MARINA BELOTI FERREIRA

**CITOTOXICIDADE EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO E TEMPO
EXPERIMENTAL DE ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS
NA TERAPIA ENDODÔNTICA**

São Paulo

2007

Marina Beloti Ferreira

**Citotoxicidade em relação à concentração e tempo experimental
de antibióticos utilizados na terapia endodôntica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. João Humberto Antoniazzi

São Paulo

2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ferreira MB. Citotoxicidade em relação à concentração e tempo experimental de antibióticos utilizados na terapia endodôntica [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007

São Paulo, ____/____/____

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação/ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação/ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação/ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

Antonio Carlos Ferreira e Helena Beloti Ferreira,

Minhas irmãs Sara e Isabela

Dedico a realização desta conquista a vocês!

Deus deve me amar muito, pois me deu vocês: com um toque especial de alegria, com corações generosos sem igual, cheios de paciência e amor para me apoiar nos momentos difíceis, não me deixando desistir. Obrigada por fazerem parte da minha vida. Amo muito vocês!

Ao *Carlos*, meu amor, meu companheiro,
amigo de todas as horas. Seu amor, caráter
e devoção me mantiveram calma, confiante
e concentrada para terminar minha busca.
Muito obrigada! Amo você!

“Fazer a si mesmo perguntas mais profundas revela novas maneiras de estar no mundo. Traz um sopro de ar fresco. Torna a vida mais alegre. A grande jogada na vida não é saber, mas mergulhar no mistério.”

Fred Alan Wolf

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À querida *Profª. Drª. Elaine Manso Oliveira Franco de Carvalho*, por ter uma energia que contagia e nos faz lutar por nossos desejos e nunca desistir. Por ter sido a primeira pessoa, na área acadêmica, a acreditar em mim, e sonhar o meu sonho para hoje torná-lo realidade. Elaine, de coração, muito obrigada por tudo!!

Ao *Prof. Dr. João Humberto Antoniazzi*, minha referência na Endodontia desde os primeiros passos de formação acadêmica. A convivência me fez admirá-lo como profissional e ser humano. Obrigada pelo carinho e por todos os ensinamentos.

Ao *Prof. Dr. José Luiz Lage-Marques* - grande responsável pela minha jornada profissional e acadêmica. Jamais esquecerei da primeira frase que me disse quando nos conhecemos: “Se este é seu sonho, então vai se tornar realidade”. É impossível expressar nessas palavras todo meu carinho e gratidão.

Ao *Prof. Dr. Antonio Carlos Bombana*, um grande mestre que admiro e tenho muito a agradecer. Obrigada pelo carinho e atenção que sempre demonstrou comigo.

À *Profª. Drª. Patrícia Helena Pereira Ferrari*, cujo entusiasmo e amor pela Endodontia nos contagia e incentiva à pesquisa. Patrícia, agradeço pela amizade e pela maneira carinhosa que me auxiliou nesse trabalho. Muito obrigada por tudo.

À *Profª. Drª. Sandra Márcia Habitante*, Agradeço pela atenção, amizade e disposição nesse momento tão importante.

A *Sueli Miyagi*, responsável por todo meu treinamento no laboratório de células. Sueli, você é um exemplo de dedicação. Com todo carinho, muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta e indireta de muitas pessoas. Manifesto minha gratidão a todas elas.

A **DEUS**, pela vida e possibilidades a mim dados, que permitiram a vitória nessa etapa.

A minha amiga **Cláudia**, pela amizade verdadeira, pelo ombro amigo e apoio em inúmeros momentos.

Às queridas amigas **Ângela Araki, Ana Lúcia Farnezi e Crystiane Basílio** pela amizade, apoio e agradável convívio.

A minha amiga **Denise Pontes** pelo carinho e pelos conselhos nas horas necessárias.

A **Emanuela**, agradeço a amizade confidente, carinho e ajuda em vários momentos.

A **Anna Carolina (Babou)**, nossa amizade desenvolveu-se a partir das longas horas no laboratório, do compartilhamento das dúvidas, das lágrimas e do desespero. Obrigada minha amiga, suas palavras e força seguem comigo!

A **Márcia Campos**, que me auxiliou no momento exato onde as dúvidas eram muitas e sua serenidade soube saná-las da melhor forma possível.

Aos meus colegas do curso: **André, Ângela, Eduardo, Janete, Patrícia, Ricardo, Rocio e Soraia**, pela amizade e pelos ótimos momentos juntos.

Aos queridos amigos **Luciana e Mauro Giuzio**, cuja amizade, confiança e apoio incondicional guiaram meu desenvolvimento profissional e contribuíram para o fortalecimento de meu caráter.

À **Prof^a. Dr^a. Márcia Martins Marques**, pela disponibilização do laboratório de cultura de células, possibilitando a realização deste experimento.

Ao **Prof. Dr. Abílio Albuquerque Maranhão de Moura, Prof. Dr. Carlos Eduardo Aun, Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira, Prof. Dr. Giulio Gavini, Prof. Dr. Manoel Eduardo de Lima Machado, Prof. Dr. Marcelo dos Santos, do Curso de Pós-Graduação**, que contribuíram para minha formação e muito acrescentaram.

Às bibliotecárias **Vânia, Cida e Solange**, pela gentileza no atendimento e pelas correções.

A **Soninha**, pela ajuda no laboratório de Pesquisas Básicas. Muito obrigada!

Aos funcionários do Departamento de Dentística: **Sr. Aldo, Ana Maria, Arnaldo, Luizinho**.

MUITO OBRIGADA.

Ferreira MB. Citotoxicidade em relação à concentração e tempo experimental de antibióticos utilizados na terapia endodôntica [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

RESUMO

Diante da presença de microrganismos resistentes à terapêutica endodôntica, novas formulações e alternativas medicamentosas têm sido investigadas. Desse modo, esse estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade de diferentes medicações indicadas como medicação intracanal. Culturas de células de fibroblastos foram estimuladas de acordo com os seguintes grupos experimentais: Grupo I: controle; Grupo II: cloridrato de ciprofloxacina; Grupo III: cloridrato de clindamicina e Grupo IV: metronidazol. Para tal, as concentrações utilizadas para cada antibiótico foram de 5, 50, 150 e 300 mg/L, nos tempos experimentais de 24, 48, 72 e 96 horas. A citotoxicidade dessas substâncias foi avaliada usando a técnica de análise do MTT e leitura em espectrofotômetro de ELISA. Os resultados obtidos foram analisados pelo software BioEstat 4.0, por meio do teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Dunn, com nível de significância de 5%. A viabilidade celular foi analisada diante da relação entre as diferentes concentrações e uma mesma concentração nos diferentes tempos experimentais. Diante dos resultados obtidos, foi possível concluir que: todos os antibióticos testados apresentaram citotoxicidade dose-dependente. As concentrações de 5 e 50 mg/L, de todos os antibióticos, permitiram a viabilidade dos fibroblastos em todos os tempos avaliados. Independente da medicação avaliada, a viabilidade celular em 24 horas foi mais elevada em comparação aos demais tempos experimentais. A comparação entre os antibióticos nas mesmas concentrações, em diferentes tempos experimentais demonstrou que o

gel de metronidazol apresentou menor citotoxicidade em 72 e 96 horas no confronto com os dois outros antibióticos, enquanto que o cloridrato de clindamicina apresentou maior viabilidade celular em relação ao cloridrato de ciprofloxacina em 72 horas.

Palavras-Chave: citotoxicidade; ciprofloxacina; clindamicina; metronidazol

Ferreira MB. Citotoxicity of antibiotics purposed as intracanal medicaments according to concentration and experimental period [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

ABSTRACT

New medicaments have been assessed due to the presence of resistant-microorganism to therapeutic procedures. Thus, this study aimed to evaluate the citotoxicity of different drugs indicated as intracanal medicament. The human gingival fibroblasts were stimulated according to the following experimental groups: Group I: control; Group II: Ciprofloxacin Hydrochloride; Group III: Clindamicin Hydrochloride and Group IV: Metronidazole. The concentration used for each drug was 5, 50, 150, and 300 mg/L, in the experimental time of 24, 48, 72, and 96 hours. The cytotoxicity was evaluated with MTT analysis and ELISA spectrophotometer reading. The results were evaluated by BioEstat 4.0 software, according to Kruskal-Wallis test supplemented by Dunn test with significance level of 5%. Cell viability analysis has been assessed in different concentrations in each experimental period. According to the results, it is possible to conclude that: all the tested drugs showed dose-dependent cytotoxicity. The concentrations of 5 and 50mg/L of all groups allowed fibroblast viability in all evaluated periods. The cell viability in 24 hours was higher than the others experimental periods. The comparing between the antibiotics at the same concentrations, in different times showed the gel metronidazole obtained lowest cytotoxicity at 72 and 96 hours when compared with the others antibiotics, meanwhile, the Clindamicin Hydrochloride showed the highest cell viability compared to Ciprofloxacin Hydrochloride, at 72 hours.

Keyword: cytotoxicity, ciprofloxacin, clindamicin and metronidazole

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Fórmula estrutural da ciprofloxacina	32
Figura 2.2 - Fórmula estrutural da clindamicina	40
Figura 2.3 - Fórmula estrutural do metronidazol	44
Figura 4.1 - Fibroblastos em cultura. Monitoramento do crescimento celular, (A) e (B) células em fase de crescimento; (C) células em estado de subconfluência	58
Figura 4.2 - Câmara do tipo Neubauer no microscópio invertido de fase para contagem celular.....	60
Figura 4.3 - Distribuição dos grupos experimentais e respectivas concentrações ..	62
Figura 4.4 - Aspecto dos poços imediatamente após a adição de 100µL do reagente B	63
Figura 5.1 - Viabilidade das células de fibroblastos, médias percentuais, em contato com a ciprofloxacina em diferentes concentrações em relação aos tempos experimentais.....	66
Figura 5.2 - Viabilidade das células de fibroblastos, médias percentuais, em contato com a clindamicina em diferentes concentrações em relação aos tempos experimentais.....	66
Figura 5.3 - Viabilidade das células de fibroblastos, médias percentuais, em contato com o metronidazol em diferentes concentrações em relação aos tempos experimentais.....	67
Figura 5.4 - Viabilidade celular de fibroblastos e médias percentuais frente aos antibióticos em suas respectivas concentrações no tempo experimental de 24 horas	68

Figura 5.5 - Viabilidade celular de fibroblastos e médias percentuais frente aos antibióticos em suas respectivas concentrações no tempo experimental de 48 horas	68
Figura 5.6 - Viabilidade celular de fibroblastos e médias percentuais frente aos antibióticos em suas respectivas concentrações no tempo experimental de 72 horas	68
Figura 5.7 - Viabilidade celular de fibroblastos e médias percentuais frente aos antibióticos em suas respectivas concentrações no tempo experimental de 96 horas	69
Figura 5.8 - Microfotografias do Grupo I- (controle)	70
Figura 5.9 - Microfotografias do Grupo II- (ciprofloxacina) em 72 horas. (A) indica possível precipitado da medicação no fundo do frasco	71
Figura 5.10 - Microfotografias do Grupo III- (clindamicina) em 72 horas	72
Figura 5.11 - Microfotografias do Grupo IV (metronidazol) em 72h. (B) indica possível precipitado da medicação no fundo do frasco.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

cél/mL	Célula por mililitro
CFC	Ciprofloxacina, Metronidazol e Hidróxido de cálcio
CIM ₉₀	Concentração inibitória mínima para 90% dos microrganismos
CIM ₂₀	Concentração inibitória mínima para 20% dos microrganismos
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HeLa	Linhagem de células epiteliais
HCl	Ácido Clorídrico
g	Grama
GUNA	Gengivite ulcerativa necrosante aguda
mm	milímetros (unidade de medida equivalente a 10 ⁻³ metros)
mL	Mililitros (unidade equivalente a 10 ⁻³ litros)
mg	Miligrama (unidade equivalente a 10 ⁻³ gramas)
mg/mL	Miligrama por mililitro
mg/L	Miligrama por litro
MG63	Linhagem de células de osteosarcoma
mM	Mile molar
MTT	Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio

MTB-2	Linhagem de células cancerígenas
MOLT3 _{IIIB}	Células infectadas pelo vírus HIV
MOLT3	Células não infectadas pelo vírus HIV
nm	Nanômetro
NaOCl	Hipoclorito de sódio
n	Número
p	Nível de significância
PBSA	Solução tampão fosfato de sódio sem cálcio
PHO	Linhagem celular de osteoblastos humanos
pH	Potencial hidrogeniônico
PMCC	Paramonoclorofenol canforado
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TPC	Fosfato de α tricálcio
T-24	Linhagem de células cancerígenas
VN	Corante Vermelho Neutro
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
U/mL	Unidades por mililitro
μm	Micrômetro (unidade de medida equivalente a 10^{-6} metros)
μL	microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius ou graus centígrados%
%	Por cento
<	Menor

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Microbiota endodôntica	21
2.2 Medicação intracanal	31
2.3 Antibióticos	32
2.3.1 Ciprofloxacina	32
2.3.2 Clindamicina	39
2.3.3 Metronidazol	43
2.4 Testes biológicos	49
3 PROPOSIÇÃO	52
4 MATERIAL E MÉTODOS	54
5 RESULTADOS	64
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	93
APÊNDICES	102
ANEXO	114

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O sucesso na clínica endodôntica está diretamente vinculado à remoção do agente etiológico, que na maioria das vezes constitui-se de fator microbiano.

A preocupação com o agente microbiano é relatada desde o século XIX, com os estudos de Miller (1894) em canais com polpas mortificadas, e mais recentemente, Kakehashi, Stanley e Fitzgerald (1965) associando os microrganismos à etiologia das doenças pulpares e periapicais.

Sem dúvida, o preparo químico e mecânico instituído durante a terapia endodôntica é o principal responsável pela eliminação dos microrganismos presentes no sistema endodôntico. Esse procedimento não é suficiente para remover completamente o foco infeccioso devido à presença dos microrganismos não somente na luz do canal radicular, como também no interior dos túbulos dentinários, exigindo assim, a aplicação da medicação intracanal.

Em outras situações clínicas, a terapia não proporciona a resposta desejada para o controle da infecção. Esses casos estão diretamente relacionados com a presença de microrganismos resistentes aos agentes químicos e medicação intracanal, além de microrganismos organizados em biofilme na região periapical.

O biofilme desempenha um papel importante no desenvolvimento e manutenção de alterações ósseas periapicais, devido à produção da matriz extracelular, que atua como uma barreira física contra os agentes antimicrobianos.

Para essas situações sugere-se o emprego de medicações alternativas, tais como a combinação de antimicrobianos, com o intuito de permear os túbulos dentinários em concentrações adequadas, para que possam atuar em áreas não

atingidas pelos instrumentos endodônticos e soluções irrigadoras e agir, particularmente, sobre os microrganismos anaeróbios facultativos e aeróbios resistentes.

A seleção da medicação é baseada na sua efetividade, potencial antimicrobiano e antiinflamatório. Entretanto, faz-se necessário uma análise criteriosa de sua citotoxicidade tecidual e concentração, capaz de cumprir com a função de auxiliar terapêutico com vistas ao controle microbiano e reparo.

O foco da Odontologia moderna busca a identificação de substâncias biocompatíveis, especialmente aquelas em contato direto com os tecidos periapicais.

A metodologia com cultura celular é utilizada há mais de 40 anos para investigações de reações citotóxicas causadas por drogas e materiais diversos, sendo reprodutível e seus protocolos estandardizados pela *International Organization for Standardization* (ISO), conseqüentemente assume um papel de destaque em relação a sua importância.

Desse modo, qualquer efeito citotóxico provocado por uma substância de utilização nos procedimentos restauradores ou endodônticos, sobre a polpa dental ou nos tecidos periapicais, pode ser previsto em experimentos *in vitro*.

Estabelecer uma relação entre a citotoxicidade dos agentes empregados na medicação intracanal é de extrema importância, uma vez que proporcionará ao profissional da clínica endodôntica embasamento científico para optar por um medicamento em condições de biocompatibilidade.

O estado da arte da medicação intracanal leva à necessidade de avaliar a reação celular dos fibroblastos de gengiva humana frente ao contato direto com os fármacos cloridrato de ciprofloxacina, cloridrato de clindamicina e metronidazol,

apoiando-se no fato de que a medicação intracanal é um importante fator em inúmeras situações como coadjuvante no protocolo da sanificação.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

O capítulo que segue foca como tema a necessidade imperiosa de se conhecer a microbiota presente nos casos de infecção endodôntica e a partir desse conhecimento, aliado ao grau mínimo de citotoxicidade, nortear a seleção do fármaco a ser administrado intracanal.

2.1 Microbiota Endodôntica

A comprovada ação dos microrganismos nos tecidos pulpare e periapicais, quando de sua instalação, é motivo constante de estudos que visam evidenciar sua presença e desenvolver métodos que levem a sua eliminação.

Um grande desenvolvimento técnico e científico foi responsável pelo conhecimento das espécies de microrganismos encontrados no sistema de canais radiculares, a interação entre eles e sua relação com as distintas patologias pulpare e periapicais.

Em 1894, na revista *Dental Cosmos*, Miller comprovou a presença de microrganismos no interior dos canais radiculares e relatou que as espécies bacterianas encontradas nos canais eram diferentes das presentes na cavidade bucal saudável. Conseguiu observar, microscopicamente vários tipos bacterianos, mas não cultivá-los em laboratório, devido às limitações dos meios de cultura da época.

Cerca de um século mais tarde, Shovelton (1964) avaliou a ocorrência e distribuição das bactérias no sistema de canais radiculares, em diferentes condições clínicas de polpa morta, utilizando uma metodologia com maiores recursos. Os dentes após a extração foram acondicionados em formalina e descalcificados para que fossem seccionados transversal e horizontalmente. A visualização dos microrganismos na dentina ocorreu devido à impregnação de corantes. Nos casos agudos, bactérias predominavam principalmente na luz do canal e na pré-dentina. Entretanto, uma maior penetração dos microrganismos foi observada nos casos crônicos. Ainda foi constatada, em raízes achatadas no sentido méso-distal maior concentração de microrganismos nos extremos vestibular e lingual dos canais radiculares, aspecto que o autor denominou de distribuição polar.

Com o passar dos anos muitos trabalhos foram realizados, principalmente na busca de novas metodologias que alcançassem bom êxito no isolamento das bactérias anaeróbias. Sundqvist¹ (1976 apud SYDNEY, 1996) apresentou uma metodologia mais complexa para demonstrar a presença de bactérias anaeróbias no interior dos canais radiculares com mortificação pulpar.

Lesões periapicais foram induzidas por Fabricius et al. (1982) ao inocular no canal radicular de dentes de macacos suspensões microbianas de uma ou várias espécies bacterianas. Um fato interessante desse estudo foi a descoberta que bacteróides, quando em cultura pura, não foram re-isolados após o período de indução, porém quando combinados com outros gêneros apresentaram-se em maior número. Já os enterococos sobreviveram como cultura pura em todos os casos. Quanto à rarefação óssea periapical verificaram que as culturas mistas apresentaram maior capacidade de induzi-las.

¹ Sundqvist, G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Umea. University of Umea, 1976. 94p. (Umea University Odontological Dissertations, n.7).

Thilo, Baehni e Holz (1986) estudaram a distribuição de cinco tipos morfológicos de bactérias (cocos, filamentosos, espiroquetas, bacilos móveis e não móveis) nos terços cervical e apical dos canais radiculares de 20 dentes humanos recém extraídos, os quais eram portadores de polpas mortificadas. Os microrganismos foram identificados em microscópio de campo escuro. Observaram que 16 dos 20 dentes avaliados apresentavam microrganismos disseminados por todo o canal radicular. Os quatro restantes apresentavam contaminação apenas no terço cervical. Foi encontrada uma proporção significativamente maior de cocos e bacilos no terço cervical do que no terço apical. Os filamentosos e espiroquetas foram mais freqüentes no terço apical. Observaram ainda correlação positiva entre a quantidade de espiroquetas e o tamanho radiográfico da lesão periapical. Tal resultado é interessante, pois em casos de lesões periodontais, esse tipo de bactéria é encontrada associada à destruição do osso alveolar e à diminuição da porcentagem de cocos e bacilos. Para os autores, as diferenças da microbiota nos diferentes terços, justificam-se principalmente pelos fatores ambientais, como a concentração de oxigênio e pH. Os anaeróbios estritos são comumente encontrados no terço apical por estarem mais protegidos do oxigênio proveniente da cavidade bucal, que pode ser consumido nos terços cervical e médio por bactérias aeróbias e facultativas.

A composição da microbiota de dentes humanos com lesão periapical, sua relação com as paredes dentinárias dos canais radiculares, os aspectos morfológicos da interação entre as diferentes espécies e a natureza dinâmica da resposta inflamatória do hospedeiro no periápice foram analisados por meio de microscopia, por Nair (1987). Trinta e um dentes com lesões periapicais (30 granulomas e 1 cisto periapical) e sem tratamento endodôntico foram obtidos por

extração e processados para análise em microscopia óptica comum e eletrônica. Nos 31 canais radiculares foram encontradas microbiota mista. Na maioria dos casos, a microbiota ficou restrita ao canal radicular, porém foram encontradas bactérias no interior de 4 granulomas e do cisto radicular. A microbiota era composta basicamente de cocos, bacilos, filamentosos e espiroquetas, sendo que os bacilos geralmente eram Gram-negativos. Foram observadas formações de agregados de bactérias, semelhante a uma relação simbiótica. Por meio de microscopia eletrônica, identificou-se uma densa camada bacteriana na parede dentinária do canal e notou-se que separando a microbiota da lesão periapical, havia uma densa parede de neutrófilos ou um tampão epitelial no forame apical. Essa barreira de neutrófilos era proveniente da resposta quimiotática às bactérias invasoras, seus subprodutos ou produtos de decomposição que invadiam a área periapical.

Com o intuito de obterem maiores informações sobre a capacidade de infecções mistas, de origem endodôntica induzirem inflamação, Wu, Moorer e Wesselink (1989) implantaram em tecido subcutâneo de ratos, 144 tubos de polietileno de 15 mm de comprimento e 3,5 mm de diâmetro interno, contendo culturas puras e quatro diferentes combinações das bactérias: *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Actinomyces* e *Streptococcus*. Essas bactérias foram inoculadas em número baixo mas, ao término do experimento, prevaleceram sobre a microbiota mista encontrada. Uma das extremidades dos tubos implantados no subcutâneo apresentava abertura de 0,35 mm de diâmetro, que simulava o forame apical. Após o período de 2 a 4 semanas observou-se reação inflamatória significativa no tecido conjuntivo ao redor dessa área. Foi possível verificar que após 4 semanas, os tubos inoculados com microbiota mista contendo anaeróbios causaram reação muito mais severa aos tecidos àqueles com apenas bactérias facultativas.

A presença de bactérias no interior dos túbulos dentinários foi objeto de estudo por Ando e Hoshino (1990). Foram selecionados 8 dentes humanos com canais radiculares infectados, cujas coroas apresentavam cárie. Imediatamente após a extração, raspas dentinárias foram obtidas de diferentes profundidades (0,5 mm e 2,0 mm) fazendo uso de brocas em alta rotação, no sentido da luz do canal para o cemento. O número de bactérias cultivadas em câmara de anaerobiose foi superior às aquelas cultivadas em ambiente aeróbio. Os resultados obtidos sugeriram que o ambiente das camadas profundas da dentina é anaeróbio, favorecendo o crescimento de microrganismos que necessitam de tal ambiente.

Tronstad, Barnett e Cervone (1990) observaram o ápice radicular de dentes portadores de lesões refratárias indicados para cirurgia endodôntica. Os ápices foram seccionados e observados em microscópio eletrônico de varredura. Nove dos dez espécimes apresentaram a superfície do cemento, próxima ao forame repleto de irregularidades, com uma variedade de microrganismos agrupados em colônias e imersos em material extracelular. Apesar da dificuldade na identificação dos microrganismos, verificaram predomínio de cocos e bacilos. Esse estudo confirmou a hipótese da infecção extra-radicular.

Buscando a caracterização da microbiota de dentes com lesões periapicais, de acordo com as espécies, frequência e associações bacterianas, Sundqvist (1992a) analisou amostras obtidas de 65 canais radiculares de dentes unirradiculares, com polpa morta e lesão periapical. Foram obtidas 353 cepas, sendo 90% delas anaeróbias estritas. A espécie mais frequente foi o *Fusobacterium nucleatum*, com 48% de incidência, seguido de espécies *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium* e associações positivas entre *Fusobacterium nucleatum* e *Peptostreptococcus micros*,

Porphyromonas endodontalis, *Selenomonas sputigena* e *Wolinella recta*, *Prevotella intermedia* e *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius* e *Eubacterium sp.* Os resultados confirmaram que, no decorrer da infecção no interior dos canais radiculares com polpas mortas, há o desenvolvimento de fortes inter-relações entre espécies bacterianas, sendo que as mudanças dessa microbiota se devem a tais interações.

O mesmo Sundqvist (1992b) revisando a literatura sobre a microbiota endodôntica, enfatizou as inter-relações entre microrganismos e o ambiente radicular, afirmando que o predomínio das bactérias anaeróbias em canais radiculares infectados justifica-se pela mudança das condições ambientais, como deficiência no aporte sanguíneo, alterações nutricionais, queda de tensão de oxigênio, redução do potencial de óxido-redução do tecido e estabelecimento de relações sinérgicas entre as bactérias, propiciando a instalação de lesões periapicais, sejam granulomas, abscessos ou cistos.

Gomes, Lilley e Druker (1996) avaliaram a associação entre a microbiota e a sintomatologia clínica de 70 dentes unirradiculares com polpa mortificada. Foram obtidas culturas a partir de coletas nos canais radiculares isolando e identificando as bactérias presentes em cada tipo de caso. Observaram que 70,3% dos casos que apresentavam anaeróbios estritos também possuíam sintomatologia dolorosa associada, e nos 29,7% restantes não havia sintomatologia. Concluíram que as diferentes associações entre as espécies bacterianas promovem sintomas clínicos.

Além das variações anatômicas, que consistem em áreas inacessíveis à instrumentação, o insucesso endodôntico pode advir da resistência de determinados microrganismos aos métodos químicos e mecânicos utilizados na terapia endodôntica. Gomes, Drucker e Lilley (1996) estudaram a suscetibilidade da

microbiota dos canais radiculares ao procedimento químico-mecânico e relataram que a terapia endodôntica não foi capaz de eliminar completamente as bactérias do sistema endodôntico, sendo que algumas espécies apresentavam-se mais resistentes que outras, como por exemplo, *Enterococcus faecalis*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp.

Avaliando 967 amostras de dentes com lesão periapical resistentes à terapia convencional, Waltimo et al. (1997) verificaram a presença de fungos em 7% das amostras (48 cepas diferentes), isolados em cultura pura (13%) ou associados a outros microrganismos (87%). Excetuando-se um dos fungos isolados, todos os demais pertenciam ao gênero *Candida*, sendo *C.albicans* a espécie mais comum (80%).

Após avaliarem 70 dentes com lesões periapicais e contra-indicações ao tratamento endodôntico via coronária, Abbou-Rass e Bogen (1998) selecionaram 13 pacientes para efetuar cirurgia endodôntica, visando investigar a presença de anaeróbios estritos. As coletas foram efetuadas em 3 locais distintos durante a cirurgia: ao acessar a loja cirúrgica, no corpo da lesão e na região apical. Em todos os casos, bactérias anaeróbias compreenderam 63% e as facultativas 36,4% da microbiota. As espécies que prevaleceram foram: *Actinomyces* sp (31,8%), *Propionibacterium* sp (22,7%), *Streptococcus* sp (18,2%), *Staphylococcus* sp (13,65%), *Porphyromonas gingivalis* (4,6%), *Peptostreptococcus micros* (4,6%) e Gram-negativos entéricos (4,6%).

Molander et al. (1998) investigaram a microbiota de 100 dentes tratados endodonticamente e com periodontite apical crônica. As amostras foram coletadas logo após a remoção do material obturador, nas proximidades do ápice radicular (0,5 a 1 mm). Em 68 dentes houve crescimento de culturas microbianas. Na maioria dos

casos (85%), o *Enterococcus* spp. foi o microrganismo mais freqüentemente isolado (32 dentes). Também foram isolados *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Escherichia* e *Staphylococcus*. Observaram predomínio dos anaeróbios facultativos sobre os aeróbios estritos. Além disso, as bactérias anaeróbias facultativas mostraram-se mais resistentes à atividade antimicrobiana que as anaeróbias estritas, podendo persistir mais freqüentemente em canais radiculares após a terapia endodôntica. Os microrganismos anaeróbios facultativos podem permanecer em fase latente, com baixa atividade metabólica por um período, sendo que mudanças das condições ambientais, como a infiltração coronária, podem ativar o seu crescimento.

Peciulienė et al. (2000) avaliaram a ocorrência de *Enterococcus faecalis* em dentes indicados para reintervenção endodôntica. Duas amostras foram coletadas de cada dente: a primeira, após a desobstrução do canal, quando conseguiu-se acesso a região apical; e a segunda, ao final do preparo químico-cirúrgico. Após a primeira coleta foram isoladas 20 culturas, destas, o *E. faecalis* foi isolado em 14 casos, sendo 5 em cultura pura e 9 associados a outros microrganismos. Esta cepa foi considerada a responsável pela maior proporção da microbiota nos casos de periodontite apical crônica. Na segunda coleta, apenas 7 culturas foram isoladas, sendo o *E. faecalis* identificado em 5 delas. Os resultados demonstraram importante relação entre a presença de *E. faecalis* e dentes tratados previamente, apresentando deficiência no preenchimento pelo material obturador.

A composição da microbiota de cinquenta e quatro dentes portadores de insucesso endodôntico foi identificada por Hancock et al. (2001). Foram feitas coletas microbiológicas em dois momentos, prévia e posteriormente ao preparo do canal. Microrganismos foram isolados em 33 casos, sendo identificadas 57 espécies. Na maioria dos casos (n=28) foi identificada uma ou duas espécies, sendo o *E.*

faecalis presente em 10 casos (30,3%). *Candida albicans* foi identificada apenas em 1 caso, como monoinfecção. Foi constatado predomínio de anaeróbios Gram-positivos nas amostras obtidas antes do preparo químico-cirúrgico. Mesmo após o preparo, *E. faecalis* foi isolado em 9 casos (32%), que juntamente com *Actinomyces* e *Streptococcus* foram os microrganismos mais freqüentes.

A identificação de microrganismos resistentes aos procedimentos clínicos endodônticos também foi realizada por Chávez de Paz et al. (2003) em 200 dentes com tratamento endodôntico e rarefação óssea periapical. As amostras foram coletadas após o acesso, ao final do preparo químico-cirúrgico e uso de medicação intracanal. Apesar da execução do preparo e medicação intracanal, anaeróbios facultativos Gram-positivos ainda puderam ser isolados na maioria daqueles canais radiculares, enquanto anaeróbios Gram-negativos foram detectados em menos de 20% dos casos estudados. *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* e *Enterococcus* spp. foram os gêneros mais prevalentes. Os autores concluíram que os anaeróbios Gram-negativos foram mais sensíveis à terapia endodôntica, quando comparados aos Gram-positivos. Apontaram fatores, tais como, estrutura da parede celular, secreção de produtos metabólicos e resistência medicamentosa como causas da alta prevalência.

Pinheiro et al. (2003) avaliaram a microbiota de 60 canais submetidos à terapia endodôntica e com lesão periapical, após 2 anos de tratamento. Os dentes foram desobturados e o material coletado. Foi identificado o crescimento de microrganismos em 51 canais, dentre os quais, 83.3% eram Gram-positivos e 57.4% eram anaeróbios facultativos. *E. faecalis* foi isolado em aproximadamente 53% dos canais e predominou como única espécie na infecção. Entretanto, os anaeróbios estritos foram freqüentemente isolados em infecções polimicrobianas e com

sintomatologia. Constataram que nos casos de insucesso há predomínio de Gram-positivos e anaeróbios facultativos, sendo o *E. faecalis* a espécie mais freqüente.

A microbiota de dentes com infecção primária e secundária foi investigada por Gomes et al. (2004). Foram coletadas amostras de sessenta dentes, sendo 41 com polpas mortificadas (infecção primária) e 19 retratamentos (infecção secundária). Na infecção primária foram isoladas 56 espécies diferentes, com o predomínio de anaeróbios ou microanaerófilos (70%). Já na infecção secundária ocorreu a predominância de facultativos e Gram-positivos (75%). Os gêneros mais freqüentemente isolados na infecção secundária foram os *Peptostreptococcus* (58,3%), *Streptococcus* (53,3%), *Fusobacterium* (33,3%), *Enterococcus* (13,3%), *Staphylococcus* (13,3%), dentre outros. Os autores identificaram importante relação do *E. faecalis*, *Streptococcus* spp., *P. micros* e *F. necrophorum* em dentes previamente tratados, além de observarem a alteração da microbiota nos casos de retratamento.

Vários são os métodos para a detecção de bactérias, tais como testes enzimáticos, imunológicos e sondas de DNA específicas para determinadas espécies. Nos últimos anos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido empregada para a detecção de microrganismos. É uma técnica rápida, relativamente simples e capaz de detectar baixos números de espécies bacterianas, com um limite de detecção 10^2 células. Esse método baseia-se o seqüenciamento genômico específico para cada espécie microbiana, podendo inclusive discriminar genes dentro de uma mesma espécie. Por outro lado, esses métodos são capazes de detectar clones, espécies não cultiváveis ou que tenham morrido durante o procedimento de coleta do espécime clínico (RÔÇAS et al., 2004).

2.2 Medicação intracanal

O sucesso na terapia endodôntica está intimamente ligado à eliminação das diversas espécies bacterianas que compõem a microbiota, além de remover substratos que permitam a posterior recontaminação. Os conceitos de preparo químico cirúrgico e irrigação/aspiração permitem a limpeza e desinfecção do sistema endodôntico. A manutenção desta cadeia asséptica depende de algumas medicações intracanal que são utilizadas tradicionalmente entre as sessões de tratamento. A escolha das medicações é baseada na efetividade, toxicidade e potencial antiinflamatório (STUART et al., 1991).

A efetividade da medicação intracanal depende do contato íntimo com as paredes do canal, da sua concentração e do tempo de ação. A ação medicamentosa se dá por atingir áreas não trabalhadas pela instrumentação, como istmos, ramificações, reentrâncias e túbulos dentinários, os quais permanecem colonizados por bactérias (LAW; MESSER, 2004).

Uma pequena parcela dos casos clínicos resiste ao protocolo tradicional, e para essas situações atípicas caracterizadas pela persistência de sinais e sintomas, exsudação, dificuldade na reparação, Lage-Marques e Antoniazzi (2000) propuseram medicações à base de clorexidina 2% gel ou a associação de cloridrato de cloridrato de ciprofloxacina, metronidazol e hidróxido de cálcio (CFC).

A proposta de estudo dos antibióticos ciprofloxacina, clindamicina e metronidazol surge pelo amplo espectro de ação e pela capacidade de atuar em microrganismos presentes nas infecções endodônticas. O capítulo a seguir revisa as propriedades e ação individualizada de cada medicação assim como sua aplicação.

2.3 Antibióticos

2.3.1 Ciprofloxacin

A ciprofloxacin constitui uma fluoroquinolona, pertencente ao grupo das quinolonas. Sua origem se deu com o desenvolvimento do ácido nalidíxico no início da década de 60, o qual apresenta atividade apenas contra as enterobactérias. Como não alcança concentração adequada na maioria dos tecidos e órgãos, sua indicação passou a ser restrita ao tratamento de infecções urinárias não complicadas. A incorporação da molécula de flúor na posição 6 do anel quinolônico e do anel piperazínico na posição 7, proporcionou um aumento importante na potência dos fármacos dessa classe de agentes, contra as bactérias Gram-negativas e ampliou o espectro de ação para as bactérias Gram-positivas (ANDRADE, 2002).

Figura 2.1 - Fórmula estrutural da Ciprofloxacin (CAINELLI, 2007)

Esse grupo, então denominado fluoroquinolonas, incorporou a norfloxacin que, lançada em 1986, apresentava excelente atividade contra Gram-Negativos

aeróbios, *Pseudomonas aeruginosa* e boa atividade contra Gram-Positivos. Logo após a introdução da norfloxacin, surgiram outras fluoroquinolonas que, além de apresentarem excelente espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mostravam também excelente penetração na maioria dos órgãos e tecidos. Os principais representantes desse grupo são a ciprofloxacina e ofloxacina. Essa segunda geração de fluoroquinolonas, representou o marco mais importante no tratamento das doenças infecciosas na década de 60 (SADER, 1999).

As quinolonas atuam no citoplasma bacteriano, capturando uma ou ambas as enzimas do cromossomo bacteriano (DNA-girase e topoisomerase IV) criando um complexo medicamento-enzima-DNA, com rupturas em um único filamento que impede a passagem contínua do DNA pelo mecanismo de replicação. Nesse estágio, a ação do fármaco é reversível. Entretanto, na presença de concentrações medicamentosas mais altas, aparecem rupturas nos dois filamentos do DNA causando lise bacteriana (GOOTZ; BRIGHTY, 1996).

Apesar de não representar o fármaco de eleição, Ferreira e Susin (1999) recomendaram o uso da ciprofloxacina na Odontologia por ter ação sobre os anaeróbios da cavidade bucal, eficácia contra os aeróbios Gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus* spp.) e Gram-negativos entéricos (*Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas*), com CIM₉₀ que varia de 0,015 e 2,0 µg/mL. Todos os *Streptococcus*, independente da espécie, são sensíveis na concentração de 1,0 a 8,0 µg/mL; *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* são susceptíveis em concentrações de 0,25 a 1,0 µg/mL. No entanto, a maioria dos anaeróbios mostra-se resistente as fluoroquinolonas.

A associação da ciprofloxacina com outros antimicrobianos é investigada com o objetivo de aumentar a atividade contra bactérias isoladas da infecção endodôntica.

Barnett et al. (1988) descreveram uma situação clínica em que o paciente apresentava lesão óssea periapical refratária após a terapia endodôntica. Dois meses após uma intervenção cirúrgica, o paciente apresentou-se com fístula. A administração sistêmica de metronidazol e penicilina não foram eficazes. A análise microbiológica revelou a presença de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus sp.* Foi prescrito então, Ciprofloxacina (750 mg), 2 comprimidos ao dia, por um período de 15 dias. Após 2 semanas houve a regressão da fístula e no período de 14 semanas foi possível observar radiograficamente a cura da rarefação óssea periapical.

Sato et al. (1993) clarificaram a eficácia da combinação de antimicrobianos, ao avaliar a associação de ciprofloxacina e metronidazol à amoxicilina, cefaclor, cefroxidina, fosfomicina, rokitamycin e minociclina, nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL de cada princípio, sobre microrganismos isolados de infecções endodônticas. Nenhum microrganismo cresceu na presença de qualquer formulação, na concentração de 100 µg/mL. Nas concentrações inferiores, o crescimento variou de acordo com o antimicrobiano empregado. Os resultados indicam que a aplicação da mistura de drogas em medicações tópicas intracanal contribuem para a desinfecção do sistema endodôntico.

Boyce, Warden e Holder (1995) avaliaram a ação da ciprofloxacina em associação com outros antimicrobianos em células de enxerto de tecido conjuntivo, justificado pela alta infecção após queimaduras. Para isso, utilizaram células de fibroblastos humanos e queratinócitos. A formulação era composta por: neomicina

(40 µg/mL), polimixina B (700 U/mL) e mupirocin (40 µg/mL) e associada a ciprofloxacina (20 µg/mL) ou norfloxacina (20 µg/mL) e anfotericina B (0,25 µg/mL) ou nistatina (100 µg/mL). A citotoxicidade foi analisada para cada combinação das substâncias por um período de 4 dias. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre as células de queratinócitos ou fibroblastos em relação ao grupo controle. Os achados sugeriram que a formulação composta por neomicina, polimixina e mupirocin pode ser associada a uma quinolona ou a um agente antifúngico para melhorar as propriedades antimicrobianas e ser usada topicamente em superfícies cutâneas com queimaduras.

O potencial antimicrobiano da associação de ciprofloxacina, metronidazol e minociclina (0,5 mg de cada substância) foi observado por Sato et al. (1996) nas diferentes profundidades da dentina radicular, por meio de 3 modelos experimentais. A cepa de *Escherichia coli* foi selecionada para a contaminação do canal radicular. Quatorze raízes de dentes unirradiculares tiveram seus canais preparados e 4 perfurações de 3 mm de profundidade foram confeccionadas, com uma distância de 1 mm da entrada do canal. Cada cavidade foi preenchida com a suspensão microbiana (10^8 cel/mL) e o canal medicado com a associação antimicrobiana. Após incubação de 5, 24 e 48 horas, a viabilidade das cepas foi avaliada. Houve redução do número de células proporcional ao tempo de exposição à droga. Ao final de 48 horas todas as cepas foram eliminadas. Para comprovar a difusão da medicação do canal radicular para a superfície radicular, utilizaram dentes preenchidos com a associação sobre placas semeadas com *E. coli* e as zonas de inibição foram avaliadas. Nenhuma zona de inibição foi observada no grupo controle de solução salina, enquanto amplas zonas foram observadas nos dentes medicados. Assim, foi

possível observar que a aplicação tópica da droga é capaz de desinfetar a dentina em 48 horas.

Hoshino et al. (1996) demonstraram que a ciprofloxacina utilizada isoladamente não foi capaz de eliminar microrganismos da dentina infectada, porém ao ser associada ao metronidazol, minociclina e/ou cefaclor promoveram a redução bacteriana. Os autores desenvolveram o conceito que relaciona a utilização de agentes antimicrobianos intracanal para a desinfecção de lesões infecciosas e concluíram que o reparo do tecido pode ocorrer se a lesão for desinfetada.

Os efeitos da ciprofloxacina e fleroxacina na proliferação celular foram determinados pela contagem do número de células vivas e pelo teste MTT por Ebisuno et al. (1997). Para tal, foram utilizadas duas linhagens de células cancerígenas (MTB-2 e T-24). As substâncias testadas foram diluídas nas concentrações 50, 100, 200, 400 e 800 µg/mL e aplicadas na cultura celular em placas de 96 poços por um período de 24 horas. Os resultados da contagem celular demonstraram que a ciprofloxacina, nas concentrações de 50 a 800 µg/mL afetaram significativamente a proliferação da célula. Como determinado pelo ensaio do MTT, a ciprofloxacina nas concentrações de 100 a 800 µg/mL inibiu a proliferação celular de ambas as linhagens celulares.

Uma alternativa para medicação intracanal foi proposta por Lage-Marques e Antoniazzi (2000), a qual consiste em uma pasta contendo ciprofloxacina, metronidazol e hidróxido de cálcio, justificando essa associação por apresentar rápida atividade frente aos microrganismos, não somente em fase de multiplicação, como também no desenvolvimento. Os autores sugeriram a manipulação na proporção de 30 mg de ciprofloxacina, 30 mg de metronidazol e 60 mg de hidróxido de cálcio, armazenadas em cápsulas.

Para analisar a ação da ciprofloxacina em culturas de células, Gürbay et al. (2002) investigaram a possibilidade do envolvimento de estresse oxidativo e a viabilidade celular de fibroblastos humanos expostos a diferentes concentrações (0 a 0,387 mM) nos tempos experimentais de 24, 48 e 72 horas. Observaram que as concentrações empregadas no período experimental de 24 horas não produziram efeito citotóxico. A viabilidade celular, calculada pelo teste Vermelho Neutro (VN), diminuiu notoriamente nas concentrações 0,129 mM a 0,194 mM e 0,129 mM em 48 e 72 horas, respectivamente. No entanto, concentrações menores que 0,0129 e 0,032 mM aumentaram a taxa de sobrevivência celular em todos os períodos experimentais. Concluíram que a ciprofloxacina foi citotóxica dependendo da concentração e duração da exposição.

Windley et al. (2005) também analisaram a ação da pasta composta por ciprofloxacina, metronidazol e minociclina em 30 dentes de cães com lesão periapical induzida por 6 semanas. Três grupos experimentais foram avaliados; grupo I: foi coletado conteúdo microbiano dos canais sem que nenhuma substância química ou medicação fosse utilizada; no grupo II: a coleta microbiana do conteúdo do canal foi realizada após irrigação com 10 mL de NaOCl 1,25%; e no grupo III: a coleta microbiana foi realizada após aplicação da pasta contendo ciprofloxacina, metronidazol e minociclina na concentração de 20 mg/mL de cada medicação, que permaneceu no interior dos canais por um período de duas semanas. Houve uma redução significativa do número de bactérias dos dentes tratados com a pasta de antibióticos, indicando-a como uma boa alternativa para o tratamento de dentes com rizogênese incompleta e lesão periapical.

A ação citotóxica da ciprofloxacina também foi analisada por Sendzik et al. (2005) em células de tendócitos humanos, justificando essa ação como uma reação

adversa provocada por essa classe de antimicrobianos. Para isso, monocamadas de tendócitos humanos foram incubadas em contato com as seguintes concentrações de ciprofloxacina e levofloxacina: 0, 3, 10, 30 e 100 mg/L. Os resultados, obtidos por meio de microscopia eletrônica de transmissão, demonstraram que todas as concentrações de ciprofloxacina testadas provocaram alterações, como diminuição na produção de matriz celular, perda de forma e aumento das organelas celulares, principalmente das mitocôndrias e complexo de Golgi. Foi possível observar que as fluoroquinolonas em baixas concentrações influenciam na patogênese das tendopatias induzidas.

Gürbay et al. (2006) investigaram o possível dano ao DNA por ação da ciprofloxacina em cultura primária de astrócitos de ratos. Foram aplicadas diferentes concentrações (5, 150, 300 mg/L) do fármaco por 24 horas e o dano ao DNA foi monitorado pelo teste COMET. A ciprofloxacina causou dano leve ao DNA a 50 mg/L e dano significativo a 150 e 300 mg/L. Concluíram que o dano ao DNA causado pela ciprofloxacina é diretamente dependente da concentração.

Nessa mesma linha de pesquisa, Gürbay et al. (2007) também utilizando culturas de astrócitos de ratos, fizeram uso de outras concentrações da ciprofloxacina (de 0,5 a 300 mg/L), em diferentes tempos experimentais. Os testes empregados para a citotoxicidade foram o Vermelho Neutro (VN) e MTT. Dos resultados obtidos, foi possível verificar que nenhuma das concentrações empregadas causou alterações celulares no período de 7 horas. No entanto, concentrações menores ou iguais a 50 mg/L, permitiram significativa proliferação celular nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas. Houve decréscimo de proliferação celular em altas concentrações (200 e 300 mg/L). Concluíram que a citotoxicidade da ciprofloxacina é dose e tempo dependente.

Duewelhenke, Kint e Eysel (2007) analisaram a ação de 20 diferentes antimicrobianos em osteoblastos humanos (PHO), células epiteliais (HeLa) e células de osteosarcoma (MG63), dentre eles a ciprofloxacina e clindamicina. Altas concentrações das drogas durante 48 horas de incubação inibiram a proliferação e a atividade metabólica. A concentração inibitória para vinte por cento das células de PHO (IC₂₀) foram 20 a 40 µg/mL para clindamicina e 60 a 80 µg/mL para as fluoroquinolonas.

2.3.2 Clindamicina

É um fármaco quimicamente derivado da lincomicina. Atravessa facilmente as barreiras teciduais, apresentando a propriedade de penetrar no interior de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, o que explica a alta concentração dessa droga em abscessos. Devido a sua excelente penetração no tecido ósseo, a clindamicina é considerada o fármaco de eleição para o tratamento de infecções endodônticas por via oral, em pacientes alérgicos à penicilina e nos casos resistentes (FERREIRA; SUSIN, 1999).

Figura 2.2 -Fórmula estrutural da Clindamicina (MACROLIDOS, CLORAMFENICOL, CLINDAMICINA Y TETRACICLINAS, 2007)

Tem uma indicação precisa na profilaxia de endocardite infecciosa, em pacientes cardiopatas de risco, de acordo com o protocolo divulgado pela American Heart Association em 1997 (DAJANI et al.,1997).

A clindamicina age por inibição da síntese protéica bacteriana. Liga-se à subunidade 50S do ribossomo bacteriano interferindo na ligação do tRNA ao ribossomo, inibindo a formação da cadeia peptídica. É bacteriostática ou bactericida, na dependência da dose empregada e espécie bacteriana (KATSUNG, 2003).

O espectro de atividade da clindamicina inclui: bactérias aeróbias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermis* produtores e não produtores de penicilinase, pneumococcus, bactérias anaeróbias Gram-positivas e Gram-negativas como *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Fusobacterium*, *Eubacterium* (CHAMBERS, 2006).

Na terapia periodontal apresenta grande eficácia, uma vez que possui boa penetração no fluido gengival e, com dados baseados no teste de susceptibilidade *in vitro*, é eficaz contra a maioria dos microrganismos envolvidos em doenças periodontais, com exceção ao *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e a *Eikenella corrodens*. É também bastante eficiente no tratamento de pacientes portadores de periodontite refratária do adulto (WALKER; KARPINA; BAEHNI, 2004).

A clindamicina foi eficiente na eliminação de grande parte das amostras de microrganismos anaeróbios coletada de infecções de origem endodôntica, na concentração de 2 µg/mL, facilmente atingida por doses terapêuticas. Apenas uma cepa de *Bacteroides* e outra de *Peptostreptococcus* necessitaram de 4 µg/mL para serem inibidas (BAKER; EVANS; SLOTS, 1985).

A ação da clindamicina utilizada como alternativa de medicação intracanal foi avaliada por Molander, Reit e Dahlén (1990) em vinte e cinco dentes com periodontite apical. Uma coleta inicial foi realizada após a cirurgia de acesso e outra, após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal com clindamicina (150 mg - pó) veiculada em soro fisiológico, por 14 dias. Inicialmente houve predomínio de bacilos Gram-positivos anaeróbios, *Bacterioides* e *Streptococcus viridans*. Em menores proporções foram isoladas *Lactobacillus* spp. e *Enterococcus* spp. Os procedimentos realizados foram efetivos na eliminação dos anaeróbios, enquanto os *Enterococcus* foram isolados em 5 dos 6 casos identificados inicialmente. Observaram que a clindamicina oferece uma vantagem antimicrobiana adicional sobre a medicação de hidróxido de cálcio, porém não é recomendável seu uso como rotina, mas em condições excepcionais.

Também analisando sua ação como medicação intracanal, Gilad et al. (1999) desenvolveram uma fibra impregnada por clindamicina para liberação lenta e constante no interior do canal radicular. Para tanto, foram feitas três análises: (1) avaliação da efetividade da clindamicina frente a microrganismos comumente encontrados nas infecções endodônticas (*S. intermedius*, *P. micros*, *F. nucleatum* e *P. intermedia*); (2) em dentes contaminados com cultura pura e (3) cultura mista destes microrganismos. O dispositivo permaneceu intracanal por um período de 7 dias. Os resultados demonstraram a eficácia desse sistema contra *P. intermedia* e *F.*

nucleatum e menor eficiência sobre *P. micros*, sendo então a medicação proposta eficaz na redução da microbiota intracanal.

Existe uma relação de insucesso na terapia endodôntica com a presença de *Enterococcus faecalis*. Para isso, Lima, Fava e Siqueira Jr (2001) avaliaram a efetividade do digluconato de clorexidina em três formulações distintas e da clindamicina associada ou não ao metronidazol, na tentativa de eliminação dessa espécie no biofilme radicular. O biofilme com *E. faecalis* foi produzido em uma membrana de nitrato de celulose e a medicação (1 mL) aplicada por 1 a 3 dias. A associação da clindamicina e metronidazol reduziu significativamente o número de células do biofilme em um dia de aplicação.

Lin et al. (2003) avaliaram a ação de perfusão intradentinária da clindamicina e tetraciclina em dentina bovina. Trinta e dois cilindros de dentina radicular foram preparados e contaminados por *Streptococcus sanguis* durante 21 dias. Após esse período, a clindamicina 2% ou a tetraciclina 2% permaneceram como medicação intracanal por 1 semana. A análise da desinfecção dos túbulos dentinários foi feita por desgastes da luz do canal com sucessivas brocas, atingindo a profundidade de 400 µm. O potencial de ação das medicações foi avaliado por meio da difusão em ágar. Foi possível observar que a clindamicina 2% mostrou-se mais efetiva que a tetraciclina, agindo em toda a extensão avaliada. Desse modo, o autor sugere sua utilização como alternativa medicamentosa para os casos resistentes à terapêutica.

Wijsman, Dekaban e Rieder (2005) investigaram a reação de citotoxicidade da clindamicina e sulfametoxazol em células humanas infectadas pelo vírus HIV (MOLT3_{III}B) e células não infectadas (MOLT3). As células foram incubadas em contato com os antimicrobianos nas seguintes concentrações: 1, 10, 100 e 1000 µM

por um período de 18 horas. Em seguida foi utilizado o teste MTT. Os resultados demonstraram que a clindamicina não provocou redução na viabilidade celular de ambos os tipos celulares testados.

Outra espécie bacteriana também muito freqüente nos casos de insucesso endodôntico é o *Actinomyces* spp. e por esse motivo, LeCorn et al. (2007) avaliaram a suscetibilidade dessas espécies frente a diferentes antimicrobianos, para que pudessem ser utilizados em contato com tecido apical em cirurgias endodônticas. As espécies testadas incluíam *A. naeslundii*, *A. viscosus*, *A. gerencseriae*, *A. israelii*, *A. odontolyticus*. A concentração inibitória mínima foi estabelecida por meio do E-test: amoxicilina 0,19 µ/mL, doxiciclina 0,25 µ/mL, moxifloxacina 0,50 µ/mL, clindamicina 1,0 µ/mL.

2.3.3 Metronidazol

O metronidazol é um agente antimicrobiano sintético, derivado do nitroimidazol. Foi introduzido na Europa em 1960 para o tratamento de vaginites causadas pelo *Trichomonas vaginalis*. Alguns anos depois, foi empregado na terapia de outras infecções parasitárias, como a amebíase e giardíase (ANDRADE, 2002).

Figura 2.3 - Fórmula estrutural do Metronidazol (EDWARDS, 1983)

Shinn (1962) relatou alívio dos sintomas de gengivite ulcerativa necrosante aguda (GUNA) em uma paciente portadora de tricomoniase vaginal, que estava sob terapia com o metronidazol. A partir dessa observação clínica casual, seguiram-se inúmeras pesquisas que demonstraram a eficácia do metronidazol sobre os microrganismos anaeróbios.

O espectro de ação do metronidazol compreende bactérias anaeróbias estritas Gram-positivas, Gram-negativas e protozoários (EDWARDS, 1983). Promove o rompimento do DNA bacteriano e inibe a síntese de ácidos nucleicos, com ação bactericida (GOODSON, 1994).

O mecanismo de ação do metronidazol se faz em meio com baixo potencial de oxirredução, associado à anaerobiose. Ao penetrar na célula, o fármaco é degradado por ação de nitroredutases, gerando compostos polares citotóxicos. Esses determinam perda da estrutura helicoidal do DNA bacteriano, quebra de filamentos e comprometimento concomitante de sua função, além de inibir a síntese de ácidos nucleicos. Com a ruptura da estrutura helicoidal do DNA, a célula bacteriana é destruída, além disso, afeta as células independentemente de estarem se dividindo ou não (ANDRADE, 2002).

É comumente administrado por via oral em situações de agudizações de processos crônicos. Largamente utilizado na periodontia para desinfecção da porção externa radicular após a raspagem, com o intuito de desorganizar o biofilme bacteriano existente (SIQUEIRA Jr; UZEDA 1997).

Sanjiwan, Chandra, Jaiswall (1990) avaliaram a efetividade do metronidazol na concentração de 0,25% sobre microrganismos anaeróbios *in vitro*, empregado como solução irrigante durante o preparo químico-cirúrgico de 10 incisivos centrais. Cada dente foi tratado em quatro sessões e entre elas não foi utilizada medicação intracanal. Após esse período não foram observados microrganismos anaeróbios em nenhum dos dentes. Os autores indicaram essa solução como boa alternativa para irrigação dos canais radiculares.

A eficácia da pasta de metronidazol na concentração de 10%, aplicada topicamente no tratamento da alveolite foi investigada por Mitchel (1984). O veículo utilizado foi a carboximetilcelulose, que também foi utilizada como placebo. Os dois materiais foram aromatizados com menta. Cinquenta e cinco pacientes foram avaliados, dos quais 26 foram tratados com a pasta e 29 com placebo. Os resultados demonstraram a cura mais rápida quando da utilização do metronidazol em comparação ao grupo controle.

A ação bactericida do metronidazol foi analisada por Hoshino et al. (1989), por meio da quantificação bacteriana com ou sem aplicação tópica do medicamento, em tecido dentinário cariado. As amostras (n=39) foram obtidas removendo-se uma pequena porção de dentina cariada, deixando o restante do tecido amolecido na cavidade. Posteriormente foi aplicado um cimento (fosfato de α -tricálcio - TPC) associado ou não ao metronidazol. Foram feitas coletas sucessivas de tecido dentinário em 1 dia, 1 mês, 1 e 2 anos. As amostras eram investigadas quanto à

presença de microrganismos em ambiente de anaerobiose. Ao final do experimento, concluíram que o metronidazol incorporado ao TPC mostrou-se eficiente quanto à ação antimicrobiana na desinfecção da dentina cariada.

Feres Filho et al. (1990) propuseram o uso do metronidazol empregando-se um dispositivo à base de silicona polimerizada para ser aplicado topicamente em bolsas periodontais. Com isso, visaram promover liberação lenta e prolongada do produto, tendo em vista ação contínua e menor número de aplicações.

Siqueira e Uzeda (1997) estudaram a ação do metronidazol na forma gel, em concentração de 10% frente a microrganismos anaeróbios comumente encontrados nas infecções endodônticas. Os medicamentos testados foram: metronidazol gel 10%, clorexidina gel 0,12%, hidróxido de cálcio associado a diferentes veículos (água destilada, paramonoclorofenol canforado (PMCC) e glicerina). Para o experimento foi usado o método de difusão em ágar. O hidróxido de cálcio veiculado ao PMCC e a clorexidina gel foram eficientes na redução de todas as bactérias testadas. O metronidazol, como esperado, causou inibição de todas as bactérias anaeróbias estritas e mostrou-se mais efetivo que o hidróxido de cálcio veiculado ao PMCC, contra *P. endodontalis* e *F. nucleatum*.

Esse mesmo gel também foi utilizado por Pol, Carvalho e Andrade (1999) para tratamento de alveolites, nos quais a predominância é de bactérias anaeróbias, obtendo bons resultados, e recomendando-o como alternativa viável para aplicação tópica.

Baumgartner e Xia (2003) investigaram a ação de antibióticos em 98 cepas bacterianas isoladas de infecções endodônticas. Para essa análise foi empregado o *E-test*. O percentual de ação e a concentração inibitória mínima para cada antibiótico foi: penicilina V (85%, < 0,5 µg/mL), amoxicilina (91%, < 0,5 µg/mL), amoxicilina +

ácido clavulânico (100%, < 4 µg/mL), clindamicina (96%, < 2 µg/mL) e metronidazol (45%, < 8µg/mL). Os resultados demonstraram maior resistência das cepas bacterianas ao metronidazol, por possuir um espectro de ação exclusivo aos anaeróbios estritos, que nesse estudo representavam 66%. Além disso, observaram melhor eficácia do metronidazol quando associado à penicilina V e amoxicilina, proporcionando valores de susceptibilidade próximos de 100%.

Carneiro, Dourado e Alves (2005) compararam dois tratamentos endodônticos realizados em dentes com abscesso dentoalveolar crônico em um mesmo paciente, empregando diferentes medicações intracanal. Em um tratamento foi utilizado pasta à base de hidróxido de cálcio (Calen) e em outro metronidazol na forma gel. Após um ano de acompanhamento clínico e radiográfico observaram reparo tecidual. Os autores concluíram que o metronidazol pode ser uma alternativa viável como coadjuvante da terapêutica medicamentosa intracanal.

Panzarini et al. (2006) compararam a resposta tecidual periapical em dentes de cães utilizando metronidazol como medicação intracanal. Assim, foram induzidas lesões periapicais crônicas em 40 dentes de cães por um período de 180 dias. A partir de então, foi realizado o esvaziamento dos canais radiculares e posteriormente a divisão em 4 grupos experimentais, de acordo com a medicação intracanal empregada: grupo I: não foi utilizada medicação intracanal; grupo II: hidróxido de cálcio veiculado em polietilenoglicol; grupo III: metronidazol veiculado em polietilenoglicol e grupo IV: partes iguais de metronidazol e hidróxido de cálcio veiculados em polietilenoglicol. Após 15 dias de permanência da medicação intracanal, os dentes foram obturados com cimento de Grossman. Passados 90 dias, os animais foram ortotanizados e então realizada a análise histológica da região periapical. Os dados obtidos permitiram observar que o hidróxido de cálcio

veiculado ao polietilenoglicol apresentou os melhores resultados em relação ao reparo tecidual. A associação do metronidazol com o hidróxido de cálcio, veiculados em polietilenoglicol obtiveram resultados semelhantes ao metronidazol veiculado em polietilenoglicol. Os autores concluíram então, que a utilização da medicação intracanal composta por metronidazol não promoveu melhoras no reparo tecidual, quando comparada ao hidróxido de cálcio.

Com a intenção de estudar medicações alternativas aos casos resistentes à terapêutica, Carreira et al. (2007) avaliaram a ação antimicrobiana do cloridrato de ciprofloxacina, metronidazol e dos veículos polietilenoglicol e natrosol, em diferentes associações e concentrações. A análise da concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada utilizando o método de diluição em ágar Müller-Hinton. Um total de 25 cepas resistentes à terapia endodôntica foram selecionadas para o estudo. Nesse modelo experimental, verificou-se sinergismo na associação do cloridrato de ciprofloxacina ao metronidazol, sendo a CIM de 2 µg/mL. O metronidazol isoladamente não foi capaz de eliminar nenhum dos microrganismos testados. A ciprofloxacina apresentou ação antimicrobiana sobre todas as bactérias avaliadas na CIM de 4 µg/mL. A formulação que demonstrou melhor efeito antimicrobiano foi a combinação do cloridrato de ciprofloxacina ao metronidazol, veiculados em gel de natrosol. Os resultados permitiram concluir que a associação proposta foi capaz de eliminar o *E. faecalis*, enterobactérias, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. mutans*, bactérias altamente resistentes ao tratamento endodôntico.

2.4 Testes biológicos

Baseado no documento nº 41 da ANSI/ADA, a *International Standard Organization* – ISO (1992) regulamentou a realização de testes biológicos de materiais dentários, por meio do documento ISO 10993 com a seguinte categorização: (1) Testes iniciais, que incluem testes de citotoxicidade em cultura de células; (2) Testes secundários, que compreendem implantes subcutâneos em ratos; (3) Testes de uso, de aplicação ou pré-clínico, que incluem experimentos em animais de grande porte, como cães e seres humanos.

Hanks, Wataha e Sun (1996) revisando a literatura sobre os modelos *in vitro* de testes de biocompatibilidade, citaram que o objetivo principal é estimular reações biológicas do tecido quando em contato com os materiais. Relataram ainda que esses métodos, relativamente acessíveis, reduzem as possibilidades de resultados inesperados quando aplicações clínicas em animais e humanos forem realizadas.

Os primeiros trabalhos avaliando o comportamento tecidual diante do uso de medicações intracanal estudaram a toxicidade valendo-se de tecido conjuntivo subcutâneo de animais ou, mais recentemente, de tecidos periapicais de cães.

Ao implantar tubos plásticos com várias substâncias, entre elas uma solução saturada de penicilina G em subcutâneo de camundongos, Torneck (1961) afirmou que o potencial irritativo de uma droga intracanal é influenciado por fatores inerentes ao produto utilizado, tais como, qualidade, concentração, natureza física da substância, volume da droga e forma de administração; aspectos relacionados ao hospedeiro, como por exemplo, diâmetro do forame apical, padrão histológico dos

tecidos periodontais, tempo de exposição à droga e suscetibilidade do indivíduo à agressão.

A determinação da viabilidade, bem como a toxicidade celular pode ser interpretada pela identificação do halo de inibição pelo contato direto do material-célula (VANDER WALL; DOWSON; SHIPMAN Jr, 1972), assim como, pela marcação com cromo radioativo (SPANGBERG, 1973), mensuração do grau de destruição da monocamada celular, contagem de células por exclusão com azul de Trypan (FRESHNEY, 2000), entre outros.

A confiabilidade científica dos estudos de citotoxicidade *in vitro*, valendo-se da cultura de células, está relacionada à escolha da metodologia, sobretudo no componente celular empregado, tipo de contato material-célula, utilização dos materiais na forma como são propostos, critérios de avaliação bem estabelecidos e também na relevância dos resultados (BROWNE; TYAS, 1979). Como vantagens dessa técnica encontra-se a simplicidade, facilidade na reprodução dos resultados, controle das condições experimentais, metodologia bastante sensível, baixo custo, rapidez e respeito a bioética (HYAKUNA et al., 1989).

Com essa finalidade, dois tipos de células são amplamente utilizados: linhagem de células permanentes – derivadas de coleções obtidas comercialmente; e linhagens primárias oriundas de tecidos e, portanto estabelecidos em cada laboratório individualmente (SCHMALZ, 1994).

Quanto à metodologia de avaliação da toxicidade celular, Mossman (1983), propôs um método com o uso do corante MTT, que é extremamente confiável, rápido e facilmente reproduzível, refletindo pela viabilidade celular, o número de células em uma amostra.

O MTT veiculado em solução de PBS apresenta a coloração amarelo-fluorescente e é solúvel em água. A forma estrutural em anel do componente tetrazólico do MTT é incorporada pelas células viáveis, e assim quebrada pelas enzimas mitocondriais, gerando cristais insolúveis de formazina na cor azul escuro. Portanto, esse método indica a atividade mitocondrial que é diretamente proporcional ao número de células vivas e metabolicamente saudáveis (COLLIER; PRITSOS, 2003).

Constatada a confiabilidade científica das técnicas de cultivo celular, bem como a necessidade por informações a respeito de medicamentos menos citotóxicos que favoreçam a reparação dos tecidos periapicais, o presente estudo tem como proposta avaliar *in vitro* a citotoxicidade do cloridrato de ciprofloxacina, cloridrato de clindamicina e metronidazol tendo como modelo experimental cultura de fibroblastos de gengiva humana.

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade do cloridrato de ciprofloxacina, cloridrato de clindamicina e metronidazol gel em diferentes concentrações e tempos experimentais, tendo como modelo experimental cultura de fibroblastos de gengiva humana em ensaio de viabilidade celular pelo método MTT.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

- Agitador mecânico vortex-Genie 2 (A. Daigger & Co., INC)
- Água tri destilada tipo Milli-Q
- Balança de precisão (Fanem, SP)
- Banho Maria a 37 °C (Fanem, SP)
- Bomba a vácuo (Nevoni)
- Câmara tipo Neubauer (Baxter)
- Capela de Fluxo laminar (VECO-Campinas, SP)
- Centrífuga Excelsa Baby I, modelo 206 (Fanem, SP)
- Cloridrato de Clindamicina - pó - 1,0 g (Farmácia Fórmula & Ação, São Paulo, SP)
- Cloridrato de Ciprofloxacina - pó - 1,0 g (Farmácia Fórmula & Ação, São Paulo, SP)
- Cultura de células (linhagem FMM1) - fragmento de gengiva humana (Banco de células do Departamento de Dentística da FOUSP)
- Dimetil-sulfóxido- DMSO (Sigma Chemical, CO-St. Louis, MO, USA)
- Espectrofotômetro ELISA (Amersham Biosciences Biotrak II, Inglaterra)
- Estufa com controle de temperatura/pressão de CO₂ (Thermo Forma)
- Folhas de papel alumínio (Wyda Embalagens-Sorocaba-SP)

- Frascos plásticos de cultivo celular – 25 e 65 cm² (Costar)
- Lamínula de vidro quadrada 20 mm (Glass Técnica)
- Meio de Cultura Eagle modificado por Dulbecco-DMEM (Sigma Chemical, CO-St. Louis, MO, USA)
- Metronidazol Gel 10% (EMS)
- Microscópio invertido de fase (Axiovert 25 ZEISS)
- Micropipetador (Pentil IV)
- MTT - Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (Invitrogen, EUA)
- Pipeta 2 a 20 µL (Nichiryo)
- Pipeta 20 a 200 µL (Nichiryo)
- Pipetador multicanal (Nichiryo)
- Pipeta Automática tipo AID, Mod.Swiftpet
- Pipetas Pasteur (Costar)
- Programa estatístico BioEstat 4,0 (BioEstat Software, Belém - PA)
- Proveta 100 mL (Vidrolabor)
- SDS-(QBioGene, EUA)
- Solução antibiótica-antimicótica 1% (Sigma Aldrich Brasil-São Paulo-SP).
- Solução salina tamponada, sem cálcio e sem magnésio-PBSA
- Solução de tripsina 0,25% (Sigma Aldrich Brasil-São Paulo-SP).
- Solução tampão de HCl a 0,01 M
- Soro fetal bovino a 10% (Cultilab, Campinas, SP, Brasil)
- Tubo de ensaio 15 mL (Costar)
- Tubo de ensaio 50 mL (Costar)
- Tubos criogênicos 200 µL (Sigma)
- Placa de cultura celular de poliestireno, aderente – 96 poços (Embriocare)

4.2 Metodologia experimental

Foram utilizados fibroblastos de gengiva humana (FMM1), cedidos pelo laboratório de Pesquisa Básica do Departamento de Dentística da FOU SP.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP, sob o parecer nº 02/05 (Anexos A e B).

4.2.1 Cultivo celular e determinação do número de células

O processo de congelamento celular é promovido pelo armazenamento das células em tubo criogênico e armazenado em nitrogênio líquido.

No momento da utilização, as células foram descongeladas por aproximadamente 30 segundos em banho-maria a 37 °C, pois o dimetil sulfóxido (DMSO), solução que mantém a célula congelada viável, é tóxica não devendo permanecer em contato com os fibroblastos descongelados. Logo após, foi realizada a neutralização da solução, por meio de transferência do conteúdo do tubo criogênico para um novo tubo de ensaio, contendo 5 mL de meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com soro fetal bovino a 10% e solução antibiótica-antimicótica a 1%. Em seguida foi realizada a centrifugação por um período de 5 minutos, com o objetivo de precipitar as células. O sobrenadante foi removido e o precipitado celular resultante foi ressuspendido em 1 mL de meio

fresco e transferido para um frasco de cultivo celular de 65 cm², contendo 15 mL de meio de cultura.

As células foram mantidas em estufa a 37 °C, numa atmosfera úmida, contendo 95% de ar e 5% de CO₂. O crescimento celular foi monitorado a cada 24 horas, utilizando-se microscópio invertido de fase, até que fosse constatado o estado de subconfluência das células. (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Fibroblastos em cultura. Monitoramento do crescimento celular. (A) e (B) células em fase de crescimento; (C) células em estado de subconfluência

É importante salientar que para a manutenção da viabilidade das células, realizou-se troca do meio de cultura dos frascos a cada dois ou três dias.

Ao constatar o estado de subconfluência, momento em que aproximadamente 70% do frasco apresentava-se repleto de células, realizou-se os subcultivos.

Para isso, o meio do frasco foi aspirado e a monocamada celular lavada com solução tampão fosfato-salina, sem cálcio e sem magnésio (PBSA), de pH 7,2. A seguir, as células foram liberadas do fundo do frasco utilizando-se 3 mL de solução de tripsina 0,25%, durante 1 minuto, em estufa a 37 °C. A tripsina foi então inativada com 5 mL de meio de cultura contendo soro fetal bovino. As células em suspensão foram transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas a 300 giros, durante 5

minutos, à temperatura ambiente. O precipitado de células resultante da centrifugação foi ressuspensionado em 1 mL de meio fresco e a suspensão de células foi então replaqueada em dois novos frascos de cultivo de 65 cm², contendo 15 mL de meio de cultura.

Os subcultivos foram feitos até que fossem obtidas quantidades de células suficientes para o experimento. Cabe acrescentar que cada subcultivo representa uma mudança na passagem da célula, e para este estudo foram utilizadas células da sexta passagem.

Para determinação do número de células existentes nos frascos originais, as células foram tripsinizadas e novamente transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas a 300 giros, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi aspirado e o precipitado de células foi ressuspensionado em 1,0 mL de DMEM. Parte dessa suspensão (10 µL) foi transferida para o hemocitômetro (câmara do tipo Neubauer) coberto com uma lamínula de vidro e então, com auxílio do microscópio invertido de fase, foi realizada a contagem celular (Figura 4.2).

A câmara do tipo Neubauer apresenta dois compartimentos, um superior e outro inferior. Dessa forma, o volume de células determinado para cada um desses compartimentos, quando coberto pela lamínula, é equivalente a 1 mm x 1 mm x 0,1 mm que corresponde a 0,1 mm³. Logo, uma vez que as células existentes em um compartimento tenham sido contadas, o número de células contadas em 1 mL é igual a esse valor multiplicado por 10⁴ (FRESHNEY, 2000).

Segundo a seguinte equação:

$$\frac{\text{Nº total de células contadas} \times 10^4}{\text{Nº de quadrados contados}}$$

Figura 4.2 - Câmara do tipo Neubauer no microscópio invertido de fase para contagem celular

Diante do número de células existentes no frasco original foi adicionado a essa suspensão, uma determinada quantidade de DMEM, de modo que fossem obtidas 10^3 células em cada 200 μL /poço da placa de cultivo.

A partir desse momento, foram selecionadas 4 placas de cultivo celular contendo 96 poços, uma para cada tempo experimental (24, 48, 72 e 96 horas), em que foram aplicados 100 μL de meio de cultura contendo 10^3 células/poço. Em seguida essas placas foram levadas à estufa a 37 °C em tensão de 5% de CO_2 , por um período de 24 horas, para aderência celular.

4.2.2 Definição dos grupos, concentrações e tempos experimentais

Para estabelecer as concentrações empregadas no experimento, seguiu-se o proposto por Gürbay et al. (2007):

Grupo I: controle

Grupo II: cloridrato de ciprofloxacina (300, 150, 50, 5 mg/L)

Grupo III: cloridrato de clindamicina (300, 150, 50, 5 mg/L)

Grupo IV: metronidazol gel 10% (300, 150, 50, 5 mg/L)

Tempos experimentais para cada grupo: 24, 48, 72 e 96 horas.

As substâncias testadas nesse experimento foram manipuladas no Laboratório de Pesquisas Básicas do Departamento de Dentística da FOUSP. Cada fármaco foi diluído em água destilada e acrescentado ao meio de cultura (DMEM).

Decorridas 24 horas do plaqueamento da cultura de fibroblastos, os meios de cultura foram retirados por aspiração cuidadosamente, para não descolar a monocamada celular. Em seguida foram aplicados 200 µL de cada concentração dos antimicrobianos testados em seus determinados grupos e para o grupo controle foi acrescido meio puro. Cabe acrescentar que nas placas dos tempos de 72 e 96 horas, os meios de cultura foram renovados ao se completar 48 horas, sendo que para o grupo controle foi aplicado meio fresco e para os demais, preparadas novas diluições dos antimicrobianos. Cada concentração dos antibióticos foi aplicada em três poços (Figura 4.3). Após a confirmação dos resultados, o experimento foi repetido por duas vezes, totalizando três experimentos.

Figura 4.3 - Distribuição dos grupos experimentais e respectivas concentrações

4.2.3 Ensaio de Viabilidade Celular

Ao término de cada tempo experimental, analisou-se a atividade mitocondrial dos fibroblastos pelo método MTT. Para sua realização, foram preparados os reagentes A e B. O reagente A era composto por 0,05 g de MTT, em 10 mL de PBSA e o reagente B, constituído por 1 g de SDS, em 10 mL de 0,01 M de HCl.

Todos os meios foram aspirados e em seguida aplicados 100 μ L de meio DMEM fresco. Quantidades de 10 μ L do reagente A foram adicionados em cada poço contendo células, tomando o cuidado para protegê-las da luminosidade com folha de papel alumínio e mantidas sob incubação em estufa a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂ durante exatamente 4 horas.

Após este período, a placa foi levada à capela de fluxo laminar para aplicação de 100 μ L do reagente B. Novamente retornou-se para incubação em estufa a 37 °C, por um período de 12 horas (Figura 4.4). Na primeira e na última coluna de cada

placa, em que não havia células, também foram aplicados os reagentes A e B para auxiliar na leitura do espectrofotômetro.

Figura 4.4 - Aspecto dos poços imediatamente após a adição de 100µL do reagente B

Concluído esse período, o conteúdo de cada poço foi gentilmente misturado com auxílio de pipetador multicanal e levado para leitura de absorbância em espectrofotômetro ELISA, com leitor de 560 nm.

Os valores resultantes da absorbância foram analisados, convertidos em porcentagens de viabilidade celular e comparados estatisticamente ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os dados da atividade mitocondrial obtidos pela mensuração das densidades ópticas nas placas de cultivo celular dos grupos experimentais foram transformados em porcentagem em relação à viabilidade do grupo controle, considerada 100% (Apêndices A, B e C).

Estes valores estão expressos na tabela 5.1 e ilustrados nas figuras 5.1 a 5.11, considerando cada grupo testado representado pelo antibiótico utilizado em cada concentração e tempo experimental, frente à cultura padrão de fibroblastos.

Tabela 5.1 - Médias em percentual da viabilidade celular (%) de fibroblastos frente aos antibióticos testados segundo a concentração e tempo experimental

Horas	24			48			72			96		
Antib. mg/L	Cipro	Clinda	Metro	Cipro	Clinda	Metro	Cipro	Clinda	Metro	Cipro	Clinda	Metro
5	78,61	70,06	71,01	55,84	66,16	68,15	83,80	77,32	71,34	69,88	81,68	73,95
50	63,31	65,37	68	35,32	58,96	61,33	51,29	72,09	62,97	53,07	71,31	67,68
150	37,56	45,35	62,75	26,87	36,16	56,97	33,39	42,74	56,33	29,31	30,50	62,90
300	27,22	15,71	53,38	9,36	5,86	55,05	17,10	13,83	53,25	10,79	0,83	57,66

Figura 5.1 - Viabilidade das células de fibroblastos, médias percentuais, em contato com a Ciprofloxacina em diferentes concentrações em relação aos tempos experimentais

Na figura 5.1 observa-se que em 24 horas as concentrações de 5 e 50mg/L de Ciprofloxacina proporcionaram pelo menos 60% de viabilidade celular, decrescendo no tempo seguinte e aumentando até o final do tempo experimental de 96 horas.

Já as concentrações mais elevadas de 150 e 300mg/L proporcionaram menor número de células viáveis em todo o período experimental.

Figura 5.2 - Viabilidade das células de fibroblastos, médias percentuais, em contato com a Clindamicina em diferentes concentrações em relação aos tempos experimentais

Na figura 5.2 é possível observar que as concentrações de 5mg/L e 50mg/L de Clindamicina permitiram cerca de 60% de células viáveis nos períodos experimentais de 24 e 48 horas e ultrapassaram 70% nos dois tempos finais. Já as concentrações de 150 e 300mg/L apresentaram valores inferiores a 50 e 20%, nos tempos experimentais de 24 e 48 horas e uma diminuição do número de células ao final de 96 horas.

Figura 5.3 - Viabilidade das células de fibroblastos, médias percentuais, em contato com a Metronidazol em diferentes concentrações em relação aos tempos experimentais

A figura 5.3 demonstra que todas as concentrações de metronidazol proporcionaram pelo menos 50% de células viáveis em todos os tempos experimentais, chegando até 73% de viabilidade na concentração de 5mg/L em 96 horas.

Figura 5.4 - Viabilidade celular de fibroblastos e médias percentuais frente aos antibióticos em suas respectivas concentrações no tempo experimental de 24 horas

Figura 5.5 - Viabilidade celular de fibroblastos e médias percentuais frente aos antibióticos em suas respectivas concentrações no tempo experimental de 48 horas

Figura 5.6 - Viabilidade celular de fibroblastos e médias percentuais frente aos antibióticos em suas respectivas concentrações no tempo experimental de 72 horas

Figura 5.7 - Viabilidade celular de fibroblastos e médias percentuais frente aos antibióticos em suas respectivas concentrações no tempo experimental de 96 horas

É possível observar nas figuras 5.4 a 5.7 a relação entre as medicações estudadas e suas concentrações. Fica evidente a relação inversamente proporcional da concentração com a viabilidade celular, ou seja, quanto maior a dose menor a viabilidade.

As imagens a seguir ilustram a relação dos fibroblastos no grupo controle (figura 5.8) e os antibióticos testados (figuras 5.9 a 5.11).

Figura 5.8 - Microfotografias do Grupo I - (Controle)

Na figura 5.8 é possível observar os fibroblastos em condições normais, representando o grupo controle. Em 24 horas as células apresentavam-se com formato fusiforme, núcleo central e a presença de prolongamento citoplasmático, sendo este importante na relação entre as células. Já em 48 horas é possível a observação de um maior número de células, que ocupavam cerca de 70% do poço de cultivo, representando o estado de subconfluência. Em 72 horas as células apresentavam-se em estado de confluência. Finalmente, em 96 horas as células em confluência e com sobreposição.

Figura 5.9 - Microfotografias do Grupo II - (ciprofloxacina) em 72 horas. (A) indica possível precipitado da medicação no fundo do frasco

Observando a figura 5.9, nota-se que as imagens representativas das concentrações de 5 e 50 mg/L expõem fibroblastos de formato fusiforme com núcleo central e típicos prolongamentos citoplasmáticos. Já a de 150 mg/L apresenta menor número de células, com maior espaçamento entre elas. A concentração de 300 mg/L apresenta partículas entre as poucas células existentes, sugerindo a precipitação da medicação (A).

Figura 5.10 - Microfotografias do Grupo III - (clindamicina) em 72 horas

Na figura 5.10, as imagens indicativas das concentrações de 5 e 50 mg/L expõem fibroblastos de formato fusiforme com núcleo central e típicos prolongamentos citoplasmáticos. Na de 150 mg/L apresenta poucas células, independentes, com formato arredondado e mínimos prolongamentos citoplasmáticos. A concentração de 300 mg/L representa a dose que inviabilizou o maior número de células dessa medicação estudada. É possível observar células aderidas, mas sem formato definido.

Figura 5.11 - Microfotografias do Grupo IV - (metronidazol) em 72 h. (B) indica possível precipitado da medicação no fundo do frasco

Na figura 5.11, em todas as imagens há presença de células fusiformes, ligeiramente arredondadas quando comparadas ao grupo controle. Percebe-se um grande número de fibroblastos nas concentrações de 5 e 50 mg/L. Além disso, nas imagens representativas das concentrações de 150 e 300 mg/L nota-se certa desordem na disposição das células, ou seja, a tendência de formação de aglomerados celulares, além da possibilidade de precipitado da medicação no fundo do frasco.

A análise da distribuição do número de células viáveis foi considerada não normal (Apêndice D), orientando para a seleção do teste estatístico Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn, com nível de significância de 5% nas várias interações para cada antibiótico e dos mesmos em relação à concentração e tempos experimentais (Apêndices E a K).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 Da proposta

Nas situações clínicas que envolvem a presença de microrganismos e biofilme apical, a terapia endodôntica exige que o profissional lance mão de recursos medicamentosos que atuem diretamente nessa microbiota.

Sendo assim, a medicação intracanal tem ação coadjuvante no combate a infecção que resiste ao preparo químico-cirúrgico, uma vez que os microrganismos alojados no sistema endodôntico constituem fator complicador no desenvolvimento e manutenção de reabsorções ósseas periapicais.

A década de 70 representou um marco no conhecimento da microbiologia aplicada à Endodontia. Até esse período, acreditava-se que nas infecções primárias, as que ocorrem nos dentes não tratados endodonticamente, predominavam microrganismos anaeróbios facultativos ou aeróbios. Essa crença estava relacionada com os métodos existentes de coleta, isolamento e cultivo dos microrganismos.

O advento e aprimoramento das técnicas de anaerobiose permitiram Sundqvist¹ (1976 apud SYDNEY, 1996) observar que 90% da composição da microbiota era composta por anaeróbios. Outros autores confirmaram a predominância de anaeróbios estritos nas infecções primárias (THILO; BAEHNI; HOLZ, 1996; WU; MOORER; WESSELINK, 1989).

¹ Sundqvist, G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Umea. University of Umea, 1976. 94p. (Umea University Odontological Dissertations, n.7).

Fabricsius et al. (1982) mostraram que as interações entre as diferentes espécies de microrganismos são fatores determinantes na dinâmica das infecções, uma vez que constataram inviabilidade de *Bacteroides* quando inoculados em dentes de macacos isoladamente, comprovando que algumas espécies produzem substâncias essenciais ao desenvolvimento de outras.

Desestruturar o ecossistema microbiano é um dos principais objetivos do tratamento endodôntico, associando a dinâmica dos instrumentos com a ação antimicrobiana de substâncias químicas. Dessa forma, a maioria das situações clínicas é solucionada pela execução da técnica endodôntica tradicional e que obedece aos fatores condicionadores do bom preparo do sistema endodôntico.

Existem, no entanto, 3% das situações clínicas que resistem a essa terapêutica, denominadas de infecções resistentes, e em menor porcentagem as infecções refratárias, caracterizadas pela ausência de resposta ao controle da infecção (LAGE-MARQUES; ANTONIAZZI, 2000). Essas dificuldades estão relacionadas com as anormalidades anatômicas (GOMES; DRUCKER; LILLEY, 1996), resistência microbiológica (CHÁVEZ DE PAZ et al., 2003; HANCOCK et al., 2001; PECIULIENE et al., 2000) e a presença de biofilme apical (TRONSTAD; BARNETT; CERVONE, 1990). Infecções que se enquadram nessas situações deverão ser submetidas ao protocolo padrão da técnica endodôntica na busca de efeitos condicionadores, visando aumentar a permeabilidade dentinária, abrindo vias de acesso em profundidade a fim de garantir a ação eficiente das medicações.

Portanto, a combinação dos antimicrobianos tem o intuito de ampliar o espectro de ação e atuar particularmente sobre os microrganismos anaeróbios facultativos e aeróbios resistentes (CARREIRA et al., 2007).

Pela falta de informações sobre a ação biológica das diferentes drogas ao atuar em casos resistentes e refratários, encontrou-se a motivação para a elaboração deste experimento.

Cabe ressaltar que a medicação aqui proposta foge do protocolo terapêutico usual, representando uma pequena parcela da casuística clínica, justamente por ser indicada nos casos em que todas as alternativas tradicionais não produziram alterações nos sinais e sintomas presentes.

6.2 Da metodologia empregada

Desde os estudos de Torneck (1961), Spangberg (1973), procurava-se avaliar as reações biológicas quando do emprego de diversos materiais endodônticos, sejam estes medicamentos, soluções irrigadoras ou mesmo cimentos obturadores, por meio de análise histológica ou por técnicas laboratoriais como o cultivo celular (ENGSTRON; SPANGBERG, 1966; FRESHNEY, 2000; VANDER WALL; DOWSON; SHIPMAN Jr, 1972).

Como preconizado pela *International Standard Organization*, ISO 10993, os experimentos de biocompatibilidade podem ser agrupados em *in vitro*, representados pela cultura de células, testes secundários em animais, como a aplicação de substâncias e a sensibilização de tecido mucoso ou conjuntivo, além dos testes clínicos.

Os resultados dos testes *in vitro* de citotoxicidade devem ser interpretados com cautela, pois seu objetivo principal é o de demonstrar o grau de toxicidade de

uma substância e não a reação tecidual provocada, sempre em relação ao grupo controle. Um material que apresenta resultados insatisfatórios em testes *in vitro* de toxicidade pode ou não ser descartado. Se forem seguidos princípios para a limitação do problema, esse material pode vir a ter aplicabilidade clínica (SPANGBERG, 1973).

Desse modo, graças aos testes laboratoriais é possível avaliar isoladamente o modo de atuação ou efeito de um componente químico específico presente em um material (FRESHNEY, 2000).

De acordo com Browne e Tyas (1979) e Schmalz (1994), a metodologia de cultura celular representa uma valiosa ferramenta para a compreensão da atividade das células frente aos materiais odontológicos testados, ainda que a padronização, reprodução e avaliação dos resultados devam ser criteriosamente definidas. Dessa forma, reduz a probabilidade de resultados insatisfatórios quando testes clínicos em animais e humanos forem realizados. Somente aqueles materiais que apresentarem biocompatibilidade em níveis aceitáveis, numa seqüência de ensaios *in vitro* e *in vivo*, devem ser considerados para utilização clínica (HANKS; WATAHA; SUN, 1996).

A metodologia selecionada para o presente experimento foi baseada nos estudos de Gürbay et al. (2002), que também avaliaram as reações biológicas da ciprofloxacina em cultura de células. Para padronização dos grupos experimentais aqui analisados, foram empregadas as mesmas concentrações por eles propostas em todas as medicações.

Quanto às células utilizadas, optou-se por trabalhar com linhagem de fibroblastos de gengiva humana, sexta passagem, por ser uma célula de fácil

manipulação e apresentar potencial metabólico parecido com as células presentes nos tecidos periapicais, além de fornecerem concentrações elevadas de células.

O número de células utilizadas (10^3 células/poço) foi estabelecido pela realização de estudo piloto para que as células pudessem permanecer viáveis ao final de 96 horas.

Importante esclarecer que o consumo dos nutrientes contidos no meio de cultura é também um dos responsáveis pelo decréscimo da viabilidade celular. A escolha de utilização do meio DMEM, enriquecido com 10% de soro fetal bovino, reproduz as condições ideais para a manutenção das células *in vitro*.

Com a realização do estudo piloto foi possível constatar que, a falta de nutrientes do meio seria uma variável influente na viabilidade celular, desta forma, justifica-se a substituição de todos os meios após 48 horas.

Para minimizar ou descartar quaisquer variáveis que pudessem interferir nos resultados deste experimento, algumas precauções foram tomadas de modo que todos os procedimentos foram realizados em ambiente asséptico (capela de fluxo laminar), seguindo o protocolo elaborado pelo Laboratório de Pesquisas Básicas do Departamento de Dentística da FOU SP. As células foram plaqueadas ao mesmo tempo e com a mesma linhagem. Após a análise e confirmação dos resultados, o experimento foi repetido duas vezes.

Ao contrário de Fleit, Fleit e Zolla-Pazner (1984) que preconizavam o uso de placas não aderentes, concentrações de fibroblastos correspondentes a 1×10^3 células/poço foram distribuídas em placas de poliestireno de 96 poços aderentes, justamente por serem consideradas mais apropriadas para o cultivo dessa linhagem de células.

A técnica proposta para a avaliação da citotoxicidade da ciprofloxacina, clindamicina e metronidazol foi mensurada mediante o grau de viabilidade celular pelo método MTT. Os trabalhos de Ebisuno (1997), Wijman, Dekaban e Rieder (2005), Gürbay et al. (2002), Gürbay et al. (2007) asseguram a eficiência dessa avaliação.

O corante MTT, inicialmente solúvel em água e de coloração amarelo-fluorescente, é incorporado por células viáveis no interior de sítios enzimáticos mitocondriais e então metabolizados, adquirindo a forma de cristais de formazina, composto insolúvel e de coloração azul escura (COLLIER; PRITSOS, 2003). Esses cristais são solubilizados pelo detergente SDS, permitindo o cálculo da absorbância pela leitora ELISA em comprimento de onda de 560 nm, sabendo-se que a absorbância é diretamente proporcional à concentração celular.

Assim como Mossman (1983), verificou-se que a avaliação da toxicidade pelo corante MTT consiste em um método rápido, reprodutível, cuja interpretação não apresenta subjetividade como o método de contagem celular de exclusão pelo azul de trypan.

Cabe esclarecer que os resultados apresentados nesse experimento *in vitro* exibem a resposta biológica de uma cultura celular quando em contato com a ciprofloxacina, clindamicina ou metronidazol e, por esse motivo os efeitos citotóxicos observados devem ser interpretados com moderação e sempre em relação ao ocorrido no grupo controle.

Assim sendo, na realização da análise estatística, os dados da atividade mitocondrial obtidos pela mensuração das densidades ópticas nas placas de cultivo celular dos diferentes grupos experimentais, foram transformados em porcentagem em relação à média do grupo controle que foi considerada 100% (Apêndices A, B e

C). Desse modo, os valores obtidos demonstram a porcentagem de viabilidade celular (Tabela 5.1).

A análise da distribuição do número de células viáveis foi não normal (Apêndice D), tornando possível a comparação dos postos médios do percentual de células viáveis de cada antibiótico testado pela aplicação do teste estatístico de Kruskal-Wallis, e complementado pelo teste de Dunn adotando níveis de significância de 5%.

Em princípio foi realizada a análise com vistas à inter-relacionar as concentrações de cada grupo com os tempos experimentais, e em seguida a comparação entre as drogas estudadas.

6.3 Dos resultados obtidos

Os resultados apresentados são provenientes da relação de três diferentes antibióticos (ciprofloxacina, clindamicina e metronidazol), em quatro concentrações distintas (5, 50, 150 e 300 mg/L), avaliadas em quatro tempos experimentais (24, 48, 72 e 96 horas), em contato com a cultura de células. As informações foram apresentadas no capítulo de resultados e em tabelas presentes no apêndice, o qual possibilita a manipulação para facilitar o entendimento.

6.3.1 Discussão dos dados do controle (GI)

As células compreendidas pelo grupo controle não sofreram qualquer tipo de estímulo, sendo cultivadas apenas com o meio de cultura (DMEM). Cada uma das placas utilizadas representou um tempo experimental, portanto em cada uma encontrava-se um grupo controle com 100% de células viáveis que eram comparadas aos demais grupos.

As figuras apresentadas no capítulo RESULTADOS, como ilustração, determinavam o melhor momento de cada concentração das drogas utilizadas, que foi o tempo experimental de 72 horas.

Como pode ser analisado em cada uma das imagens da figura 5.8, é possível observar os fibroblastos em condições normais, representando o grupo controle. Em 24 horas as células apresentavam-se com formato fusiforme, núcleo central e a presença de prolongamento citoplasmático, sendo este importante na relação entre as células. Já em 48 horas é possível a observação de um maior número de células que ocupavam cerca de 70% do poço de cultivo, expressando o estado de subconfluência. Em 72 horas, as células apresentavam-se em estado de confluência. E por fim, em 96 horas, células em confluência e com sobreposição.

6.3.2 Discussão dos resultados obtidos com o cloridrato de ciprofloxacina (GII)

A relação entre as concentrações da ciprofloxacina está exposta na figura 5.1 e apêndice E. A análise estatística demonstrou as diferenças dos postos médios de células viáveis em cada concentração utilizada nos tempos experimentais.

Da interação estatística entre as concentrações de ciprofloxacina, obteve-se diferença significativa entre as concentrações de 5 mg/L x 150 mg/L, 5 mg/L x 300 mg/L e 50 mg/L x 300 mg/L no período de 24 horas; 5 mg/L x 300 mg/L no tempo experimental de 48 horas; 5 mg/L x 300 mg/L e 50 mg/L x 300 mg/L no período de 72 horas; 5 mg/L x 150 mg/L, 5 mg/L x 300 mg/L e 50 mg/L x 300 mg/L no período de 96 horas.

A partir desses dados e das médias de viabilidade celular constantes na Tabela 5.1 observa-se que as maiores concentrações determinaram um menor número de células viáveis, em relação ao controle.

Na análise dos resultados da interação estatística da mesma concentração em diferentes tempos experimentais da ciprofloxacina não foram obtidas diferenças estatisticamente significantes.

Analisando a viabilidade celular, Ebisuno et al. (1997) demonstraram que as concentrações de 50 a 800 µg/mL afetaram significativamente a proliferação celular.

Estudando a citotoxicidade em fibroblastos, Boyce, Warden e Holder (1995) encontraram resultados satisfatórios quando da ação da ciprofloxacina na concentração de 20 µg/mL (20 µg/mL = 20 mg/L), sugerindo ainda sua associação a antimicrobianos e antifúngicos.

Os experimentos publicados por Gürbay et al. (2002, 2006, 2007) constataram a citotoxicidade da ciprofloxacina quando utilizadas em concentrações acima de 50 mg/L.

Ainda, é necessário esclarecer que na dose de 300 mg/L houve presença de precipitações da medicação no fundo do frasco de células. Fato que pode justificar a saturação do meio de cultura. Ocorrência comentada por Gürbay² (2007) em comunicação pessoal, manifestando a dificuldade de solubilização desta medicação.

Observando cada uma das imagens da figura 5.9, fica clara a influência da concentração sobre as células viáveis. As imagens representativas das concentrações de 5 e 50 mg/L expõem fibroblastos de formato fusiforme, com núcleo central e típicos prolongamentos citoplasmáticos. Já a de 150 mg/L apresenta menor número de células com maior espaçamento entre elas. A concentração de 300 mg/L apresenta partículas entre as poucas células existentes, sugerindo a precipitação da medicação.

Tecendo um paralelo com os estudos relacionados com a ação antimicrobiana da ciprofloxacina, observa-se que é eficiente quando usada nas concentrações de 0,015 a 2,0 µg/mL, as quais foram capazes de atuar em microrganismos Gram-positivos, em *Streptococcus* sp., *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (FERREIRA; SUSIN, 1999).

Na tentativa de alcançar o sucesso clínico pela ação medicamentosa (SATO et al., 1993, 1996; LAGE-MARQUES; ANTONIAZZI, 2000; WINDLEY et al., 2005), estudaram concentrações mais elevadas que quando comparadas a esse experimento, as quais determinou menor número de células vivas.

² Gürbay A. [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por marinabeloti@usp.br em 08 ago. 2007

6.3.2 Discussão dos resultados obtidos com o cloridrato de clindamicina (GIII)

A relação entre as concentrações da clindamicina está exposta na figura 5.2 e apêndice F. A análise estatística demonstrou as diferenças dos postos médios de células viáveis em cada concentração utilizada nos tempos experimentais.

Da interação estatística entre as concentrações de clindamicina obteve-se diferença significativa entre as concentrações de 5 mg/L x 300 mg/L no período de 24 horas; 5 mg/L x 300 mg/L e 50 mg/L x 300 mg/L no tempo experimental de 48 horas; 5 mg/L x 150 mg/L, 5 mg/L x 300 mg/L e 50 mg/L x 300 mg/L no período de 72 horas; e por fim, 5 mg/L x 150 mg/L, 5 mg/L x 300 mg/L, 50 mg/L x 150 mg/L e 50 mg/L x 300 mg/L no período de 96 horas.

A partir desses dados e das médias de viabilidade celular constantes na Tabela 5.1 observa-se que as maiores concentrações determinaram um menor número de células viáveis, em relação ao controle.

Na análise dos resultados da interação estatística da mesma concentração em diferentes tempos experimentais da clindamicina não foram obtidas diferenças estatisticamente significantes.

Estes resultados também estão de acordo com os apresentados por Wijsman et al. (2005) no que se refere à toxicidade dose-dependente da clindamicina.

Duewelhenke, Krut e Eysel (2007) estabeleceram que a concentração que inibiu 20% das células apresentava-se no espectro entre 20 a 40 µg/mL, em 48 horas. O presente estudo contou com a morte celular de aproximadamente 40% na concentração de 50 mg/L, no mesmo período.

Observa-se com clareza nas imagens da figura 5.10, as diferenças entre os resultados das concentrações empregadas. As imagens indicativas das

concentrações de 5 e 50 mg/L expõem fibroblastos de formato fusiforme, com núcleo central e típicos prolongamentos citoplasmáticos. Já na de 150 mg/L apresenta poucas células, independentes, com formato arredondado e mínimos prolongamentos citoplasmáticos. A concentração de 300 mg/L representa a dose que inviabilizou o maior número de células dessa medicação estudada. É possível observar células aderidas, mas sem formato definido.

Molander, Reit e Dahlén (1990) utilizando a clindamicina na concentração de 150 mg encontraram efetividade sobre microrganismos anaeróbios. De acordo com o presente experimento, essa concentração mostrou-se inviável no quesito biológico.

Tecendo um paralelo com a ação antimicrobiana, os achados desse experimento estão de acordo com LeCorn et al. (2007), que avaliaram a susceptibilidade da clindamicina frente a várias espécies de *Actinomyces*. A concentração inibitória mínima para este antimicrobiano foi de 1,0 µg/mL.

6.3.3 Discussão dos resultados obtidos com o metronidazol (GIV)

A relação entre as concentrações do metronidazol está exposta na figura 5.3 e apêndice G. A análise estatística demonstrou as diferenças dos postos médios de células viáveis em cada concentração utilizada, nos tempos experimentais.

Da interação estatística entre as concentrações de metronidazol obteve-se diferença significativa entre as concentrações de 5 mg/L x 300 mg/L, 50 mg/L x 300 mg/L no período de 24 horas; 5 mg/L x 150 mg/L e 5 mg/L x 300 mg/L no tempo

experimental de 48 horas; 5 mg/L x 150 mg/L e 5 mg/L x 300 mg/L no período de 72 horas; 5 mg/L x 300 mg/L no período de 96 horas.

Na análise dos resultados da interação estatística da mesma concentração em diferentes tempos experimentais do metronidazol, não foram obtidas diferenças estatisticamente significantes.

Como passo complementar, a interpretação das imagens apresentadas pelo contato do metronidazol aos fibroblastos é apresentada na figura 5.11. Nesse grupo, em todas as imagens há presença de células fusiformes, ligeiramente arredondadas quando comparadas ao grupo controle. Além disso, nas imagens representativas das concentrações de 150 e 300 mg/L observa-se certa desordem na disposição das células, ou seja, a tendência de formação de aglomerados celulares, além da possibilidade de precipitado da medicação no fundo do frasco.

Cabe acrescentar que os dados apresentados por esta medicação devem ser interpretados com cautela, uma vez que o metronidazol encontrava-se veiculado em gel, portanto, não se trata de uma substância pura. Esse episódio justifica-se pelo fato de o metronidazol na forma pó mostrar-se insolúvel nos veículos testados (água destilada, água benzoicada e polietilenoglicol). A solubilização foi possível somente em pH próximo de 1, o que em estudo piloto influenciou a viabilidade celular.

O metronidazol na forma gel, na concentração de 10%, foi motivo de estudos envolvendo infecções anaeróbias, sendo indicado como alternativa viável como coadjuvante da medicação intracanal (CARNEIRO; DOURADO; ALVES, 2005; PANZARINI et al., 2006; SIQUEIRA Jr; UZEDA, 1997).

Esse antibiótico foi estudado por Carreira et al., (2007), como medicação intracanal alternativa para casos resistentes à terapêutica. Os autores obtiveram

resultados satisfatórios quando da associação com a ciprofloxacina em concentrações de 4 µg/mL.

6.3.3 Discussão dos resultados obtidos pela interação dos grupos experimentais

A comparação entre as medicações empregadas e suas concentrações podem ser observadas nas figuras 5.4 a 5.7 e apêndices H, I, J e K.

Em 24 horas de contato com os fibroblastos, a ciprofloxacina na concentração de 150 mg/L apresentou diferença estatisticamente significativa quando defrontada com o metronidazol na concentração de 150 mg/L.

No tempo experimental de 48 horas, a ciprofloxacina, nas concentrações de 150 mg/L e 300 mg/L, apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparadas ao metronidazol, nas concentrações de 150 mg/L e 300 mg/L, respectivamente. A clindamicina na concentração de 300 mg/L também apresentou diferença estatística quando comparada com o metronidazol na concentração de 300 mg/L.

Já em 72 horas, a ciprofloxacina nas concentrações de 5 mg/L, 50 mg/L e 150 mg/L apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparadas com a clindamicina nas mesmas concentrações. Da mesma forma, a ciprofloxacina nas concentrações de 5 mg/L, 150 mg/L e 300 mg/L apresentaram significância estatística quando comparadas ao metronidazol nas mesmas concentrações. Da interação clindamicina e metronidazol não foram obtidas diferenças significantes.

E por fim, em 96 horas obteve-se diferença estatística quando da relação de ciprofloxacina 50 mg/L com a clindamicina na mesma concentração. Também foi

possível observar relevância estatística da ciprofloxacina nas concentrações de 50 mg/L, 150 mg/L e 300 mg/L com o metronidazol nas mesmas concentrações. As concentrações de 150 mg/L e 300 mg/L da clindamicina também apresentaram significância estatística quando comparadas ao metronidazol nas mesmas concentrações.

Os resultados obtidos pelo emprego dessa metodologia podem incentivar novos estudos com vistas ao emprego das medicações aqui utilizadas. Julga-se importante identificar estes achados como agentes desencadeadores de uma análise crítica para o emprego de novas drogas na fase da medicação intracanal.

Assim a contribuição ao estudo se faz na medida em que discussões se estabeleçam, empregando esta e outras linhas de pesquisa com a missão de aprimorar ainda mais os resultados de sucesso da terapia endodôntica.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos pela aplicação do modelo experimental permitiu concluir que:

7.1 da citotoxicidade

- Todos os antibióticos testados, cloridrato de ciprofloxacina, cloridrato de clindamicina e metronidazol apresentaram citotoxicidade dose-dependente.

7.2 dos tempos experimentais

- Independente do antibiótico avaliado, a viabilidade celular em 24 horas foi mais elevada em comparação com os demais tempos experimentais.

7.3 das concentrações

- As concentrações de 5 e 50 mg/L de todos os antibióticos permitiram a viabilidade dos fibroblastos em todos os tempos avaliados.

7.4 das interações

- A comparação entre os antibióticos nas mesmas concentrações em diferentes tempos experimentais mostrou que o gel de metronidazol apresentou menor citotoxicidade em 72 e 96 horas no confronto com os dois outros antibióticos, enquanto o cloridrato de clindamicina proporcionou maior viabilidade celular em relação ao cloridrato de ciprofloxacina no tempo experimental de 72 horas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

Abbou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J* 1998;31(1):39-47.

Ando N, Hoshino E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentine. *Int Endod J* 1990;23(1):20-7.

Andrade ED. Terapêutica medicamentosa em odontologia. São Paulo: Artes Médicas; 2002.

Baker PJ, Evans RT, Slots J. Antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria from the human oral cavity. *J Dent Res* 1985;64:1233-44.

Barnett F, Axelrod P, Tronstad L, Slots J, Graziani A, Talbot G. Ciprofloxacin treatment of periapical *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Endod Dent Traumatol* 1988;4:132-37.

Baumgartner JC, Xia T. Antibiotic susceptibility of bacteria associated with endodontic abscesses. *J Endod* 2003;29(1):44-7.

Boyce ST, Warden GD, Holder IA. Noncytotoxic combinations of topical antimicrobials agents for use with cultured skin substitutes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(6):1324-27.

Browne RM, Tyas MJ. Biological testing of dental restorative materials in vitro – a review. *J Oral Rehabil* 1979;6(4):365-74.

Cainelli G. Glycosyl-beta-lactams: new antibacterial agents against resistant strains. Design, synthesis and evaluation of in vitro activity. 2007. Disponível em URL: http://www.ricercaitaliana.it/prin/dettaglio_prin-2004038004.htm

Carneiro SMBS, Dourado, AT, Alves DF. Uso do metronidazol como medicação intracanal em dentes com necrose pulpar e reação periapical – Relato de caso. *Rev Odonto Ciênc* 2005;20(47):78-82.

¹ De acordo com estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Carreira CM, Santo, SSF, Jorge AOC, Lage-Marques JL. Antimicrobial effect of intracanal substances. *J Appl Oral Sci* 2007;15(5):453-8.

Chambers HF. Antimicrobianos: considerações gerais. In: Goodman LS, Gilman A. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 11^a. ed. McGraw-Hill; 2006. Cap 8, p.859-1011.

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

Collier AC, Pritsos CA. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. *Bioch Pharm* 2003;66:281-7.

Dajani AS, Taubert KA, Wilson W, Borlger AF, Bayer A, Ferreiri P et al. Prevention of bacterial endocarditis: Recommendations by the American Heart Association. *Circulation* 1997;96:358-66.

Duewelhenke N, Krut O, Eysel P. Influence on mitochondria and cytotoxicity of different antibiotics administered in high concentrations on primary human osteoblasts and cell lines. *Antimicrob Agents Chemot* 2007;51(1):54-63.

Ebisuno S, Inagaki T, Kohjimoto Y, Ohkawama T. The citotoxic effects of fleroxacin and ciprofloxacin on transitional cell carcinoma in vitro. *Cancer* 1997;80(12):2263-67.

Edwards DI. Metronidazole. In: Hahn FE. *Modes and mechanisms of microbial growth inhibition*. Antibiotics. New York: Spring; 1983.

Engstron B, Spangberg L. Studies on root canal medicaments: cytotoxic effect of root canal antiseptics. *Acta Odontol Scand* 1966;25(45):77-82.

Fabricius L, Dahlén G, Holm SE, Möller AJR. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* 1982;90(3):200-6.

Feres Filho EJ, Chevitarese O, Zebral AA, Villoria GE. Desenvolvimento de um dispositivo de liberação prolongada contendo metronidazol para terapia periodontal tópica (nota prévia). *Rev Bras Odontol* 1990;47(2):44-5.

Ferreira MBC, Susin C. Anaerobicidas In: Wannmacher L, Ferreira MBC. Farmacologia clínica para dentistas. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. cap. 29, p.200-08.

Fleit SA, Fleit HB, Zolla-Pazner S. Culture and recovery of macrophages and cell lines from tissue culture-treated and untreated plastic dishes. J Immunol Methods 1984; 68(1-2):119-29.

Freshney RI. Cytotoxicity. In: Culture of animal cells: a manual of basic technique. 4th. ed. Indianápolis: Willy-Liss; 2000. cap. 21, p.329-44.

Gilad JZ, Teles R, Goodson M, White RR, Stashenko P. Development of a clindamicyn-impregnated fiber as an intracanal medication in endodontic therapy. J Endod 1999;25(11):722-27.

Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. Int Endod J 1996;29(2):69-75.

Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. Int Endod J 1996; 29:235-41.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. Oral Microbiol Immunol 2004;19(2):71-6.

Goodson JM. Antimicrobial strategies for treatment of periodontal diseases. Periodontol 2000 1994;64:1-12.

Gootz TD, Brighty KE. Fluoroquinolone antibacterials: SAR, mechanism of action, resistance, and clinical aspects. Med Res Rev 1996;16:433-86.

Gürbay A, Garrel C, Osman M, Richard MJ, Favier A, Hincal F. Cytotoxicity in ciprofloxacin-treated human fibroblast cells and protection by vitamin E. Human & Experim Toxicol 2002;21:635-41.

Gürbay A, Gonthier B, Signorini-Allice N, Barret L, Favier A, Hincal F. Ciprofloxacin-induced DNA damage in primary culture of rat astrocytes and protection by Vitamin E. Neurotoxicology 2006;27:6-10.

Gürbay A, Gonthier B, Barret L, Favier A, Hincal F. Cytotoxic effect of ciprofloxacin in primary culture of rats and protection by Vitamin E. *Toxicology* 2007;229:54-61.

Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mat* 1996;12(3):186-93.

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

Hyakuna K, Yamamuro t, Kotoura Y, Kakutani Y, Kitsugi T, Takagi H et al. The influence of calcium phosphate ceramics and glass-ceramics on cultured cells and their surrounding media. *J Biomed Mater Res* 1989;23(9):1049-66.

Hoshino E, Iwaku M, Sato M, Ando N, Kota K. Bactericidal efficacy of metronidazole against bacteria of human carious dentin in vivo. *Caries Res* 1989;23:78-80.

Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J* 1996;29(2):125-30.

International Standard Organization. ISO 10993: 1-6. Biological evaluation of medical and dental materials and devices; 1992.

Takehashi S, Staley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.

Katzung BG. *Farmacologia: básica & clínica*. 8. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro; 2003.

Lage-Marques JLS, Antoniazzi JH. Quando a medicação é fundamental para o sucesso da terapia endodôntica. In: Gorab R, Gonçalves EAN. (Organizadores). *Atualização na clínica odontológica*. São Paulo: Artes Médicas; 2000. v. 1, p. 59-89.

Law A, Messer H. An evidence-based analysis of the antibacterial effectiveness of intracanal medicaments. *J Endod* 2004;30(10):689-93.

LeCorn DW, Vertucci F, Rojas MF, Progulsk-Fox A, Bélanger M. In vitro activity of amoxicillin, clindamycin, doxycycline, metronidazole, and moxifloxacin against oral *actinomyces*. J Endod 2007;33(5):557-60.

Lima KC, Fava LRG, Siqueira Jr JF. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* Biofilms to Some Antimicrobial Medications. J Endod 2001;27(10):616-9.

Lin S, Levin L, Peled M, Weiss EI, Fuss Z. Reduction of viable bacteria in dentinal tubules treated with clindamycin or tetracycline. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003;96:751-6.

Macrolidos, Cloramfenicol, Clindamicina y Tetraciclinas; 2007. Disponível em URL: <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c741.htm>.

Miller WD. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. Dent Cosmos 1894;36(7):505-28.

Mitchell DA. Topical metronidazole: Its use in clinical dentistry. J Clin Periodontol 1984;11:145-58.

Molander A, Reit C, Dahlén G. Microbiological evaluation of clindamycin as a dressing in teeth with apical periodontitis. Int Endod J 1990;23(2):113-18.

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

Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. J Immunol Methods 1983;65:55-63.

Nair PNR. Light and electron microscope studies of root canal flora and periapical lesions. J Endod 1987;13(1):29-39.

Panzarini SR, Souza V, Holland R, Dezan Júnior E. Association of calcium hydroxide and metronidazole in the treatment of dogs teeth with chronic periapical lesion. J Appl Oral Sci 2006;14(5):334-40.

Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in Lithuanian population. J Endod 2000;26(10):593-5.

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

Pol WR, Carvalho PSR, Andrade, ED. Nova pasta para tratamento da alveolite. *RGO* 1999;47(2):102-9.

Rôças IN, Jung II-Y, Lee OY, Siqueira JF. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean Population. *J Endod* 2004;30(7):504-8.

Sader H. Quinolonas: avanços e conquistas clinicamente relevantes. *J Quinolonas* 1999;1-7.

Sanjiwan R, Chandra S, Jaiswal JN. The effect of metronidazole on the anaerobic microorganisms of the root canal – a clinical study. *Fed Oper Dent* 1990;1(2):30-6.

Sato T, Hoshino E, Uematsu H, Noda T. *In vitro* antimicrobial susceptibility to combinations of drugs of bacteria from carious and endodontic lesions of human deciduous teeth. *Oral Microbiol Immunol* 1993;8:172-6.

Sato I, Ando-Kurihara N, Kota K, Iwaku M, Hoshino E. Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minicycline in situ. *Int Endod J* 1996;29(2):118-24.

Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials – advantages and limitations. *J Dent* 1994;2 Supl:S6-S11.

Sendzik J, Shakibaei M, Schäfer-Korting M, Stahlmann R. Fluoroquinolones cause changes in extracellular matrix, signalling proteins, metalloproteinases and caspase-3 in cultured human tendon cells. *Toxicology* 2005;212:24-36.

Shinn DLS. Metronidazole in acute ulcerative gingivitis [letter to the editor]. *Lancet* 1962;1:1191.

Shovelton DS. The presence and distribution of micro-organisms within nonvital teeth. *Br Dent J* 1964;17(3):101-7.

Siqueira Jr JF, Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antimicrobial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endod* 1997;23(3):167-9.

Spangberg L. Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 1973;35:389-401.

Stuart KG, Miller CH, Brown CE Jr, Newton CW. The comparative antimicrobial effect of calcium hydroxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;72(1):101-4.

Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992a;7(5):257-62.

Sundqvist G. Ecology of root canal flora. *J Endod* 1992b;18(9):427-30.

Sydney GB. Identificação da microflora endodôntica após o preparo do canal radicular de dentes portadores de periodontite apical assintomática e o emprego de medicação de hidróxido de cálcio em diferentes tempos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1996.

Thilo BE, Baehni P, Holz J. Dark-field observation of the bacterial distribution in root canals following pulp necrosis. *J Endod* 1986;12(5):202-5.

Torneck CD. Reaction of hamster tissue to drug used in sterilization of the root canal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1961;14:730-47.

Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endod Dent Traumatol* 1990;6(3):129-36.

Vander Wall GL, Dowson J, Shipman Jr C. Antibacterial efficacy and cytotoxicity of three endodontic drugs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972;33(2):231-41.

Walker CB, Karpina K, Baehni P. Chemotherapeutics: antibiotics and other antimicrobials. *Periodontol* 2000 2004;36:146-65.

Waltimo TMT, Siren EK, Torkko HLK, Olsen I, Haapasalo MPP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J* 1997;30:96-101.

Wijsman JA, Dekaban GA, Rieder MJ. Differential toxicity of reactive metabolites of clindamycin and sulfonamides in HIV-infected cells: influence of HIV infection on clindamycin toxicity in vitro. *J Clin Pharmacol* 2005;45:346-51.

Windley W, Teixeira F, Levin L, Sigurdsson A, Trope M. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endod* 2005;31(6):439-43.

Wu KU, Moorer WR, Wesselink PR. Capacity of anaerobic enclosed in a simulated root canal induce inflammation. *Int Endod J* 1989;22(6):269-77.

APÊNDICES

Apêndice A- Valores originais da contagem das células viáveis e sua conversão em porcentagem (%) em relação ao controle segundo a concentração e tempo experimental da Ciprofloxacina

Valores originais – 24 horas

Controle	5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
0,251	0,198	0,161	0,079	0,068
0,259	0,218	0,185	0,107	0,077
0,272	0,209	0,167	0,108	0,077
0,254	0,194	0,164	0,099	0,072
0,269	0,216	0,175	0,104	0,069
0,282	0,210	0,172	0,105	0,071
0,252	0,193	0,154	0,089	0,070
0,259	0,217	0,165	0,102	0,074
0,272	0,217	0,170	0,106	0,072

Dados percentuais – 24 horas

5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
78,88	64,14	31,47	27,09
78,14	66,31	38,35	27,6
78,84	61,4	39,71	28,31
76,38	64,57	38,98	28,35
80,3	65,06	38,66	25,65
74,47	60,99	37,23	25,18
76,59	61,11	35,32	27,78
83,78	63,71	39,38	28,57
80,15	62,5	38,97	26,47
média	78,61	63,31	37,56

Valores originais – 48 horas

Controle	5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
0,827	0,414	0,215	0,209	0,074
0,729	0,396	0,304	0,215	0,073
0,726	0,460	0,284	0,195	0,068
0,825	0,412	0,212	0,201	0,072
0,719	0,398	0,300	0,215	0,070
0,736	0,459	0,279	0,189	0,074
0,823	0,410	0,210	0,200	0,070
0,717	0,395	0,304	0,218	0,071
0,735	0,458	0,278	0,188	0,072

Dados percentuais – 48 horas

5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
50,06	25,99	25,27	8,95
54,32	41,7	29,49	10,01
63,36	39,11	26,86	9,36
49,94	25,69	24,36	8,72
55,35	41,72	29,9	9,73
62,36	37,9	25,67	10,05
49,81	25,51	24,3	8,5
55,09	42,4	30,4	9,09
62,31	37,82	25,58	9,79
média	55,84	35,32	9,36

Valores originais – 72 horas

Controle	5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
1,200	0,971	0,597	0,410	0,204
1,210	1,040	0,613	0,373	0,204
1,220	1,020	0,653	0,430	0,211
1,207	0,970	0,594	0,420	0,208
1,215	1,041	0,612	0,363	0,200
1,210	1,025	0,650	0,434	0,212
1,208	0,971	0,593	0,419	0,209
1,205	1,042	0,611	0,353	0,202
1,209	1,042	0,660	0,433	0,211

Dados percentuais – 72 horas

5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
80,91	49,75	34,16	17
85,95	50,66	30,82	16,86
83,6	53,52	35,24	17,29
80,36	49,21	34,8	17,23
85,68	50,37	29,87	16,46
84,71	53,71	35,87	17,52
80,38	49,09	34,68	17,3
86,47	50,7	29,29	16,76
86,18	54,59	35,81	17,45
média	83,80	51,29	17,10

Valores originais – 96 horas

Controle	5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
1,745	1,247	0,891	0,515	0,192
1,703	1,138	0,994	0,452	0,184
1,741	1,250	0,864	0,572	0,189
1,735	1,245	0,890	0,514	0,182
1,713	1,139	0,993	0,453	0,194
1,751	1,251	0,866	0,562	0,183
1,730	1,244	0,892	0,524	0,180
1,712	1,138	0,994	0,453	0,195
1,754	1,241	0,876	0,561	0,182

Dados percentuais – 96 horas

5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
71,46	49,34	29,51	11
66,82	58,36	26,54	10,8
71,8	49,62	32,85	10,85
71,75	51,29	29,62	10,49
66,49	59,97	26,44	11,32
71,44	49,46	30,09	10,45
71,9	51,56	30,29	10,4
66,47	58,06	26,46	11,39
70,75	49,94	31,98	10,37
média	69,88	53,07	10,79

Apêndice B- Valores originais da contagem das células viáveis e sua conversão em porcentagem (%) em relação ao controle segundo a concentração e tempo experimental da Clindamicina

Valores originais – 24 horas

Controle	5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
0,251	0,196	0,171	0,124	0,040
0,259	0,187	0,175	0,114	0,041
0,272	0,173	0,166	0,118	0,040
0,254	0,194	0,172	0,128	0,050
0,269	0,183	0,178	0,115	0,048
0,282	0,178	0,169	0,119	0,030
0,252	0,193	0,170	0,127	0,040
0,259	0,173	0,175	0,112	0,042
0,272	0,179	0,179	0,118	0,040

Dados percentuais – 24 horas

Dados percentuais - 24 horas				
	5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
	78,08	68,12	49,4	15,93
	72,2	67,57	44,01	15,83
	63,6	61,02	43,38	14,7
	76,37	67,71	50,39	19,68
	68,03	66,17	42,75	17,84
	63,12	56,92	41,19	10,63
	76,58	67,46	50,39	15,87
	66,79	67,57	43,24	16,21
	65,8	65,8	43,38	14,7
média	70,06	65,37	45,35	15,71

Valores originais – 48 horas

Controle	5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
0,827	0,488	0,447	0,271	0,057
0,729	0,509	0,442	0,267	0,038
0,726	0,506	0,453	0,282	0,031
0,825	0,489	0,445	0,261	0,067
0,719	0,503	0,432	0,277	0,048
0,736	0,509	0,463	0,280	0,032
0,823	0,486	0,444	0,268	0,057
0,717	0,505	0,430	0,278	0,044
0,735	0,508	0,461	0,274	0,031

Dados percentuais – 48 horas

Dados percentuais – 48 horas				
	5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
	59	54,05	32,77	6,9
	69,82	60,63	36,62	5,21
	69,69	62,39	39,25	4,27
	59,27	53,94	31,63	8,12
	69,95	60,08	38,52	6,67
	69,15	62,91	38,04	4,35
	59,05	53,95	32,56	6,92
	70,43	59,97	38,77	6,13
	69,11	62,72	37,28	4,21
média	66,16	58,96	36,16	5,86

Valores originais – 72 horas

Controle	5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
1,200	0,969	0,856	0,500	0,172
1,210	0,916	0,900	0,533	0,159
1,220	0,919	0,856	0,509	0,167
1,207	0,968	0,846	0,502	0,182
1,215	0,915	0,910	0,539	0,158
1,210	0,929	0,859	0,504	0,162
1,208	0,967	0,839	0,522	0,180
1,205	0,912	0,911	0,530	0,157
1,209	0,920	0,869	0,514	0,160

Dados percentuais – 72 horas

Dados percentuais 12 horas				
	5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
	80,75	71,33	41,6	14,33
	75,7	74,38	44,05	13,14
	75,32	70,16	41,72	13,69
	80,2	70,09	41,59	15,79
	75,3	74,9	44,36	13
	76,77	71	41,65	13,38
	80,05	69,45	43,21	14,9
	75,68	75,6	43,98	13,02
	76,09	71,87	42,51	13,23
média	77,32	72,09	42,74	13,83

Valores originais – 96 horas

Controle	5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
1,745	1,394	1,245	0,585	0,017
1,703	1,477	1,267	0,484	0,012
1,741	1,373	1,190	0,531	0,015
1,735	1,392	1,255	0,582	0,014
1,713	1,479	1,257	0,488	0,019
1,751	1,370	1,192	0,530	0,010
1,730	1,390	1,252	0,581	0,013
1,712	1,459	1,258	0,458	0,018
1,754	1,390	1,194	0,520	0,012

Dados percentuais – 96 horas

Dados percentuais - 60 horas				
	5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
	79,88	71,34	33,52	0,97
	86,72	74,4	28,42	0,7
	78,86	68,35	30,5	0,86
	80,23	72,33	33,54	0,8
	86,33	73,38	28,25	1,11
	78,24	68,07	30,27	0,57
	80,35	72,37	33,58	0,75
	85,22	73,48	26,75	1,05
	79,25	68,07	29,64	0,68
média	81,68	71,31	30,50	0,83

Apêndice C- Valores originais da contagem das células viáveis e sua conversão em porcentagem (%) em relação ao controle segundo a concentração e tempo experimental do Metronidazol

Valores originais – 24 horas

Controle	5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
0,251	0,172	0,172	0,164	0,158
0,259	0,210	0,183	0,174	0,140
0,272	0,191	0,183	0,158	0,140
0,254	0,171	0,173	0,163	0,158
0,269	0,212	0,182	0,178	0,130
0,282	0,181	0,187	0,159	0,125
0,252	0,161	0,174	0,162	0,140
0,259	0,213	0,172	0,158	0,133
0,272	0,171	0,185	0,169	0,128

Dados percentuais – 24 horas

Dados percentuais - 2ª flor				
	5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
	68,52	68,52	65,33	62,94
	81,08	70,65	67,18	54,05
	70,22	67,27	58,08	51,47
	67,32	68,11	64,17	62,2
	78,81	67,65	66,17	48,32
	64,18	66,31	56,38	44,32
	63,88	69,04	64,28	58,73
	82,23	66,4	61	51,35
	62,86	68,01	62,13	47,06
média	71,01	68,00	62,75	53,38

Valores originais – 48 horas

Controle	5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
0,827	0,560	0,470	0,415	0,425
0,729	0,458	0,481	0,446	0,420
0,726	0,519	0,458	0,452	0,408
0,825	0,570	0,460	0,425	0,423
0,719	0,459	0,471	0,436	0,427
0,736	0,529	0,460	0,425	0,402
0,823	0,574	0,462	0,429	0,421
0,717	0,455	0,451	0,426	0,426
0,735	0,539	0,465	0,424	0,400

Dados percentuais – 48 horas

Dados percentuais - 48 horas				
5mg/L		50mg/L	150mg/L	300mg/L
67,71		56,83	50,18	51,39
62,82		65,98	61,18	57,61
71,48		63,08	62,26	56,2
69,09		55,75	51,51	51,27
63,84		65,5	60,64	59,39
71,87		62,5	57,74	54,62
69,74		56,13	52,12	51,15
63,46		62,9	59,41	59,41
73,33		63,26	57,69	54,42
média	68,15	61,33	56,97	55,05

Valores originais – 72 horas

Controle	5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
1,200	0,873	0,810	0,692	0,640
1,210	0,854	0,767	0,683	0,690
1,220	0,861	0,715	0,680	0,607
1,207	0,872	0,820	0,699	0,630
1,215	0,857	0,757	0,673	0,691
1,210	0,860	0,711	0,682	0,608
1,208	0,871	0,820	0,670	0,631
1,205	0,855	0,751	0,683	0,692
1,209	0,862	0,712	0,672	0,607

Dados percentuais – 72 horas

Dados pessoais - 12.10.14				
	5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
	72,75	67,5	57,66	53,33
	70,58	62,56	56,44	57,02
	70,57	58,6	55,73	49,75
	72,24	67,94	57,66	52,19
	70,53	62,3	55,39	56,87
	71,07	58,76	56,36	50,25
	72,1	67,88	55,46	52,23
	70,95	62,32	56,68	57,42
	71,29	58,89	55,58	50,2
média	71,34	62,97	56,33	53,25

Valores originais – 96 horas

Controle	5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
1,745	1,384	1,204	1,170	0,931
1,703	1,199	1,183	1,091	1,011
1,741	1,220	0,150	0,995	1,049
1,735	1,383	1,207	1,171	0,930
1,713	1,180	1,119	1,114	1,081
1,751	1,230	1,152	1,022	1,009
1,730	1,380	1,205	1,170	0,932
1,712	1,318	1,182	1,016	1,002
1,754	1,232	1,150	1,053	1,048

Dados percentuais – 96 horas

Dados percentuais de flores				
	5mg/L	50mg/L	150mg/L	300mg/L
	79,31	68,7	67,05	53,35
	70,4	69,46	64,06	59,36
	70,07	66,05	57,15	60,25
	79,71	69,56	67,49	53,6
	68,88	65,32	65,03	63,1
	70,24	65,79	58,36	57,11
	79,76	69,65	67,63	53,87
	76,98	69,04	59,34	58,52
	70,23	65,56	60,03	59,75
média	73.95	67.68	62.90	57.66

Apêndice D - Teste de normalidade das amostras experimentais de células viáveis após a utilização de antibióticos em diversas concentrações e tempos experimentais

	- 1 - cipro 5-24	- 2 - cipro 50-24	- 3 - cipro 150-24	- 4 - cipro 300-24	- 5 - cipro 5-48	- 6 - cipro 50-48
Tamanho da amostra =	9	9	9	9	9	9
Desvio máximo =	0,1554	0,1753	0,2836	0,1769	0,2103	0,2996
Valor crítico (0,05) =	0,271	0,271	0,271	0,271	0,271	0,271
p(valor)	ns	ns	< 0,05	ns	ns	< 0,05

	- 7 - cipro 150-48	- 8 - cipro 300-48	- 9 - cipro 5-72	- 10 - cipro 50-72	- 11 - cipro 150-72	- 12 - cipro 300-72
Tamanho da amostra =	9	9	9	9	9	9
Desvio máximo =	0,2451	0,1884	0,2099	0,2778	0,2812	0,2036
Valor crítico (0,05) =	0,271	0,271	0,271	0,271	0,271	0,271
p(valor)	ns	ns	ns	< 0,05	< 0,05	ns

	- 13 - cipro 5-96	- 14 - cipro 50-96	- 15 - cipro 150-96	- 16 - cipro 300-96	- 17 - clinda 5-24	- 18 - clinda 50-24
Tamanho da amostra =	9	9	9	9	9	9
Desvio máximo =	0,3042	0,3008	0,2108	0,2196	0,1927	0,3222
Valor crítico (0,05) =	0,271	0,271	0,271	0,271	0,271	0,271
p(valor)	< 0,05	< 0,05	ns	ns	ns	< 0,01

	- 19 - clinda 150-24	- 20 - clinda 300-24	- 21 - clinda 5-48	- 22 - clinda 50-48	- 23 - clinda 150-48	- 24 - clinda 300-48
Tamanho da amostra =	9	9	9	9	9	9
Desvio máximo =	0,3105	0,2297	0,3773	0,2691	0,2276	0,1913
Valor crítico (0,05) =	0,271	0,271	0,271	0,271	0,271	0,271
p(valor)	< 0,05	ns	< 0,01	ns	ns	ns

	- 25 - clinda 5-72	- 26 - clinda 50-72	- 27 - clinda 150-72	- 28 - clinda 300-72	- 29 - clinda 5-96	- 30 - clinda 50-96
Tamanho da amostra =	9	9	9	9	9	9
Desvio máximo =	0,2604	0,2043	0,2525	0,2334	0,3184	0,214
Valor crítico (0,05) =	0,271	0,271	0,271	0,271	0,271	0,271
p(valor)	ns	ns	ns	ns	< 0,01	ns

	- 31 - clinda 150-96	- 32 - clinda 300-96	- 33 - metro 5-24	- 34 - metro 50-24	- 35 - metro 150-24	- 36 - metro 300-24
Tamanho da amostra =	9	9	9	9	9	9
Desvio máximo =	0,2153	0,1263	0,2077	0,1327	0,2062	0,1687
Valor crítico (0,05) =	0,271	0,271	0,271	0,271	0,271	0,271
p(valor)	ns	ns	ns	ns	ns	ns

	- 37 - metro 5-48	- 38 - metro 50-48	- 39 - metro 150-48	- 40 - metro 300-48	- 41 - metro 5-72	- 42 - metro 50-72
Tamanho da amostra =	9	9	9	9	9	9
Desvio máximo =	0,1961	0,2821	0,2295	0,1969	0,1919	0,2084
Valor crítico (0,05) =	0,271	0,271	0,271	0,271	0,271	0,271
p(valor)	ns	< 0,05	ns	ns	ns	ns

	- 43 - metro 150-72	- 44 - metro 300-72	- 45 - metro 5-96	- 46 - metro 50-96	- 47 - metro 150-96	- 48 - metro 300-96
Tamanho da amostra =	9	9	9	9	9	9
Desvio máximo =	0,1957	0,211	0,3251	0,2569	0,1976	0,1987
Valor crítico (0,05) =	0,271	0,271	0,271	0,271	0,271	0,271
p(valor)	ns	ns	< 0,01	ns	ns	ns

Apêndice E – Teste de Dunn com nível de significância de $p \leq 5\%$ para o valor Z calculado das diferenças dos postos médios de células viáveis com a utilização de Ciprofloxacina segundo as concentrações mg/L e tempos experimentais em horas (Dunn crítico $_{5\%} = 3,13$)

H o r a s	Horas	24			48				72				96			
	mg/L (%)	50	150	300	5	50	150	300	5	50	150	300	5	50	150	300
2 4	5	1,03	3,21	4,60	1,69	-	-	-	1,70	-	-	-	0,46	-	-	-
	50	-	2,18	3,57	-	2,61	-	-	-	2,61	-	-	-	0,97	-	-
	150	-	-	1,39	-	-	1,60	-	-	-	1,60	-	-	-	,091	-
	300	-	-	-	-	-	-	2,04	-	-	-	2,04	-	-	-	1,35
4 8	5	-	-	-	-	1,95	3,12	4,95	0	-	-	-	1,23	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	1,17	2,99	-	0	-	-	-	1,64	-	-
	150	-	-	-	-	-	-	1,83	-	-	0	-	-	-	0,69	-
	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	0,69
7 2	5	-	-	-	-	-	-	-	-	1,95	3,12	4,95	1,23	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,17	2,99	-	1,64	-	-
	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,83	-	-	0,69	-
	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,69
9 6	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,54	3,66	5,49
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,12	3,95
	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,83

■ Não significante

Apêndice F – Teste de Dunn com nível de significância de $p \leq 5\%$ para o valor Z calculado das diferenças dos postos médios de células viáveis com a utilização de Clindamicina segundo as concentrações mg/L e tempos experimentais em horas (Dunn crítico $_{5\%} = 3,13$)

H o r a s	Horas	24			48				72				96			
	mg/L (%)	50	150	300	5	50	150	300	5	50	150	300	5	50	150	300
24	5	0,80	2,10	3,87	0,52	-	-	-	1,22	-	-	-	1,62	-	-	-
	50	-	1,30	3,07	-	0,55	-	-	-	1,17	-	-	-	1,04	-	-
	150	-	-	1,77	-	-	0,83	-	-	-	0,19	-	-	-	1,19	-
	300	-	-	-	-	-	-	0,84	-	-	-	0,31	-	-	-	1,30
48	5	-	-	-	-	0,83	2,41	4,20	1,74	-	-	-	2,14	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	1,58	3,35	-	1,72	-	-	-	1,59	-	-
	150	-	-	-	-	-	-	1,78	-	-	0,64	-	-	-	0,36	-
	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,53	-	-	-	0,46
72	5	-	-	-	-	-	-	-	-	0,85	3,50	5,39	0,40	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,66	4,54	-	0,13	-	-
	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,89	-	-	1,00	-
	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,99
96	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,38	4,90	6,79
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,53	5,41
	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,88

■ Não significante

Apêndice G – Teste de Dunn com nível de significância de $p \leq 5\%$ para o valor Z calculado das diferenças dos postos médios de células viáveis com a utilização de Metronidazol segundo as concentrações mg/L e tempos experimentais em horas (Dunn crítico $_{5\%} = 3,13$)

H o r a s	Horas	24			48				72				96			
	mg/L (%)	50	150	300	5	50	150	300	5	50	150	300	5	50	150	300
24	5	0,19	1,94	4,25	0,13	-	-	-	1,03	-	-	-	0,97	-	-	-
	50	-	1,75	4,06	-	2,21	-	-	-	1,62	-	-	-	0,13	-	-
	150	-	-	2,31	-	-	1,58	-	-	-	2,05	-	-	-	0,08	-
	300	-	-	-	-	-	-	0,10	-	-	-	0,34	-	-	-	0,86
48	5	-	-	-	-	2,28	3,39	4,03	1,16	-	-	-	2,14	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	1,12	1,75	-	0,59	-	-	-	1,59	-	-
	150	-	-	-	-	-	-	0,63	-	-	0,47	-	-	-	0,36	-
	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,44	-	-	-	0,46
72	5	-	-	-	-	-	-	-	-	2,85	5,02	5,62	0,06	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,77	2,17	-	1,49	-	-
	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,60	-	-	2,13	-
	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,20
96	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,30	2,83	4,35
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,52	3,06
	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,53

■ Não significante

Apêndice H - Teste de Dunn com nível de significância de $p \leq 5\%$ para o valor Z calculado das diferenças dos postos médios de células viáveis com a utilização dos antibióticos segundo as concentrações mg/L no tempo experimental de 24 horas (Dunn crítico_{5%} = 3,13)

Antibióticos		Clindamicina				Metronidazol			
	mg/L	5	50	150	300	5	50	150	300
ciprofloxacina	5	2,55	-	-	-	2,29	-	-	-
	50	-	0,84	-	-	-	1,83	-	-
	150	-	-	1,29	-	-	-	3,45	-
	300	-	-	-	0,74	-	-	-	1,33
clindamicina	5	-	-	-	-	0,26	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	1,00	-	-
	150	-	-	-	-	-	-	2,15	-
	300	-	-	-	-	-	-	-	2,08

■ Não significante

Apêndice I - Teste de Dunn com nível de significância de $p \leq 5\%$ para o valor Z calculado das diferenças dos postos médios de células viáveis com a utilização dos antibióticos segundo as concentrações mg/L no tempo experimental de 48 horas (Dunn crítico_{5%} = 3,13)

Antibióticos		Clindamicina				Metronidazol			
	mg/L	5	50	150	300	5	50	150	300
ciprofloxacina	5	1,60	-	-	-	2,20	-	-	-
	50	-	1,96	-	-	-	2,54	-	-
	150	-	-	2,00	-	-	-	4,95	-
	300	-	-	-	0,91	-	-	-	4,30
		-	-	-	-	-	-	-	-
clindamicina	5	-	-	-	-	1,11	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	0,58	-	-
	150	-	-	-	-	-	-	2,95	-
	300	-	-	-	-	-	-	-	5,22
		-	-	-	-	-	-	-	-

■ Não significante

Apêndice J—Teste de Dunn com nível de significância de $p \leq 5\%$ para o valor Z calculado das diferenças dos postos médios de células viáveis com a utilização dos antibióticos segundo as concentrações mg/L no tempo experimental de 72 horas (Dunn crítico_{5%} = 3,13)

Antibióticos		Clindamicina				Metronidazol			
	mg/L	5	50	150	300	5	50	150	300
ciprofloxacina	5	4,93	-	-	-	3,45	-	-	-
	50	-	6,08	-	-	-	2,94	-	-
	150	-	-	3,29	-	-	-	4,59	-
	300	-	-	-	1,62	-	-	-	3,95
		-	-	-	-	-	-	-	-
clindamicina	5	-	-	-	-	1,59	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	3,15	-	-
	150	-	-	-	-	-	-	1,29	-
	300	-	-	-	-	-	-	-	2,33
		-	-	-	-	-	-	-	-

■ Não significativa

Apêndice K - Teste de Dunn com nível de significância de $p \leq 5\%$ para o valor Z calculado das diferenças dos postos médios de células viáveis com a utilização dos antibióticos segundo as concentrações mg/L no tempo experimental de 96 horas (Dunn crítico_{5%} = 3,13)

Antibióticos		Clindamicina				Metronidazol			
	mg/L	5	50	150	300	5	50	150	300
ciprofloxacina	5	3,12	-	-	-	0,99	-	-	-
	50	-	4,75	-	-	-	3,54	-	-
	150	-	-	0,32	-	-	-	5,08	-
	300	-	-	-	2,48	-	-	-	3,78
		-	-	-	-	-	-	-	-
clindamicina	5	-	-	-	-	2,14	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	1,21	-	-
	150	-	-	-	-	-	-	4,76	-
	300	-	-	-	-	-	-	-	6,26
		-	-	-	-	-	-	-	-

■ Não significante

ANEXOS

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**PARECER DE APROVAÇÃO**
PROTOCOLO nº 02/05

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, **APROVOU** o protocolo de pesquisa ***“Reação biológica de osteoblastos cultivados em contato com diferentes substâncias utilizadas como medicação intracanal”***, de responsabilidade da pesquisadora **Marina Beloti Ferreira**, sob orientação da Professora Doutora **Márcia Martins Marques**.

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01(um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em “cd” ou “disquete” ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 20 de abril de 2005

Prof. Dr. **CELSO LUIZ CALDEIRA**
PRESIDENTE DA SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP

ANEXO B – Retificação do Parecer do Comitê de Ética

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

DECLARAÇÃO

Protocolo 02/05

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente as alterações do tipo de célula a ser estudada, modificação dos grupos experimentais, de orientador e título do projeto inicialmente denominado "Reação biológica de osteoblastos cultivados em contato com diferentes substâncias utilizadas como medicação intracanal" para "Reação biológica de fibroblastos cultivados em contato com diferentes substâncias utilizadas como medicação intracanal", de responsabilidade da Pesquisadora Mariana Beloti Ferreira, agora sob orientação do(a) Professor(a) Doutor(a) João Humberto Antoniazzi.

São Paulo, 18 de setembro de 2007.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira".
São Paulo - SP - CEP 05508-900 - FAX (0XX11) 3091-7887.