

**ARTIGO EXPERIMENTAL:  
AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS  
PRESENTES NAS LESÕES PERIAPICAIS EM PACIENTES  
NORMORREATIVOS.**

MICROBIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL EVALUATION OF  
BACTERIA PRESENT IN PERIAPICAL LESIONS IN PATIENTS  
WITHOUT SYSTEMIC DISEASES.

**Rene Porfirio Gonzales Reyes Ortiz Junior (Ortiz Junior RPGR) \***

**Charlotte Cesty Borda de Saenz (Borda CC) \***

**Erik Cendel Saenz Tejada (Saenz EC) \***

**Ricardo Ruiz Martuci (Martuci RR) \*\***

**Sylvio Correa Fiuza (Fiuza SC) \***

**Cristina Tebechrani Fiuza (Fiuza CT) \***

**RESUMO**

As lesões periapicais são reações imunoinflamatórias, as quais compreendem uma rede integrada com fatores de virulência bacteriano e, conseqüentemente, um intrínseco processo infeccioso é instalado, tendo como resultado, um microambiente que proporciona uma destruição tecidual periapical em um dente desvitalizado. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a população bacteriana presente nas lesões periapicais em pacientes normorreativos. Os pacientes (n = 5) assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a metodologia, utilizada para a identificação bacteriana, seguiu, como padrão, as características morfológicas das colônias no meio de cultura (ágar-sangue) e testes bioquímicos específicos, sendo que, as amostras clínicas foram obtidas por meio da exodontia e curetagem mecânica da lesão. Dentre as cinco amostras avaliadas, tivemos como resultado, 100% de bactérias anaeróbias facultativas e cocos Gram-positivos, sendo encontradas as seguintes espécies bacterianas, em ordem decrescente de prevalência: *Streptococcus viridans* (71%), *Staphylococcus aureus* (17%), *Staphylococcus coagulase negativa* (11%) e *Enterococcus faecalis* (1%). Através dessa pesquisa, podemos concluir que

---

\* Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU); Av. Santo Amaro, 1239 – Vila Nova Conceição – São Paulo, SP, Brasil. CEP: 04505-002.

\*\* Doutorado em Materiais Dentários pela Universidade de São Paulo (USP); Cidade Universitária – São Paulo, SP, Brasil.

há uma maior predominância de *S. viridans* nas lesões periapicais, além disso, a identificação bacteriana por meio das características morfológicas das colônias no meio de cultura e os testes bioquímicos específicos são eficazes.

**PALAVRAS-CHAVE:** avaliação microbiológica; cisto periapical; granuloma periapical; identificação bacteriana; periodontite apical crônica; testes bioquímicos.

## **ABSTRACT**

The periapical lesions are immunoinflammatory reactions, which comprise an integrated network with bacterial virulence factors and therefore an intrinsic infectious process is installed, resulting in a microenvironment providing a periapical tissue destruction in a devitalized tooth. The objective of this study was to evaluate the bacterial population present in periapical lesions in patients without systemic diseases. The patients (n = 5) signed an Informed Consent (IC) and the methodology used for bacterial identification, followed by default, the morphological characteristics of the colonies in the culture medium (blood agar) and biochemical tests specific, and the clinical samples were obtained through tooth extraction and mechanical curettage of the lesion. Among the five samples tested had as a result, 100% of facultative anaerobic bacteria and Gram-positive cocci, the following bacterial species being found in decreasing order of prevalence: *Streptococcus viridans* (71%), *Staphylococcus aureus* (17%), *Staphylococcus negative coagulase* (11%) and *Enterococcus faecalis* (1%). Through this research we can conclude that there is a higher prevalence of *S. viridans* in periapical lesions, in addition, bacterial identification by means of the morphological characteristics of the colonies in the culture medium and the specific biochemical tests are effective.

**KEYWORDS:** bacterial identification; biochemical tests; chronic apical periodontitis; microbiological evaluation; periapical cyst; periapical granuloma.

## **INTRODUÇÃO**

As lesões periapicais correspondem a reações imunoinflamatórias, as quais, os microrganismos e seus subprodutos são considerados os agentes etiológicos do seu desenvolvimento<sup>1,2</sup>. Sua patogenia decorre da necrose pulpar, uma vez que a polpa mortificada torna-se o ambiente propício dessas bactérias<sup>3,4</sup>.

Este é um processo complexo que envolve uma série de mecanismos intrínsecos mediados por moléculas sinalizadoras, o que resulta no desenvolvimento de lesões que podem representar estágios de um mesmo processo inflamatório,

destacando-se os granulomas periapicais (GP's), os cistos radiculares (CR's) e os cistos periapicais residuais (CPR's)<sup>5</sup>.

Como define Neville et al. (2009), o GP é uma massa de tecido granulomatoso cronicamente inflamado no ápice de um dente desvitalizado (figura 1), a qual representa uma reação secundária e defensiva do hospedeiro na tentativa de conter a progressão do processo infeccioso<sup>4</sup>. Por outro lado, o CR e o CPR são ambos constituídos por uma cavidade patológica, contendo líquido e restos celulares no seu interior, e revestidos por epitélio, oriundo, principalmente, dos restos epiteliais de Malassez que permanecem na região periapical após a odontogênese e se desenvolvem como resultado do estímulo inflamatório<sup>6,7,8</sup>.

Se, por um lado, no CR, um dente necrosado e com gangrena pulpar presumivelmente pode ser estimulado pela inflamação, por outro, o tecido inflamatório periapical que não é curetado no momento da remoção do dente pode dar origem ao cisto inflamatório denominado de CPR<sup>4</sup>.

Grande parte das lesões é descoberta durante exames radiográficos de rotina, observando-se uma radiolucidez de tamanho variável, e o dente afetado mostra a perda da lâmina dura apical (figura 2). A reabsorção radicular não é incomum nestes casos<sup>4</sup>.



Figura 1. Lesão periapical no ápice do elemento 25, tendo 3 mm de diâmetro.



Figura 2. Radiografia com lesão radiolúcida circunscrita no ápice do elemento 25.

Atualmente sabe-se que as infecções endodônticas são polimicrobianas, sendo que mais de 200 espécies bacterianas e alguns microrganismos, como leveduras, já foram isolados de canais radiculares infectados<sup>2,9,10,11,12</sup>.

Assim, nos dias atuais, o tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar e reação periapical crônica deve ter como objetivo, além da eliminação dos microrganismos, a inativação de endotoxinas e demais produtos tóxicos, através da limpeza e modelagem do canal, utilizando instrumentos endodônticos, realizando o

procedimento de irrigação-aspiração com substâncias químicas auxiliares e administrando medicações intracanaís<sup>13</sup>.

Ao levar em conta que a identificação bacteriana é uma ferramenta muito útil para o diagnóstico e tratamento dos pacientes com lesões periapicais e, além disso, com esses conhecimentos, pode-se estabelecer um manual terapêutico, mostrando qual antibiótico, substância química auxiliar e medicação intracanal são os mais eficazes para o controle microbiano nestes tipos de casos. Com isso, o objetivo principal do trabalho é avaliar a população bacteriana presente nas lesões periapicais em pacientes normorreativos, através das características morfológicas das colônias no meio de cultura (ágar-sangue), coloração de Gram e testes bioquímicos específicos, avaliando, também, a efetividade da metodologia utilizada.

## **METODOLOGIA**

Primeiramente, podemos destacar que o presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Santo Amaro (UNISA), através da submissão na Plataforma Brasil, sendo conduzido de acordo com as normas éticas e visando os princípios da bioética, tais quais: a autonomia, beneficência, não maleficência, justiça e equidade. Além disso, antes da realização dos procedimentos de coletas, os sujeitos da pesquisa foram informados dos procedimentos que seriam efetuados, além de serem sanadas todas as suas dúvidas e, os mesmos, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Foram considerados, como fatores de inclusão, os pacientes normorreativos acima de 18 anos, que apresentavam a lesão periapical em qualquer dente. Em caso de pacientes que tinham sido submetidos à antibioticoterapia, os mesmos aguardaram 30 dias antes da intervenção cirúrgica. Assim sendo, foram considerados, como fatores de exclusão, pacientes com dentes decíduos, não-normorreativos e/ou submetidos à antibioticoterapia.

Em casos de indicação de exodontia do elemento dentário, devido estar condenado, os pacientes foram encaminhados diretamente para a Clínica Odontológica das Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU), onde foi realizada a extração do elemento dentário e curetagem mecânica da lesão periapical. Lembrando que, previamente a extração do elemento dentário, foi feita uma avaliação com dois especialistas, que não faziam parte da pesquisa e de diferentes especialidades (endodontista e cirurgião), para saber se o plano de tratamento era o mais adequado ao paciente.

Neste estudo, cuidados foram tomados para prevenir a contaminação do espécime clínico com a microbiota da cavidade oral. Por isso, realizou-se a antisepsia intrabucal, nos pacientes atendidos, com um enxaguatório composto por gluconato de clorexidina 0,12%, sendo feito o bochecho por um minuto. Em seguida, a antisepsia extrabucal foi realizada com uma gaze embebida em gluconato de clorexidina a 0,2%. Através dessa manobra pré-cirúrgica, permitiu-se a redução no número de microrganismos presentes na cavidade oral e, portanto, qualquer intervenção odontológica foi antecedida por esse procedimento<sup>14,15</sup>.

As lesões periapicais coletadas, excluindo o elemento dentário da pesquisa, foram acondicionadas em um coletor universal estéril, devidamente rotulado (nome do paciente, número de identificação, data e hora da coleta), contendo 20 mililitros (ml) de Tris-EDTA (TE) como meio de transporte e, em seguida, foram enviados ao Laboratório de Biologia Molecular da FMU em temperatura refrigerada, evitando choques térmicos, e em um tempo menor que duas horas<sup>14</sup>.

Iniciando os procedimentos laboratoriais, realizamos as sementeiras iniciais, em condições assépticas, utilizando o meio de o ágar-sangue com sangue de carneiro, e foram incubadas a 37°C em condições anaeróbia e aeróbia. Após 48 horas de incubação as culturas primárias foram avaliadas através das características morfológicas das colônias, tais como, o tamanho, a borda ou forma, a elevação, a consistência, a coloração, a aparência da superfície da colônia e a presença (total ou parcial) ou ausência de hemólise no meio. Além disso, a contagem de número de colônias foi determinada, para obter a frequência microbiana de cada tipo de espécie.

A segunda etapa foi à sementeira secundária, com finalidade de isolar uma espécie bacteriana, ou seja, obter uma cultura pura, através da técnica de esgotamento em ágar-sangue com sangue de carneiro, e incubada a 37°C em condições anaeróbia e aeróbia. Após 48 horas de incubação, as culturas secundárias foram analisadas para subsequente identificação bacteriana.

A identificação bacteriana das anaeróbias facultativas foi concretizada através das características morfológicas das colônias no meio de ágar-sangue (tabela 1), da coloração de Gram e dos testes bioquímicos específicos, tais como, o teste da catalase, teste da coagulase, teste do ágar bile esculina e o teste do cloreto de sódio (NaCl) a 6,5% (figura 3)<sup>14,16</sup>.

Tabela 1. Características morfológicas das colônias anaeróbias facultativas no ágar-sangue.

Espécie	Tamanho	Forma	Elevação	Aparência	Cor	Hemólise
<i>S. aureus</i>	Grande	Circular	Convexa	Cremosa	Amarela ou Branca	$\beta$
<b>SCN</b>	Média	Circular	Elevada	Cremosa	Branco-acinzentada	$\gamma$
<i>S. viridans</i>	Pequena	Puntiforme / Irregular	Achatada	Embaçada	Branco-acinzentada	$\alpha$
<i>E. faecalis</i>	Média	Circular	Elevada	Brilhante	Cinza	$\gamma$

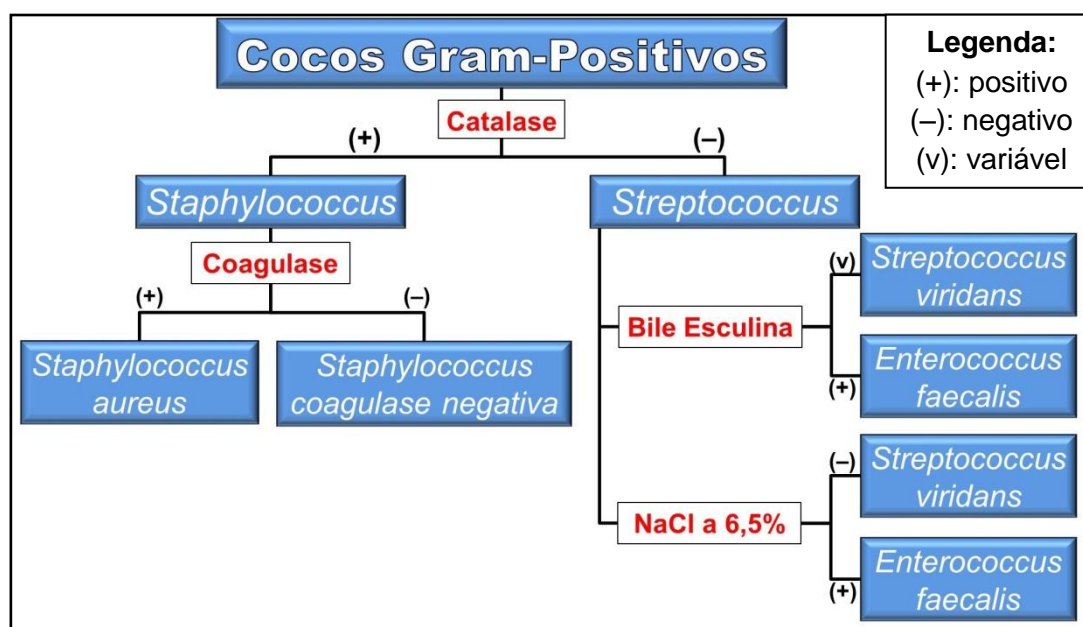


Figura 3. Testes bioquímicos realizados em bactérias anaeróbias facultativas.

Por outro lado, a identificação bacteriana de anaeróbias estritas seguiu as características morfológicas das colônias no meio de ágar-sangue (tabela 2), a coloração de Gram e os testes bioquímicos, tais como, o teste do indol (tabela 2), além do teste de nitrato, teste da catalase e antibiograma para analisar a sensibilidade das espécies bacterianas com vancomicina, canamicina e colistina (tabela 3).

Ao final dos procedimentos laboratoriais, os resultados determinados foram tabelados e avaliados estatisticamente.

Tabela 2. Características morfológicas das colônias anaeróbias estritas no ágar-sangue.

Identificação	Gram	Morfologia das colônias no ágar-sangue	Prova do indol
<b><i>Bacteroides</i> grupo <i>fragilis</i></b>	Bacilo médio pleomórfico.	Grandes (2 a 3 mm), convexas, brilhantes, acinzentadas.	Variável.
<b><i>Fusobacterium nucleatum</i></b>	Bacilo fusiforme, fino, com extremidades afiladas.	Opacas e esfareladas achatadas, cinza-claro, colônias de 0,5 a 2,0 mm halo esverdeado ao redor da colônia quando expostas ao ar.	Positiva.
<b><i>Fusobacterium necrophorum</i></b>	Bacilo longo, pleomórfico, com extremidades arredondadas.	Umbilicado, halo esverdeado quando exposto ao ar.	Positiva.
<b><i>Fusobacterium varium</i></b>	Largas com extremidades arredondadas.	Forma de ovo frito, translúcidas, centro opaco e bordas irregulares.	Variável.
<b><i>Porphyromonas</i> spp.</b>	Cocobacilo muito pequeno.	Pequenas, translúcidas, opacas, fluorescência vermelho-tijolo em ágar brucella.	Positiva.
<b><i>Prevotella intermedia/ nigrescens</i> <i>P. pellens</i></b>	Cocobacilo muito pequeno.	Pequenas, translúcidas ou opacas.	Positiva.
<b><i>Veillonella</i> spp.</b>	Diplococo muito pequeno.	Pequenas, transparentes ou opacas.	Negativa.

(Modificado de Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 3 ed. São Paulo: Sarvier; 2010. 530p.)

Tabela 3. Testes bioquímicos realizados em bactérias anaeróbias estritas.

Microrganismos	Vancomicina (5 µg)	Canamicina (1.000 µg)	Colistina (10 µg)	Nitrato	Catalase
<b><i>Bacteroides</i> grupo <i>fragilis</i></b>	Resistente	Resistente	Resistente	–	Variável
<b><i>Porphyromonas</i> spp.</b>	Sensível	Resistente	Resistente	–	–
<b><i>Prevotella</i> spp.</b>	Resistente	Resistente	Variável	–	–
<b><i>Fusobacterium</i> spp.</b>	Resistente	Sensível	Sensível	–	+
<b><i>Veillonella</i> spp.</b>				+	Variável

(Modificado de Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. 3 ed. São Paulo: Sarvier; 2010. 530p.)

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para obter maior diversidade bacteriana foi utilizado o meio de ágar-sangue por ser um meio de cultura diferencial, não seletivo e rico em nutrientes, o qual oferece ótimas condições de crescimento na maioria dos microrganismos. Além disso, pelo fato da conservação dos eritrócitos íntegros, favorecem a formação de halos de

hemólise nítidos, úteis para a diferenciação de *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp<sup>17</sup>.

Durante a avaliação dos resultados da identificação bacteriana, observou-se que 100% das bactérias isoladas eram cocos Gram-positivos e anaeróbios facultativos, ou seja, houve crescimento em condições anaeróbias e aeróbias, havendo uma predominância de microrganismos anaeróbios facultativos sobre as espécies anaeróbias estritas<sup>18,19</sup>. Diante disto, a pesquisa foi focada na identificação dos cocos Gram-positivos e bactérias anaeróbias facultativas (tabela 1 e figura 3).

As bactérias isoladas das amostras clínicas foram *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Streptococcus viridans* e *Enterococcus faecalis* e mostraram variabilidade entre elas (Figura 4), onde se observou alto número de colônias de *S. viridans* nas amostras B, C, D e E.

Em trabalhos anteriores os *Streptococcus viridans* foram isolados de todas as áreas da boca e compreendem uma grande proporção da microflora oral residente, sendo que, pode ser divididos em quatro grupos: Grupo *S. mutans* (relacionado com a etiologia da cárie dentária), *S. salivarius*, *S. anginosus* e *S. mitis*<sup>20</sup>. Além disso, apesar dos *Staphylococcus* spp. não serem geralmente considerados como membros da microflora oral residente, eles podem estar presente de modo transitório, sendo que já foram isolados de algumas áreas com cáries de superfície radicular e de algumas bolsas periodontais que falharam em responder à terapia convencional<sup>20</sup>.



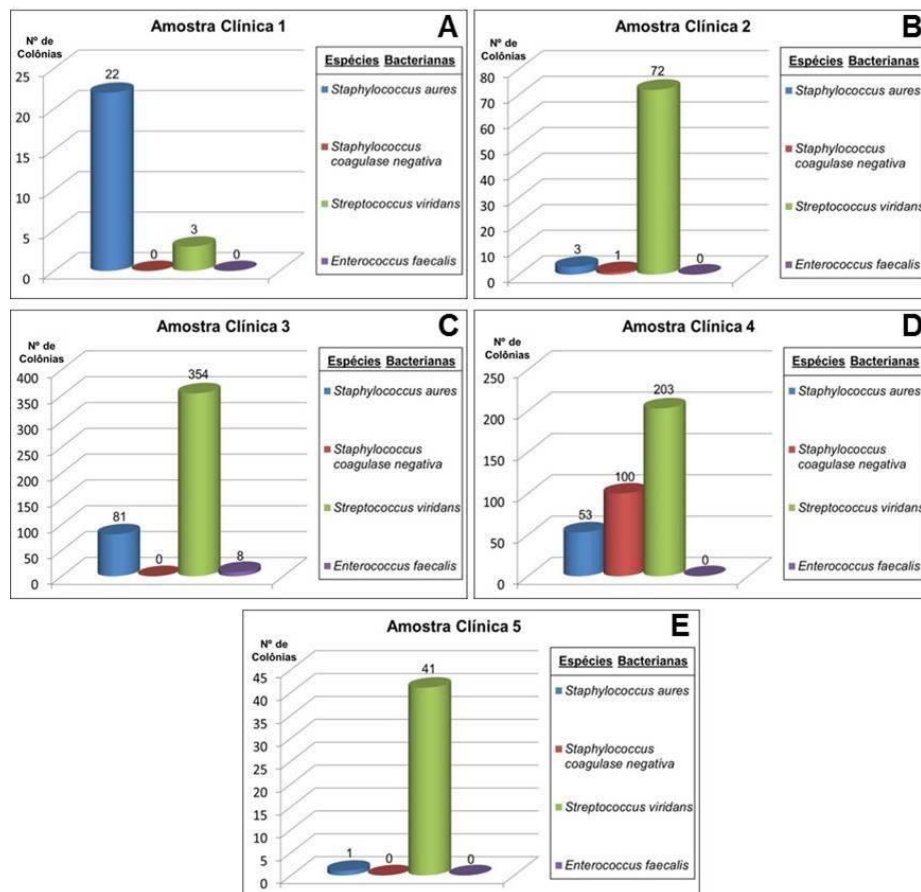


Figura 4. Diversidade bacteriana das lesões periapicais. A) Paciente 1 com coroa intacta; B) Paciente 1 com raiz residual; C) Paciente 2 com coroa intacta; D) Paciente 3 com raiz residual; E) Paciente 4 com raiz residual.

Ao ser avaliado os gráficos anteriores, observamos fatores diferenciais, onde se encontrou a espécie *Enterococcus faecalis* apenas em uma amostra clínica, e fatores variáveis, representados pela espécie *Staphylococcus coagulase negativa*, que esteve presente em duas amostras e ausentes nas demais. Além disso, observou-se em apenas uma amostra a espécie *Staphylococcus aureus* superando o número de colônias da espécie *Streptococcus viridans*.

Quando comparadas as amostras clínicas 1 e 2, os quais eram amostras de lesões periapicais do mesmo paciente, porém, a amostra clínica 1 apresentava o primeiro pré-molar superior direito com coroa intacta, enquanto que, a amostra 2 era o primeiro pré-molar inferior esquerdo com raiz residual e o canal radicular exposto à cavidade bucal. Na amostra 2 foi notado uma quantidade maior de número de colônias, principalmente a espécie *Streptococcus viridans*, em relação a amostra 1, que apresentou a maior quantidade de número de colônias da espécie *Staphylococcus aureus*.

Uma segunda comparação, agora com as amostras clínicas 2 e 5, os quais eram amostras de lesões periapicais em dentes, de pacientes diferentes, com grande

comprometimento da coroa clínica, devido cárie extensa, e canal radicular exposto à cavidade bucal, houve uma semelhança quanto as espécies presentes e quantidade de número de colônias de ambas.

Para finalizar os resultados, elaborou-se o gráfico a seguir com finalidade de demonstrar a quantidade da população bacteriana encontrada nesse estudo completo (figura 5). Assim sendo, temos:

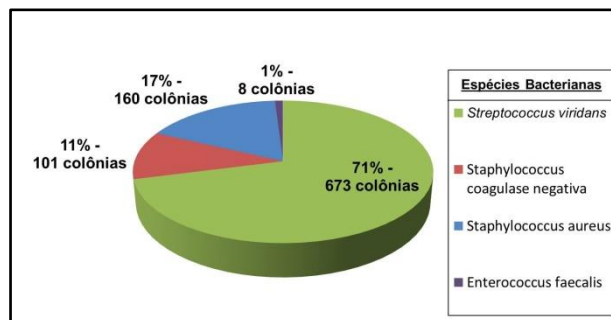


Figura 5. Frequência de cada espécie bacteriana encontradas nas lesões periapicais (em porcentagem e número de colônias).

Podemos destacar, nesta pesquisa, duas amostras que foram desconsideradas, pois durante a interpretação do crescimento da semente primária observou-se o crescimento de uma coloração esverdeada espalhada por toda a placa, sendo sugestivo de contaminação fúngica durante a coleta. Além disso, apresentou-se com uma quantidade de número de colônias muito acima do esperado, não podendo ser contabilizada.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados pode-se concluir que, dentre as bactérias anaeróbias facultativas presentes nas lesões periapicais, podemos encontrar as seguintes espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Streptococcus viridans* e *Enterococcus faecalis*. Dentre essas espécies, houve uma maior frequência de *Streptococcus viridans*, os quais representaram 71% das bactérias encontradas nas lesões periapicais, enquanto a espécie *Enterococcus faecalis* esteve presente em apenas 1%. Quanto à identificação bacteriana através das características morfológicas das colônias no meio de ágar-sangue, coloração de Gram e os testes bioquímicos específicos mostraram-se eficazes, sendo que, ambos são procedimentos complementares, ou seja, um não substitui o outro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lin LL, Skrbner JE, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. *J Endod.* 1992; 18:625-627.
2. Nair PNR, Sjögren U, Key G, Kahnberg K-E, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, a symptomatic human teeth with therapy resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod.* 1990; 16:580-588.
3. Bletsas A, Virtej A, Berggreen E. Vascular endothelial growth factors and receptors are up-regulated during development of apical periodontitis. *J Endod.* 2012; 38(5):628-635.
4. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquet JE. Doença Periapical Inflamatória (Granuloma; Cisto; Abscesso). In: Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquet JE. *Patologia Oral & Maxilofacial.* 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p.111-121.
5. Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24(1):25-31.
6. Bhaskar SN. Periapical lesions-types, incidence, and clinical features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1966; 21(5):657-671.
7. Hedman WJ. An investigation into residual periapical infection after pulp canal therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1951; 4:1173-1179.
8. Neto MM, Danesi CC, Unfer DT. Contribuição ao estudo do cisto radicular: revisão de literatura. *Rev Saúde.* 2004; 30(1-2):90-99.
9. Gomes BPFA, Drucker DB, Liley JD. Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J.* 1996; 29(2):69-75.

10. Gomes BPFA, Pedroso J, Jacinto RC, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. *Br Dent J.* 2004a; 15(1):30-35.
11. Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Souza EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004b; 19(2):71-76.
12. Kubo CH, Gomes APM, Jorge AOC. Isolamento de *Candida* em canais radiculares e verificação da sua sensibilidade a medicamentos utilizados na prática endodôntica. *Rev Odontol UNICID.* 1997; 9(2):119-130.
13. Maekawa LE. Avaliação in vitro da ação de substâncias químicas auxiliares e medicações intracanaís sobre *Escherichia coli* e sua endotoxinas em canais radiculares [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP; 2007.
14. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI. *Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica.* 3 ed. São Paulo: Sarvier; 2010. 530p.
15. Hupp JR. Princípios de Assepsia. In: Peterson LJ, Ellis III E, Hupp JR, Tucker MR. *Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea.* 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.
16. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Anvisa, 2013. p.149.
17. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 4: Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Anvisa, 2004. p.64.
18. Kettering JD, Torabinejad M. Microbiologia e Imunologia. In: Cohen S, Burns RC. *Caminhos da Polpa.* 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p.364-377.

19. Wayman BE, Murata SM, Almeida RJ, Fowler CB. A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. *J Endod.* 1992; 18:152.
20. Marsh P, Martin MV. A microflora oral residente. In: Marsh P, Martin MV. *Microbiologia Oral.* 4 ed. São Paulo: Editora Santos; 2005. p.18-32.