterizando a presença de fungos. Entretanto o gênero e a espécie destes fungos não foram identificados. De acordo com os autores o conhecimento da microbiota oral é muito limitada pela falta de taxonomista em diferentes táxons e que muitas espécies deixam de ser isoladas e identificadas. Os fungos estavam presentes no canal radicular, no forame apical e na lesão periapical. Sua presença foi atribuída à contaminação durante o tratamento, à possibilidade de diferenças na susceptibilidade da microbiota em infecções do canal radicular, à utilização de diferentes medicações intracanaís empregadas no tratamento endodôntico e, ainda, à administração de antibióticos sistêmicos, o que poderia facilitar o crescimento de fungos.

SEN *et al.*⁵² (1995) observaram, através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), a presença de bactérias e fungos nos canais radiculares e nos túbulos dentinários de dentes extraídos que apresentavam necrose pulpar. Fungos na forma de levedura foram encontrados ao longo das paredes dos canais radiculares, em 40% dos casos como uma célula simples esférica e oval, geralmente com 4 a 6 µm de diâmetro. Formavam densas colônias nos três terços (cervical, médio e apical), separadas ou fixadas às paredes dos canais radiculares por meio de pequenos filamentos que cresciam para fora da célula. Foram detectados crescimentos, na forma de hifas e de embriões.

Ao avaliar, microbiologicamente, bacteremias ocorridas após o tratamento endodôntico, DEBELIAN *et al.*⁸ (1995) encontraram um caso em que *Saccharomyces cerevisiae* foi isolada no canal radicular e na corrente sanguínea. Espécie mais comum do gênero *Saccharomyces*, esse microrganismo é um fungo geralmente encontrado na mucosa

oral, no pulmão, no baço e no intestino delgado, estando associado a infecções em pacientes imunocomprometidos, submetidos à quimioterapia, aids, alcoólatras e a outras condições que afetam a resposta imune.

Através da microscopia eletrônica de varredura, LOMÇALI *et al.*²⁸ (1996) verificaram a superfície externa do cimento radicular apical de dentes com lesão periapical. Foram observados os 3 milímetros da porção apical de 5 pré-molares e 3 molares extraídos, totalizando 17 raízes. Os autores relataram a presença de leveduras em dois espécimes, aderidas por microfilamentos a um tecido fibrilar na base da lacuna de reabsorção.

WALTIMO *et al.*⁷¹ (1997) analisaram 967 amostras colhidas de dentes portadores de lesão periapical persistente na população da Finlândia. Microrganismos foram isolados em 692 dessas amostras e em 275 não foi detectada a presença de microrganismos. Em 47 amostras foram isoladas leveduras (7% das culturas positivas). Foram identificadas biomorfológicamente 20 cepas de leveduras. Todos os isolados, exceto o *Geotrichum candidum*, pertenciam ao gênero *Candida*, sendo a espécie mais comum a *C. albicans*. Também foram isoladas as espécies: *Candida guilhermimondii*, *Candida glabrata*, *Candida inconspícua*. Algumas culturas de leveduras apresentavam-se puras (6 amostras), entretanto 41 amostras estavam associadas com bactérias. As bactérias associadas eram Gram-positivas facultativas, sendo as mais comuns *Streptococcus* alfa hemolíticos, presentes em 31 amostras. Bactérias anaeróbicas foram detectadas nas outras 10 amostras, espécies Gram-positivas como *Peptostreptococcus* e Gram-negativas como *Fusobacterium nucleatum*. Os autores concluíram que o isolamento de leveduras em culturas puras pode ter um papel importante nos casos de periodontites persistentes após o tratamento endodôntico convencional.

SUNDQVIST *et al.*⁶⁷ (1998) apreciaram a microbiota de dentes nos quais a terapia endodôntica havia falhado e correlacionaram o tipo de microrganismo presente com o resultado do novo tratamento. Foram selecionados 54 dentes com canais tratados e presença

de lesão periapical. Após a remoção do material obturador, a microbiota foi analisada e os dentes retratados e preservados por até 5 anos. Os autores observaram que a microbiota era composta de organismos predominantemente Gram-positivos, sendo que os isolados mais freqüentes foram os *Enterococcus* da espécie *faecalis*. A taxa total de sucesso após retratamento foi de 74%. A presença de *C. albicans* foi observada em duas culturas sendo considerada pelos autores como um possível causador de infecções persistentes.

MOLANDER *et al.*³⁴ (1998) pesquisaram a condição microbiológica, quatro anos depois de realizadas as obturações, de 100 dentes, nos quais radiograficamente se verificava a presença de lesão periapical, e de 20 dentes, que seriam submetidos a retratamento, porém sem alteração periapical associada. A identificação microbiana foi realizada pela análise de micromorfologia, morfologia da colônia, testes físicos e bioquímicos e cromatografia de gás líquido. O crescimento microbiano foi classificado como muito esparso, esparso, moderado, pesado e muito pesado. A presença de fungos foi observada em 3% dos casos com lesões periapicais e em 10% dos casos sem lesões periapicais. Em 85% dos casos, apenas uma ou duas espécies microbianas foram isoladas por canal. Em 69% dos casos, a microbiota predominante era de anaeróbios facultativos. Essas observações quantitativas e qualitativas demonstram que a microbiota de canais radiculares obturados difere da encontrada em dentes com necrose pulpar.

ASSED *et al.*¹ (2000), através de revisão da literatura, concluíram que em casos de dentes com necrose pulpar e lesão periapical submetidos a tratamento endodôntico em que não foi observado o reparo dos tecidos periapicais, verificou-se a presença de fungos isolados ou associados a outros microrganismos. Os autores alertaram que os fungos são capazes de se disseminar via corrente sanguínea, caracterizando um quadro de fungemia. Portanto, a profilaxia contra possíveis infecções fúngicas deve ser aplicada em pacientes sistemicamente comprometidos. Os fungos são capazes de se reproduzir no sistema de canais radiculares e de

invadir os túbulos dentinários, na forma de blastosporos, pseudo-hifas ou hifas verdadeiras. De acordo com os autores atualmente, deve ser dada atenção especial à utilização de medicamentos específicos no tratamento das infecções endodônticas com envolvimento de fungos.

BAUMGARTNER *et al.*² (2000) avaliaram a presença de *C. albicans* usando o método de PCR em canais radiculares infectados e em aspirações de celulites e abscessos de origem endodôntica. Foram usados primers específicos para *C. albicans* para exame de 24 amostras de canais infectados e 19 aspirações de infecções periapicais de origem endodôntica. Sua presença foi detectada em 5 das 24 amostras tomadas dos canais, mas nenhuma foi detectada das aspirações periapicais.

PECIULIENICE *et al.*⁴¹ (2001) realizaram um estudo objetivando determinar a ocorrência e o papel dos fungos, bactérias entéricas e espécies de *Enterococcus* em dentes com canais tratados e associados à infecção periapical crônica. Foram coletadas 40 amostras, 33 apresentaram culturas positivas. Os fungos da espécie *C. albicans* foram isolados de seis dentes, caracterizando uma prevalência de 18% dos casos, sendo que em três amostras estava associado ao *Enterococcus faecalis*. Os autores concluíram haver uma elevada prevalência de fungos e bactérias entéricas em dentes tratados endodonticamente com presença de lesão periapical, porém não correlacionaram o número de microrganismos presentes no canal radicular ao tamanho da lesão periapical.

LANA *et al.*²⁵ (2001) pesquisaram os agentes microbianos envolvidos em infecções endodônticas empregando técnicas específicas de anaerobiose. Neste estudo, foi realizada a análise microbiológica de 31 canais com necrose pulpar antes e depois da instrumentação. Além das bactérias anaeróbias estritas e facultativas, 2 fungos foram isolados. Os gêneros isolados com mais frequência foram: *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* e *Peptostreptococcus* para as bactérias e o *Candida* e o

Saccharomyces para fungos. Mesmo depois da instrumentação e do uso de Ca(OH)_2 , anaeróbios facultativos foram detectados em dois e fungos em três canais radiculares respectivamente. No final do tratamento endodôntico foram isolados bactérias anaeróbias facultativas de cinco e fungos de um canal radicular. Os autores concluíram que canais radiculares com necrose pulpar apresentam infecções polimicrobianas, envolvendo principalmente bactérias anaeróbias, podendo conter também fungos, e que a infecção pode persistir após o tratamento endodôntico.

Com a finalidade de determinar a microbiota de dentes nos quais o tratamento endodôntico falhou, HANCOCK *et al.*²⁰ em (2001) pesquisaram uma população norte-americana. Os resultados foram comparados aos resultados previamente obtidos em estudos realizados na população da Escandinávia. Foram utilizados neste estudo 54 dentes tratados endodonticamente, que apresentavam lesão periapical persistente. Após a remoção do material obturador, foram colhidas amostras dos canais radiculares através de cone de papel. Das 54 amostras, 34 apresentaram presença de microrganismos, sendo detectada entre os isolados uma cepa de *C. albicans*.

EGAN *et al.*¹² (2002) cotejaram a prevalência e a diversidade de leveduras existentes simultaneamente na saliva e no canal radicular de mesmos indivíduos. Desta forma, observaram uma prevalência de 32% de leveduras na saliva enquanto que em relação aos canais radiculares, esta foi de 10%. A *C. albicans* e a *Rhodotorula mucilaginosa* foram as espécies mais comumente encontradas simultaneamente na saliva e nos canais radiculares, com uma ocorrência maior destes isolados microbianos a partir de canais radiculares tratados endodonticamente.

Através de uma revisão da literatura sobre os conceitos e paradigmas das infecções endodônticas, SIQUEIRA JR.⁵⁸ (2002) discorreu sobre a presença de fungos nos canais

radiculares. Citando a presença do gênero *Candida* em infecções endodônticas, principalmente, nos casos de infecções secundárias ou persistentes. O autor também dissertou sobre fatores de virulência, resposta do hospedeiro e sobre a susceptibilidade do hospedeiro a infecções e falhas no tratamento endodôntico, concluindo que entre as causas que aumentam a susceptibilidade a infecções, a deficiência de resposta imune é um dos fatores de maior significado. Pode influenciar na resposta do hospedeiro a infecções: deficiência nutricional, fatores hormonais, estresse, AIDS, uso de drogas imunossupressoras, doenças debilitantes como diabetes e câncer.

SIQUEIRA JR. *et al.*⁵⁹ (2002a) estimaram a capacidade de colonização da dentina radicular por cinco espécies de fungos. Raízes de dentes bovinos foram infectadas com as seguintes espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *S. cerevisiae*. Após 14 dias, as secções foram preparadas e examinadas sob o microscópio eletrônico. A *C. albicans* colonizou a maioria dos espécimes demonstrando diferentes padrões de infecção da dentina: em alguns espécimes, a colonização da superfície dentinária foi rápida, enquanto nos túbulos dentinários nenhuma penetração foi observada; em outros espécimes, algumas áreas das paredes do canal radicular foram cobertas por colônias de fungos e alguns túbulos dentinários infectados pesadamente. As outras quatro espécies de fungo apresentaram discreta ou nenhuma colonização da dentina radicular. Os resultados sugeriram que a *C. albicans* possui habilidade de colonizar a dentina, e as outras quatro espécies não. De acordo com os autores estes achados podem ajudar a explicar porque a *C. albicans* é a espécie de fungo isolada com mais frequência em infecções endodônticas.

Uma investigação a respeito da microbiota dos canais radiculares, com infecção endodôntica primária, associada à lesão periapical, foi realizada por SIQUEIRA JR. *et al.*⁶⁰ (2002b), através de microscopia eletrônica. Após extração, 15 dentes com cárie extensa e

lesão periapical de tamanho variado, foram avaliados quanto ao padrão de colonização microbiana. Bactérias foram visualizadas em todas as amostras, e em 1 amostra foi evidenciada a presença de fungo associado à bactéria.

SIQUEIRA JR. *et al.*⁶¹ (2002c) identificaram a prevalência e seleção dos patógenos nas infecções endodônticas através do método reação em cadeia polimerase (PCR). Foram selecionadas 91 amostras de dentes com infecção endodôntica associada à lesão periapical, inclusive casos de abscesso. Fungos estavam presentes em somente uma amostra dentre as 50 amostras verificadas, representando um percentual de 2%. Os autores concluíram que os fungos são raramente encontrados em infecções primárias, sendo considerados patógenos oportunistas que causam infecção secundária após mudanças no ecossistema dos canais radiculares que permitem seu crescimento. Devido a este fato, são encontrados associados a infecções persistentes e/ou secundárias do canal radicular, incluindo casos de lesões refratárias.

SUNDE *et al.*⁶⁶ (2002) avaliaram a microbiota de 36 dentes portadores de lesão periapical refratária. Após a coleta cirúrgica, processamento e cultura do material apical, os autores observaram 148 amostras microbianas totalizando 67 espécies diferentes, sendo que a presença de *C. albicans* foi observada em 5,6% das amostras analisadas.

PINHEIRO *et al.*⁴² (2003) investigaram microrganismos associados a canais radiculares tratados endodonticamente com lesão periapical persistente e procuraram relacionar as espécies encontradas com os sinais clínicos. Foram analisados 60 dentes dos quais o isolamento e caracterização das espécies envolvidas foram realizados através de técnicas microbiológicas avançadas de anaerobiose. O crescimento microbiano não foi observado em 9 canais (15%), 28 casos (46,7%) apresentaram um único microrganismo, sendo que em 18 canais o *E. faecalis* era o único microrganismo isolado, 8 (13,3%)

apresentavam duas espécies e 15 (25%) eram infecções polimicrobianas. Os autores relataram que 57,4% dos isolados eram espécies anaeróbias facultativas, 83,3% Gram-positivas. O *E. faecalis* foi a espécie isolada com mais frequência e a *C. albicans* foi encontrada em 2 culturas. Os autores observaram uma relação significativa entre dentes com coroas inadequadamente seladas e a prevalência de fungos.

WALTIMO *et al.*⁷² (2003a) examinaram a prevalência de *C. albicans* em granulomas periapicais removidos cirurgicamente de lesões resistentes a terapia endodôntica. Foram analisadas neste estudo 103 amostras submetidas à análise por meio de testes moleculares (PCR), histológicos e imuno-histoquímicos. Concluíram que não foi possível observar a presença de *C. albicans* nos granulomas periapicais estudados.

Através de revisão da literatura, a respeito da incidência de fungos nos canais radiculares, WALTIMO *et al.*⁷³ (2003b) relataram que os fungos podem ser isolados em aproximadamente 5 a 20% dos canais infectados, em culturas puras ou associados a bactérias. Quase todos fungos isolados pertencem ao gênero *Candida*, e a espécie predominante é a *C. albicans*. O fenótipo e genótipo dos isolados dos canais radiculares são similares aos isolados de outros sítios orais. A *C. albicans* expressa diversos fatores de virulência que são capazes de infectar o complexo dentino-polpar e os túbulos dentinários, causando uma resposta inflamatória em torno do ápice radicular, que sugere seu papel de patogenicidade na formação da lesão periapical. Os autores alertaram para o fato de que os fungos são associados a infecções persistentes do canal radicular, podendo ser devido à resistência da *Candida* ao hidróxido de cálcio, medicação tópica geralmente empregada durante o tratamento endodôntico.

SIQUEIRA JR. e SEN⁶³ (2004) investigaram os atributos de virulência dos fungos através dos quais estes seriam capazes de desempenhar um importante papel nas infecções endodônticas podendo participar na etiologia da doença periapical. Os autores concluíram que

os fungos possuem fatores de virulência relevantes e que as espécies mais comuns de fungos patogênicos, com caráter oportunista pertencem aos gêneros *Candida* e *Aspergillus*. Ainda de acordo com os autores os fungos são encontrados ocasionalmente em infecções primárias dos canais radiculares, mas parecem ocorrer mais freqüentemente nos canais com tratamento endodôntico falho, sendo a *C. albicans* a espécie mais encontrada. Esta espécie possui afinidade pela dentina, habilidade de invadir túbulos dentinários e capacidade de resistir à ação do hidróxido de cálcio, que é o medicamento empregado com maior freqüência durante o tratamento endodôntico, o que pode ser um fator de relevância quanto à associação da presença de fungos a casos de lesões persistentes.

Os aspectos clínicos, relacionados às infecções endodônticas causadas por fungos, foram pesquisados por WALTIMO *et al.*⁷⁴ (2004). Segundo este estudo, os fungos podem ser detectados em 7-18% dos canais radiculares infectados. São geralmente associados a casos persistentes de periodontite apical, mas podem também serem isolados de infecções primárias. Sua proporção relativa à flora dos canais radiculares infectados é baixa, em torno de 1%. Conseqüentemente, sua detecção através de métodos microbiológicos convencionais pode ser difícil. Entretanto através de métodos biológicos moleculares pode ocasionalmente ocorrer resultados falso-positivos. A *C. albicans* é a espécie mais isolada e encontra-se tipicamente junto com bactérias Gram-positivas, tais como *Streptococcus*, mas pode ser também isolada em cultura pura, o que é uma indicação de sua patogenicidade. Uma variedade de fatores de virulência permite a *C. albicans* aderir e penetrar na dentina, além de possuir tolerância a condições ecológicas difíceis, incluindo alcalinidade elevada. O hidróxido de cálcio geralmente não é eficiente na destruição dos fungos orais *in vitro*, e *in vivo* sua eficiência não é conhecida.

SIQUEIRA JR. e RÔÇAS⁶² (2004) realizaram uma investigação através do método PCR da microbiota dos canais radiculares com lesão periapical persistente. Foram submetidos

ao exame 22 canais radiculares. O *E. faecalis* foi detectado em 77% das amostras e a *C. albicans* foi isolada em 9% dos casos.

Através de microscopia eletrônica de varredura, FERREIRA *et al.*¹⁴ (2004), visualizaram a porção apical de um dente, portador de lesão periapical persistente, submetido ao tratamento cirúrgico. Os autores verificaram que, associados ao forame apical podiam-se observar formas fúngicas isoladas ou acompanhadas de cocos circundando o material obturador extravasado e que as lacunas de reabsorção dentinárias e a dentina próxima à região estavam recobertas por um material semelhante a uma substância polimérica extracelular. Estas observações atentam para a possível capacidade de sobrevivência de leveduras na superfície externa radicular.

De acordo com SIDRIM e ROCHA⁵⁷ (2004) a Aspergilose invasiva acomete, especialmente, o seio da face de pacientes imunossuprimidos. O prognóstico é desfavorável, sobretudo, pela capacidade da infecção de destruir a base do crânio e órbita ocular. Entretanto, um quadro mais comum de infecção aspergilar dos seios paranasais é a forma localizada. Essa infecção acomete principalmente os seios maxilares de pacientes que apresentam processo dentário, como granuloma apical e fístula bucossinusal. Os fungos mais freqüentemente implicados neste quadro são da espécie *Aspergillus fumigatus*, seguido do *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*.

FERRARI e BOMBANA¹³ (2005) estimaram o efeito dos procedimentos endodônticos sobre *Enterococcus*, bactérias entéricas e fungos em dentes com infecção endodôntica primária. As amostras foram coletadas antes e após a instrumentação dos canais radiculares. Microrganismos foram isolados de 92% das amostras depois do acesso, 22% eram *Enterococcus*, bactérias entéricas ou fungos. Logo após a preparação biomecânica dos canais estas espécies não foram detectadas. Após 7 dias, 100% dos canais continham microrganismos, 52% eram *Enterococcus*, bactérias entéricas e fungos. Entretanto após uso

de medicação intracanal com Paramonoclofenol, Rinosoro e Propilenoglicol durante 7 dias somente os *Enterococcus* ainda foram isolados. Os autores concluíram que *Enterococcus*, bactérias entéricas e fungos estão presentes em infecções endodônticas primárias e que o uso de medicação intracanal (Paramonoclofenol, Rinosoro e Propilenoglicol) foi capaz de debelar os fungos e bactérias entéricas não sendo, entretanto, capaz de destruir os *Enterococcus*.

MENSI *et al.*³² (2007) realizaram um estudo tendo como objetivo determinar se a presença de tratamento endodôntico em molares e pré-molares era um fator de risco para o desenvolvimento de sinusite maxilar causada por fungo. Foram avaliados pacientes com sinusite admitidos no Departamento de Otorrinolaringologia na Universidade de Bríxia entre janeiro de 1990 a abril de 2005. Dos 102 pacientes, 91(89,2%) tinham tratamento endodôntico. Os autores concluíram que o tratamento endodôntico nos dentes superiores, com íntima relação com o seio maxilar, é fator de risco forte para o desenvolvimento de sinusite maxilar causada por fungo.

CHUGAL *et al.*⁶ (2007) avaliaram a presença de fungos nos canais radiculares de pacientes com necrose pulpar e lesão periapical. Uma metodologia foi proposta pelos autores a fim de evitar resultados falso-positivos, uma vez que a *Candida* é encontrada na flora oral. Foram selecionados para este estudo pacientes HIV+/AIDS e HIV-(grupo controle). Após o isolamento absoluto, foi efetuada uma coleta para identificar fungos aderidos à superfície do dente. Realizada a desinfecção da superfície do dente outra amostra foi coletada. Após o acesso ao canal radicular, uma nova amostra foi coletada do seu interior. A *Candida* estava presente na superfície do dente de 37% dos pacientes HIV-, antes da desinfecção, e nenhuma foi encontrada no interior dos canais radiculares. Entretanto a *Candida* que estava presente na superfície dos dentes dos pacientes HIV+/AIDS foi totalmente eliminada após a desinfecção, porém sua presença foi detectada no interior dos canais radiculares. Os autores salientaram que as espécies coletadas do interior dos canais radiculares eram as mesmas encontradas

aderidas nas superfícies dos dentes antes da desinfecção. Esta metodologia foi capaz de assegurar que as espécies de *Candida* recuperadas dos canais radiculares não eram por contaminação durante a coleta do material. Os resultados indicaram que a *Candida* pode ter um papel importante na infecção endodôntica de pacientes HIV+/AIDS.

2.2 Vias de acesso e viabilidade dos fungos nos canais radiculares

MACDONALD *et al.*²⁹ (1957) isolaram leveduras de dentes com coroa intacta, portadores de necrose pulpar e lesão periapical e histórico de traumatismo dentário.

SEVILLA e ODDS⁵⁵ (1986) alertaram para a possibilidade das leveduras, assim como outros microrganismos, penetrarem através dos túbulos dentinários.

NAIR³⁸ (1987) observou, pela microscopia óptica e eletrônica de transmissão, 31 lesões de dentes extraídos que apresentavam necrose pulpar e lesão periapical. Em casos raros, foram observadas estruturas parecidas com hifas e suas ramificações, sugestivas da presença de fungos. Segundo o autor a presença desses microrganismos decorreria de invasão oportunista em canais radiculares infectados. Concluindo que, apesar de estar relacionada principalmente com as lesões refratárias ou resistentes ao tratamento, a participação de fungos na infecção endodôntica pode ocorrer em casos em que não houve tratamento.

De acordo com SHEPHERD⁵⁶ (1992), a predominância da levedura da espécie *C. albicans* na maioria dos isolados é devido a fazerem, em mais de 80% das pessoas, parte da flora da cavidade oral, sendo a espécie a de maior virulência.

NAJZAR-FLEGER *et al.*³⁷ (1992) relataram que as leveduras podem invadir a polpa dentária e chegar aos canais radiculares causando infecções endodônticas através de dentes cariados.

De acordo com TEN CATE⁷⁰ (1994) a medida dos túbulos dentinários é de aproximadamente 2,5 µm de diâmetro perto da polpa, 1,2 µm na região mediana da dentina e 0,9µm perto da junção cimento dentinária.

HOOG e GUARRO²⁴ (1995) relataram através de estudos que o diâmetro de uma bactéria, dependendo da espécie, é entre 0,3-0,9µm, os blastoconídios das leveduras medem entre 3-8 x 2-7µm, porém o tamanho das hifas, em meio de cultura pode chegar ao diâmetro 1,9-2,6µm.

WHITTAKER *et al.*⁷⁵ (1996) demonstraram que a cavidade oral abriga uma diversidade de micro-ambientes e superfícies às quais as células microbianas podem aderir, incluindo dentes, mucosa epitelial, superfícies protéticas, formadas simplesmente a partir da ligação de microrganismos comensais da cavidade oral a biofilmes já existentes, aumentando assim a complexidade desta estrutura.

DEBELIAN *et al.*⁹ (1997) compararam a espécie fúngica *S. cerevisiae*, isolada do canal radicular de um paciente, com outras seis espécies de *S. cerevisiae*, isoladas do sangue, do trato respiratório, da vagina, da garganta e de cepa padrão (ATCC – 18.824). Foram realizados testes bioquímicos, teste de susceptibilidade a antifúngicos, extração de proteínas celulares, SDS-PAGE e ribotipagem. Comprovaram que a mesma espécie de *Saccharomyces cerevisiae* isolada do canal radicular foi encontrada no sangue do paciente, sendo a ribotipagem o melhor método para sua identificação. Os autores concluíram que o tratamento de canal radicular pode causar fungemia e em pacientes comprometidos provocar sérias conseqüências.

DEBELIAN *et al.*¹⁰ (1998) examinaram a incidência de bacteremia e fungemia durante e após tratamento endodôntico. Foram colhidas amostras de microrganismos de 26 pacientes com lesão periapical assintomática. Uma amostra do sangue dos pacientes foi colhida 10 minutos após a terapia endodôntica. Através do mapeamento de DNA

(ribotipagem), pôde-se comprovar que os microrganismos identificados no canal radicular apresentavam as mesmas características genéticas dos encontrados na corrente sangüínea dos pacientes avaliados. Os autores concluíram que os microrganismos podem ganhar a corrente sangüínea via procedimento endodôntico, circular pelo corpo e ser eliminados pelo sistema reticulo-endotelial em poucos minutos, sem causar sintomatologia clínica, caracterizando-se como uma bacteremia ou fungemia transitória. Entretanto, em pacientes comprometidos, HIV positivos, submetidos a tratamento com corticosteróide, terapia citotóxica, irradiação, ou subnutridos, entre outros, a bacteremia e a fungemia podem levar a infecções no endocárdio, no miocárdio, ao infarto cerebral e a outras doenças de origem não oral.

WALTIMO *et al.*⁷¹ (1997) avaliaram microbiologicamente 967 dentes com lesões periapicais resistentes ao tratamento endodôntico. A identificação microbiana foi verificada pelas características de crescimento da colônia em meio de cultura, por sua morfologia e aparência celular, pela formação de aminas vasoativas, antibiograma e pela fermentação de carboidratos. Microrganismos foram encontrados em 692 casos. Em 7% deles, fungos foram isolados do canal radicular, e, em 13%, isolados de culturas puras, o que pode indicar a possibilidade de esses microrganismos serem capazes de manter a periodontite apical. Das 48 espécies de fungos encontradas, 80% eram *C. albicans*. Quando houve associações, em 66% dos casos ela havia ocorrido com *Streptococcus sp.*(Gram-positivo facultativo). Os autores questionaram a via de contaminação da polpa por fungos, relatando que o diâmetro destes, seja na forma de blastosporos seja na de hifas, seria grande demais para possibilitar sua invasão via túbulos dentinários, porém concluíram que a principal via de entrada de bactérias e leveduras para o interior dos canais radiculares é através da dentina pelos túbulos dentinários.

SEN *et al.*⁵³ (1997a) estudaram, através de microscopia eletrônica de varredura, a topografia da parede dentinária do canal radicular infectada experimentalmente por *C.*

albicans e o modelo de crescimento desse microrganismo na dentina radicular. Em relação ao modelo de crescimento de *C. albicans* no canal radicular, os autores observaram células únicas (leveduras) migrando para dentro dos túbulos dentinários, mostrando evidências de reprodução (formação de embriões). Verificaram que as diferentes formas de fungos fixaram-se na parede do canal radicular pela projeção de microfibrilas vindas da membrana celular. Formas de hifas, pseudo-hifas e blastosporos fixaram-se em estruturas membranosas em que havia remanescentes de tecido mole. A forma de hifa foi dominante nos espécimes após cinco dias, demonstrando penetração para o interior dos túbulos dentinários; esta invasão foi creditada à natureza tubular da dentina. Na forma de hifa, a *C. albicans* possui um fator regulador de crescimento, a MARS - Substância Morfogênica Autoreguladora. A presença de íons Ca^{++} tem papel crítico no controle desse fator regulador da morfogênese. Quando esse microrganismo degrada o colágeno, há liberação de minerais, incluindo o Ca^{++} . O aumento da concentração de cálcio pode alterar a morfologia de crescimento do microrganismo, o que pode indicar que ele utiliza-se da dentina como fonte de nutrição. Assim sendo, *Candida sp.* pode ser considerado um microrganismo dentinofílico, diante de sua capacidade de crescer na dentina, onde há ausência de fluidos tissulares ricos em substratos, podendo usar a dentina como fonte de nutriente durante longo período.

Em um estudo subsequente, SEN *et al.*⁵⁴ (1997b), monitorando a colonização da *C. albicans* na dentina com e sem a camada de *smear layer*, observaram que na presença de *smear layer* havia formação de biofilme. Na ausência desta camada, uma rede de pseudo-hifas estava presente na parede dentinária, tendendo sempre a penetrar nos túbulos dentinários, porém não havia formação de biofilme. Os autores concluíram que a presença de *smear layer* favoreceu o crescimento de fungo e que, após o tratamento da dentina com hipoclorito de sódio e EDTA, diminuiu a quantidade de matéria orgânica e inorgânica da dentina o que aparentemente não favoreceu a formação de biofilme pela *C. albicans*.

Utilizando-se de técnicas de cultura anaeróbia sofisticada, SUNDQVIST *et al.*⁶⁷ (1998) demonstraram a microbiota de dentes com lesão periapical persistente ao tratamento endodôntico, submetidos a retratamento. Foram selecionados 54 dentes com canais radiculares tratados há cinco anos e com lesão periapical, visível radiograficamente. Do total de casos avaliados, 24 apresentaram culturas microbiológicas positivas, sendo 19 caracterizados como mono infecções. Dois casos apresentaram *C. albicans*. De acordo com os autores, provavelmente esse microrganismo aparece como um oportunista devido ao desaparecimento ou à remoção de outros microrganismos do canal radicular, já que esses fungos têm a capacidade de crescer no ambiente de baixa quantidade de nutrientes existente nos canais tratados.

Segundo ASSED *et al.*¹ (2000) os fungos são capazes de se disseminar via corrente sangüínea, caracterizando um quadro de fungemia. Portanto, profilaxia contra possíveis infecções fúngicas deve ser aplicada em pacientes sistemicamente comprometidos. Os fungos são capazes de se reproduzir no sistema de canais radiculares e de invadir os túbulos dentinários, na forma de blastosporos, pseudo-hifas ou hifas verdadeiras. Os autores enfatizaram que deve ser dada atenção especial à utilização de medicamentos específicos no tratamento das infecções endodônticas com envolvimento de fungos.

MILETIC *et al.*³³ (2002) avaliaram a infiltração de *C. albicans* em cultura pura e uma associação de bactérias através dos canais radiculares obturados com guta-percha e cimento AH26 ou AHPlus. Foram empregados neste estudo 80 dentes divididos aleatoriamente em dois grupos de 40 dentes, cada um, conforme o cimento obturador empregado. Foram adicionados 10 dentes que serviram como controles negativos e 10 como controles positivos. O *Streptococcus mutans*, *melaninogenico*, *mitis*, *Prevotella* e *Lactobacillus acidophilus* foram colocados nas cavidades de acesso de 20 dentes obturados com o AH26 e 20 obturados com o AHPlus. A *C. albicans* foi colocada nas cavidades de acesso dos outros dentes. O meio de

cultura com microrganismos foi mudado a cada 7 dias. O crescimento de bactérias e fungos foi avaliado a cada 72 h durante um período de 90 dias. A infiltração ocorreu em 47% de todas as amostras. Das amostras obturadas com AH26, 45% apresentaram infiltração bacteriana e 60% infiltração fúngica; nos espécimes obturados com AHPlus, houve infiltração bacteriana em 50% e de fungos em 55%. Não houve diferença estatística significativa entre as amostras testadas, sendo que ambos os cimentos permitiram infiltração de bactérias e fungos, demonstrando *in vitro* a capacidade da *C. albicans* de atravessar a massa obturadora até atingir a porção externa da raiz.

SIQUEIRA JR.⁶² (2004) relatou que fungos constituem uma pequena parte da microbiota da cavidade oral. Uma grande parte desta microbiota é constituída por espécies de *Candida*. A espécie mais comumente detectada na cavidade oral de indivíduos saudáveis e comprometidos é a *C. albicans*. Sua incidência na cavidade oral de indivíduos saudáveis é em torno de 30 a 40% e 95% em pacientes infectados com AIDS. Julga-se que o dorso da língua seja o habitat principal da *C. albicans*, entretanto outros sítios podem ser colonizados secundariamente. Estes sítios incluem mucosa supragengival e subgengival, dentina, raiz e bolsa periodontal. Um grande número de outros fungos tem sido isolado dos canais radiculares, incluindo *C. glabata*, *C. guilhermondii*, *G. candidum* e *S. cerevisae*.

NAIR⁴⁰ (2004) realizou uma revisão detalhada sobre patogenicidade da periodontite apical e das causas de falhas endodônticas. As prováveis vias de infecção dos canais radiculares foram revistas, sendo citadas como principais vias de acesso dos microrganismos aos canais radiculares a cárie, bem como procedimentos clínicos e as fraturas ou fissuras advindas do traumatismo dentário. Sendo que os microrganismos são isolados também dos dentes com polpas necróticas e coroas intactas. Segundo relatos da literatura os dentes podem parecer clinicamente intactos, mas revelar micro-fissuras nos tecidos duros, que são portais de entrada para bactérias. As bactérias do sulco gengival ou das bolsas periodontais também

podem alcançar os canais radiculares de dentes com necrose pulpar através dos túbulos dentinários expostos na superfície cervical da raiz, devido às aberturas no cimento. Pode também haver a contaminação por via anacorética. Porém a exposição da polpa dental à cavidade oral é a rota mais importante da infecção endodôntica. O autor discorreu sobre a presença de fungos, em infecções endodônticas, relatada anteriormente em diversos trabalhos, citando a presença destes microrganismos como um dos fatores que podem levar ao insucesso da terapia endodôntica.

2.3 Características dos Fungos

Durante muito tempo, os fungos foram considerados como vegetais. WHITTAKER *et al.*⁷⁵ (1969) evidenciaram o fato de que os fungos não atendiam a características básicas para permanecerem no reino vegetal e passaram a ser classificados como um reino à parte, o Reino Fungi. De acordo com estes autores os fungos apresentam um conjunto de características próprias, que permitem sua diferenciação das plantas: não sintetizam clorofila, não tem celulose na sua parede celular, exceto alguns fungos aquáticos.

SOLL *et al.*⁶⁵ (1981) demonstraram a influência da presença de zinco no crescimento e fenótipo da *C. albicans*. Segundo os autores, o zinco em baixa concentração pode estimular o crescimento deste fungo.

RIPPON⁴⁷ (1988) estimou que dentre as 100.000 espécies fúngicas descritas, 200 espécies não são consideradas patogênicas para humanos e que menos de 60 espécies estão, constantemente, associadas às infecções humanas. No estudo dos fungos, diferenças na forma e estrutura das colônias e diferentes tipos de técnicas de isolamento, dificultam sua identificação taxonômica. Os padrões de doenças micóticas diferem dos padrões das doenças bacterianas. Poucos são os fungos transmitidos de pessoa a pessoa. As epidemias são raras e

podem, usualmente, ser associadas à exposição a uma fonte comum. As infecções micóticas ocorrem em pessoas com resistência diminuída ou com um sistema imunológico defeituoso, imunocomprometido. Na realidade, como enfatizou este autor, qualquer um que venha a desenvolver uma doença fúngica, a menos que exposto a um contato maciço, é portador de uma deficiência no sistema imunológico.

LEGENT *et al.*²⁷ (1989) realizaram um estudo *in vitro*, no qual, demonstraram que o crescimento do *Aspergillus* pode ser estimulado na presença de baixa concentração de zinco. Os pesquisadores alertaram para a importância da composição da pasta obturadora dos canais radiculares, uma vez que a presença de zinco pode estimular o crescimento de *Aspergillus*.

Conforme SAMARANAIAKE e MAC FARLANE⁴⁹ (1990), os fungos são microrganismos que apresentam núcleo, complexo de Golgi, retículo endoplasmático, vesículas, membrana celular e parede celular espessa com microfibrilas de actina e glicana. A parede celular representa 30% do peso da célula e é composta de b-glicanas, manoproteínas e quitina, carboidratos (80-90%), lipídios (2%) e proteínas (3-6%). A parede celular é importante fator de virulência, pois promove adesão e colonização da célula fúngica, apresenta componentes antigênicos e secreta produtos (hidrolases e toxinas, entre outros). A morfologia varia sob diferentes condições ambientais, incluindo leveduras (blastóporos, blastoconídeo), pseudo-hifas, hifas verdadeiras e clamidósporos. Os principais fatores de virulência dos fungos são: mecanismos de adesão pela parede celular, dimorfismo, germes em forma de tubos, interferência com a fagocitose, defesa imune e complemento, sinergia com bactérias e liberação de fatores moleculares, como hidrolases extracelulares (proteínases, lipases), anafilatoxinas, toxinas, nitrosaminas e metabólitos ácidos.

Baseado em relatos de DAHLÉN e MOLLER⁷ (1992), os fungos crescem em meio com sais, fontes de carbono, nitrogênio e fosfato, sendo capazes de se adaptar a uma grande variedade de temperatura e pH.

De acordo com SHEPHERD⁵⁶ (1992), uma das características das infecções micóticas oportunistas é se instalar quando o hospedeiro apresenta condições e nutrientes essenciais para adesão, crescimento e reprodução do fungo. Assim devem existir fatores locais e/ou sistêmicos que favoreçam seu crescimento. Os fungos são microrganismos heterotróficos e, em sua maioria, aeróbios obrigatórios. No entanto, certos fungos são anaeróbios facultativos, se desenvolvem em ambientes com pouco oxigênio ou mesmo na ausência deste elemento. Podem ter morfologia diferente, segundo as condições nutricionais e a temperatura de seu desenvolvimento. O fenômeno de variação morfológica mais importante em micologia médica é o dimorfismo, que se expressa por um crescimento micelial entre 22° e 28°C e leveduriforme entre 35°C e 37°C. Em geral, essas formas são reversíveis. A fase micelial ou saprofítica é a forma infectante e está presente no solo, nas plantas e no ar; a fase leveduriforme ou parasitaria é encontrada nos tecidos. Os fungos se desenvolvem em meios de cultivo especiais formando colônias de dois tipos: leveduriformes ou filamentosas. As colônias leveduriformes são pastosas ou cremosas, formadas por microrganismos unicelulares que cumprem as funções vegetativas e reprodutivas e as filamentosas podem ser algodonosas, aveludadas ou pulverulentas, formadas por elementos multicelulares, em forma de tubo, denominados hifas.

Segundo HOOG e GUARRO²⁴ (1995), os fungos são seres vivos eucarióticos, com um só núcleo, como as leveduras, ou multinucleados, como se observa entre os fungos filamentosos ou bolores. Seu citoplasma contém mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso.

MOORE-LANDECKER³⁶ (1996) relatou que os fungos vivem em habitat diferentes, bem como em diferentes substratos, podem ser unicelulares, leveduras, ou pluricelulares, filamentosos. Sua disseminação usualmente ocorre pelo ar, podendo também ocorrer através da água, plantas, animais, alimentos entre outros. São microrganismos com três a cinco

micrometros de diâmetro, capazes de se reproduzir sexualmente, assexualmente e parasexualmente. Na fase de célula simples, são chamadas de leveduras e se reproduzem por brotamento, diferente das bactérias, que se reproduzem por divisão. Dessa maneira, uma célula mãe dá origem a uma célula filha, inicialmente de menor tamanho.

De acordo com SEN *et al.*⁵³ (1997), leveduras usualmente não formam micélio, são unicelulares, algumas em condições especiais formam uma fase filamentosa. A *C. albicans* é descrita como um fungo polimórfico, apresenta blastosporos, pseudomicélio, tubo germinativo e clamidósporos; dependendo das condições ambientais, medem aproximadamente 5µm de diâmetro, forma oval e se reproduzem assexuadamente por germinação.

Alguns fatores relacionados ao hospedeiro podem predispor ao crescimento de fungo, tal como imunossupressão, permitindo que estes microrganismos assumam uma condição oportunista através da expressão de diversos fatores de virulência, os quais, segundo SWEET⁶⁸ (1997), incluem aderência, transição morfológica, capacidade de sobreviver em ambientes com variedade de temperatura e pH.

CHAFFIN *et al.*⁵ (1998) relataram que das espécies fúngicas encontradas na cavidade oral, a *C. albicans* é a mais comum. Os autores ressaltaram que *C. albicans* constitui-se em um organismo eucariótico unicelular com característica pleomórficas, isto é, pode variar sua morfologia, tendo a parede celular papel essencial na transição morfológica. Reproduz-se por brotamento na sua forma de levedura, sendo chamada de blastóporo ou blastoconídeo. A produção de tubos germinativos é resultante da forma filamentar de crescimento originando as hifas e conseqüentemente a forma de micélio. A forma de pseudo-hifa ocorre por polarização e alongamento da célula durante o processo de divisão por brotamento, sem que haja a separação da célula mãe. Sob certas condições desfavoráveis de crescimento, a *C. albicans*

pode ainda apresentar-se na forma de esporo arredondado com espessa parede celular denominado clamidósporo. A forma de hifa tem maior capacidade de invadir os tecidos e maior patogenicidade, por ser mais hidrofóbica que a forma de blastóporo, facilitando a penetração em diferentes superfícies e tecidos.

Segundo MARSH e MARTIN³¹ (1999), os fungos produzem enzimas como lipases, invertases, lactases, proteinases, amilases, que hidrolisam o substrato tornando-o assimilável através de mecanismos de transporte ativo e passivo. Alguns substratos podem induzir a formação de enzimas degradativas; há fungos que hidrolisam substâncias orgânicas, inclusive osso. Muitas espécies fúngicas podem se desenvolver em meios mínimos, contendo amônia ou nitritos como fontes de nitrogênio. As substâncias orgânicas, de preferência, são carboidratos simples como D-glicose e sais minerais como sulfatos e fosfatos. Oligoelementos como ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio e cálcio são exigidos em pequenas quantidades.

Conforme relatos de MADIGAN *et al.*³⁰ (2000), o micélio que se desenvolve no interior do substrato é chamado de micélio vegetativo e pode funcionar também como elemento de sustentação e de absorção de nutrientes. O micélio que se projeta na superfície e cresce acima do meio de cultivo é o micélio aéreo. Quando o micélio aéreo se diferencia para sustentar os corpos de frutificação ou propágulos, constitui o micélio reprodutivo. Os propágulos ou órgãos de disseminação dos fungos são classificados, segundo sua origem, em externos e internos, sexuados e assexuados. Embora o micélio vegetativo não tenha especificamente funções de reprodução, alguns fragmentos de hifa podem se desprender do micélio vegetativo e cumprir funções de propagação, uma vez que as células fúngicas são autônomas. Estes elementos são denominados de taloconídios e compreendem os: blastoconídios, artroconídios, clamidoconídios. Os blastoconídeos, também denominados gêmulas, são comuns nas leveduras e se derivam por brotamento da célula-mãe. Às vezes, os

blastoconídeos permanecem ligados à célula-mãe, formando cadeias, as pseudo-hifas, cujo conjunto é o pseudomicélio. Os arthroconídios são formados por fragmentação das hifas em segmentos retangulares. São encontrados nos fungos do gênero *Geotrichum*, em *Coccidioides immitis* e em *dermatófitos*. Os clamidoconídios têm função de resistência, semelhante à dos esporos bacterianos. São células geralmente arredondadas, de volume aumentado, com paredes duplas e espessas, nas quais se concentra o citoplasma. Sua localização no micélio pode ser apical ou intercalar. Formam-se em condições ambientais adversas, como escassez de nutrientes, de água e temperaturas não favoráveis ao desenvolvimento fúngico. Entre outras estruturas de resistência, devem ser mencionados os esclerócios ou esclerotos, que são corpúsculos duros e parenquimatosos, formados pelo conjunto de hifas e que permanecem em estado de dormência, até o aparecimento de condições adequadas para sua germinação.

De acordo com CALDERONE e FONZI⁴ (2001), o pH mais favorável ao desenvolvimento dos fungos esta entre 5 e 7, entretanto a maioria dos fungos tolera amplas variações de pH. Os fungos filamentosos podem crescer na faixa entre 1,5 e 11, mas as leveduras não toleram pH alcalino. Muitas vezes, a pigmentação dos fungos está relacionada com o pH do substrato. Os meios com pH entre 5 e 6, com elevadas concentrações de açúcar, alta pressão osmótica, favorecem o desenvolvimento dos fungos nas porções em contato com o ar.

FISCHER e COOK¹⁵ (2001) documentaram que o crescimento dos fungos é mais lento que o das bactérias e suas culturas precisam, em média, de 7 a 15 dias, ou mais, de incubação. Com a finalidade de evitar o desenvolvimento bacteriano que pode inibir ou se sobrepor ao do fungo, é necessário incorporar aos meios de cultura antibacterianos de largo espectro, como o Cloranfenicol. Pode-se também acrescentar Cicloheximida para diminuir o crescimento de fungos saprófitos contaminantes, de cultivos de fungos patogênicos. Ainda,

conforme relato destes autores, alguns fungos que infectam os humanos apresentam-se na forma sexuada ou perfeita sendo classificados como teleomorfos, e outros apresentam-se na forma assexuada ou imperfeita e são denominados anamorfos.

LANGFELDER *et al.*²⁶ (2003) descreveram sobre a importância da presença de melanina sobre a patogenicidade dos fungos. De acordo com os autores, os fungos do gênero *Aspergillus* produzem *dihydroxynaphthalene-melanin*, que é um fator de virulência. Este pigmento hidrofóbico está presente na superfície do conídio e é capaz de proteger o patógeno da ação dos *macrófagos e neutrófilos*.

BOLIGNANO e CRISEO³ (2003) descreveram o fungo *Aureobasidium pullulans* como sendo um fungo demáceo que possui habilidade de crescer em altas temperaturas, podendo sobreviver dentro dos tecidos animais. Possui como característica a capacidade de produzir melanina, o que é considerado um importante fator de patogenicidade, e pode ser isolado do solo, das plantas, da madeira, do ar, e mesmo da pedra. É fator etiológico raro das ceratomicoses, da septicemia, de infecções peritoniais, e das infecções dermatológicas. Estes autores alertaram para o fato de que, devido aos avanços na medicina, as infecções fúngicas estão se tornando mais importantes. A frequência aumentada de transplantes e o desenvolvimento de terapias mais eficazes para doenças severas, aumentaram as possibilidades da recuperação para muitos pacientes. Conseqüentemente infecções oportunistas têm aumentado, acometendo pacientes com resposta imunológica comprometida. Certamente não há nenhum limite ao número de espécies fúngicas no ambiente, potencialmente capazes de invadir e disseminar nos tecidos, aumentando o número já elevado de microrganismos oportunistas. Estas infecções podem ocorrer quando as condições dos pacientes se deterioram, como após intervenções cirúrgicas, doenças imunocomprometedoras,

tratamentos com drogas que interferem na resposta imunológica como corticosteróide e/ou terapias antibióticas em dose elevada.

De acordo com SIDRIM e ROCHA⁵⁷ (2004), no trato respiratório superior de pessoas saudáveis encontramos *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Neisseria sp.*, *Haemophilus sp.*, *Peptostreptococcus sp.*, *Actinomyces sp.*, *Veillonella sp.*, *Fusobacterium sp.*, *Candida sp.* e fungos filamentosos como: *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* e *Fusarium sp.* Segundo estes autores, a principal via de penetração de *Aspergillus*, no homem e nos animais, é a respiratória: assim a árvore broncopulmonar e os seios nasais são os locais preferenciais para o desenvolvimento de enfermidades aspergiliares. Os fungos deste gênero dão origem a grande quantidade de conídeos que medem de 2-3 μm , capazes de serem facilmente veiculados pelo ar. Dessa forma, diferentes mecanismos fisiopatológicos são implicados como responsáveis por quadros respiratórios, os quais são favorecidos por fatores gerais extrapulmonares e fatores locais do parênquima pulmonar. Os fatores gerais mais importantes são: agranulocitopenia pós-quimioterapia rigorosa e prolongada, uso de corticosteróides e pacientes portadores de outras formas de imunossupressão. Já os fatores locais mais freqüentemente implicados na instalação de processos pulmonares são: tabagismo, antecedentes de tuberculose, pneumopatia bronco-obstrutiva crônica, fibrose pulmonar, radioterapia do mediastino e pneumopatias formadoras de cavernas. Apesar de existirem muitas espécies de *Aspergillus*, somente cerca de 20 delas têm sido implicadas como patógenos em potencial para o homem, entre as quais podemos citar o *Aspergillus ustus*, *Aspergillus granulosis*, *Aspergillus sydowi* e o *Aspergillus niger*. A *Emericella quadriluniata* pertence ao filo *Ascomycycota*, é relatada como agente causador da Aspergilose, sendo considerado como uma forma perfeita de *Aspergillus*, isto é, forma sexuada. O gênero *Penicillium*, esta amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado no ar e no solo. Clinicamente pode afetar indivíduos com deficiência de resposta imunológica. Os gêneros

Penicillium implicatum, *Penicilium micsynvisck*, *Penicilium ctrionigrum* têm sido isolados de infecções humanas, como ceratites, otites, sinusites, infecções urinárias e pulmonares. Os fungos do gênero *Fusarium* são microrganismos ubíquos, vivendo normalmente com saprófitas no solo, na água e em numerosas plantas. No homem, podem afetar os tecidos superficiais e profundos, causando grande variedade de manifestações clínicas, acometendo pacientes imunocompetentes e imunossuprimidos. As espécies de *Fusarium* possuem tendência a invadir vasos sangüíneos, podendo acometer vários órgãos durante sua disseminação hematogênica, tais como fígado, pulmão, baço, olho, etc. Dezenas de espécies de *Fusarium* têm sido isoladas de lesões humanas, entre elas podemos citar: *Fusarium melanochorum* e *Fusarium moniliforme*. Ainda conforme relatos destes autores, o *Eurotium amstelodami* é um fungo encontrado no solo e no ar, podendo apresentar riscos à saúde das pessoas com sistema imune comprometido. Do mesmo modo, o *Cladosporium sphaerospermum*, que é uma espécie freqüentemente encontrada no ar e no solo e que não é considerado patógeno humano, pode também infectar pessoas imunologicamente comprometidas.

MONTIEL³⁵ (2004) realizou uma revisão da literatura sobre patógenos emergentes em micoses subcutâneas e sistêmicas. Segundo este autor, as doenças fúngicas podem ser divididas em dois grupos: produzidas pelos patógenos genuínos, onde o fungo inoculado em grande quantidade é capaz de causar doença no hospedeiro normal, e um outro grupo no qual o desenvolvimento da infecção é relacionado a uma resposta imune comprometida do hospedeiro, que é chamado infecção oportunista. Sendo que os fungos oportunistas emergiram como causas importantes de morbidade e mortalidade, devido a um aumento no número de pacientes imunocomprometidos. De acordo com as características das culturas destes fungos, podem ser agrupados em: filamentosos, leveduras e fungos dimórficos, cada um com gênero bem definido, espécie e características macro e microscópicas. Os fungos filamentosos são

agrupados como: hialohifomicosis, feohifomicosis, zigomicosis e dermatophytosis. As leveduras são agrupadas como: candidiasis, trichosporosis e pitirosporiasis. Os fungos dimorficos são fungos patogênicos por si mesmos. Os filamentosos classificados como hialohifomicosis são caracterizados pela presença de hifas septadas, sem pigmento na parede micelial. Os gêneros mais importantes são: *Aspergillus*, *Pseudallescheria*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Beauveria*, *Chrysosporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Scytalidium*, que se disseminam no ambiente e que penetram através de inalação, embora tenham também capacidade de penetrar através de traumas cutâneos ou mucosos. Os feohifomicosis são caracterizados pela presença de paredes e de conídeo micelial escuro, devido à existência de melanina em suas paredes e são encontrados comumente na natureza relacionados com detritos do solo, causando enfermidade nas plantas e em diferentes animais. Do ponto de vista clínico podem ser isolados de infecções subcutâneas, infecções dos seios paranasais e de forma invasiva generalizada. O *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Bipolaris*, *Cladophialophora bantiana*, *Curvularia*, *Dactylaria*, *Exophiala*, *Dreschlera*, *Phialophora* e o *Exserohilum* são gêneros classificados neste grupo. Ainda estes autores afirmaram que a *Exophiala jeanselmei* é um fungo que pode ser isolado em pacientes diabéticos e imunodeprimidos, capaz de causar enfermidades subcutâneas assim como infecções sistêmicas. Pode provocar um quadro de sinusite indolor que permanece confinada na cavidade dos seios maxilares ou disseminar-se para estruturas contíguas em pacientes imunocomprometidos.

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Considerando a importância e questionamentos a respeito dos fungos apresentados na revisão da literatura, este trabalho tem como proposta:

- 1- Demonstrar *in vivo* a presença de fungos filamentosos nos canais radiculares de dentes portadores de necrose pulpar e lesão periapical (infecções primárias);
- 2- Relacionar sua presença a pacientes com comprometimento da resposta imunológica;
- 3- Realizar o estudo taxonômico dos isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

- Acetona PA (Difco Laboratories, Detroit, USA);
- Ácido láctico (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA);
- Ágar Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA);
- Ágar batata (Difco Laboratories, Detroit, USA);
- Água destilada q.s.p (Destilador, Equipamentos e produtos químicos Ltda., Curitiba, PR, Brasil);
- Alça de platina (Difco Laboratories, Detroit, USA);
- Arco de Ostby (J.O.N- Comércio de Produtos Odontológicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil);
- Algodão (Apolo, CIA Manufatora de Tecidos de Algodão, Cataguases, MG, Brasil);
- Aparelho de RX Spectro70X (Dabi Atlate, Ribeirão Preto, SP, Brasil);
- Autoclave Horizontal Vitale 21 (Cristófoli Biosegurança, Campo Mourão, Paraná, Brasil);
- Azul-algodão (Difco Laboratories, Detroit, USA);
- Balão de fundo chato de 2 litros (Roni Alzi Vidros Científicos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Bastão de vidro em forma de U (Roni Alzi Vidros Científicos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Broca esférica para alta rotação n° 1014 Carbide (KG Sorensen Indústria e Comércio Ltda., Barueri, SP, Brasil);
- Cabine de segurança biológica VECO classe II BII (VECO, Campinas, SP, Brasil);
- Caixa de Revelação (VH Soft Line - VH Equipamentos Médicos Odontológicos e Acessórios Ltda., Araraquara, SP, Brasil);

- Câmara Fotográfica USB para microscópio (Hexasystems, São Paulo, SP, Brasil);
- Caneta de alta rotação (Kavo do Brasil Ind. e Com. Ltda., Joinville, SC, Brasil);
- Clean Stand (Maillefer, Ballaigues, Swiss);
- Cloranfenicol (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA);
- Cloreto de potássio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA);
- Contra ângulo (Kavo do Brasil Ind. e Com. Ltda., Joinville, SC, Brasil);
- Dextrose (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA);
- Estufa (Fanem Ltda, São Paulo, SP, Brasil);
- Extrato de malte (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA);
- Fenol (Difco Laboratories, Detroit, USA);
- Filme Radiográfico Periapical Insight (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA);
- Fixador de Radiografia (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil);
- Forno Pasteur (Difco Laboratories, Detroit, USA);
- Fosfato e sódio dibásico (Merck & Co, Incorporation, Whitehouse Station, NJ, USA);
- Frascos de vidro do tipo penicilina (Roni Alzi Vidros Científicos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Gelo seco (Laboratório de Cultura de Fungos do IOC / FIOCRUZ);
- Glicerina (Merck & Co, Incorporation, Whitehouse Station, NJ, USA);
- Glicose (Difco Laboratories, Detroit, USA);
- Grampo para isolamento absoluto (S.S.White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Hipoclorito de sódio 5,25% (Cristal Farma, Niterói, R.J)
- Lamparina (J.O.N- Comércio de Produtos Odontológicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil);
- Lâmina (Roni Alzi Vidros Científicos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);

- Lamínula (Roni Alzi Vidros Científicos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Lençol de Borracha (Madeitex Indústria e Comércio de Artefatos de Látex Ltda, São José dos Campos, S.P, Brasil);
- Limas Tipo K 1ª e 2ª série - 25mm (Maillefer, Ballaigues, Swiss);
- Limas Tipo H 1ª e 2ª série - 25mm (Maillefer, Ballaigues, Swiss);
- Localizador apical (ROOT ZX , J Morita Corporation, Kyoto, Japão)
- Micromotor (Kavo do Brasil Ind. e Com. Ltda., Joinville, SC, Brasil);
- Microscópio ótico YS 100 (Nikon Corporation, Japan);
- Microscópio operatório (DF Vasconcelos S.A Óptica e Mecânica, São Paulo, S.P);
- Nitrato de sódio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA);
- Óleo Mineral Nujol (Indústria Química e Farmacêutica Schering Plough S/A - Rio de Janeiro, R.J, Brasil);
- Papel filtro (Mellita Brasil Incorp, São Paulo, SP, Brasil);
- Papel Kraft (Papeleria Icaraí, Niterói, RJ, Brasil);
- Peça Reta (Kavo do Brasil Ind. e Com. Ltda., Joinville, SC, Brasil);
- Peptona (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA);
- Pipeta (Roni Alzi Vidros Científicos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Pinça clínica (Duflex, S.S.White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Placa de Petri (Roni Alzi Vidros Científicos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Pontas de papel absorvente (Tanary Industrial Ltda, Manacapuru, AM, Brasil)
- Revelador de Radiografia (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil);
- Sacarose (Merck & Co, Incorporation, Whitehouse Station, NJ, USA);
- Sonda Exploradora nº 5 (Duflex, S.S.White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil);

- Solução de Criopreservação Skin Milk (Difco, St Sauveur, Canadá);
- Soro fisiológico estéril ampola (Ariston Ind. Quims. e Farms. Ltda., São Paulo-SP, Brasil);
- Sulfato de ferro (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA);
- Sulfato de magnésio (Merck & Co, Incorporation, Whitehouse Station, NJ, USA);
- Thiosulfato de sódio a 5% (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA);
- Tubos de ensaios 18x150 mm (Roni Alzi Vidros Científicos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Vidro âmbar (Roni Alzi Vidros Científicos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);

4.2 Métodos

4.2.1 Isolamento

Após aprovação do comitê de ética (1638-CEP-HUPE) foram realizadas culturas de 60 dentes com necrose pulpar e lesão periapical (infecção primária) diagnosticada através do exame clínico e radiográfico. O tamanho da lesão não foi levado em consideração, porém os casos nos quais, apesar da necrose pulpar, comprovada através do exame clínico, a lesão não pôde ser evidenciada radiograficamente, foram eliminados da pesquisa.

Os dentes selecionados eram de pacientes de ambos os sexos e idade variando de 23 a 70 anos.

Foram incluídos na pesquisa pacientes com comprometimento da resposta imunológica e pacientes saudáveis, com o intuito de verificar a relação entre o comprometimento da resposta imune e o isolamento de fungos filamentosos.

Os dentes pesquisados apresentavam câmara pulpar fechada, sem comunicação com a cavidade oral, apesar de apresentarem restauração de: resina composta, cerâmica, amálgama,

metálica ou acrílica, com ou sem infiltração, e com ou sem a presença de cárie. Sendo que dentre os 60 dentes estudados, 6 estavam hígidos (sem nenhuma restauração) e apresentavam necrose pulpar com presença de lesão periapical, devido a traumatismo dentário. Após remoção da restauração e da cárie, quando existentes, o diagnóstico da não comunicação da câmara pulpar com a cavidade oral foi realizado através de radiografia periapical, de inspeção visual através de microscópio operatório com aumento de 16x e de sondagem com sonda exploradora.

Todos os pacientes responderam a um questionário de saúde detalhado e assinaram um termo de consentimento permitindo a inclusão do caso clínico na pesquisa.

Para coleta do material efetuou-se o isolamento absoluto com lençol de borracha e assepsia do dente e do campo com hipoclorito de sódio 5,25% e neutralização com tiosulfato de sódio a 5%. Uma broca esférica diamantada estéril de diâmetro compatível com o volume da câmara pulpar, movimentada em alta rotação foi empregada para abertura da cavidade de acesso. Ao término do acesso, o campo operatório foi novamente higienizados seguindo o mesmo protocolo supracitado.

O canal radicular foi umedecido com soro fisiológico estéril e introduziu-se uma lima tipo K estéril, com calibre e medida estimada previamente, através da radiografia de estudo. A odontometria do canal foi realizada por meio de localizador apical e conferida através de radiografia periapical.

Posteriormente uma lima tipo Hedströen estéril foi introduzida no canal, objetivando liberar raspas de dentina das paredes radiculares.

Para coleta do material do interior do canal radicular foram empregadas três pontas de papel absorvente estéreis. Dentro de campo isolado por duas lamparinas, uma ponta de papel absorvente foi inserida no canal radicular, 1 milímetro aquém do limite apical, permanecendo ali por 1 minuto. Em seguida, esta foi introduzida dentro de um tubo de ensaio contendo meio

de cultura Sabouraud Agar acrescido de Cloranfenicol para inibir o crescimento bacteriano. Este processo foi repetido por 3 vezes até completar 3 pontas de papel para cada tubo de ensaio.

Próximo ao campo isolado pelas duas lamparinas foi colocado uma placa de Petri aberta contendo o mesmo meio de cultura do tubo de ensaio (Sabouraud Agar acrescido de Cloranfenicol), com o intuito de verificar a acuidade do isolamento do campo operatório. Ao mesmo tempo era efetuado um controle positivo, quando uma placa de Petri, com o mesmo meio de cultura, permanecia aberta durante a coleta, fora do campo isolado, para verificar o possível crescimento de fungos do ambiente e verificar se os fungos isolados coincidiam com os isolados dos canais radiculares.

Os tubos de ensaio e as placas de Petri contendo o material coletado foram mantidos a temperatura ambiente por um período de sete a quatorze dias observando-se o crescimento micelial a cada 24 horas. Os tubos e placas que apresentaram crescimento de colônias fúngicas foram enviados para o Laboratório de Coleção de Culturas de Fungos do IOC/FIOCRUZ para identificação e classificação taxonômica das colônias macro e microscopicamente, segundo as técnicas micológicas descritas na literatura específica para cada Táxon.

Preparo do Meio de cultura Sabouraud Ágar com Cloranfenicol

Glicose----- 30g

Peptona-----10g

Ágar Agar-----18g

Água destilada q.s.p.----- 1.000ml

Cloranfenicol-----50mg

Os elementos foram misturados em um balão de fundo chato de 2 litros e deixados em repouso por 1 hora. A seguir 50mg de Cloranfenicol foram associados a esta solução que, após fundida foi distribuída em tubos de ensaio de 5 ml (160 x 16mm) e esterilizada em autoclave durante 15 minutos a 121⁰C, ph 5,6.

4.2.2 Exame direto das colônias fúngicas

A Partir de uma cultura monospórica retirou-se um fragmento da colônia que foi colocado sobre uma lâmina acrescido de uma gota do corante citoplasmático Lactofenol de Amann com Azul de algodão e sobre esta, colocamos uma lamínula. Através desta técnica preparou-se o material para ser observado ao microscópio óptico objetivando visualizar o micélio vegetativo e reprodutivo de propagação dos fungos (Figura 1- A, B, C). Nos casos nos quais o fungo era muito escuro substitui-se o corante por uma gota de água. As Lâminas aqui preparadas foram denominadas lâminas temporárias, pois as estruturas observadas eram fragmentadas não permitindo definição da espécie e sim do filo e de um possível gênero.

Preparo do corante Lactofenol de Amann com Azul de algodão:

Ácido lático-----20g

Fenol----- 20g

Glicerina-----20g

Azul-algodão-----0,05g

Água destilada q.s.p.-----20ml

Após fusão dos cristais de fenol as demais substâncias foram misturadas. Esperou-se durante 24hs, filtrou-se com papel-filtro e acondicionou-se em vidro âmbar.

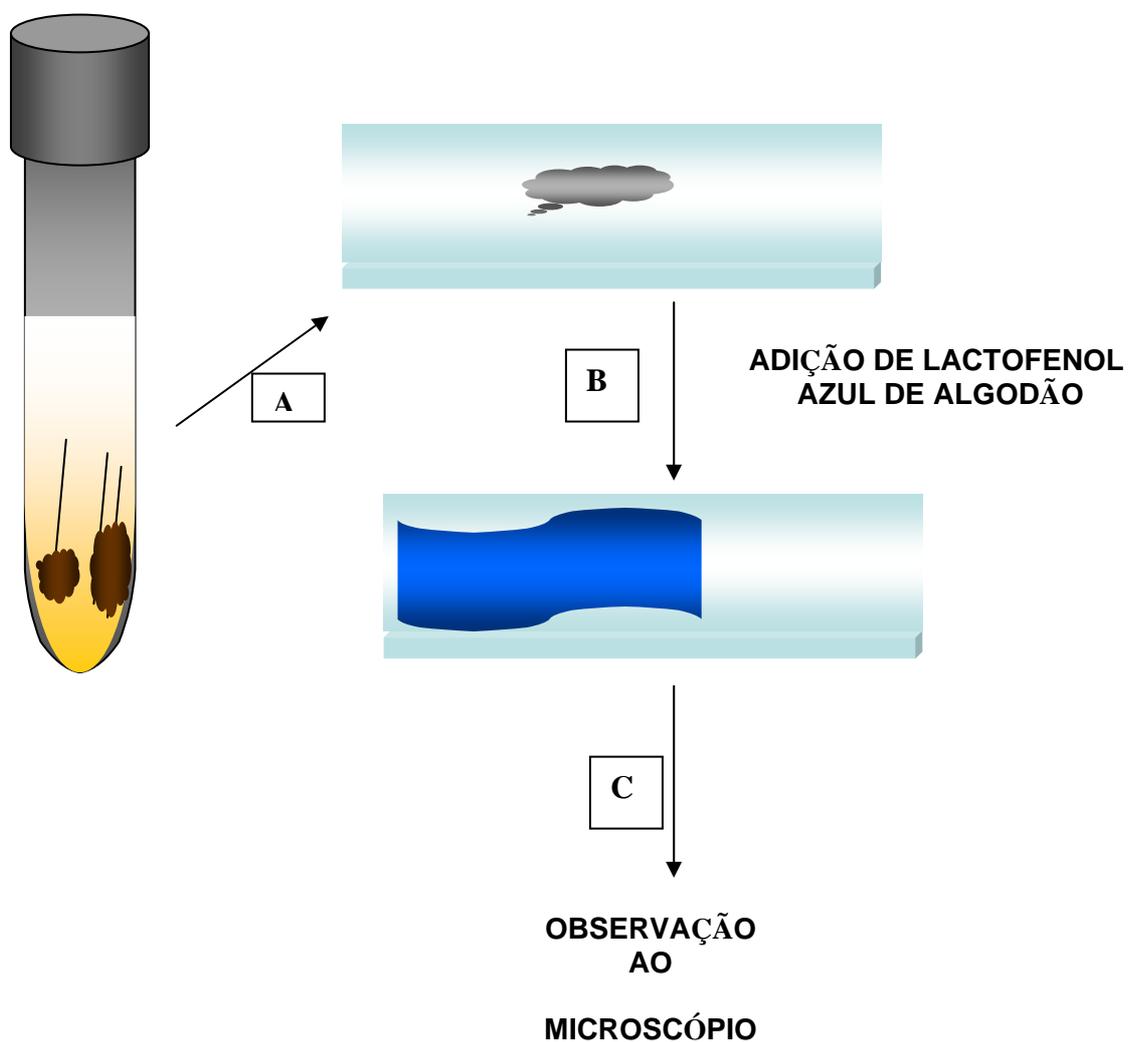


Figura 1- Esquema de preparo do material para observação ao microscópio óptico: (A) Tubo de ensaio contendo cultura positiva, (B) retirou-se um fragmento da colônia que foi colocado sobre uma lâmina acrescido de uma gota do corante citoplasmático Lactofenol de Amann com Azul de algodão e sobre esta, colocamos uma lamínula, (C) para observação ao M.O.

4.2.3 Repique em meio específico

Após a observação das características dos fungos, as linhagens foram repicadas com o auxílio de uma alça de platina estéril, e um fragmento do fungo foi inoculado, ponto de inóculo, em um meio de cultura sólido, específico para favorecer seu crescimento e esporulação. Dependendo das características apresentadas por cada fungo um meio de cultura foi utilizado podendo ser o Extrato de Malte Ágar, Ágar Czapeck (CYA Agar) ou o Ágar Batata.

As colônias foram incubadas a temperatura ambiente e observadas a cada 24 horas, pois as cepas têm tempo de crescimento dependente do seu grupo taxonômico. Com isso, um estudo macro e microscópico foram realizados.

Preparação do meio Extrato de Malte Ágar

Extrato de malte-----	20g
Peptona-----	3g
Ágar Agar-----	20g
Água destilada q.s.p.-----	1.000ml

O Extrato de Malte, a Peptona e o Ágar foram dissolvidos em água destilada sob aquecimento. A seguir o meio foi homogeneizado e esterilizado, em autoclave por 15 minutos a 121⁰C, distribuído em placas de Petri e acondicionado, sob refrigeração, até o momento do uso.

Preparação do meio Ágar Czapeck (CYA Agar)

Sacarose-----	30g
Nitrato de sódio-----	3g
Fosfato e sódio dibásico-----	1g

Cloreto de potássio-----	0,5g
Sulfato de magnésio-----	0,5g
Sulfato de ferro-----	0,01g
Ágar Agar-----	20g
Água destilada q.s.p.-----	1000ml

Todos os componentes foram dissolvidos em água destilada sob aquecimento e pH ajustado em 6,5. O meio foi autoclavado por 15 minutos a 121⁰C e distribuído em alíquotas de 4ml, em tubos de ensaio. A seguir os tubos foram deixados na posição inclinada, de modo que, o meio se solidificasse formando uma superfície de aproximadamente 6 cm.

Preparação do meio Ágar Batata

Infusão de batata-----	500ml
Dextrose-----	10g
Ágar Agar-----	15g
Água destilada q.s.p.-----	1.000ml

As batatas-inglesas foram descascadas (*Solanum tuberosum*) e cozidas em 500ml de água, por 1 hora. A seguir esta infusão de batatas foi filtrada através de gaze e o volume inicial de água restituído acrescentando-se 500ml de água destilada. Esta mistura foi acrescida de Ágar e Dextrose, levada a autoclave por 15 minutos a 121⁰C e distribuída em alíquotas de 4ml, em tubos de ensaio. Os tubos foram deixados na posição inclinada, de modo que, o meio se solidificasse formando uma superfície de aproximadamente 6 cm.

4.2.4 Identificação macroscópica

A identificação e autenticação das espécies foram realizadas após as observações das características macroscópicas relacionadas a cada cepa, assim como: textura das colônias, coloração da superfície do verso e reverso, produção de pigmentos, diâmetro das colônias, tempo de crescimento, raio da colônia, produção ou não de exsudato. Todas as características foram anotadas e observadas por serem potencialmente importantes para a classificação das linhagens.

4.2.5 Identificação microscópica

Fragmentos miceliais de cada isolado foram criteriosamente estudados nas preparações obtidas a partir de microcultivos em meios específicos e em lâminas e lamínulas, segundo a técnica de RIVALIER e SEYDEL⁴⁸ (1932). Essa metodologia revelou o arranjo dos conídios como eles eram *in situ* e assim pode-se visualizar a morfologia das estruturas de reprodução e/ou propagação. Após o tempo de crescimento de cada fungo, foi possível a observação das lâminas através do uso do corante citoplasmático, Lactofenol de Amann com azul de algodão, e identificação das espécies através de microscópio óptico.

Técnica de RIVALIER e SEYDEL⁴⁸ (1932)

É composta por uma placa de Petri estéril de 15 cm de diâmetro, com o fundo coberto com papel de filtro ou chumaço de algodão e com um bastão de vidro em forma de U, sobre o qual foram colocadas duas lâminas com duas lamínulas. O conjunto foi embrulhado em papel Kraft e esterilizado em forno Paster durante 2 horas.

Foram preparados meios de cultura adequados para cada gênero ou espécie e vertidos em placa de Petri. Após solidificação dos meios, foram cortados quadrados de 1cm² com o

auxílio de um bisturi com lâmina estéril, os quais foram colocados sobre cada lâmina da câmara de microcultivo com alça de platina estéril. Inoculou-se a colônia nos quatro lados do quadrado do meio de cultura. Sobre cada meio foi colocada uma lamínula. Para manter a umidade no interior da câmara foi colocado um papel de filtro umedecido com água destilada estéril. Após identificação da placa, esta foi mantida na câmara de microcultivo sob temperatura ambiente por sete dias ou mais, dependendo do fungo, para observação do crescimento e esporulação da colônia. Após o tempo de crescimento adequado, lâminas e lamínulas foram montadas separadamente. Gotejou-se o corante azul Lactofenol de algodão nas lâminas. Lamínulas contendo micélio vegetativo e reprodutivo foram retiradas com pinça estéril e colocadas sobre as lâminas com corante. Fixou-se em formol por 24 horas os quadrados de meio de cultura com o fungo crescido. Em seguida lâminas foram observadas ao microscópio para classificação taxonômica das espécies.

4.2.6 Identificação e classificação segundo bibliografia

A partir dos estudos macro e microscópicos da morfologia e utilizando bibliografias adequadas (PITT⁴³, 1979; PITT⁴⁴, 1985; RAPER e THOM⁴⁵, 1949; RAPER e FENNEL⁴⁶, 1965; SAMSON *et al.*⁵⁰ 1976; SAMSON⁵¹, 1979; GERLACH e NIRENBERG¹⁷, 1982; HAWKSWORTH *et al.*²¹ 1983; HAWKSWORTH *et al.*²² 1995; GARRO e GENE¹⁶, 1992), as culturas de fungos examinadas foram identificadas taxonomicamente.

4.2.7 Preservação das linhagens

Todas as colônias identificadas no Laboratório de Coleção de Cultura de fungos do IOC/FIOCRUZ foram preservadas em três metodologias para posteriores estudos: sob óleo mineral, em água destilada estéril e liofilização.

Preservação sob óleo mineral

O óleo mineral Nujol foi esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121°C e em seguida aquecido à 170°C por 2 horas. Após crescimento do fungo por tempo adequado, o óleo mineral estéril foi colocado sobre a superfície da cultura a uma altura aproximadamente de 1 a 2 cm. Os tubos de preservação foram estocados na posição vertical, à temperatura ambiente.

Preservação em água destilada estéril

Após crescimento do fungo em placa de Petri, contendo meio sólido apropriado para cada gênero, foram cortados blocos de meio de cultura de 4 a 6 mm, pela margem da colônia jovem utilizando bisturi com lâmina estéril. Através de uma alça de platina estéril, estes blocos foram transferidos para vidros esterilizados do tipo penicilina, contendo água destilada estéril. Os vidros foram vedados e mantidos à temperatura ambiente.

Liofilização

Numa cabine de segurança biológica, a cultura fúngica foi suspensa em uma solução de Criopreservação Skin Milk. Para cada cultura foi feita uma suspensão. Uma alíquota de 0,5 ml desta solução foi colocada com o auxílio de uma pipeta dentro de vidros esterilizados do

tipo penicilina. Os vidros foram congelados por alguns minutos em gelo seco e acrescido de uma quantidade de acetona PA.

4.2.8 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foram usadas as técnicas: intervalo de confiança para proporção com objetivo de estimar a proporção de presença de fungos nos canais radiculares; teste de independência entre variáveis categóricas através da estatística qui-quadrado para as variáveis: presença de fungo nos meios de cultura e presença de deficiência imunológica; distribuição de frequências e gráfico de barras para a variável: tipo do fungo. O programa computacional utilizado foi o pacote estatístico (*freeware*) “R”.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Cepas isoladas

Das 60 amostras coletadas 17 apresentaram cultura positiva para fungos filamentosos (Figura 2), perfazendo um total de 28,3%..

O gênero *Aspergillus* foi isolado *in situ* de 7 amostras (11,6%). A espécie *Aspergillus ustus* foi isolada em 3 pacientes, totalizando 5% das amostras (Figura 3, 4, 5 e 6). O *Aspergillus granulatus*, *Aspergillus niger* e o *Aspergillus sydowii* foram isoladas de 3 pacientes respectivamente. A espécie *Emericella quadriluniata* (Figura 7 e 8), forma sexuada de *Aspergillus*, foi isolada de 1 paciente.

O gênero *Penicillium* foi isolado *in situ* de 4 amostras (6,6%), sendo as espécies isoladas: *Penicillium implicatum* (Figura 9 e 10), *Penicillium micsynvisk*, *Penicillium lividum* e *Penicillium citrionigrum*.

O gênero *Fusarium* foi isolado *in situ* de 2 amostras (3,3%), sendo as espécies isoladas de 2 pacientes a *Fusarium moniliforme*, *Fusarium melanochorum*, respectivamente.

As espécies *Aureobasidium pullulans*, *Exophiala jeancelmei* (Figura 11), *Eurotium amstelodame*, e *Cladosporium sphaerospermum*, foram isolados *in situ* de 4 amostras pertencentes a 4 pacientes respectivamente.

Nas placas de Petri empregadas no raio das duas lamparinas não houve crescimento micelial. Entretanto nas placas-controle positivo, abertas para verificar a contaminação do meio ambiente, houve crescimento de fungos ambientais que não eram compatíveis com os isolados dos canais radiculares, além de não apresentarem culturas puras.

5.2 Relação dos resultados com a resposta imune do hospedeiro

Todos os pacientes em que o meio de cultura apresentou crescimento de fungo filamentoso apresentavam quadros que levam à deficiência da resposta imunológica (Quadro 1).

Cinco pacientes eram diabéticos, sendo que destes 2 eram também fumantes. Quadro de depressão foi relatado por 2 pacientes. A Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide foi relatada por um paciente. Durante preenchimento do questionário de saúde, um paciente revelou ser portador de Hipotireoidismo e outro relatou ter realizado a remoção da glândula tireóide devido à presença constante de nódulos. Além de ser fumante um paciente era portador de Vitiligo, outro relatou ter Lúpus Eritematoso. Devido a quadro alérgico e de Asma brônquica, dois pacientes respectivamente revelaram fazer uso de corticoterapia. Um outro paciente no qual houve crescimento micelial relatou ser fumante e fazer uso de droga ilícita. Um paciente havia sofrido queimadura grave inclusive com perda do braço direito e havia ficado internado em Unidade de Terapia Intensiva. Quadro de Artrite Reumatóide foi relatado por um paciente.

	FUNGO FILAMENTOSO	COMPROMETIMENTO SISTÊMICO
Paciente 1-	<i>Aspergillus ustus</i>	Corticoterapia
Paciente 2	<i>Penicillium implicatum</i>	Depressão
Paciente 3	<i>Fusarium melanochorum</i>	Diabetes
Paciente 4-	<i>Aspergillus ustus</i>	Diabetes / Fumante
Paciente 5-	<i>Emericella quadriluniata</i>	Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide
Paciente 6-	<i>Eurotium amstelodame</i>	Remoção da Tireóide
Paciente 7-	<i>Aspergillus granulosis</i>	Lúpus Eritematoso
Paciente 8-	<i>Fusarium moniliforme</i>	Hipotireoidismo
Paciente 9-	<i>Aspergillus sydowii</i>	Diabetes
Paciente 10-	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Fumante/ Uso de Droga
Paciente 11-	<i>Penicillium micsynvisk</i>	Depressão
Paciente 12-	<i>Exophiala jeancelmei</i>	Diabetes
Paciente 13-	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Queimadura grave
Paciente 14-	<i>Penicillium citrionigrum</i>	Vitiligo
Paciente 15-	<i>Penicillium lividum</i>	Diabetes/ Fumante
Paciente 16-	<i>Aspergillus niger</i>	Artrite Reumatóide
Paciente 17-	<i>Aspergillus ustus</i>	Asma brônquica/ Corticoterapia

Quadro 1- Fungos encontrados e deficiência na resposta imune dos pacientes.

5.3 Tratamento Estatístico dos Dados

5.3.1 Estimativa da proporção de presença de fungos nos canais radiculares

Considerando esta amostra como elementos independentes e identicamente distribuídos como uma variável aleatória:

$X_i = 1$ - se o paciente tem a presença de fungo nos canais radiculares,

$X_i = 0$ - caso contrário.

Sendo p a Probabilidade de $X = 1$, $P(X_i = 1) = p$, que será estimado, à luz da amostra, pontualmente por $\hat{p} = 17/60$ e pelo Intervalo de Confiança de 95% , $\hat{p} \pm 1.96 \sqrt{\hat{p}(1 - \hat{p})/n}$,

onde $n = 60$, o tamanho da amostra:

Limite inferior = 16.9

Limite superior = 39.7.

5.3.2 Teste de Independência

As duas variáveis categóricas foram avaliadas quanto à independência :

X = presença de fungo nos meios de cultura,

Y = presença de deficiência imunológica

Estas variáveis estão apresentadas na tabela de contingência abaixo:

Y=Deficiência Imunológica	X=presença de fungo	
	Sim	Não
Sim	17	0
Não	0	43

Tabela 1- Relação entre presença de fungo e comprometimento da resposta imune.

O valor da estatística Qui-quadrado referente à tabela de contingência acima, com a correção de Yates, foi de 55.18 com 1 grau de liberdade correspondendo a um p-valor de 1.1×10^{-13} que é muito menor que 1% sendo o resultado do teste altamente significativo. Os dados aqui observados corroboram para a rejeição da hipótese de independência entre as duas variáveis categóricas X e Y, havendo interdependência entre elas.

5.3.3 Distribuição amostral dos fungos

Com a parte da amostra de hospedeiros, os 17 com algum comprometimento imunológico apresentamos a distribuição de freqüências abaixo:

Tipo do Fungo	freqüência	%
<i>Aspergillus</i>	7	41
<i>Penicillium</i>	4	24
<i>Fusarium</i>	2	12
<i>Aureobasidium</i>	1	06
<i>Exophiala</i>	1	06
<i>Eurotium</i>	1	06
<i>Cladosporium</i>	1	06

Tabela 2- Freqüência de isolamento de cada gênero de fungo.

O mesmo resultado visto de forma gráfica:

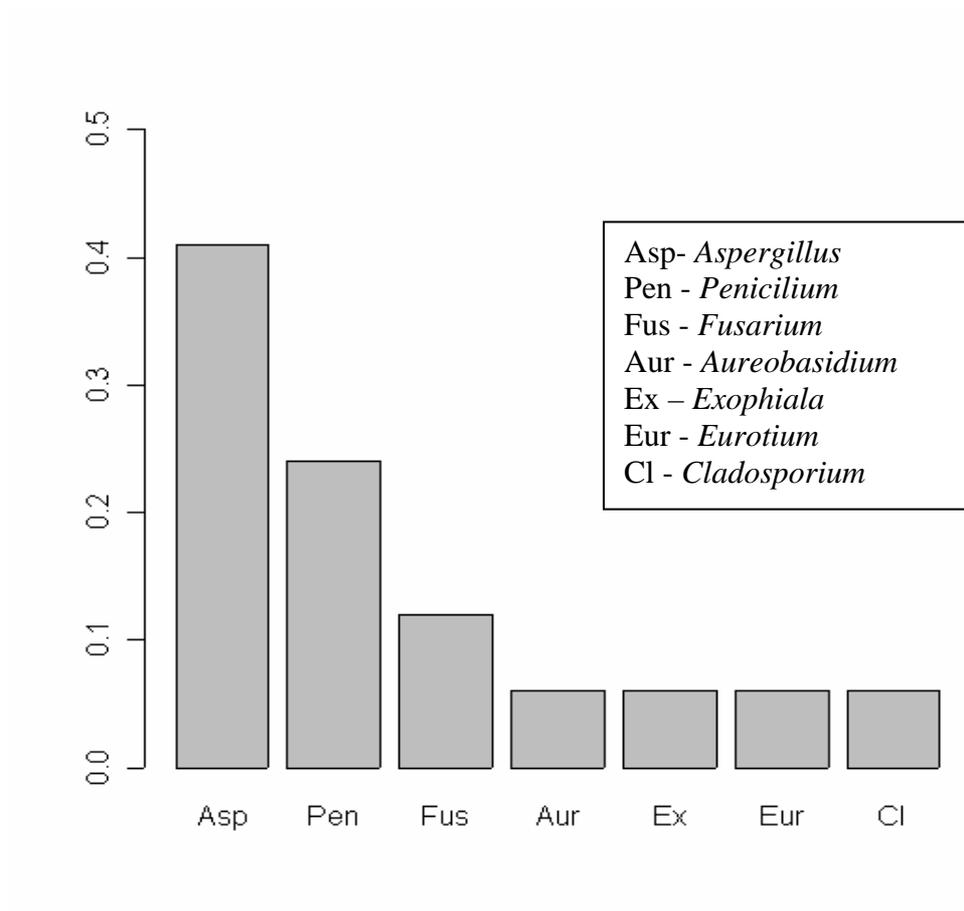


Gráfico 1- Frequência de isolamento de cada gênero de fungo.



Figura 2- Tubo de ensaio apresentando cultura positiva.

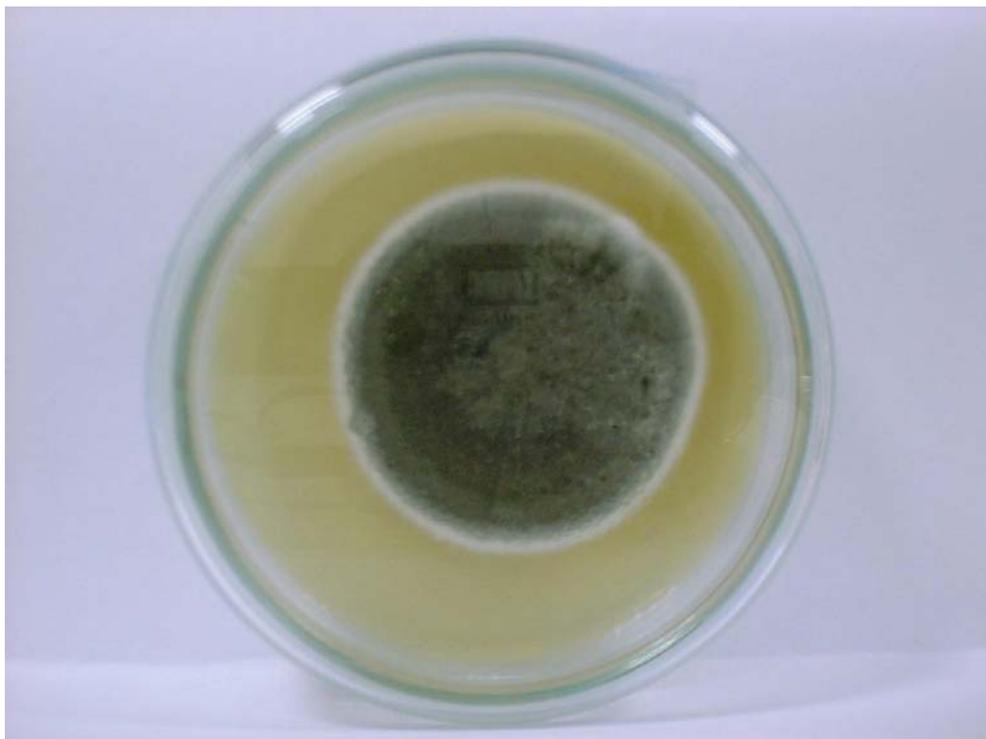


Figura 3- *Aspergillus ustus* em meio de Extrato de Malte a 37⁰C –frente.

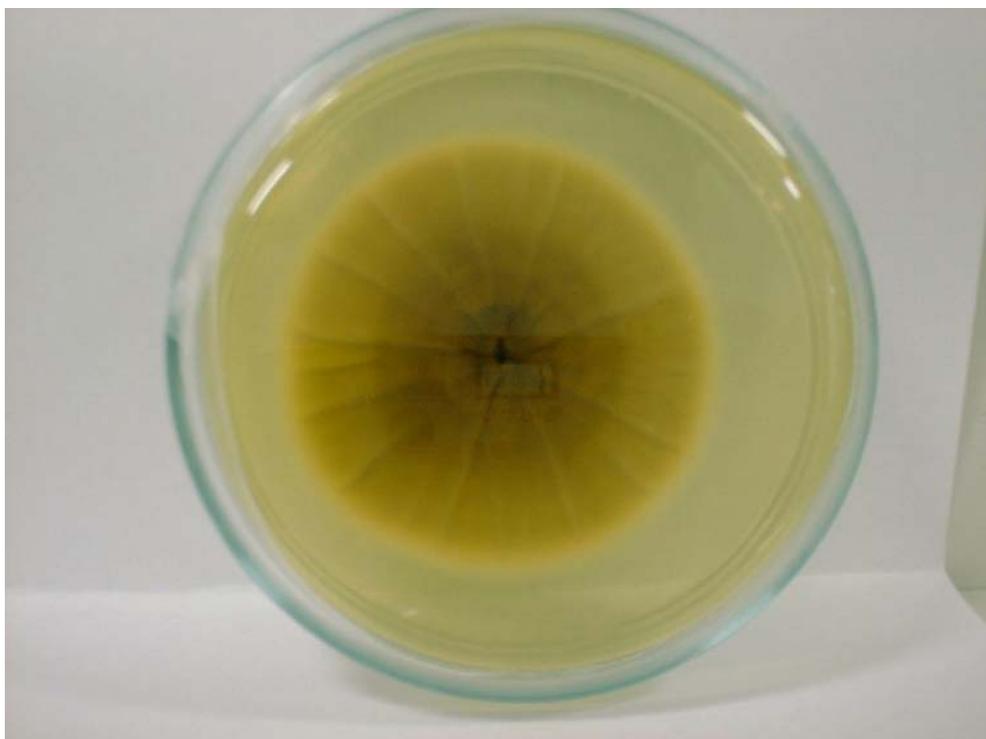
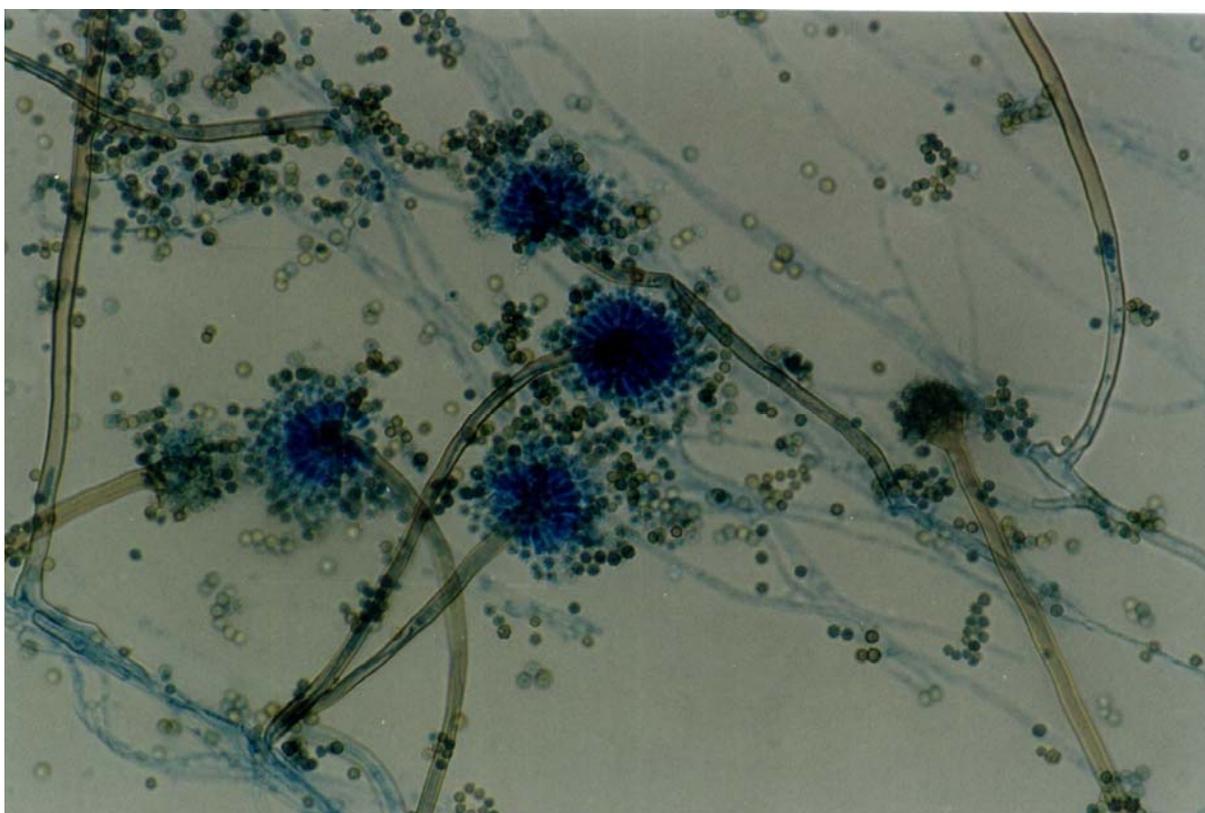
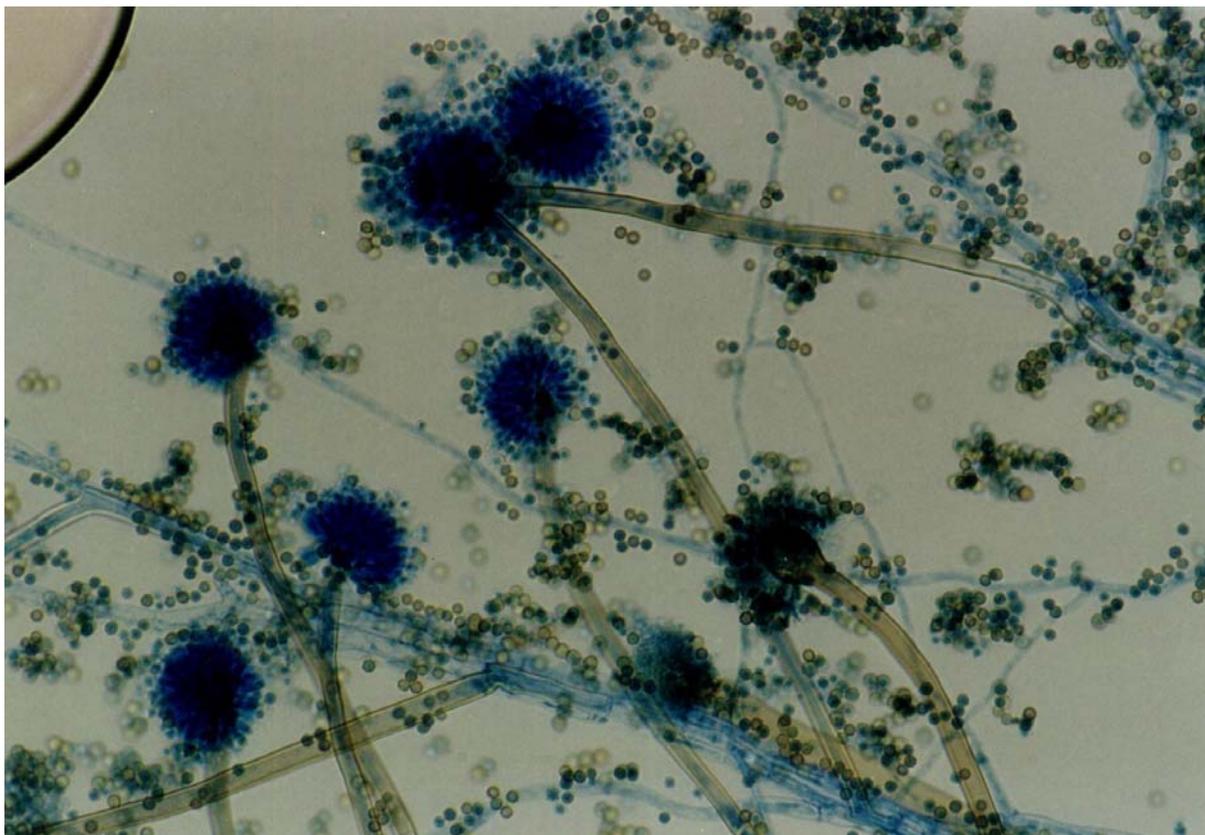
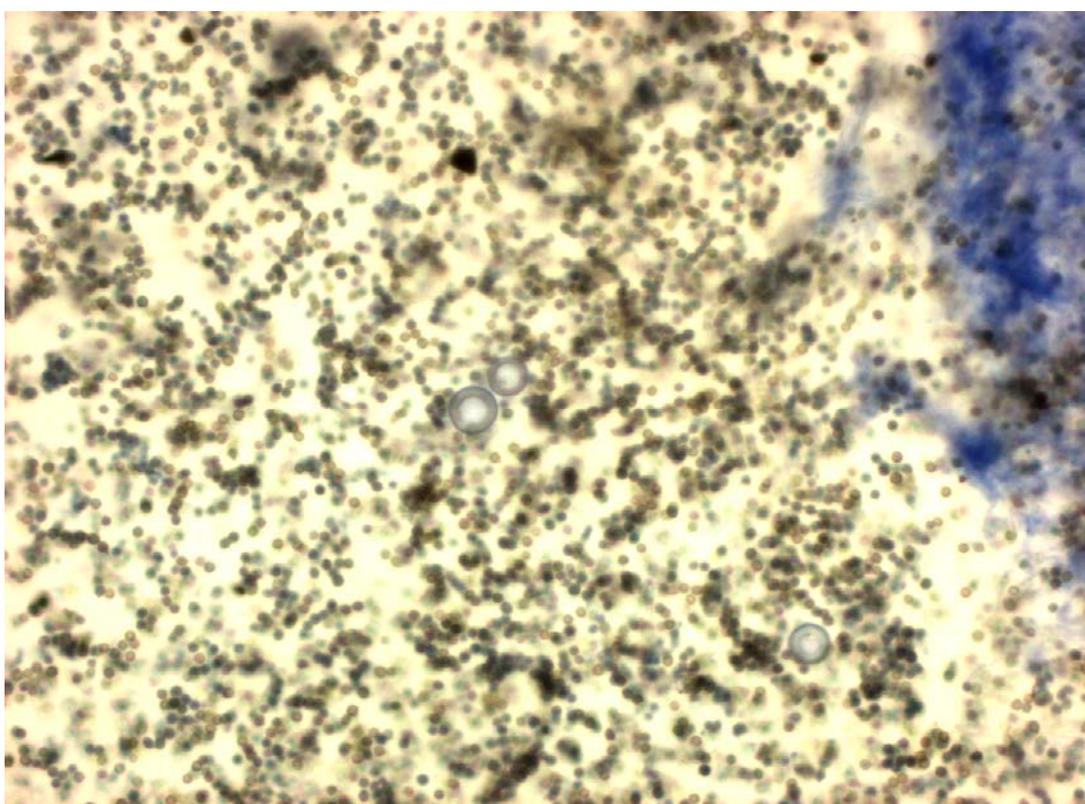
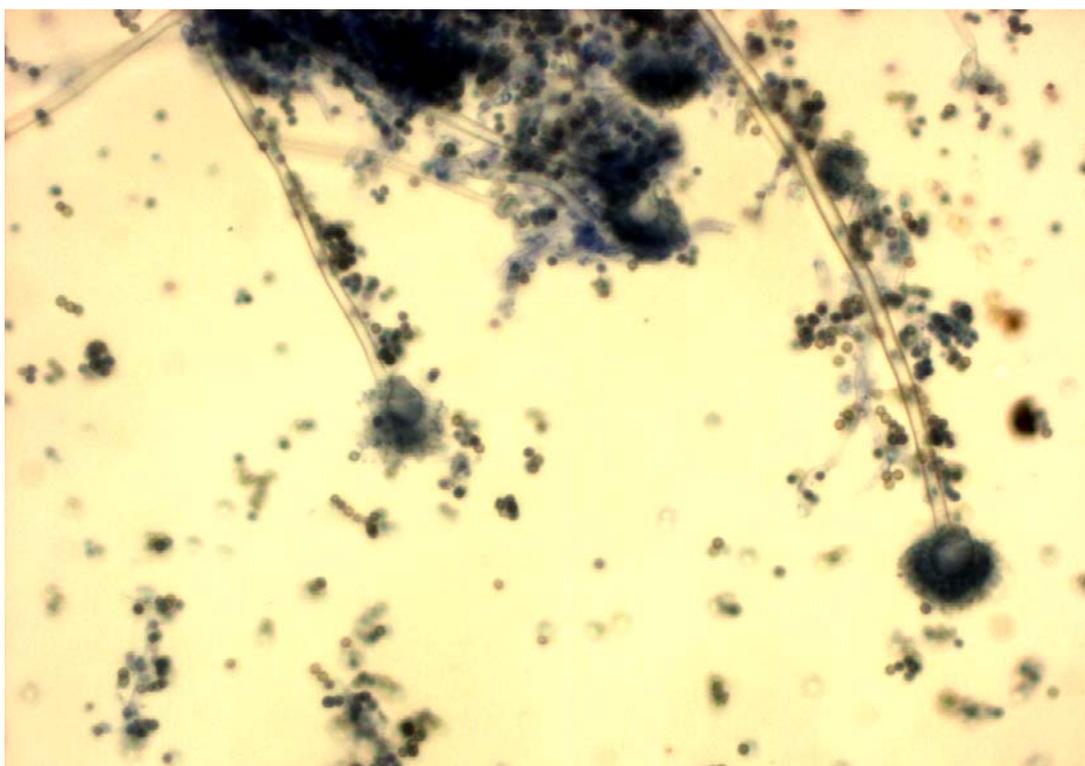


Figura 4- *Aspergillus ustus* em meio de Extrato de Malte a 37⁰C – verso.



Figuras 5 e 6 - Imagem através de microscópio óptico de *Aspergillus ustus*.



Figuras 7 e 8 - Imagem através de microscópio óptico de *Emericella quadrilunia*.

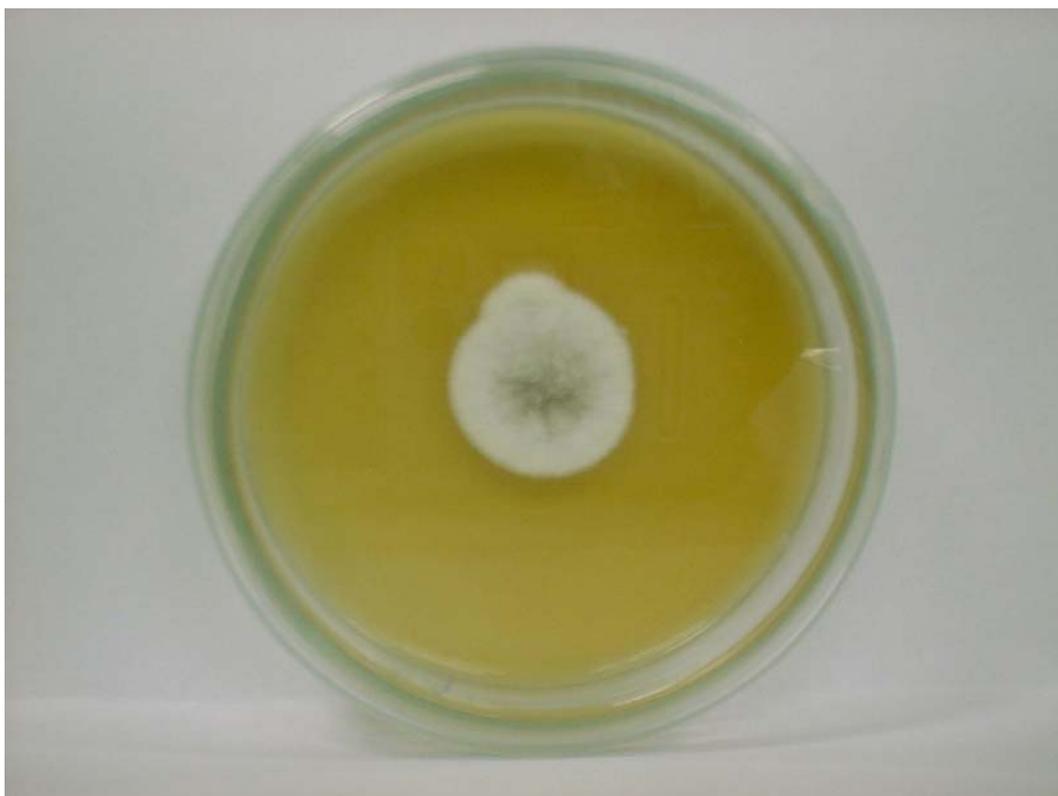


Figura 9- *Penicillium implicatum* em Meio CYA - frente.



Figura 10- *Penicillium implicatum* em Meio CYA - verso.

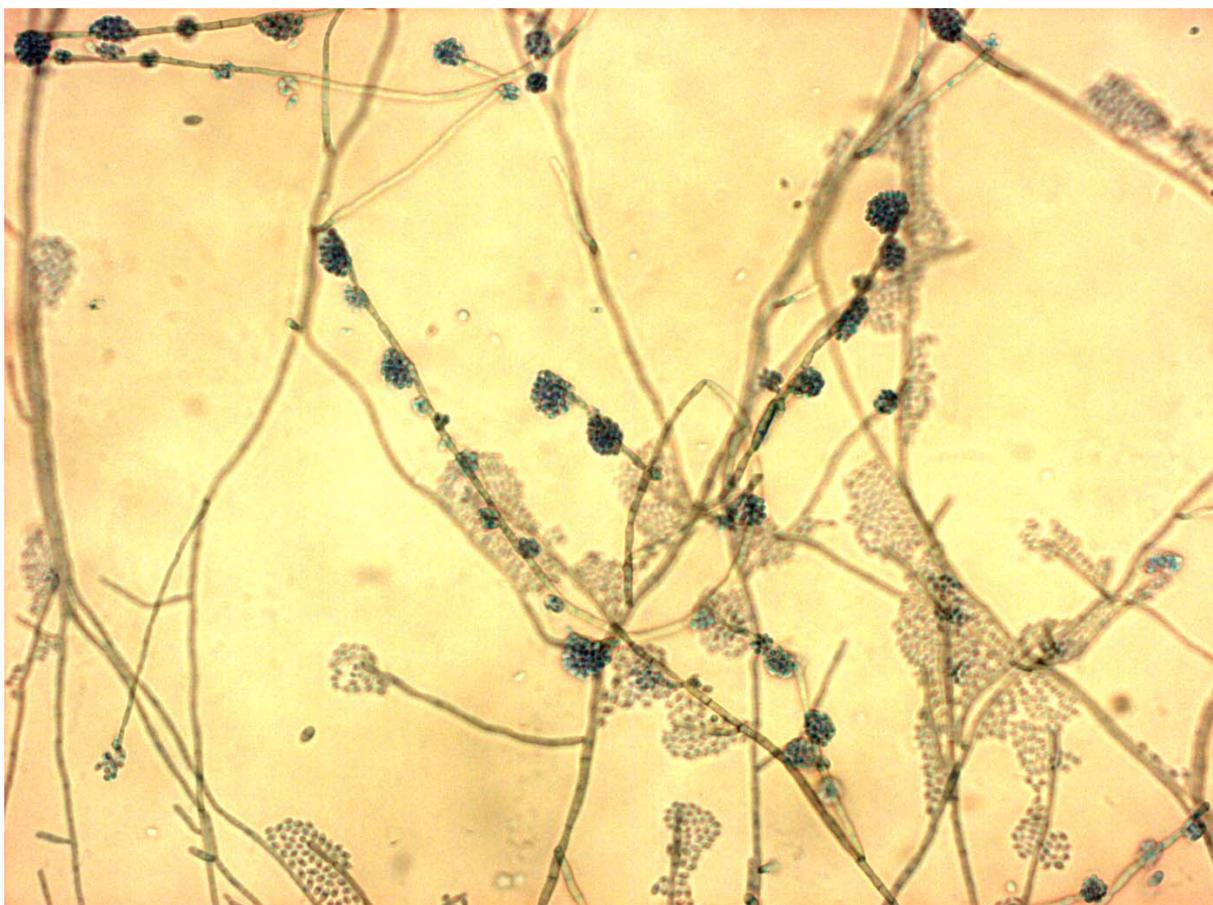


Figura 11- Imagem através de microscópio óptico de *Exophiala jeancelmei*.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A biodiversidade da microbiota dos canais radiculares infectados tem sido evidenciada nas últimas décadas por diversos autores (NAIR *et al.*³⁹, 1990; SEN *et al.*⁵², 1995; WALTIMO *et al.*⁷¹, 1997; SUNDQVIST *et al.*⁶⁷, 1998; MOLANDER *et al.*³⁴, 1998; PECIULIENE *et al.*⁴¹, 2001; LANA *et al.*²⁵, 2001; SIQUEIRA *et al.*⁶¹, 2002c; SUNDE *et al.*⁶⁶, 2002; PINHEIRO *et al.*⁴², 2003), que buscam investigar a especificidade dos microrganismos que invadem e infectam os canais radiculares e o grau de patogenicidade dos organismos isolados.

Evidências indicam que as doenças endodônticas e periapicais estão associadas a microrganismos patogênicos de diferentes táxons (NAIR *et al.*³⁹, 1990; SEN *et al.*⁵², 1995; WALTIMO *et al.*⁷¹, 1997; SUNDQVIST *et al.*⁶⁷, 1998; MOLANDER *et al.*³⁴, 1998; PECIULIENE *et al.*⁴¹, 2001; LANA *et al.*²⁵, 2001; SIQUEIRA *et al.*⁶¹, 2002c; SUNDE *et al.*⁶⁶, 2002; PINHEIRO *et al.*⁴², 2003). Investigações microbiológicas de dentes portadores de lesões periapicais primárias e persistentes tem revelado a presença de fungos tanto em cultura pura (WALTIMO *et al.*⁷¹, 1997; PECIULIENE *et al.*⁴¹, 2001; WALTIMO *et al.*⁷⁴, 2004) quanto associada a bactérias (NAIR *et al.*³⁹, 1990; SEN *et al.*⁵², 1995; WALTIMO *et al.*⁷¹, 1997; PECIULIENE *et al.*⁴¹, 2001; LANA *et al.*²⁵, 2001; SIQUEIRA *et al.*⁶¹, 2002c; MILETIC *et al.*³³, 2002, PINHEIRO *et al.*⁴², 2003; WALTIMO *et al.*⁷⁴, 2004).

Os fungos dimórficos, como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, são os que mais se adaptaram ao organismo humano sendo capazes de causar infecções em indivíduos aparentemente hígidos. As leveduras e os fungos filamentosos são oportunistas podendo causar infecção em hospedeiros imunocomprometidos (SHEPHERD⁵⁶, 1992; TELLES⁶⁹, 2004).

Entretanto até a presente data somente fungos do tipo leveduras têm sido isolado dos canais radiculares, sendo que a maioria das leveduras isoladas pertence ao gênero *Candida* (GROSSMAN¹⁹, 1952; HOBSON²³, 1959; LOMÇALI *et al.*²⁸, 1996; SUNDQVIST *et al.*⁶⁷, 1998; BAUMGARTNER *et al.*², 2000; PECIULIENICE *et al.*⁴¹, 2001; HANCOCK *et al.*²⁰, 2001; SUNDE *et al.*⁶⁶, 2002; PINHEIRO *et al.*⁴², 2003; WALTIMO *et al.*⁷², 2003; SIQUEIRA e SEN⁶², 2004; WALTIMO *et al.*⁷⁴, 2004; SIQUEIRA e ROÇAS⁶³, 2004; CHUGAL *et al.*⁶, 2007) e a espécie predominante é a *C. albicans* (HOBSON²³, 1959; SUNDQVIST *et al.*⁶⁷, 1998; BAUMGARTNER *et al.*², 2000; PECIULIENICE *et al.*⁴¹, 2001; HANCOCK *et al.*²⁰, 2001; SUNDE *et al.*⁶⁶, 2002; PINHEIRO *et al.*⁴², 2003; WALTIMO *et al.*⁷², 2003, SIQUEIRA e SEN⁶², 2004; WALTIMO *et al.*⁷⁴, 2004; SIQUEIRA e ROÇAS⁶³, 2004). A *C. albicans* expressa diversos fatores de virulência que são capazes de infectar o complexo dentino-pulpar e os túbulos dentinários, causando uma resposta inflamatória em torno do ápice radicular, que sugere seu papel de patogenicidade na formação da lesão periapical (WALTIMO *et al.*⁷², 2003; SIQUEIRA e SEN⁶², 2004).

De acordo com revisão da literatura realizada por SIQUEIRA *et al.*⁵⁸ (2002) as espécies mais comuns de fungos patogênicos, com caráter oportunista, pertencem aos gêneros *Candida* e *Aspergillus*. Porém não existem relatos na literatura sobre a presença de fungos filamentosos infectando os canais radiculares apesar de serem detectados em infecções em outros locais do organismo como exemplo: seio maxilar (LEGENT *et al.*²⁷, 1989; MENSI *et al.*³², 2007). Portanto o presente trabalho é pioneiro e trata-se do primeiro relato de fungos filamentosos nos canais radiculares.

As investigações no presente estudo foram realizadas em dentes que com necrose pulpar e lesão periapical, ou seja, infecção primária. Em consonância com alguns investigadores (GROSSMAN¹⁸, 1967; MACDONALD²⁹, 1957; HOBSON²³, 1959; NAIR *et*

*al.*³⁸, 1987; SEN *et al.*⁵², 1995; DEBELIAN *et al.*⁹, 1997; BAUMGARTNER *et al.*², 2000; LANA *et al.*²⁵, 2001; SIQUEIRA *et al.*⁶¹, 2002c; FERRARI e BOMBANA¹³, 2005) que através de cultura, microscopia eletrônica e método PCR detectaram a presença de fungos do tipo levedura em infecções primárias. DEBELIAN *et al.*⁸ (1995) relataram o isolamento de *S. cerevisiae* em 1 de 26 canais radiculares associados com necrose pulpar e lesão periapical assintomática. DEBELIAN *et al.*⁹ (1997) detectaram também esta espécie fúngica no sangue de um paciente submetido à terapia endodôntica em dente com necrose pulpar e lesão periapical. LANA *et al.*²⁵ (2001) isolaram *C. tropicalis* de dois pacientes, e *S. cerevisiae* em 1 de 27 pacientes com necrose pulpar e infecção primária. BAUMGARTNER *et al.*² (2000) detectaram *C. albicans* em 5 das 24 amostras de canais radiculares por meio do método de PCR. SEN *et al.*⁵² (1995) encontraram fermentos invadindo pesadamente os canais radiculares de 4 dos 10 dentes extraídos associados com necrose pulpar e lesão periapical, observando-se em uma amostra estrutura de hifa. SIQUEIRA *et al.*⁶¹ (2002c) investigaram a colonização microbiana de infecções primárias de canais radiculares através de microscopia eletrônica e encontraram fungos em 1 dos 15 dentes examinados. No presente estudo foram isolados fungos filamentosos de infecções primárias, sendo que os isolados ainda não haviam sido detectados em nenhum outro experimento, sendo este o primeiro relato de isolamento e identificação taxonômica destes em canais radiculares.

Porém, de acordo com a literatura, outros gêneros de fungos, como as leveduras parecem ser mais comuns nos canais radiculares com infecção persistente ao tratamento endodôntico convencional (NAIR *et al.*³⁹, 1990; WALTIMO *et al.*⁷¹, 1997; SUNDQVIST *et al.*⁶⁷, 1998; MOLANDER *et al.*³⁴, 1998; PECIULIENE *et al.*⁴¹, 2001; HANCOCK *et al.*²⁰, 2001; PINHEIRO *et al.*⁴², 2003; SIQUEIRA e ROÇAS⁶², 2004). NAIR *et al.*³⁹ (1990) observaram fungos em 2 de nove biópsias de lesão periapical refratária ao tratamento endodôntico. WALTIMO *et al.*⁷¹ (1997) relataram a ocorrência de fungos em 47 dos 692

casos de infecções endodônticas persistentes em cultura pura ou associada a bactérias. A *C. albicans* foi a espécie isolada com maior frequência, isolando-se ainda outras espécies: *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua* e *G. candidum*. SUNDQVIST *et al.*⁶⁷ (1998) isolaram *C. albicans* de dois dos 24 canais radiculares com infecção persistente. Sob circunstâncias similares, MOLANDER *et al.*³⁴ (1998) encontraram *C. albicans* em 3 de 68 amostras e PECIULIENE *et al.*⁴¹ (2001) em 6 dos 33 dentes apresentaram cultura-positiva associada com canais previamente obturados, porém com lesão periapical refratária. HANCOCK *et al.*²⁰ (2001) pesquisaram 34 canais radiculares com lesão periapical crônica, após tratamento endodôntico, sendo que a *C. albicans* foi isolada de somente de 1 canal. PINHEIRO *et al.*⁴² (2003) encontraram *Candida* em 2 dos 51 pacientes usando a cultura, enquanto SIQUEIRA e ROÇAS⁶² (2004) detectaram *C. albicans* em 2 de 22 pacientes através de PCR.

Estes achados podem fazer-nos suspeitar de uma possível contaminação durante (NAIR *et al.*³⁹, 1990) ou após o tratamento endodôntico (PINHEIRO *et al.*⁴², 2003), assim como podemos pensar na possibilidade da prévia existência destes patógenos no interior dos canais radiculares (FERRARI e BOMBANA¹³, 2005). SUNDQVIST *et al.*⁶⁷ (1998) estudaram a microbiota de dentes com lesão periapical persistente ao tratamento endodôntico submetidos a retratamento. De acordo com estes autores, provavelmente o fungo aparece como um oportunista devido ao desaparecimento ou à remoção de outros microrganismos do canal radicular, já que os fungos têm a capacidade de crescer no ambiente de baixa quantidade de nutrientes existente nos canais tratados endodonticamente. Entretanto, estes fungos já poderiam estar no canal radicular antes do tratamento endodôntico, uma vez que fungos também são isolados em infecções primárias (GROSSMAN¹⁸, 1967; MACDONALD²⁹, 1957; HOBSON²³, 1959; NAIR *et al.*³⁸, 1987; SEN *et al.*⁵², 1995; DEBELIAN *et al.*⁸, 1995; DEBELIAN *et al.*⁹, 1997; BAUMGARTNER *et al.*², 2000; LANA *et al.*²⁵, 2001; SIQUEIRA

*et al.*⁶¹, 2002c; FERRARI e BOMBANA¹³, 2005). Alguns experimentos têm demonstrado que os fungos são resistentes à terapia de hidróxido de cálcio (WALTIMO *et al.*⁷³, 2003b; SIQUEIRA e SEN⁶³, 2004; WALTIMO *et al.*⁷⁴, 2004) e, ainda, que estes podem utilizar o cálcio como fonte de nutriente (SEN *et al.*⁵³, 1997a). Portanto o emprego sistemático de hidróxido de cálcio, como medicação intracanal de dentes com lesão periapical, pode permitir que os fungos permaneçam viáveis (LANA *et al.*²⁵, 2001) impedindo o reparo da lesão periapical. Outro fator de relevância a ser considerado, é que a presença do zinco na composição da guta-percha e nos cimentos obturadores endodônticos pode predispor ao crescimento de fungos, pois o zinco acelera o crescimento de algumas espécies de fungos (SOLL *et al.*⁶⁵, 1981; LEGENT *et al.*²⁷, 1989; MENSI *et al.*³², 2007), inclusive do *Aspergillus* (LEGENT *et al.*²⁷, 1989) isolado de infecções primárias no presente estudo. Estes fatores supracitados foram decisivos na nossa opção de pesquisar casos de infecções endodônticas primárias.

Fungos podem ser aeróbios estritos, anaeróbios facultativos, desenvolvendo-se em ambientes com pouco oxigênio ou mesmo na ausência deste elemento (SHEPHERD⁵⁶, 1992). Os dentes selecionados no presente estudo apresentavam necrose pulpar e lesão periapical, as coroas não apresentavam cárie ou restauração comunicante com a câmara pulpar, sendo que algumas amostras obtidas de dentes anteriores apresentavam coroas intactas e história pregressa de traumatismo dentário. As prováveis vias de entrada de bactérias e fungos para o interior dos canais radiculares são a cárie, procedimentos clínicos, fraturas ou fissuras advindas do traumatismo dentário (NAIR⁴⁰, 2004; WALTIMO *et al.*⁷¹, 1997). NAJZAR-FLEGER *et al.*³⁷ (1992) sugerem que as leveduras podem invadir a polpa dentária e chegar aos canais radiculares causando infecções endodônticas através de dentes cariados, entretanto MACDONALD *et al.*²⁹ (1957) isolou leveduras de dentes intactos com polpa necrosada não vitais após trauma. Porém os dentes podem parecer clinicamente intactos, mas revelar micro-

fissuras nos tecidos duros, que são portais de entrada para microrganismos. As bactérias do sulco gengival ou das bolsas periodontais também podem alcançar os canais radiculares de dentes com necrose pulpar através dos túbulos dentinários expostos na superfície cervical da raiz, devido às aberturas no cimento (NAIR⁴⁰, 2004). Da mesma forma, tratando-se dos fungos, esta via também pode ser considerada, uma vez que estudos recentes realizados por WALTIMO *et al.*⁷² (2003) demonstraram semelhança entre o fenótipo e genótipo da espécie de *C. albicans* isolada dos canais radiculares e de outros sítios orais de um mesmo indivíduo. Pode também haver a contaminação por via anacorética (NAIR⁴⁰, 2004). A medida dos túbulos dentinários é de aproximadamente 2,5 µm de diâmetro perto da polpa, 1,2 µm na região mediana da dentina e 0,9µm perto da junção cimento dentinária (TEN CATE⁷⁰, 1994). O diâmetro de uma bactéria, dependendo da espécie é entre 0,3-0,9µm, os blastoconídios das leveduras medem entre 3-8 x 2-7µm (HOOG e GUARRO²⁴, 1995) as hifas podem chegar ao diâmetro 1,9-2,6µm (SEVILLA e ODDS⁵⁵, 1986). Portanto a possibilidade de leveduras e outros microrganismos, como fungos filamentosos, que estejam entre esses diâmetros, de penetrarem nos túbulos dentinários e canais radiculares não pode ser excluída.

NAIR *et al.*³⁹ (1990) estudando dentes humanos com lesões periapicais persistentes, através de microscopia eletrônica observaram estruturas compatíveis com fungos, medindo de 3 – 5µm de diâmetro com parede celular distinta e núcleo denso. Os autores não identificaram as espécies, salientando que o conhecimento da microbiota oral é muito limitada pela falta de taxonomista em diferente táxon e que muitas espécies deixam de ser isoladas e identificadas. Do mesmo modo SEN *et al.*⁵² (1995) relataram a presença de formas compatíveis com fungos medindo de 4 a 6µm de diâmetro, porém não identificam biomorfológicamente as espécies encontradas. Tanto fungos do gênero *Candida* como todas as espécies isoladas no presente estudo apresentam-se dentro destes diâmetros e podem se apresentar tanto como células

simples ou em forma de pseudo-hifa. Portanto, os isolados nos artigos supracitados poderiam pertencer a qualquer uma das espécies, uma vez que não foram identificados.

O método de cultura foi empregado nesta pesquisa para detecção de fungos nos canais radiculares assim como os estudos realizados por GROSSMAN¹⁸ (1967); HOBSON²³ (1959); WALTIMO *et al.*⁷¹ (1997); SUNDQVIST *et al.*⁶⁷ (1998); PECIULIENE *et al.*⁴¹ (2001); LANA *et al.*²⁵ (2001); EGAN *et al.*¹² (2002); PINHEIRO *et al.*⁴² (2003) e CHUGAL *et al.*⁶ (2007). De acordo com WALTIMO *et al.*⁷⁴ (2004) a detecção de fungos através de métodos biológicos moleculares é sensível, podendo ocasionalmente ocorrer resultados falso-positivos. Porém o isolamento de fungos através do método de cultura também pode gerar resultados falso-positivos. Para assegurar o controle do material coletado no presente trabalho foi realizado isolamento absoluto com dique de borracha. A limpeza do campo operatório e superfície dentária foram realizadas com hipoclorito de sódio a 5,25% seguida de neutralização com tiosulfato de sódio a 5%, este protocolo foi repetido após o acesso aos canais radiculares para garantir a assepsia do campo operatório de acordo com trabalhos de PINHEIRO *et al.*⁴² (2003) e CHUGAL *et al.*⁶, (2007). Foi introduzida lima tipo K estéril no interior do canal radicular, com calibre e medida estimada previamente, através da radiografia de estudo. A odontometria do canal foi realizada por meio de localizador apical e conferida através de radiografia periapical, objetivando estimar com precisão o tamanho do conduto, para que a coleta do material fosse realizada ao longo de todo canal, uma vez que fungos filamentosos podem ser aeróbios, aeróbios facultativos ou anaeróbios SHEPHERD⁵⁶ (1992), podendo sobreviver na porção mais apical do canal radicular. Entretanto houve a preocupação de não deixar que houvesse extravasamento do cone de papel, o que poderia gerar um falso resultado.

Uma lima tipo Hedströen estéril foi introduzida no canal, objetivando remover raspas de dentina das paredes radiculares, as quais poderiam ser coletadas através de cone papel uma vez que o canal foi previamente umedecido com soro fisiológico estéril.

Para coleta do material do interior do canal radicular foram empregadas pontas de papel absorvente estéreis que, apesar de já virem esterilizadas de fábrica, foram novamente esterilizadas em autoclave como garantia da manutenção da assepsia. Em seguida foi realizada a cultura através de cone de papel estéril deixado no interior do conduto durante 1 minuto (EGAN *et al.*¹², 2002; PINHEIRO *et al.*⁴², 2003). Em campo isolado por 2 lamparinas, o cone foi inoculado dentro de um tubo de ensaio contendo meio de cultura. Um controle negativo foi realizado através da colocação de uma placa de Petri aberta dentro deste campo estéril contendo o mesmo meio de cultura contido no tubo de ensaio. Ao mesmo tempo era efetuado um controle positivo, quando uma placa de Petri, com o mesmo meio de cultura, permanecia aberta durante a coleta, fora do campo isolado. Ao meio de cultura foi acrescentado Cloranfenicol com a finalidade de evitar o desenvolvimento bacteriano que pode inibir ou se sobrepor ao do fungo. Para evitar o crescimento de fungos saprófitas pode-se acrescentar ao meio de cultura a Cicloheximida, porém este agente antimicótico não foi usado no presente estudo, pois de acordo FISCHER e COOK¹⁵ (2001), a maioria dos fungos oportunistas é sensível a cicloheximida.

No controle negativo em 100% dos casos não houve contaminação, enquanto o controle positivo apresentou crescimento de fungos contaminantes ambientais, porém de linhagens diferentes dos fungos isolados no presente estudo, além de não se apresentarem em cultura pura como os isolados dos canais radiculares.

Os resultados do presente estudo alertam para o isolamento de fungos filamentosos, em infecções endodônticas primárias em pacientes com comprometimento da resposta imunológica, através de método de cultura e caracterização taxonômica dos isolados (PITT⁴³,

1979; PITT⁴⁴, 1985; RAPER e THOM⁴⁵, 1949; RAPER e FENNEL⁴⁶, 1965; SAMSON *et al.*⁵⁰, 1976; SAMSON⁵¹, 1979; GERLACH e NIRENBERG¹⁷, 1982; HAWKSWORTH *et al.*²¹, 1983; HAWKSWORTH *et al.*²², 1995; GARRO e GENE¹⁶, 1992). As espécies isoladas foram: *Aspergillus ustus*, *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus granulatus*, *Emericella quadriluniata*, *Penicillium citrionigrum*, *Penicillium implicatum*, *Penicillium lividum*, *Penicillium micsynvisk*, *Fusarium melanochorum*, *Fusarium moniliforme*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Exophiala jeancelmei*, *Eurotium amstelodame*.

Outros fungos têm sido isolados dos canais radiculares, incluindo *C. glabata*, *C. guilhermondii*, *G. candidum* (WALTIMO *et al.*⁷¹, 1997), *Rhodotorula* (EGAN *et al.*¹², 2002) e *S. cerevisiae* (DEBELIAN *et al.*⁸, 1995). Espécie mais comum do gênero *Saccharomyces*, essa levedura geralmente é encontrada na mucosa oral, no pulmão, no baço e no intestino delgado, estando associada a infecções em pacientes imunocomprometidos, submetidos à quimioterapia, aidéticos, alcoólatras e a outras condições que afetam a resposta imune (DEBELIAN *et al.*⁹, 1997). O gênero *Rhodotorula* é uma levedura que também está associada a pacientes debilitados e imunocomprometidos (FISCHER e COOK¹⁵, 2001). Os fungos filamentosos assim como as leveduras são consideradas oportunistas (MARSH e MARTIN³¹, 1999). As infecções causadas por fungos filamentosos invasores ocorrem quase que exclusivamente em pacientes imunocomprometidos e imunodeprimidos, incluindo deficiência nutricional, fatores hormonais, estresse, uso de drogas imunossupressoras, doenças debilitantes como diabetes e câncer, pacientes com doenças hematológicas e reumatológicas, depressão, AIDS, endocrinopatias, uso de antibiótico de amplo espectro, corticoterapia em altas doses (TELLES⁶⁹, 2004) e de acordo com DUNCAN e PITT FORD¹¹ (2006), os pacientes fumantes também apresentam alterações na resposta imune. Objetivando investigar a presença de fungos filamentosos nos canais radiculares de pessoas com comprometimento

da resposta imunológica, pacientes saudáveis também foram incluídos neste estudo com o intuito de verificar a real relação ente a baixa resposta imune e o isolamento de fungos filamentosos, uma vez que estes são considerados oportunistas.

Fungos filamentosos foram isolados em 17 das 60 amostras pesquisadas deste grupo de pacientes avaliados: cinco eram diabéticos, sendo que destes, 2 eram também fumantes. Quadro de depressão foi relatado por 2 pacientes. A Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide foi relatada por um paciente. Durante preenchimento do questionário de saúde, um paciente revelou ser portador de Hipotireoidismo e outro relatou ter realizado a remoção da glândula tireóide devido à presença constante de nódulos. Além de ser fumante, um paciente era portador de Vitiligo, outro relatou ter Lúpus Eritematoso. Devido a quadro alérgico e de Asma brônquica, dois pacientes respectivamente revelaram fazer uso de corticoterapia. Um outro paciente no qual houve crescimento micelial relatou ser fumante e fazer uso de droga ilícita. Um paciente havia sofrido queimadura grave inclusive com perda do braço direito e havia ficado internado em Unidade de Terapia Intensiva. Quadro de Artrite Reumatóide foi relatado por um paciente. Portanto, ao longo da pesquisa, pudemos verificar que a presença de fungos filamentosos, nos canais radiculares com necrose pulpar e lesão periapical, estava diretamente ligada à deficiência de resposta imune do paciente, pois todos os casos nos quais houve isolamento daqueles, os pacientes apresentavam fatores capazes de causar alterações na resposta imunológica (TELLES⁶⁹, 2004; DUNCAN e PITT FORD¹¹, 2006).

De acordo com relatos de ASSED *et al.*¹ (2000); DEBELIAN *et al.*⁹ (1997); DEBELIAN *et al.*¹⁰ (1998), os fungos são capazes de se disseminar via corrente sanguínea, caracterizando um quadro de fungemia. Sendo que uma profilaxia contra possíveis infecções fúngicas deve ser aplicada em pacientes sistemicamente comprometidos, devendo ser dada atenção especial à utilização de medicamentos específicos no tratamento das infecções

endodônticas com envolvimento de fungos. Os fungos possuem ainda fatores de virulência, capazes de induzir à formação de lesão periapical, incluindo adaptação a uma variedade de circunstâncias ambientais, adesão a uma variedade de superfícies, à produção de enzimas hidrolíticas, transição morfológica, formação de biofilme (SIQUEIRA e SEN⁶³, 2004; SAMARANAIKE e MAC FARLANE⁴⁹, 1990). Fungos do gênero *Aspergillus* e as espécies *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Exophiala jeancelmei*, produzem melanina, este pigmento hidrofóbico que se localiza na superfície do conídio é reconhecido como fator de virulência devido à capacidade de proteger o patógeno de danos causados pelos macrófagos e pelos neutrófilos (LANGFELDER *et al.*²⁶, 2003).

Baseado nestes resultados é de fundamental importância a conscientização de que a resposta de cada paciente diante do tratamento endodôntico é diferente, pois cada qual apresenta sua capacidade de defesa. Portanto o protocolo de atendimento não pode ser idêntico para todos os pacientes, e mais uma vez a questão da realização do tratamento endodôntico, em sessão única ou não, deve ser repensado, uma vez que fatores relacionados à saúde geral do paciente podem interferir tanto na microbiota do canal radicular, quanto na resposta imunológica, podendo interferir no resultado final do tratamento.

Portanto novos estudos devem ser desenvolvidos com o intuito de determinar um protocolo de tratamento, relacionado a soluções irrigadoras, curativo de demora e terapia sistêmica adequada, capaz de erradicar esses patógenos promovendo desta forma condições adequadas ao reparo dos tecidos periapicais após o tratamento endodôntico.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais em que esta pesquisa foi conduzida e, com base nos resultados obtidos, pôde-se concluir que:

1- Em canais radiculares, com necrose pulpar e lesão periapical (infecção primária), pode ser demonstrado, através de culturas positivas, a presença de fungos filamentosos.

2- O crescimento de fungos filamentosos no interior dos canais radiculares, com polpa necrótica e lesão periapical, apresentaram relação direta com a deficiência da resposta imunológica do hospedeiro.

3- O estudo taxonômico dos isolados, realizado neste estudo, revelou a presença das seguintes espécies: *Aspergillus ustus*, *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus granulatus*, *Emericella quadriluniata*, *Penicillium citrionigrum*, *Penicillium implicatum*, *Penicillium lividum*, *Penicillium micsynvisk*, *Fusarium melanochorum*, *Fusarium moniliforme*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Exophiala jeancelmei*, *Eurotium amstelodame*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. ASSED, L. B. S.; PERASSI, F. T.; YOKO ITO, I.; YAMASHITA, J.; BONIFÁCIO, K. C.; TANOMARU, M. A presença de fungos nas infecções endodônticas. **Revista da Universidade de Medicina de Piracicaba**, v. 12, n. 1, p. 63-7, jan/dez. 2000.
2. BAUMGARTNER, J. C.; WATSS, C. M.; XIA, T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. **J Endod**, v. 26, n. 12, p. 695-8, 2000.
3. BOLIGNANO, G., CRISEO, G. Disseminated nosocomial fungal infection by *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum*: a case report, **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 9, p. 4483-85, Sep. 2003.
4. CALDERONE, R.A; FONZI, W.A. Virulência factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol**, v. 9, p. 327-35, 2001.
5. CHAFFIN, W. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARÑEZ, J. P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 1, p. 130-80, Mar. 1998.
6. CHUGAL, N.; FLEISCHMANN, J.; SONDEJ, M.; SPÄNGBERG, L. Isolações quantitative dos fungos dos canais da raiz: um estudo methodological, **IADR/AADR/CADR General Session and Exhibition Online**, New Orleans, Mar. 2007. Disponível em: <<http://www.iadr.confex.com/iadr/2007orleans/techprogram/abstract>>. Acesso em: 2 Ab.2007
7. DAHLÉN, G.; MOLLER, A. J. R. Microbiology of endodontic infections. *In*: SLOTS, J.; TAUBMAN, M. A. **Contemporary oral microbiology and immunology**. St. Louis: Mosby, cap. 24, p. 444-75, 1992.
8. DEBELIAN, G. J.; OLSEN, I.; TRONSTAD, L. Bacteremia in conjunction with endodontic therapy. **Endod Dent Traumatol**, v. 11, n. 3, p. 142-6, Jun. 1995.
9. DEBELIAN, G. J.; OLSEN, I.; TRONSTAD, L. Observation of *Saccharomyces cerevisiae* in blood of patient undergoing root canal treatment. **Int Endod.**, v. 30, n. 5, p. 313-17, Sep. 1997.
10. DEBELIAN, G. J.; OLSEN, I.; TRONSTAD, L. Anaerobic bacteremia and fungemia in patients undergoing endodontic therapy: an overview. **Ann Periodontol**, v. 3, n. 1, p. 281-7, Jul. 1998.
11. DUNCAN, H. F.; PITT FORD, T. R. The potential association between smoking and endodontic disease. **Int Endod J**, v. 39, n. 11, p. 843-54, Nov. 2006.
12. EGAN, M. W.; SPRATT, D. A.; NG, Y. L.; LAM, J. M.; MOLES, D. R.; GULABIVALA, K. Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. **Int Endod J**, v. 35, n. 4, p. 321-9, Apr. 2002.

13. FERRARI, P. H. P.; CAI, S.; BOMBANA, A. C. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. **Int Endod J**, n. 6, v. 38, p. 372-80, Jun. 2005
14. FERREIRA, F. B.; FERREIRA, A. L.; GOMES, B. P.; SOUZA-FILHO, F. J. Resolution of persistent periapical infection by endodontic surgery. **Int Endod J**, v. 37, n. 1, p. 61-9, Jan. 2004.
15. FISCHER, F.; COOK, N.B. **Micologia - Fundamentos e Diagnóstico**, Rio de Janeiro: Revinter. 2001.
16. GARRO, J.; GENE, J. *Fusarium* infections criteria for the identification on the responsible species. **Mycoses**, v. 35, p. 109-14, 1992.
17. GERLACH, W.; NIRENBERG, H. The genus *Fusarium*. **A Pictorial Atlas**, Berlim, Institute fur Mikrobiologie Press, p. 406, 1982.
18. GROSSMAN, L. I. Evaluation of antifungal agents for endodontic use. **J Dent Res**, v. 46, p. 215-7, 1967.
19. GROSSMAN, L. I. **Root Canal Therapy**, 3 ed. London: Henry Kimpton, 1952.
20. HANCOCK, H.; SIGURDSSON, A.; TROPE, M.; MOISEIWITSCH, J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 91, p. 579-86, May. 2001.
21. HAWKSWORTH, D. L.; SUTTON, B. C.; AINSWORTH, G. D. **Dictionary of Fungi**, 7 ed. P. 445, Kew, Surrey, England. CAB Press, 1983.
22. HAWKSWORTH D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. **Dictionary of Fungi**, 8 ed. P. 816, Wallingford, CAB International, 1995.
23. HOBSON, P. An investigation into the bacteriological control of infected root canal. **Br Dent J**, v. 20, p. 63-70, 1959.
24. HOOG, G. S.; GUARRO, J. **Atlas of Clinical Fungi**, Baarn and Delft, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures/Reus, Spain: Universitat Rovira I Virgili, 1995
25. LANA, M. A.; RIBEIRO-SOBRINHO, A. P.; STEHLING, R., GARCIA, G. D., SILVA, B. K., HAMDAN, J. S., NICOLI, J. R., CARVALHO, M. A.; FARIAS, L. M. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. **Microbiol Oral Immunol**, v. 16, n. 2, p. 100-5, Apr. 2001.
26. LANGFELDER, K.; STREIBEL, M.; JAHN, B.; HAASE, G.; BRAKHAGE, A. A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for pathogenic fungi. **Fungal Genet Biol**, v. 38, p. 143-58, 2003.
27. LEGENT, F.; BILLET, J.; BEAUVILLAIN, C.; BONNET, J.; MIEGEVILLE, M. The role of dental canal fillings in the development of *Aspergillus* sinusitis. A reportr 85 cases. **Arch Otorhinolaryngol**, v. 246, n. 5, p. 318-20, 1989.

28. LOMÇALI, G.; SEM, B. H.; ÇANKAYA, H. Scanning electron microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. **Endod Dent Traumatol**, v. 12, p. 70-6, 1996.
29. MACDONALD, J. B.; HARE, G. C.; WOOD, A. W. S. The bacteriologic status of the pulp chambers in intact teeth found to be non-vital following trauma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 10, n. 3, p.318–22, Mar. 1957.
30. MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganismis**. 9 ed. Upper Saddle River NJ: Prentice Hall, 2000.
31. MARSH, P.; MARTIN, M. V. **Oral Microbiology**. 4 ed., Oxford (England): Wright, 1999.
32. MENSI, M.; PICCIONI, M.; MARSILI, F., NICOLAI, P.; SAPELLI, C. L.; LATRONICO, N. Risk of maxillary fungus ball in patients with endodontic treatment on maxillary teeth: a case-control study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 103, n. 3, p. 433-36, Mar. 2007.
33. MILETIC, I.; PRPIC-MEHICIC, G., MARSAN, T., TAMBIC-ANDRASEVIC, A.; PLESKO, S.; KARLOVIC, Z.; ANIC, I. Bacterial and fungal microleakage of AH26 AHPlus root canal sealers. **Int Endod J**, v. 35, n. 5, p. 428-32, May. 2002.
34. MOLANDER, A.; REIT, C.; DAHLÉN, G.; KVIST, T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int Endod J**, v. 31, p. 1-7, 1998.
35. MONTIEL, H. V. Patógenos emergentes en micosis cutáneas y sistémicas. **Dermatología Venezolana**, v. 42, n. 2, p.4-18, 2004.
36. MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the Fungi**, 4 ed. upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 1996.
37. NAJZAR-FLEGER, D.; FILIPOVIC, D.; PRPIC, G.; KOBLER, D. *Candida* in root canal in accordance with oral ecology. **Int Endod J**, v. 25, p. 40, 1992 (Abstract 1528).
38. NAIR, P. N.; SJOGREN, U.; KREY, G.; KAHNBERG, K. E.; SUNDQVIST, G. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. **J Endod**, v. 13, p. 29-39, 1987.
39. NAIR, P. N. R.; SJÖGREN, U.; KREY, G.; KAHNBERG, K.; 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**, v. 16, n. 12, p. 580-8, Dec. 1990.
40. NAIR, P. N. R. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 15, n. 6, p. 348-81, 2004.
41. PECIULIENE, V.; REYNAUD, A. H.; BALCIUNIENE, I.; HAAPASALO, M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. **Int Endod J**, n.6, v.34, p.429–34, Sep. 2001.

42. PINHEIRO, E. T.; GOMES, B. P.; FERRAZ, C. C.; SOUZA, E. L.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **Int Endod J**, v. 36, n. 1, p. 1-11, Jan. 2003.
43. PITT, J. I. **The genus *Penicillium***. Academic Press, p. 635, Austrália, 1979.
44. PITT, J. I. **A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species**. Academic Press, p.182, Austrália, 1985.
45. RAPER, K. B; THOM, C. **A Manual of the *Penicillium***. The Willians & Wilkns Co. Baltimore, USA, 1949.
46. RAPER, K. B.; FENNEL, D. I. **The Genus *Aspergillus***. The Willians & Wilkns Co. p. 690, Baltimore, USA, 1965.
47. RIPPON, J. W. Medical Mycology. **The Phathogenic Fungi and Pathogenic Actinomycetes**, 3 ed. Philadelphia: WB Saunders, 1988.
48. RIVALIER, E.; SEYDEL, S. Nouveau procedé de culture sur lames gélosées applique a l'étude microscopique des champignons des teignes. **Ann Parasitol**, v.10, n.5, p.444-52,1932.
49. SAMARANAIAKE, L. P.; MAC FARLANE, T. W. **Oral Candidosis**. London: Ed. Buter Worth Eco Ltd., p. 265, 1990.
50. SAMSON, R. A.; STOLK, A. C.; HADLOK, R. Revision of the subsection fasciculate of *Penicillium* and some allied species. **Studies in mycology**, p.11, 1976.
51. SAMSON, R. A. A compilation of the *Aspergillus* described since 1965. **Studies in mycology**, p.18, 1979.
52. SLACK, G. The bacteriology of infected root canal and *in vitro* penicillin sensitivity. **Brit Dent J**, v. 3, p. 211-4, 1953.
53. SEN, B. H.; PISKIN, B.; DEMIRCI, T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. **Endod Dent Traumatol**, v. 11, p. 6-9, 1995.
54. SEN, B. H.; SAFAVI, K. E.; SPÄNGBERG, L. S. Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 84, n. 1, p. 68-73, Jul. 1997a.
55. SEN, B. H.; SAFAVI, K. E.; SPÄNGBERG, L. S. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. **Arch Oral Biol**, v. 42, n. 7, p. 513-20, Jul. 1997b.
56. SEVILLA, M. J.; ODDS, F. C. Development of *Candida albicans* hyphae in different growth media-variations in growth rates, cell dimensions and timing of morphogenetics events. **J Gen Microbiol**, v. 132, p. 3083-8, 1986.
57. SHEPHERD, M.G. Basic Mycology In : SLOTS J. TAUBMAN, M.A. **Contemporary Oral Microbiology and Immunology**, p. 59-62. St. Louis Missouri, USA, 1992.

58. SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 277, 2004.
59. SIQUEIRA JR, J. F. Endodontics infections: concepts, paradigms, and perspectives. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 94, n. 3, p. 281-93, Sep. 2002.
60. SIQUEIRA JR, J. F.; ROÇAS, I.; ELIAS, C. N., DE UZEDA, M. Fungal infection on the radicular dentin. **J Endod**, v. 28, n. 11, p. 770-3, Nov. 2002a.
61. SIQUEIRA JR, J. F.; ROÇAS, I.; LOPES, H. Patterns of microbial colonization in primary canal infections. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Endod**, v. 93, n. 2, p.174-8, Feb. 2002b.
62. SIQUEIRA JR, J. F.; ROÇAS, I.; MORAES, S. R.; SANTOS, K. R. N. Direct amplification of rRNA gene sequence for identification of selected oral pathogens in root canal infections. **Int Endod J**, v. 35, p. 345-51, Apr. 2002c.
63. SIQUEIRA JR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. Endod**, v. 97, p. 85-94, 2004.
64. SIQUEIRA JR, J. F.; SEN, B. H. Fungi in endodontic infection. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 97, n. 5, p. 632-41, 2004.
65. SOLL, D. R.; BENDELL, G. W.; BRUMMEL, M. Zinc and regulation of growth and phenotype in the infectious yeast *Candida albicans*. **Infect Immun**, v. 32, n. 3, p. 1139-47, Jun. 1981.
66. SUNDE, P. T.; OLSEN, I.; DEBELIAN, G. J.; TRONSTAND, L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. **J Endod**, v. 28, n. 4, p. 304-10, Apr. 2002.
67. SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D.; PERSSON, S.; SJÖGREN, U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 85, n. 1, p. 86-93, Jan. 1998.
68. SWEET, S. P. Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV infection. **Oral Dis**, v. 3, n. 1, p. 88-95, May. 1997.
69. TELLES, F. Q. Infecções por fungos filamentosos invasores. **Revista Hospitalar**. Ano VI, n. 36, nov/dez. 2004.
70. TEN CATE, A. R. **Oral Histology**. Development. Structure and Function, 4 ed., p. 174. St. Louis, Missouri, USA: Mosby., 1994.
71. WALTIMO, T. M. T.; SIRÉN, E. K.; TORKKO, H. L.; OLSEN, I.; HAAPASALO, M. P. Fungi in therapy-resistant in apical periodontitis. **Int Endod J**, v. 30, p. 96-101, Mar. 1997.
72. WALTIMO, T. M. T.; KUUSINEN, M.; JÄRVENSIVU, A.; NYBER, G. P.; VÄNÄNEN, A.; RICHARDSON, M.; SALO, T.; TJÄDERHANE, L. Examination on

Candida spp. In refractory periapical granulomas. **Int Endod J**, v. 36, n. 9, p. 643-47, Sep. 2003a.

73. WALTIMO, T. M. T.; SEN, B. H.; MEURMAN, J. H.; ORSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. P. P. Yeasts in apical periodontitis. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 14, n. 2, p. 128-37, 2003b.

74. WALTIMO, T. A. T.; HAAPASALO, M.; ZEHNDER, M.; MEYER, J. Clinical aspects related to endodontics yeast infections. **Endodontics Topics**, v. 9, n. 1, p. 66-78, Nov. 2004.

75. WHITTAKER, C. J.; KLIER, C. M.; KOLENBRANDER, P. E. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. **Ann. Rev Microbiol**, v. 50, p. 513-52, 1996.

ANEXO

ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecimento

PrezadoSr(Sra):_____

A pesquisa da qual você esta sendo convidado a participar tem como objetivo determinar os microrganismos envolvidos nas infecções endodônticas e corresponde a parte clínica da tese de doutorado intitulada "Isolamento e caracterização biomorfológica de fungos filamentosos em infecções endodônticas". Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Pedro Ernesto, o qual após avaliação considerou o projeto aprovado por encontrar-se dentro dos padrões éticos de pesquisa em seres humanos, conforme resolução nº 196.

O protocolo deste estudo envolve preenchimento de um questionário de saúde, exame clínico e radiográfico, sendo que, somente participarão do mesmo, pacientes que apresentarem necrose pulpar e presença de lesão periapical, sem comunicação com a cavidade oral e sem presença de bolsa periodontal. Uma vez diagnosticado este quadro, será realizado acesso aos canais radiculares mediante isolamento absoluto e assepsia. A coleta do material será realizada por intermédio de cones de papel estéril, de forma gratuita e sem representar nenhum risco para o paciente. Todo o procedimento será realizado pelo pesquisador responsável, e os dados dos pacientes permanecerão sobre sigilo e não serão utilizados sem autorização prévia, tendo o mesmo o direito de recusar-se a participar da pesquisa ou retirar o consentimento, por escrito, sem qualquer penalidade.

Eu, _____

identidade nº _____, declaro que li e compreendi o que me foi explicado e, desta, autorizo voluntariamente a participação na pesquisa.

Rio de Janeiro _____/_____/_____, _____
Assinatura do paciente

Rio de Janeiro _____/_____/_____, _____
Assinatura do pesquisador

ANEXO B - Folha de aprovação do Conselho de Ética

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



Rio de Janeiro, 07 de dezembro de 2006

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof. Paulo José D'Albuquerque Medeiros
Para: Aut. Cinthya Cristina Gomes
Orient. Prof. Rivail Fidel

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (1638-CEP/HUPE) " ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOMORFOLÓGICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM INFECÇÕES ENDODÔNTICAS " aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. S^{a.}, que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Prof. Paulo José D'Albuquerque Medeiros
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa