VITOR CESAR NAKAMURA

**Influência da irrigação ultrassônica passiva na redução de bactérias e
endotoxinas dos canais radiculares: um estudo clínico randomizado**

São Paulo

2014

VITOR CESAR NAKAMURA

**Influência da irrigação ultrassônica passiva na redução de bactérias e
endotoxinas dos canais radiculares: um estudo clínico randomizado**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade de São Paulo
para obter o título de Doutor pelo Programa
de Pós-graduação em Ciências
Odontológicas

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Giulio Gavini

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Nakamura, Vitor Cesar.

Influência da irrigação ultrassônica passiva na redução de bactérias e endotoxinas dos canais radiculares: um estudo clínico randomizado / Vitor Cesar Nakamura ; orientador Giulio Gavini. -- São Paulo, 2014.

90p. : 1 fig., 6 tab., 1 graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Endodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Tratamento do canal radicular. 2. Instrumentos odontológicos. 3. Irrigantes do canal radicular. 4. Endotoxinas I. Gavini, Giulio. II. Título.

Nakamura VC. Influência da irrigação ultrassônica passiva na redução de bactérias e endotoxinas dos canais radiculares: um estudo clínico randomizado. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho à minha esposa, companheira e amor da minha vida, muito obrigado por acreditar, por ter paciência e compreensão, por continuar sempre ao meu lado em todos os momentos.

À meus pais pela minha vida e por me ensinarem a importância da dedicação, trabalho, esforço e caráter.

À minha irmã e meu irmão, com quem posso sempre contar e me espelhar.

AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Doutor Giulio Gavini** pelas orientações, liderança, apoio, e por sempre servir de modelo de profissionalismo e caráter nestes anos de mestrado e doutorado. Muito Obrigado!

À **Professora Doutora Ericka Tavares Pinheiro** pela imensa ajuda, incentivo e dedicação, em todos os momentos deste trabalho.

Ao **Professor Doutor Celso Caldeira** por estar sempre presente, seja como professor ou como amigo.

Ao **Professor Doutor Érico de Mello Lemos** pela grande amizade e companheirismo, e por ter acreditado e me guiado profissionalmente em muitos momentos.

À **Professora Doutora Márcia Pinto Alves Mayer** e a todos os professores, alunos e funcionários do Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pela colaboração no desenvolvimento desta pesquisa.

Às mestrandas **Laís Cunha Prado** e **Amanda da Costa Silveira** pela fundamental colaboração, sem a qual este trabalho não seria possível.

À **Ana Polay** da LONZA do Brasil, por todas as aulas, truques, dicas e macetes sobre quantificação de endotoxinas.

À todos os amigos e colegas da Pós-graduação em Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, por todos os momentos de aprendizado e descontração que passamos juntos.

Aos funcionários da Clínica Odontológica e da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo apoio e colaboração.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado 140457/2011-9.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do auxílio de pesquisa regular, processo FAPESP 2013/02923-9.

“Se eu pude enxergar mais longe do que os outros,
foi por estar nos ombros de gigantes...”

Isaac Newton

RESUMO

Nakamura VC. Influência da irrigação ultrassônica passiva na redução de bactérias e endotoxinas dos canais radiculares: um estudo clínico randomizado [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão corrigida.

Este estudo clínico analisou os efeitos dos procedimentos endodônticos e da irrigação ultrassônica passiva (PUI) em bactérias e endotoxinas de canais radiculares. Cinquenta pacientes com dentes com periodontite apical primária foram divididos de forma randomizada em dois grupos: PUI (n=25) e irrigação convencional (IC) (n=25). O preparo químico-cirúrgico (PQC) foi realizado com instrumentos reciprocantes, utilizando-se NaOCl 2,5% durante o preparo; e EDTA 17%, para remoção do magma dentinário. Os canais radiculares foram preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio por 14 dias e obturados. Foram realizadas coletas microbiológicas dos canais antes (S1) e após o PQC (S2), após os protocolos de irrigação (S3), após a medicação intracanal (S4) e após a reinstrumentação dos canais (S5). Durante o processamento das amostras, as coletas de 5 casos foram perdidas por fatores diversos. As amostras foram analisadas por PCR quantitativo para detecção e quantificação de bactérias e pelo teste turbidimétrico de LAL para detecção e determinação do nível de endotoxinas. Bactérias e endotoxinas foram observadas em 100% das amostras iniciais coletadas. Em ambos os grupos, houve diminuição significativa na concentração de endotoxinas entre uma etapa do tratamento e a etapa posterior ($p < 0,05$). O mesmo foi observado quanto ao número de bactérias, exceto entre a remoção da medicação intracanal e a reinstrumentação antes da obturação (S5). A análise intergrupos demonstrou que, com relação às endotoxinas, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$). Com relação à redução bacteriana, a PUI foi capaz de reduzir significativamente mais o número de bactérias do que a IC ($p < 0,05$). A análise qualitativa dos resultados demonstrou que nenhuma das técnicas sobressaiu-se sobre a outra em relação à frequência de casos com leituras positivas, tanto para bactérias quanto para endotoxinas. Concluiu-se que a PUI foi mais eficaz do que a IC em reduzir o número de bactérias, mas não a quantidade de endotoxinas do canal radicular. Além disso, cada etapa do tratamento

endodôntico foi capaz de reduzir tanto o número de bactérias quanto a quantidade de endotoxinas.

Palavras-chave: Tratamento do canal radicular. Instrumentos odontológicos. Irrigantes do canal radicular. Endotoxinas.

ABSTRACT

Nakamura VC. Influence of passive ultrasonic irrigation in bacteria and endotoxins from root canals: a randomized clinical study [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão corrigida.

The aim of this clinical study was to compare the effects of passive ultrasonic irrigation (PUI) and intracanal medication with calcium hydroxide in bacteria and endotoxins from root canal. Fifty teeth with apical periodontitis were randomly divided into two groups according to the irrigation protocol: PUI (n = 25) and conventional irrigation (CI) (n = 25). The root canal preparation of all the teeth was carried out with reciprocating files and 2.5% NaOCl during preparation; and 17% EDTA for smear layer removal. The root canals were medicated with calcium hydroxide for 14 days. Microbiological sampling were performed before (S1) and after the preparation (S2) after irrigation protocols (S3), and after intracanal medication (S4 and S5). During the processing of the samples, five cases were lost for several factors. The samples were analyzed by real time PCR, for the detection and quantification of bacteria, and the turbidimetric LAL assay, for the detection and analysis of the endotoxin levels. Bacteria and endotoxins were observed in 100% of the initial samples. In both groups, there was a significant decrease in the concentration of endotoxins between one step and the subsequent step of treatment ($p < 0.05$). The same was observed for the number of bacteria, with the exception of the reinstrumentation after the removal of the medication (S5). The intergroup analysis showed no significant differences between groups in endotoxin reduction ($p > 0.05$). PUI was able to reduce the number of bacteria significantly better than CI ($p < 0.05$). No significant statistical difference was observed between groups regarding the occurrence of cases yielding positive results for bacteria or endotoxin. It was concluded that PUI was more effective than CI in reducing the number of bacteria but not the amount of endotoxin in the root canal. Furthermore, each step of the endodontic therapy was effective in reducing both the number of bacteria as the amount of endotoxin.

Keywords: Root canal therapy. Dental instruments. Root canal irrigants. Endotoxin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celsius
Ca(OH) ₂	hidróxido de cálcio
CHX	digluconato de clorexidina
CRT	comprimento real de trabalho
EDTA	ácido etileno diamino tetra-acético
IC	irrigação convencional
LAL	Lisado de amebócitos de Limulus
µL	microlitros
mL	mililitros
min	minutos
mm	milímetro
NaOCl	hipoclorito de sódio
PCR	Reação em cadeia de polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
PQC	preparo químico-cirúrgico
PUI	irrigação ultrassônica passiva (do inglês <i>passive ultrasonic irrigation</i>)
qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa
RPM	Rotações por minuto
s	segundos
EU/mL	Unidade de endotoxina por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
3 PROPOSIÇÃO	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	39
4.2 SELEÇÃO DE PACIENTES	39
4.3 PREPARO DOS CANAIS RADICULARES E COLETAS MICROBIOLÓGICAS	42
4.4 ANÁLISES QUANTITATIVAS DE BACTÉRIAS E ENDOTOXINAS	46
4.4.1 Extração de DNA	46
4.4.2 Reação em cadeia de polimerase em tempo real	47
4.4.3 Teste quantitativo cinético turbidimétrico de <i>Limulus ameobocyte lisate</i>	47
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5 RESULTADOS	49
5.1 ANÁLISES DOS NÍVEIS DE BACTÉRIAS	49
5.2 ANÁLISES DOS NÍVEIS DE ENDOTOXINAS	52
6 DISCUSSÃO	56
6.1 DA METODOLOGIA	56
6.2 DOS RESULTADOS - REDUÇÃO MICROBIANA	61
6.3 DOS RESULTADOS - REDUÇÃO DE ENDOTOXINAS	64
6.4 CONSIDERAÇÕES COMPLEMENTARES	67
7 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICES	79
ANEXOS	90

1 INTRODUÇÃO

Bactérias são os principais agentes etiológicos das doenças da polpa e do periápice, sendo sua presença condição fundamental para a mortificação pulpar e desenvolvimento da periodontite apical. Estes micro-organismos possuem fatores de virulência que possibilitam sua manutenção no sistema de canais radiculares e estimulam a formação de lesões periapicais. Dentre estes fatores de virulência, destacam-se as endotoxinas, que são constituintes da camada externa da parede celular de bactérias Gram-negativas. Estas substâncias são secretadas por bactérias em proliferação, ou liberadas durante a lise celular. Enquanto estão aderidas à parede celular, as endotoxinas não apresentam toxicidade ao hospedeiro, quando são liberadas, no entanto, dão início a uma série de eventos biológicos por parte do sistema imunológico do organismo, que vão desde a ativação de macrófagos até a estimulação osteoclástica e consequente reabsorção óssea.

Micro-organismos e seus subprodutos são, em sua maior parte, eliminados durante a etapa de preparo químico-cirúrgico (PQC) do canal radicular mediante a utilização conjunta de instrumentos endodônticos e substâncias químicas. Técnicas de preparo manuais e mecanizadas têm sido propostas no intuito de promover a antisepsia de canais radiculares com maior eficiência, segurança, agilidade e conforto para ambos, profissional e paciente. Instrumentos mecanizados de níquel-titânio propiciam preparos mais centrados, gerando desgastes mais uniformes e seguros quando comparados a instrumentações realizadas manualmente com limas convencionais de aço inoxidável.

No entanto, trabalhos recentes têm mostrado que, independentemente do tipo de instrumento empregado, diversas áreas do sistema de canais radiculares não são tocadas durante o PQC. Desta forma, nestas regiões, a limpeza e a antisepsia são proporcionadas unicamente pela ação das substâncias químicas. Dentre estas substâncias, as soluções de hipoclorito de sódio (NaClO) são as mais conhecidas e amplamente utilizadas na Endodontia - em concentrações que variam de 0,5% a 6,15% - dada à alta capacidade antimicrobiana decorrente de sua dissociação em íons Na^+ e ClO^- quando em solução aquosa. Contudo, sabe-se que esta substância, quando empregada durante ou após o PQC, não tem ação significativa sobre as

endotoxinas bacterianas, e a eventual diminuição da sua concentração se dá simplesmente pelo arraste mecânico que a passagem do irrigante promove no interior do canal.

Além da natureza química da substância utilizada, o método de irrigação pode influenciar na limpeza e antissepsia do sistema de canais radiculares. O método mais utilizado é, ainda, realizado por meio de seringas e cânulas de pequenos calibres. Contudo, novos métodos e sistemas de irrigação estão sendo disponibilizados no mercado. Dentre eles, a irrigação ultrassônica passiva (PUI) baseia-se na transmissão de energia acústica pelo agente irrigante por meio de um inserto ou lima. Essa energia é dissipada na substância por ondas ultrassônicas, as quais geram cavitação transiente ou estável e microcorrenteza acústica, potencializando a ação dos irrigantes. Diversos autores demonstraram que a aplicação da PUI após o preparo do canal radicular proporciona paredes mais limpas do que a irrigação convencional com seringas e cânulas. Quanto à redução bacteriana, alguns estudos *ex vivo* demonstraram que o uso de PUI potencializa a capacidade antisséptica dos agentes irrigantes. Até o momento, no entanto, são poucos os trabalhos *in vivo* que utilizem métodos mais sensíveis de detecção e quantificação de micro-organismos e endotoxinas para avaliar esta questão.

Assim, propõe-se com este estudo avaliar *in vivo*, por qPCR, a influência de sistemas de irrigação ultrassônica passiva e da medicação intracanal de hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 na antissepsia do sistema de canais radiculares em dentes portadores de infecção endodôntica primária. Após o PQC com as diferentes técnicas de irrigação, também serão analisados a quantidade de endotoxinas pelo método do LAL (*Limulus amoebocyte lysate assay*). A hipótese de nulidade é que o sistema de irrigação utilizado não influenciará na redução de bacteriana e de endotoxinas encontrados no sistema de canais radiculares.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Micro-organismos possuem um papel fundamental no desenvolvimento das doenças da polpa e do periápice. Em vista disto, os procedimentos endodônticos têm sido estudados quanto a seus efeitos sobre a microbiota de dentes com polpa mortificada.

Distel et al. (2002) avaliaram a colonização por *E.faecalis* em 46 dentes extraídos, após o preenchimento com medicação intracanal de Ca(OH)_2 , em diferentes formulações. A análise foi realizada por microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal a laser em períodos de até 160 dias. Os dentes foram divididos em 2 grupos experimentais, medicados com pasta de Ca(OH)_2 e metilcelulose (n=15) ou com cones de Ca(OH)_2 (n=15). Oito dentes foram deixados sem medicação e sem contaminação (controle negativo), enquanto 8 dentes foram deixados sem medicação, mas receberam contaminação (controle positivo). Após a inserção das medicações, bolinhas de algodão contaminados com *E.faecalis* foram depositadas nas câmaras pulpares do dentes. A microscopia eletrônica de varredura detectou formação de biofilme nos canais medicados com cones de Ca(OH)_2 e no grupo controle positivo, em um período de 2 dias após a introdução da medicação. Nos canais medicados com Ca(OH)_2 na forma de pasta, a microscopia eletrônica de varredura pôde identificar a formação de biofilme em um período de 77 dias. A análise por microscopia confocal a laser de duas raízes medicadas com pasta de hidróxido e cálcio foi capaz de identificar biofilmes após 86 dias e, em uma raiz, após o período de 160 dias, pôde-se visualizar uma estrutura em forma de cogumelo, típica de biofilmes em estágios avançados de amadurecimento.

Evans et al. (2002) estudaram os mecanismos de sobrevivência do *E.faecalis* em meios com pH elevado. Culturas de *E.faecalis* sofreram pré-tratamentos com concentrações subletais de Ca(OH)_2 (pH 10,3) ou NaOCl (0,0001%). Depois disso, as bactérias de cada grupo foram expostas a 3 diferentes desafios antimicrobianos - Ca(OH)_2 em pHs 11,1 e 11,5 e NaOCl 0,0005% - por períodos de 0, 15 e 30 minutos. Após o tempo estipulado, as bactérias foram coletadas e semeadas em placas com meio de cultura. Agentes bloqueadores foram adicionados para determinar a importância do mecanismo de síntese de proteínas induzida pelo stress alcalino e da

bomba de prótons da parede celular. *E.faecalis* foi resistente ao Ca(OH)_2 em pH de 11,1, mas não em pH superior a 11,5 ou ao NaOCl. Os pré-tratamentos não foram capazes de aumentar sua tolerância a exposição à pH 11,5 ou ao NaOCl. Não houve diferença na resistência celular quando a síntese de proteínas foi bloqueada durante a indução de stress, no entanto, a adição de um inibidor da bomba de prótons, resultou numa drástica redução da viabilidade do *E.faecalis*.

Vianna et al. (2006) analisaram *in vivo*, a redução microbiana, após o PQC de 32 canais radiculares humanos com polpa mortificada, com NaOCl 2,5% ou gel de CHX 2%. A avaliação da redução bacteriana foi realizada por meio de qPCR com kits SybrGreen e TaqMan e métodos de cultura. Observou-se nos resultados das contagens de UFCs que a quantidade de bactérias foi reduzida significativamente em ambos os grupos (mais de 96 %). No entanto, usando qPCR a quantidade de bactérias antes e após o PQC foi maior do que quando avaliado por contagem de UFCs. Além disso, a redução de bactérias no grupo NaOCl (SybrGreen: 99,99%; TaqMan: 99,63%) foi significativamente maior do que no grupo CHX (SybrGreen: 96,62%; TaqMan: 96,60%). De acordo com a técnica de cultura, 75% dos casos estavam livres de bactérias após o PQC no grupo NaOCl, enquanto 50% dos casos estavam livre de bactérias no grupo CHX.

Sakamoto et al. (2007) avaliaram a redução bacteriana promovida por procedimentos endodônticos e identificaram as taxa persistentes após o tratamento. Amostras de canais de dentes com periodontite apical foram coletadas antes (S1) e após o PQC com NaOCl 2,5% (S2) e após a medicação entre as sessões com uma pasta de Ca(OH)_2 (S3). As amostras foram submetidas a identificação de espécies bacterianas persistentes por clonagem de DNA e análise de biblioteca de clones e as bactérias foram quantificadas por qPCR. As amostras S2 e S3 de cinco dos 15 canais apresentaram resultados negativos. Nos outros casos, a instrumentação e a medicação intracanal promoveram redução significativa de 99,67 % e 99,85 %, respectivamente, em comparação com amostras S1. Foram identificadas quarenta e três taxa de bactérias distintas, dos quais 24 (56%) eram filotipos ainda não cultivados. *Streptococos* foram as taxa mais prevalentes inclusive nas amostras de pós-tratamento.

Siqueira Jr. et al. (2007a) avaliaram a eficácia antimicrobiana do NaOCl 2,5% e da medicação intracanal de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ associado a paramonoclorofenol canforado (PMCC). Utilizaram onze pré-molares inferiores portadores de periodontite apical crônica, os quais foram submetidos ao PQC, com instrumentos de níquel-titânio manuais, e medicados com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ /PMCC por 7 dias. Coletas microbianas foram realizadas antes e depois do preparo do canal, e após a remoção da medicação intracanal. A análise microbiana foi realizada por meio de PCR. O PQC com NaOCl 2,5% não foi capaz de eliminar as bactérias de todos os canais avaliados, pois 5 continham bactérias em suas luzes. Após a utilização da medicação, este índice diminuiu para 1.

Siqueira Jr. et al. (2007b) realizaram ensaios de PCR e cultura de bactérias de amostras microbiológicas de dentes portadores de periodontite apical crônica, antes e após o PQC com o emprego de NaOCl 2,5% ou CHX 0,12%. Dos 16 dentes irrigados com NaOCl, seis demonstraram culturas negativas após o PQC, este número aumentou para 8 quando se empregou CHX, não havendo diferença estatística entre estes grupos. O ensaio de identificação das espécies encontradas no interior dos canais demonstrou que as taxa de bactérias mais observada foram *Streptococci*, correspondendo a 6 dos 13 táxons identificados.

Rôças e Siqueira Jr. (2011) avaliaram os efeitos antimicrobianos do PQC complementados por medicação intracanal no tratamento de dentes com periodontite apical. As amostras foram coletadas a partir de 24 canais radiculares com polpas mortas, no início do tratamento (S1), após o PQC com NaOCl 2,5% (S2) e depois de 7 dias com medicação intracanal com pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ veiculado em glicerina ou paramonoclorofenol canforado/glicerina (S3). A presença de bactérias, archaea, e fungos foi avaliada por PCR, e identificações bacterianas foram realizadas por reação de closed-ended Checkerboard para 28 possíveis patógenos endodônticos. Todas as amostras iniciais foram positivas para bactérias, mas negativas para archaea e fungos. Os procedimentos endodônticos foram altamente eficazes na redução de bactérias e número de táxons. As amostras de S2 e S3 produziram resultados negativos de PCR em 50% e 58% para os canais no grupo de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ /glicerina e em 42 % e 67 % para os canais no grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$ /PMMC, respectivamente. Exceto por comparações com amostras S1, não foram observadas outras diferenças

estatisticamente significativas nas comparações intra e intergrupos envolvendo S2 e S3.

Alves et al. (2012) comparam *ex vivo* a redução bacteriana em canais radiculares ovais, promovida por uma técnica de instrumento único e uma técnica rotatória por meio de qPCR e culturas microbiológicas. Canais com secção oval, de dentes extraídos contaminados com *E.faecalis*, foram instrumentados usando sistema reciprocante de instrumento único Reciproc ou instrumentos rotatórios BioRaCe. Amostras bacteriológicas foram realizadas antes (S1) e após a instrumentação (S2). A análise intragrupo da contagem de UFCs mostrou que ambos os protocolos promoveram uma redução significativa de bactérias. A análise intergrupo não mostrou diferenças significativas entre os dois sistemas de instrumentação.

Basmaci et al. (2013) avaliaram o efeito das técnicas de instrumentação reciprocante de instrumento único e instrumentação rotatória com o uso de diversos regimes de irrigação na redução de *E.faecalis* do interior de 81 canais radiculares de pré-molares inferiores humanos extraídos. Os dentes foram divididos em 9 grupos, de acordo com o instrumento e o regime de irrigação utilizados: grupo 1-A – Self Adjusting File (SAF) e solução salina estéril; grupo 1-B – SAF e NaOCl 5% + EDTA 15%; grupo 1-C – SAF e NaOCl 5% + ácido maleico 7%; grupo 2-A: Reciproc e solução salina; grupo 2-B – Reciproc e NaOCl 5 % + EDTA 15%; grupo 2-C – Reciproc e NaOCl 5 % + ácido maleico 7%; grupo 3-A – ProTaper e solução salina; grupo 3-B – ProTaper e NaOCl 5% + EDTA 15%; grupo 3-C – ProTaper e NaOCl 5% + ácido maleico 7%. Após o PQC, os dentes receberam nova contaminação com *E.faecalis* e, após 21 dias, cada canal foi irrigado com o regime de irrigação pertinente ao seu grupo. Amostras microbiológicas foram realizadas antes e após o PQC e após a irrigação final. As amostras foram semeadas em placas e mantidas em estufa e, após 48 horas, realizou-se a contagem de UFCs. Todas as técnicas e regimes de irrigação foram eficazes em reduzir significativamente a quantidade de bactérias do canal radicular. Não foram observadas diferenças significativas na redução bacteriana entre as técnicas de instrumento único (SAF e Reciproc) e rotatórios, ou entre os diferentes regimes de irrigação.

Machado et al. (2013) comparam a redução bacteriana obtida com sistemas reciprocantes e rotatórios no preparo de canais radiculares contaminados com

biofilme de *E.faecalis*. Sessenta canais disto-vestibulares de molares superiores foram contaminados com *E.faecalis* por um período de 21 dias. Os canais radiculares foram divididos em cinco grupos (n=12) de acordo com o sistema utilizado para o preparo do canal: Waveone, Reciproc, ProTaper, Mtwo e instrumentação manual. Os controles negativos consistiram de cinco canais não contaminados. Amostras bacteriológicas foram coletadas antes, imediatamente, e 7 dias após o PQC. Todas as técnicas analisadas diminuíram significativamente a quantidade de bactérias do interior dos canais radiculares. No entanto, não foram observadas diferenças significativas na diminuição bacteriana entre as técnicas. Após 7 dias, observou-se novo aumento na quantidade de bactérias em todos os dentes.

Nakamura et al. (2013) avaliaram *in vitro* a desinfecção de canais radiculares de pré-molares inferiores humanos, variando a técnica de preparo e os regimes de irrigação utilizados. Oitenta e cinco pré-molares inferiores extraídos receberam contaminação com *E.faecalis* e *Candida albicans* por 28 dias. Os canais foram divididos em 8 grupos: G1 - instrumentação manual e solução fisiológica; G2 - instrumentação manual e NaOCl 1,0%; G3 - instrumentação manual e NaOCl 1,0% + ácido cítrico 15%; G4 - instrumentação manual e NaOCl 5,25%; G5 - instrumentação rotatória e solução fisiológica; G6 - instrumentação rotatória e NaOCl 1,0%; G7 - instrumentação rotatória e NaOCl 1,0% + ácido cítrico 15%; G8 - instrumentação rotatória e NaOCl 5,25%. O grupo controle negativo foi composto por 5 dentes preenchidos com meio de cultura esterilizado e não contaminado. Todos os canais dos grupos experimentais foram preparados até instrumentos com diâmetro final de 0,50mm. Coletas microbianas foram realizada antes e após o PQC, com pontas de papel esterilizadas, e raspas de dentina das paredes dos canais radiculares foram produzidas com brocas diamantadas estéreis de diferentes diâmetros. Não houve diferença estatística entre as técnicas de instrumentação, quanto à diminuição microbiana no interior dos canais. Quanto aos regimes de irrigação, o soro fisiológico resultou nas menores diminuições microbianas, seguido pelo NaOCl à 1,0%. Os grupos irrigados com NaOCl 5,25% e NaOCl 1% + ácido cítrico 15% proporcionaram as maiores diminuições nas contagens de UFCs, não diferindo significativamente entre si.

Rôças et al. (2013) compararam a eficácia antibacteriana de duas técnicas de instrumentação, uma usando instrumentos manuais de níquel-titânio e a outra por

meio de instrumentos rotatório de níquel-titânio BioRace, em canais radiculares de dentes com periodontite apical. O irrigante utilizado em ambos os grupos foi NaOCl 2,5%. A análise qualitativa e quantitativa foi realizada por meio de culturas e qPCR das amostras coletadas antes e após o PQC. Bactérias foram detectadas em todas as amostras iniciais por ambos os métodos. Na análise de cultura, 45% e 35% dos canais apresentaram resultados positivos para a presença de bactérias após instrumentação manual e rotatória, respectivamente. A comparação intergrupos dos dados quantitativos não demonstrou diferença significativa entre as duas técnicas. No entanto, o preparo com instrumentos rotatórios resultou em significativamente menos resultados positivos ao qPCR (60%) do que a técnica manual (95%).

Na literatura, diversos trabalhos estudaram o importante papel das endotoxinas na patogênese das doenças periapicais. Da mesma forma, pesquisas têm sido publicadas acerca dos efeitos das substâncias e procedimentos utilizados no tratamento endodôntico sobre as endotoxinas intrarradiculares.

Schein e Schilder (1975, republicado em 2006) avaliaram, através do teste *Endpoint* de LAL e de radiografias periapicais, o conteúdo de endotoxinas da câmara pulpar de 40 dentes de pacientes com necessidades de tratamento endodôntico em diferentes condições de saúde pulpar. Observou-se que a quantidade de endotoxinas em dentes com polpa morta foi significativamente superior à quantidade observada em dentes com polpa viva, e dentes sintomáticos continham mais endotoxinas que dentes com ausência de sintomas. Além disso, dentes com lesão periapical apresentaram quantidades mais elevadas de endotoxinas do que dentes sem lesão.

Dahlén e Hofstad (1977) avaliaram os efeitos tóxicos de LPS bacterianos extraídos de cepas de *Bacterioides oralis*, *Fusobacterium necrophorum* e *F. nucleatum* isoladas do canal radicular de uma raiz de um dente com periodontite apical crônica de *Macaca fascicularis*. As endotoxinas foram analisadas quanto às reações cutâneas primárias em coelhos e indução de quimiotaxia de leucócitos em ratos. As endotoxinas foram capazes de desenvolver reações inflamatórias e induzir a quimiotaxia de leucócitos, independentemente da bactéria da qual foram extraídas. No entanto, LPS de *B.oralis* demonstrou capacidade significativamente menor de causar inflamação na pele dos coelhos que o LPS das Fusobactérias.

Dahlén e Bergenholtz (1980) avaliaram *in vivo* por meio de culturas bacterianas e do teste cinético de LAL a quantidade de bactérias e endotoxinas de canais radiculares de 13 dentes com polpas necróticas. As bactérias foram identificadas de acordo com as características morfológicas e fenotípicas das colônias. Os resultados correlacionaram o número de bactérias gram-negativas, coletadas das amostras de canais radiculares, com as quantidades de endotoxinas encontradas nas mesmas amostras.

Mattison et al. (1987) analisaram a resposta inflamatória e a formação de lesões ósseas no periodonto apical de dentes de cães preenchidos com endotoxinas de *Eikenella corrodens*, uma bactéria anaeróbia facultativa Gram-negativa. Cinquenta e seis canais radiculares de 28 dentes de cães tiveram suas polpas extraídas e receberam inoculação de endotoxinas (n=28) ou soro fisiológico (n=28). Após a inoculação, o dente era selado e, durante 4 semanas, o inóculo era renovado semanalmente. Análises radiográficas e exames sanguíneos foram realizados durante o período, e após as 4 semanas, um dos cães foi sacrificado para a realização de análise histológica. Alterações sanguíneas não foram observadas, mas os canais que receberam endotoxinas apresentaram lesões periapicais e maior infiltrado inflamatório do que os dentes que receberam soro fisiológico.

Horiba et al. (1990) estudaram o conteúdo de endotoxinas em diferentes porções de raízes de 30 dentes com periodontite apical, correlacionando a quantidade de endotoxinas com os sinais e sintomas clínicos. Os dentes foram extraídos e seccionados em diversos segmentos, os quais foram pulverizados. O pó obtido das secções foi tratado com ácido cítrico para a extração de endotoxinas. Cada secção foi analisada quanto a quantidade de endotoxinas pelo teste cromogênico de LAL. Concentrações mais elevadas de endotoxinas foram observadas em profundidades de até 300µm do canal radicular, mas puderam ser detectadas até a proximidade do cimento (800µm). Em dentes com lesão periapical, a quantidade de endotoxinas era maior do que em dentes sem lesão. Quanto aos sintomas, não observaram diferenças entre dentes sintomáticos e assintomáticos.

Safavi e Nichols (1993) avaliaram os efeitos do Ca(OH)_2 sobre LPS bacteriano. Suspensões de LPS de *Salmonella typhimurium* foram tratadas com Ca(OH)_2 ou água apirogênica, ou mantidas sem tratamento, por um período de 7 dias à 37°C. Após este período as amostras foram analisadas sob cromatografia a gás e espectrometria de

massa. Grande quantidade de hidroxi-ácidos graxos livres foram detectados nas amostras tratadas com Ca(OH)_2 . Concluiu-se que o Ca(OH)_2 hidrolisa a porção lipídica de LPS bacteriano, resultando na liberação de hidroxi-ácidos graxos livres.

Safavi e Nichols (1994) avaliaram se o tratamento de LPS com Ca(OH)_2 altera a sua ação biológica. Culturas de células de monócitos foram estimuladas com LPS ou LPS tratado com Ca(OH)_2 e os sobrenadantes de cultura foram analisadas para teor de prostaglandina E2 por espectrometria de massa e cromatografia a gás. A prostaglandina E2 foi identificada nos sobrenadantes de monócitos estimulados por LPS, mas não nos sobrenadantes estimulados com LPS tratado com Ca(OH)_2 . Concluiu-se que o tratamento com Ca(OH)_2 pode alterar as propriedades biológicas dos LPS bacterianos.

Buck et al. (2001) analisaram os efeitos de substâncias comumente utilizados na irrigação de canais radiculares e do Ca(OH)_2 sobre o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano por meio de cromatografia e espectrometria de gás e massa com monitoramento de íons selecionados. As substâncias analisadas foram: água destilada, EDTA, etanol, CHX 0,12%, CHX 0,12% + NaOCl 2,6% e NaOCl 2,6% sozinho. Solução aquosa de LPS foi misturada a uma destas soluções irrigantes durante 30 minutos. O Ca(OH)_2 foi também aplicado a LPS durante 1, 2 ou 5 dias. Todas as substância irrigantes avaliadas mostraram pouco efeito sobre o LPS. Já o Ca(OH)_2 a longo prazo inativou as moléculas de LPS por hidrólise de ligações éster nas cadeias de ácidos graxos do lípidio A.

Nelson-Filho et al. (2002) avaliaram radiograficamente as alterações da região apical e periapical de dentes de cães submetidos à inoculação intracanal de endotoxina bacteriana associada ou não a Ca(OH)_2 . Após a remoção da polpa, 60 pré-molares foram divididos em quatro grupos de acordo com o inóculo: grupo 1 – somente LPS; grupo 2 – LPS + Ca(OH)_2 ; grupo 3 – solução fisiológica; grupo 4 – sem inóculo, no entanto, lesões apicais foram induzidas por um período de 30 dias sem nenhum tratamento. Após um período de 30 dias, radiografias periapicais foram realizadas e as condições periapicais foram analisadas quanto a presença e tamanho de lesões ósseas. Lesões periapicais similares foram observados nos grupos 1 e 4. Já a lâmina dura nos grupos 2 e 3 encontrava-se intacta, evidenciando a ausência de alteração periapical. Concluiu-se que a endotoxina bacteriana causou lesões

periapicais visíveis radiograficamente, mas quando associada com Ca(OH)_2 , esta endotoxina foi neutralizada.

Silva et al. (2002) avaliaram *in vivo* os efeitos de LPS bacteriano em tecidos apicais e periapicais de dentes de cães. Sessenta pré-molares de cães tiveram suas polpas dentárias removidas e foram divididos em quatro grupos segundo a substância inoculada no interior dos canais radiculares: grupo 1 – solução de LPS bacteriano; grupo 2 - LPS bacteriano + Ca(OH)_2 ; grupo 3 - solução salina; grupo 4 – permaneceram abertos e sem tratamento, induzindo, assim a formação de lesão periapical. Após 30 dias, os animais foram sacrificados e os dentes processados e analisados histologicamente. O infiltrado inflamatório, a espessura do ligamento periodontal, e a presença de áreas de reabsorção foram semelhantes para os grupos 1 e 4. Os grupos 2 e 3 apresentaram características histológicas similares entre si. Conclui-se que a endotoxina bacteriana foi capaz de gerar lesões periapicais e que o Ca(OH)_2 foi eficiente na neutralização desta endotoxina.

Tanomaru et al. (2003) avaliaram o efeito do PQC com diferentes soluções irrigadoras e medicação intracanal com pasta de Ca(OH)_2 em canais radiculares de cães contaminados com LPS bacteriano. Cento e quarenta pré-molares de sete cães foram preenchidos com LPS de *E.coli* por 10 dias. As seguintes soluções irrigantes foram utilizadas durante o PQC: grupo 1 – NaOCl 1%; grupo 2 - NaOCl 2,5 %; grupo 3 - NaOCl 5 %; grupo 4 - CHX 2%; grupo 5 - solução fisiológica; grupo 6 - a solução de LPS foi mantida no canal radicular durante todo o experimento; grupo 7 - PQC com solução fisiológica e medicação com Ca(OH)_2 . Após 60 dias, os animais foram sacrificados e os tecidos periapicais foram processados e avaliados histologicamente. O exame histopatológico revelou que os grupos 1 à 6 tinham mais infiltrado inflamatório, maior espessamento do ligamento periodontal e reabsorção óssea em comparação com o grupo 7, que recebeu a medicação de Ca(OH)_2 .

Hong et al. (2004) estudaram o papel das endotoxinas bacterianas, isoladas de *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas endodontalis*, na indução de reabsorção óssea periapical, e a ação da polimixina B sobre estas endotoxinas. A exposição destas endotoxinas em culturas de macrófagos estimulou a produção de interleucina- 1α (IL- 1α) e fator de necrose tumoral α (TNF α), e a adição de polimixina B às endotoxinas inibiram a produção destes mediadores. Além disso, ratos Wistar

tiveram as polpas de seus incisivos expostas para a indução de lesões periapicais, por um período de 20 dias. Injeções diárias de polimixina B ou soro fisiológico foram realizadas durante o tempo que os dentes permaneceram abertos. A análise radiográfica demonstrou que a administração de polimixina B proporcionou lesões periapicais com dimensões entre 76% a 80% inferiores às lesões induzidas no grupo tratado somente com soro fisiológico.

Silva et al. (2004) analisaram *in vivo* o efeito do PQC de canais radiculares utilizando diferentes soluções irrigadoras em dentes de cães preenchidos com LPS após pulpectomia. Cento e vinte canais radiculares de 6 cães foram preenchidos com uma solução de LPS após pulpectomia e dividido em 5 grupos, de acordo com a substância química utilizada durante o PQC: grupo 1 – NaOCl 1%; grupo 2 – NaOCl 2,5%; grupo 3 – NaOCl 5%; grupo 4 – CHX 2%; grupo 5 – não recebeu nenhuma solução irrigadora. Os animais foram sacrificados após 60 dias e os dentes foram fixados e preparados para análise histológica. A análise mostrou que o infiltrado inflamatório foi menos intenso nos grupos em que os canais foram irrigados com NaOCl 5% e CHX 2%. No entanto, nenhuma das soluções irrigantes foi capaz de inativar completamente os efeitos deletérios do LPS.

Oliveira et al. (2005) avaliaram a capacidade de endotoxinas em se difundir através dos túbulos dentinários e observaram o período necessário para alcançar a superfície radicular externa. Após o PQC até limas tipo K número 30, 30 dentes unirradiculares extraídos foram divididos em 2 grupos (n = 15): grupo 1 – inoculados com endotoxina; grupos 2 – inoculados com água apirogênica. Após a inoculação, as cavidades de acesso foram seladas e os dentes mantidos em água apirogênica pelos períodos de 30 min, 2h, 6h, 1h, 24h, 48h, 72h e 7 dias. A água em que os dentes permaneceram submersos após a inoculação foi testada para a presença de endotoxina. A presença de endotoxinas no meio externo das raízes foi observada a partir de 24 horas após a inoculação.

Oliveira et al. (2007) avaliaram os efeitos dos irrigantes endodônticos sobre endotoxinas em canais radiculares de 98 dentes humanos unirradiculares extraídos. Os dentes foram preparados até instrumentos tipo K número 30 e preenchidos com endotoxina de *E.coli* por 24 horas, com exceção do grupo de controle negativo. Os grupos analisados (n=14) foram: grupo 1 – NaOCl 2,5%; grupo 2 – NaOCl 5,25%; grupo 3 – CHX 2%; grupo 4 – água de cal 0,14%; grupo 5 – polimixina B; grupo 6 –

controle positivo; grupo 7 – controle negativo. O PQC foi realizado até limas K número 80 com a substância pertinente a cada grupo. Coletas do conteúdo dos canais foram realizadas logo após o PQC e depois de 7 dias, e analisadas pelo teste cromogênico de LAL e produção de imunoglobulina M (IgM) em culturas celulares. Em ambos os testes, a redução de endotoxinas foi significativamente superior nos grupos 4, 5 e 7, os grupos 1, 2, 3 e 6 resultaram em pouca diminuição, evidenciando a ineficácia do NaOCl e da CHX em inativar endotoxinas do canal radicular.

Vianna et al. (2007) avaliaram a quantidade de endotoxinas e bactérias cultiváveis em 24 canais radiculares com polpa morta, antes (S1) e após o PQC com CHX (S2), e depois de 7 dias de medicação intracanal (S3) com três medicamentos diferentes: CaOH₂, CHX gel 2% e CaOH₂ + CHX gel 2%. Foram utilizadas técnicas de cultura para quantificar e identificar as bactérias, e o teste de LAL para quantificação de endotoxinas. Após o PQC, foi observada uma redução média de endotoxinas de 44,4%. Oito (33,3%) canais radiculares apresentaram cultura positiva, com uma redução média de bactérias de 99,96%. Depois de 7 dias de medicação intracanal, não se observou redução significativa na concentração de endotoxinas em comparação com S2, e as bactérias residuais foram recuperados por meio de análise de cultura em 13 casos (54,1 %). Nenhuma diferença significativa foi observada entre as diferentes medicações intracanal.

Martinho et al. (2010) avaliaram a capacidade do PQC com instrumentos rotatórios, NaOCl 2,5% e EDTA 17% na remoção de endotoxinas de canais de dentes com periodontite apical primária. Vinte e um pacientes portadores de dentes com canais radiculares com polpa necrótica foram selecionados. As amostras foram coletadas antes (S1) e após o PQC (S2) e analisadas pelo teste cinético de LAL para quantificação de endotoxinas. O teste de LAL indicou que as endotoxinas estavam presentes em 100 % dos canais radiculares investigados, antes e após o preparo dos canais. A análise dos dados quantitativos revelou que o conteúdo de endotoxina foi significativamente reduzida em S2 (98,06 %) em comparação a S1.

Martinho et al. (2011) compararam três diferentes métodos quantitativos de análises de endotoxinas a fim de determinar qual destes métodos é o mais aplicável para análises de infecções endodônticas. Vinte e uma amostras de canais radiculares com periodontite apical foram analisadas por meio do teste cromogênico endpoint de LAL (QCL), teste quantitativo cinético cromogênico de LAL (KQCL), e teste cinético

turbidimétrico de LAL (Turbidimétrico). Os três métodos foram eficazes na recuperação de endotoxinas das amostras do canal radicular. Independentemente do método de análise, endotoxinas foram detectadas em 100 % dos canais. Não foi observada diferença significativa entre os testes cinéticos KQCL e Turbidimétrico, os quais resultaram em valores médios de endotoxinas de 7,49EU/mL e 9,19EU/mL, respectivamente. Em contrapartida, o QCL demonstrou um valor médio de 34,20EU/mL, significativamente maior que os dois outros testes. Além disso, os coeficientes de variação dos valores observados entre duplicatas de uma mesma amostra nos testes KQCL e Turbidimétrico foram significativamente inferiores aos observados no QCL. Assim, concluiu-se que os testes KQCL e Turbidimétricos foram mais precisos e com melhor reprodutibilidade que o teste QCL.

Endo et al. (2012) realizaram um estudo *in vivo* da quantidade de bactérias e endotoxinas do canal radicular de 15 dentes com periodontite apical secundária, antes e após o PQC, por meio de culturas e do teste de LAL. O PQC foi eficaz em reduzir a quantidade de bactérias em 99,61%, e a quantidade de endotoxinas em 60,6%. Observou-se também uma correlação positiva entre a dimensão radiográfica da lesão e a quantidade de endotoxinas no interior dos canais radiculares.

Marinho et al. (2012) avaliaram *in vitro* a influência do alargamento apical com instrumentos rotatórios na redução do nível de endotoxinas de canais radiculares. Foram utilizados quarenta canais radiculares de pré-molares inferiores, dos quais 30 foram inoculados com endotoxina de *Escherichia coli*, enquanto 10 canais não contaminados serviram como controle negativo. Após o período de incubação, amostras iniciais de endotoxina foram coletadas dos canais radiculares com uma ponta de papel antes da instrumentação (S1). O preparo dos canais foi realizado com o sistema Mtwo seguindo a sequência: 10/.04, 15/.05, 20/.06, 25/.06, 30/.05, 35/.04 e 40/.04. Para monitorar a eficácia do aumento do diâmetro apical na remoção de endotoxinas, outras amostras foram coletadas de todos os canais radiculares após a instrumentação com os instrumentos 25/.06, 30/.05, 35/.04 e 40/.04. A quantificação de endotoxinas foi realizada com o teste cinético de LAL. Todos os instrumentos, a partir do 25/.06 foram eficazes em reduzir significativamente os níveis de endotoxinas intrarradiculares. Redução significativa da concentração de endotoxina foi observada em S4 e S5 em comparação com S2, no entanto, o PQC não foi capaz de eliminar toda a endotoxina do canal radicular.

Oliveira et al. (2012) estudaram os efeitos do tratamento endodôntico, utilizando diferentes irrigantes, em endotoxinas de 36 canais radiculares com necrose pulpar e avaliaram seus efeitos citotóxicos. Amostras foram coletadas antes (S1) e após a instrumentação (S2), após o uso de EDTA e após medicação intracanal (S4, CHX + Ca(OH)_2 por 14 dias). Os canais foram divididos em 3 grupos: grupo 1 - gel de CHX 2% + água de cal (solução aquosa de Ca(OH)_2 0,14%); grupo 2 - CHX + polimixina B; controle: CHX + soro fisiológico. Endotoxinas foram quantificadas pelo teste de LAL e os efeitos citotóxicos avaliados pela produção de citocinas (interleucina 1β [IL- 1β] e $\text{TNF}\alpha$) em macrófagos. O grupo 1 apresentou a maior redução de endotoxinas após instrumentação (99,18 %), semelhante ao grupo 2 (96,42 %, $P>0,05$) e diferente do grupo controle (90,78 %, $P<0,05$). A medicação intracanal promoveu uma redução de 99,2 % para 100 %. O conteúdo inicial do canal radicular induziu um aumento significativo na produção de $\text{TNF}\alpha$ e IL- 1β em comparação às amostras obtidas após o tratamento.

Xavier et al. (2013) compararam a eficácia de tratamentos endodônticos realizados em uma ou duas visitas, quanto à sua eficácia na redução de endotoxinas e bactérias cultiváveis de canais radiculares com polpa mortificada. Quarenta e oito canais radiculares de dentes com periodontite apical foram selecionados e aleatoriamente divididos em 4 grupos: G1 – NaOCl 1%; G2 – CHX 2%; G3 - NaOCl 1% + medicação de Ca(OH)_2 por 14 dias; G4 - CHX 2% + medicação de Ca(OH)_2 por 14 dias. As amostras foram coletadas antes e após os procedimentos endodônticos. A quantidade de bactérias foi analisada por técnicas de cultura, enquanto a quantificação de endotoxinas foi realizada por meio do teste cinético cromogênico de LAL. Endotoxinas e bactérias cultiváveis foram detectados em 100 % das amostras iniciais. Não foram observadas diferenças na redução de bactérias na comparação entre os protocolos de tratamento, tanto na análise dos irrigantes, quanto no número de sessões. Já com relação à quantidade de endotoxinas, os tratamentos realizados em duas sessões foram significativamente mais eficazes, independentemente da substância irrigante, não havendo, contudo, diferença significativa entre os resultados obtidos com NaOCl e CHX.

Martinho et al. (2014) compararam a eficácia dos sistemas reciprocantes de instrumento único e sistemas rotatórios na remoção de endotoxinas e bactérias cultiváveis de canais radiculares com periodontite apical. Quarenta e oito pacientes

com dentes com canais radiculares com periodontite apical primária foram aleatoriamente divididos em 4 grupos de acordo com o sistema de preparo utilizado: Waveone; Reciproc; ProTaper; e Mtwo. As amostras foram coletadas antes e após o PQC e analisadas por meio do teste cromogênico de LAL, para quantificação de endotoxinas, e culturas para determinar a contagem de UFCs. Endotoxinas e bactérias cultiváveis foram recuperados em 100 % das amostras iniciais. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de redução de endotoxinas e bactérias, independentemente do sistema utilizado.

Sousa et al. (2014) realizaram um estudo clínico para medir as quantidades de endotoxinas em canais radiculares contaminados e no exsudato de abscessos periapicais agudos, bem como a eficácia dos procedimentos endodônticos em reduzir os níveis de endotoxinas intracanal. Amostras de canais radiculares de dentes com periodontite apical e exsudato foram coletados de 10 indivíduos antes (S1) e após o PQC (S2), depois da irrigação com EDTA 17% (S3), e após 30 dias de medicação intracanal com Ca(OH)_2 + CHX (S4). O teste cinético turbidimétrico de LAL foi utilizado para a quantificação de endotoxinas. Endotoxinas foram detectados em 100 % das amostras iniciais com valores médios de 175EU/mL e de 41,5EU/mL, para exsudato e canal, respectivamente. Após o PQC, endotoxinas foram reduzidos a um valor médio de 0,54EU/mL. Irrigação posterior com EDTA não apresentou eficácia significativa na redução dos níveis de endotoxina. No entanto, a medicação intracanal por 30 dias reduziu significativamente as endotoxinas para valores médios de 0,03EU/mL. A utilização da PUI para complementar os procedimentos de limpeza e desinfecção do canal radicular tem sido estudada acerca de seus atributos. Há consenso na literatura a respeito da contribuição da PUI na limpeza e remoção de magma dentinário de canais radiculares após o PQC, sendo poucos os artigos publicados que demonstrem resultados contrários.

Ahmad et al. (1987) descreveram os fenômenos acústicos de limas endodônticas ativadas por mecanismo de ultrassom em uma cuba retangular contendo NaOCl 2,5%. A ocorrência de cavitação acústica não foi observada pelo sistema de fotometria utilizado. Já a microcorrenteza acústica foi evidenciada por meio da movimentação de microesferas de poliestireno durante a ativação ultrassônica da lima em solução de azul de metileno.

Roy et al. (1994) estudaram o efeito hidrodinâmico de insertos utilizados na PUI e sua relação com fatores como tamanho do inserto e curvatura, as características de sua superfície, amplitude e velocidade de oscilação, geometria do canal radicular, e o tipo de irrigante. Propriedades hidrodinâmicas relevantes incluíram a propensão de um inserto para a produção de cavitação estável ou transiente, fluxo contínuo, e microcorrenteza acústica. Sonoluminescência foi empregue como um indicador de atividade de cavitação transiente e análise fotográfica foi utilizada como um meio para a detecção de fluxo contínuo, microcorrenteza acústica, e cavitação estável. Os resultados obtidos não indicaram qualquer correlação entre a potência de acionamento e a produção de cavitação transiente. Os insertos que possuíam pontas afiadas foram mais eficazes na geração de cavitação transiente. Em todos os casos estudados, fluxo contínuo e cavitação estável foram observados em diferentes graus, dependendo da liberdade do inserto no interior do canal. A produção de cavitação estável provavelmente foi aumentada pela adição de quantidades moderadas de gás dissolvido no irrigante. Embora a ocorrência de contato do inserto na parede do canal tenha inibido a produção de cavitação transiente, isto teve relativamente pouco efeito sobre a capacidade de um inserto em produzir um fluxo contínuo, microcorrenteza acústica, e cavitação estável.

Mayer et al. (2002) avaliaram a influência de dois sistemas de instrumentação rotatória na limpeza de canais radiculares, bem como a remoção de magma dentinário por dois tipos de insertos ultrassônicos utilizados durante a PUI. Quarenta e dois dentes unirradiculares extraídos foram divididos em 6 grupos diferentes de acordo com o instrumento rotatório e inserto ultrassônico utilizados. Os dentes dos grupos 1, 2 e 3 foram preparados com instrumentos ProFile.04, enquanto os grupos 4, 5 e 6 foram preparados com instrumentos Lightspeed. Todos os grupos foram preparados até instrumentos de diâmetro apical 45 e irrigados com NaOCl 5,25% e EDTA 17%. Os canais dos grupos 2 e 5 foram ativados por ultrassom usando uma lima tipo K de aço inoxidável de numeração 15, e canais dos grupos 3 e 6 foram irrigados com inserto liso de níquel-titânio. Os grupos 1 e 4 serviram como controles negativos. As raízes foram divididas longitudinalmente e as paredes dos canais examinadas com ampliação de 15x, 200x e 400x por meio de microscopia eletrônica de varredura. A remoção do magma dentinário e detritos foi analisada a 3, 6 e 9mm do ápice utilizando uma grade quadrangular de 200µm e uma escala de pontuação de 5 pontos. O

sistema de preparo e o tipo de inserto ultrassônico utilizado não interferiram significativamente na remoção de magma dentinário dos canais radiculares.

van der Sluis et al.(2005) compararam a eficácia da PUI realizada com um inserto liso ou uma lima tipo K convencional, na remoção de detritos depositados em ranhuras realizadas em canais radiculares simulados em blocos de resina. Quarenta blocos de resina contendo um canal simulado padrão foram divididos longitudinalmente através do canal. Numa parede do canal, ranhuras foram realizadas a 2 e 6 mm de sua extremidade apical. Cada sulco foi preenchido com raspas de dentina misturadas com NaOCl 2%. Os blocos foram remontados e divididos em dois grupos, de acordo com o tipo de inserto utilizado durante a PUI: grupo 1 – lima tipo K número 15; grupo 2 – inserto liso com as mesmas dimensões da lima utilizada no outro grupo. Antes e depois da irrigação, imagens de cada metade do canal foram realizadas com uma câmera digital acoplada a um microscópio de luz. A quantidade de restos de dentina no sulco foi avaliada utilizando um sistema de pontuação. Após a PUI, os detritos foram completamente removidos da ranhura em 35 canais (87,5%), não havendo diferença significativa entre os grupos.

van der Sluis et al. (2006) estudaram a influência do volume, tipo de irrigante e método de irrigação na remoção de raspas de dentina artificialmente colocadas da porção apical de canais radiculares de 15 caninos humanos extraídos. Após a cirurgia de acesso, os dentes foram preparados até um instrumento 20/.10 e cada raiz foi dividida longitudinalmente. Ranhuras foram realizadas na parede do canal a 2 e 6 mm do vértice em cada metade do canal, e foram preenchidas com raspas de dentina antes das raízes serem remontadas. Todos os canais foram irrigados com ultrassom, usando inserto liso de 0,15mm de diâmetro e conicidade 0.02. No grupo 1, o canal foi irrigado com um fluxo contínuo de 50mL de NaOCl 2%. No grupo 2, o canal recebeu 12mL de NaOCl 2% em uma velocidade 4mL/min utilizando uma seringa. No grupo 3, o canal recebeu 6mL de NaOCl 2%, a uma velocidade de 2mL/min. O grupo 4 foi tratado da mesma forma que o grupo 1, mas água foi utilizada como o irrigante. Antes e após a irrigação, imagens das ranhuras foram captadas e armazenadas. A quantidade de raspas de dentina na ranhura foi avaliada por meio de um sistema de pontuação. Grupos 1, 2 e 3 resultaram em quantidades significativamente menores de dentina do que no grupo 4; não havendo diferenças significativas entre eles

Munley e Goodell (2007) compararam o uso de espaçadores digitais e limas convencionais utilizados como insertos ultrassônicos quanto à sua eficácia na remoção de magma dentinário. Oitenta e cinco canais retos de dentes humanos extraídos foram instrumentados e divididos em 4 grupos de acordo com o inserto e tempo de ativação ultrassônica: grupo 1 – espaçador digital e 3min de ativação; grupo 2 – espaçador digital e 1min de ativação; grupo 3 – lima manual e 3min de ativação; grupo 4 – lima manual e 1min de ativação. As raízes foram seccionadas longitudinalmente e analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura. Ao comparar o canal como um todo, em 3 minutos de ativação com uma lima endodôntica foi observado significativamente menos magma dentinário remanescentes do que 1 minuto de ativação com um espaçador digital. A comparação entre terços não demonstrou diferenças estatísticas entre os insertos.

Kuah et al. (2009) estudaram *in vitro* a eficácia do EDTA 17% com e sem ativação ultrassônica na remoção de magma dentinário das paredes de canais radiculares submetidos ao PQC. Cento e cinco pré-molares extraídos foram divididos aleatoriamente em sete grupos de acordo com os protocolos de irrigação final: grupo A - soro fisiológico por 3 minutos com ultrassom; grupos B e C - NaOCl 1 % durante 3 minutos, sem e com ultrassom, respectivamente; grupos D e E - EDTA 17% durante 3 minutos, sem e com ultrassom, respectivamente; grupos F e G - EDTA 17% durante 1 minuto sem e com ultrassom, respectivamente. As amostras foram examinadas em microscópio eletrônico de varredura e avaliadas segundo um sistema de pontuação para remoção de magma dentinário e raspas de dentina. Observou-se que os grupos que utilizaram EDTA e irrigação ultrassônica apresentaram scores significativamente maiores de remoção de magma e raspas de dentina que os demais grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos E (EDTA + PUI por 3min) e G (EDTA + PUI por 1 minuto).

Goel e Tewari (2009) compararam a ação da PUI contínua e intermitente e a da irrigação com pontas Navitip FX na remoção de magma dentinário de canais radiculares. Quarenta dentes unirradiculares foram divididos aleatoriamente em 5 grupos experimentais e submetidos a irrigação final com EDTA 17% seguido de NaOCl a 2,5% por 1 minuto cada, utilizando diferentes métodos de ativação: sem ativação (controle), escovação com Navitip FX, PUI contínua com irrigante entregue na câmara pulpar por meio de seringa e cânula de irrigação, PUI contínua com

irrigante entregue pela unidade de ultrassom, e PUI intermitente com irrigante entregue no interior do canal com seringas. As amostras foram examinadas por microscópio eletrônico de varredura seguindo um sistema de pontuação. Os grupos irrigados com Navitip FX e PUI intermitente resultaram em canais significativamente mais limpos no terço apical do que os outros grupos estudados.

Rödig et al. (2010) compararam a eficiência de um dispositivo de irrigação sônica, irrigação convencional com seringa e PUI na remoção de raspas de dentina de irregularidades simuladas em canais radiculares. Duas ranhuras padronizadas nas porções apical e cervical de canais radiculares foram preenchidas com raspas de dentina. Os dentes foram divididos em três grupos distintos, de acordo com o protocolo de irrigação utilizado: grupo 1 – irrigação convencional; grupo 2 – irrigação sônica; grupo 3 - PUI. A quantidade de raspas de dentina remanescentes foi avaliada utilizando um sistema de pontuação de 4 pontos. PUI removeu quantidades significativamente maiores de detritos do que a irrigação sônica e com seringa, tanto no terço apical quanto no terço cervical. A irrigação sônica foi significativamente melhor no terço apical do que a irrigação convencional.

Amato et al. (2011) compararam a eficácia da irrigação hidrodinâmica, PUI e irrigação convencional com seringa na limpeza de canais radiculares retos e curvos. Os canais radiculares de 6 pré-molares unirradiculares com canais retos e 6 raízes de molares com canais curvos foram preparadas até um instrumento de diâmetro 45, e divididos longitudinalmente. Para simular irregularidades no canal, 3 cavidades padronizadas foram realizadas em uma das paredes do canal. Em seguida, os canais foram cobertos com raspas de dentina e remontados. Após a remontagem, os dentes foram distribuídos em 3 grupos compostos por 2 raízes retas e 2 curvas. Em cada grupo, foi empregada uma das três técnicas de irrigação avaliadas. O remanescente de raspas de dentina foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura e classificado com um sistema de 4 pontos. As técnicas de irrigação hidrodinâmica e ultrassônica foram significativamente mais eficientes do que a irrigação convencional, tanto nos canais radiculares retos como nos curvos. A PUI demonstrou uma maior eficácia nos canais retos enquanto a irrigação hidrodinâmica foi mais eficiente nos canais curvos.

Paqué et al. (2011) analisaram o efeito de procedimentos de irrigação sequenciais no magma dentinário formado após a instrumentação de raízes mesiais de molares inferiores humanos. Com base em imagens obtidas por microtomografias, foram selecionados 20 molares inferiores extraídos com dois canais na raiz mesial unidos por istmo. Os canais foram instrumentados com o sistema rotatório ProTaper até o instrumento F3. NaOCl 1% foi utilizado durante a instrumentação, seguido por irrigação final de 5mL da mesma substância. Os canais foram, então, irrigados com 5mL de EDTA 17%. Depois disso, PUI foi realizada usando NaOCl 1% em três ciclos de 20s cada. Valores percentuais do volume do magma dentinário foram calculados através de imagens obtidas após cada etapa do tratamento. Após o PQC e irrigação com 5mL de NaOCl 1%, cada procedimento de irrigação subsequente reduziu significativamente o volume de magma dentinário originário da instrumentação. Contudo, cerca de metade dos debris que se acumularam durante a instrumentação permaneceu no sistema de canais.

Ribeiro et al. (2012) analisaram a presença de magma dentinário nas paredes internas do canal radicular após o uso de diferentes protocolos de agitação de irrigantes. Cinquenta incisivos inferiores foram distribuídos em cinco grupos de acordo com o protocolo de agitação utilizado durante o PQC: grupo 1 - irrigação convencional com agulha Navitip; grupo 2 – irrigação com agulhas Navitip FX com pontas com escovas; grupo 3 - irrigação dinâmica manual; grupo 4 – PUI; grupo 5 - pressão apical negativa (EndoVac). Os canais foram irrigados com 5mL de NaOCl 2,5% a cada troca de instrumento e receberam uma irrigação final com EDTA 17% por 1 min. Após a instrumentação, as raízes foram divididas longitudinalmente e micrografias em 100x e 1000x foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura para avaliar a quantidade magma dentinário. A irrigação dinâmica manual deixou significativamente mais magma dentinário no interior dos canais do que os outros protocolos, enquanto a PUI e a técnica de pressão apical negativa foram as mais eficazes.

Mancini et al. (2013) estudaram a eficácia de diferentes métodos de irrigação na remoção de magma dentinário em diferentes porções do ápice de canais radiculares. Sessenta e cinco pré-molares unirradiculares extraídos foram preparados com sistema rotatório ProTaper, até o instrumento F4, na presença de NaOCl 5,25%. Os dentes foram divididos em 2 grupos de controle (n=10) e três grupos experimentais (n = 15) de acordo com a técnica de irrigação empregada: irrigação sônica, PUI, ou

pressão apical negativa (EndoVac). Os canais radiculares foram então divididos longitudinalmente e observados por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo. A presença de resíduos e magma dentinário foi avaliada nas distâncias de 1, 3, 5, e 8 mm a partir do forame apical. O sistema sônico foi significativamente mais eficiente do que a PUI e os grupos de controle na remoção do magma dentinário em 3, 5 e 8 mm do ápice. O sistema de pressão apical negativa removeu significativamente mais magma dentinário do que todos os grupos em 1, 3, 5 e 8 mm do ápice.

Ao se analisar a PUI quanto à sua eficácia na diminuição de micro-organismos de canais radiculares, trabalhos divergem quanto a suas conclusões. Algumas pesquisas mostram que esta técnica de irrigação não contribui significativamente na redução da contaminação intracanal.

Bhuva et al. (2010) compararam os efeitos da PUI com a irrigação convencional em biofilmes de *E.faecalis* em 48 dentes humanos unirradiculares extraídos. Os dentes tiveram suas coroas cortadas e suas raízes foram padronizadas em comprimento e diâmetro do canal e seccionadas longitudinalmente. Após a remontagem destas raízes, os canais foram contaminados com *E.faecalis* por 21 dias para formação de biofilme. Os dentes foram, então, divididos em 4 grupos de 12. Os dentes do grupo A receberam irrigação convencional com seringa e NaOCl 1 %, e os dentes do grupo B foram irrigado com PUI e NaOCl 1%. Dos dois grupos controle, o primeiro recebeu irrigação convencional com solução salina, enquanto o segundo grupo controle não recebeu nenhuma irrigação. Após a irrigação, as secções foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura e fotomicrografias dos terços cervical, médio e apical foram realizadas. As imagens foram randomizados e o biofilme foi avaliado por três examinadores calibrados, utilizando-se um sistema de pontuação de 4 pontos. Não se observou diferenças significativas nos escores de biofilme entre o grupo A e o grupo B.

Beus et al. (2012) comparam *in vivo* os resultados da irrigação convencional com NaOCl 1% e da PUI com NaOCl 1% + EDTA 17% + CHX 2%, bem como os efeitos da medicação intracanal de Ca(OH)₂, na eliminação de bactérias de canais de dentes com periodontite apical de 50 pacientes. Os indivíduos foram divididos em 2 grupos e receberam tratamento endodôntico em 2 sessões, com uso de medicação

intracanal de Ca(OH)_2 por um período de 14 dias. Após o PQC, Os dentes foram tratados aleatoriamente com um dos protocolos na primeira visita. Amostras microbiológicas foram coletadas em quatro momentos: (S1) antes de instrumentação, (S2), após o protocolo de irrigação, (S3) após a medicação, e (S4) antes da obturação. A irrigação convencional e a PUI resultaram em canais livres de bactérias em 80% e 84% dos casos, respectivamente, ao final da primeira visita. Após a medicação o total da amostra aumentou para 87% livre de bactérias, e a reinstrumentação gerou um total de 91%. Não houve diferença estatística entre os métodos de irrigação ou entre os resultados obtidos em uma ou duas sessões.

Paiva et al. (2012) avaliaram *in vivo* a capacidade de 2 técnicas diferentes de irrigação quanto aos seus efeitos antimicrobianos, após o PQC de canais radiculares de dentes com periodontite apical. Amostras microbiológicas do conteúdo intracanal foram coletadas no início do tratamento (S1), após o preparo com instrumentos de níquel-titânio BioRace e irrigação com NaOCl 2,5% (S2) e, em seguida, após PUI com NaOCl 1% ou irrigação convencional com CHX 2% (S3). A análise foi realizada por meio de incidência de cultura positiva para bactérias e fungos, e reação de PCR para bactérias, fungos e archaea. Todas as amostras iniciais foram positivas para as bactérias, fungos não foram detectados, e archaea ocorreu em apenas uma amostra. O PQC foi significativamente eficaz na redução da incidência de cultura positiva e resultados de PCR. Embora ambas as abordagens complementares tenham reduzido a incidência de resultados bacteriológicos positivos quando comparados com amostras S2, a redução não foi estatisticamente significativa. A análise entre os grupos não demonstrou haver diferença significativa entre as técnicas.

Paiva et al. (2013) avaliaram os efeitos da PUI na redução de bactérias proporcionada após o preparo do canal radicular. Foram coletadas amostras de 10 canais radiculares de dentes com periodontite apical antes (S1), depois do PQC com instrumentos BioRace e NaOCl 2,5% (S2) e depois da PUI com NaOCl 2,5% (S3). Os parâmetros examinados incluíram a incidência de resultados positivos em PCR para a presença de bactérias, o impacto sobre a diversidade bacteriana, avaliado por PCR com eletroforese em gel desnaturante (DGGE), a redução bacteriana quantitativa determinada por qPCR, e a identificação de espécies persistentes por clonagem de DNA e análise de biblioteca de clones. Os procedimentos de tratamento foram significativamente eficazes na redução da incidência de resultados positivos para as

bactérias, o número de células bacterianas, e a diversidade bacteriana. No entanto, a PUI não conseguiu melhorar significativamente a desinfecção além daquele alcançado pelo PQC.

Alguns trabalhos, no entanto, demonstram que a PUI pode beneficiar o tratamento endodôntico, contribuindo significativamente na diminuição de micro-organismos, mesmo após o PQC.

Townsend e Maki (2009) comparam 5 técnicas de irrigação na remoção mecânica de bactérias de canais simulados plásticos contaminados com *E.faecalis*. Os blocos de plástico foram divididos em sete grupos sendo todos eles irrigados somente com água destilada estéril: o grupo controle, não recebeu contaminação, e foi irrigado apenas com seringa; grupo 1 – PUI; grupo 2 – irrigação convencional; grupo 3 – sistema EndoVac; grupo 4 – sistema EndoActivator; grupo 5 – agitação com lima tipo F; grupo 6 – irrigação sônica. Bactérias remanescentes foram coradas com cristal violeta 0,1%, o qual foi extraído e medido com espectrofotometria. Não foram observadas diferenças estatísticas entre o grupo PUI e o grupo controle (sem contaminação). Não houve diferença significativa entre a PUI, EndoActivator, lima F e irrigação sônica. A PUI foi significativamente mais eficaz na remoção de bactérias do que a irrigação convencional com agulha e com EndoVac.

Harrison et al. (2010) avaliaram a ação da PUI em eliminar as bactérias da parede do canal radicular e túbulos dentinários de dentes humanos extraídos. Cento e trinta raízes de dentes humanos foram inoculados com *E.faecalis*, durante 28 dias. As raízes foram distribuídas aleatoriamente em um grupo controle (n = 25) e três grupos experimentais, cada qual com 35 raízes: grupo 1 - somente PQC; grupo 2 – PQC e PUI com NaOCl 1% por 1 minuto; grupo 3 – PQC e medicação intracanal com Ca(OH)₂ por 7 dias. Todas as raízes foram processadas para microscopia de luz (n = 28) ou microscopia eletrônica de varredura (n = 7). A penetração bacteriana basal (grupo controle) resultou em uma profundidade média de invasão tubular de 151 µm. A realização de PQC apenas não conseguiu eliminar as bactérias de forma significativa das paredes do canal ou dentro dos túbulos dentinários. PUI e medicação intracanal com Ca(OH)₂ diminuíram significativamente a quantidade de bactérias da parede do canal e dos túbulos dentinários em comparação com os valores basais e PQC sozinho.

Alves et al. (2011) avaliaram a capacidade de diferentes métodos de irrigação quanto aos seus efeitos na redução de bactérias após o PQC de canais radiculares ovais contaminados com *Enterococcus faecalis*. Cinquenta e quatro canais radiculares de pré-molares foram submetidos ao PQC com instrumentos BioRaCe, utilizando NaOCl 2,5% como substância química. Em seguida, foram submetidos a dois protocolos distintos de irrigação. No primeiro grupo os canais foram submetidos a PUI com NaOCl 2,5% seguido por uma irrigação final com solução de digluconato de clorexidina 0,2% (CHX). No outro grupo os canais foram instrumentados com limas Hedström nas porções vestibular e lingual dos canais. Amostras bacteriológicas foram realizadas antes (S1) e após o preparo (S2), e após a técnica de irrigação pertinente ao grupo (S3). O preparo dos canais e as técnicas de irrigação avaliadas promoveram uma redução significativa no número de bactérias. A análise intergrupos demonstrou que a PUI associada à irrigação final com CHX foi superior à reinstrumentação com limas Hedström na redução bacteriana dos canais radiculares.

Gründling et al. (2011) analisaram *in vitro* o efeito da PUI com NaOCl e EDTA em canais radiculares de dentes bovinos contaminados com *E. faecalis*, por meio de contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) e microscopia eletrônica de varredura. Oitenta e quatro incisivos bovinos foram inoculados com *E. faecalis* por 50 dias para a formação de biofilme e divididos em quatro grupos de acordo com o protocolo de irrigação utilizado: grupo controle - sem tratamento; grupo 1 - PUI + água destilada; grupo 2 - irrigação convencional com NaOCl + EDTA; grupo 3 - PUI com NaOCl + EDTA. Com relação à contagem de UFCs, os grupos irrigados com NaOCl não apresentaram crescimento bacteriano. Houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo 1 e entre estes grupos e os grupos que utilizaram NaOCl. Na análise de microscopia eletrônica de varredura, não se observou diferença significativa entre os grupos que utilizaram NaOCl. O grupo 1 apresentou redução bacteriana significativamente superior ao grupo controle.

Cachovan et al. (2013) avaliaram *in vitro* a ação antibacteriana de um sistema hidrodinâmico e da PUI em canais radiculares de 250 dentes extraídos contaminados com *E. faecalis*. Os dentes foram divididos em um grupo controle – no qual os canais foram irrigados manualmente com solução fisiológica – e dois grupos experimentais: G1 – irrigação hidrodinâmica (RisEndo); G2 – PUI. Os dois sistemas foram utilizados com NaOCl 1,5% sozinho ou NaOCl 1,5% + CHX 0,2%. Foram determinadas as

unidades formadoras de colônias nas raízes tratadas e não tratadas durante um período de 5 dias. Ambos os sistemas de irrigação reduziram o número de bactérias de forma mais eficaz do que a irrigação manual. Com NaOCl, a PUI foi mais eficaz do que a irrigação hidrodinâmica. Para ambos os grupos, a associação NaOCl + CHX foi mais eficaz do que o NaOCl sozinho. Quando do uso desta associação, a irrigação hidrodinâmica foi mais eficaz.

A irrigação ultrassônica passiva (PUI) tem sido proposta como um recurso adicional utilizado na fase final do preparo do canal radicular com o objetivo de aprimorar as condições de limpeza e assepsia das paredes dentinárias. Entretanto, sua eficácia clínica ainda não foi comprovada. Além de um pequeno número de estudos clínicos, os resultados desses estudos são inconclusivos quanto à sua eficácia em aumentar a desinfecção dos canais radiculares. Portanto, a proposta do presente trabalho é realizar um estudo clínico randomizado para avaliar o resultado de desinfecção promovido por um protocolo de irrigação ultrassônica passiva (PUI). A contribuição do presente trabalho consiste na utilização de métodos moleculares quantitativos (qPCR) para detecção de bactérias. A análise quantitativa dos micro-organismos e seus subprodutos por métodos sensíveis se torna mais acurada e válida do que apenas uma análise qualitativa (presença/ ausência), uma vez que o sucesso do tratamento depende da redução de micro-organismos e que sua total eliminação dos canais radiculares não é obtida. Portanto, esse trabalho é o primeiro estudo clínico randomizado a avaliar a eficácia antimicrobiana da PUI utilizando métodos moleculares quantitativos. Além da quantificação bacteriana, esse trabalho fornece dados sobre a redução de endotoxinas utilizando a PUI como método suplementar de desinfecção. Até o presente momento, nenhum estudo avaliou a eficácia da PUI em remover endotoxinas dos canais radiculares *in vivo*.

3 PROPOSIÇÃO

Diante da revisão da literatura atual apresentada, observa-se a importância da realização de trabalhos clínicos que elucidem os efeitos da PUI sobre os níveis de bactérias e endotoxinas de dentes portadores de periodontite apical. Assim, propõe-se com este trabalho os objetivos descritos neste capítulo.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vivo*, por meio de técnicas moleculares de quantificação do gene 16S rRNA e do teste cinético turbidimétrico do Lisado de Amebócitos de Limulus, a eficácia do preparo químico-cirúrgico, utilizando irrigação convencional com seringas ou irrigação ultrassônica passiva, e da medicação intracanal d hidróxido de cálcio, na redução dos níveis de bactérias e de endotoxinas de canais radiculares de dentes portadores de periodontite apical primária.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar se a irrigação ultrassônica passiva é mais eficaz em promover a redução bacteriana dos canais radiculares do que a irrigação convencional com seringas e agulhas endodônticas.
- Determinar se a irrigação ultrassônica passiva é mais eficaz em promover a redução de endotoxinas dos canais radiculares que a irrigação convencional com seringas e agulhas endodônticas.
- Determinar o papel de cada etapa do tratamento endodôntico em aprimorar a redução de bactérias e endotoxinas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada nesta pesquisa baseou-se em diversos outros trabalhos clínicos e microbiológicos já expostos na Revisão da Literatura. Todos os procedimentos foram cuidadosamente realizados, seguindo criteriosos protocolos de assepsia e de manuseio dos materiais a fim de se garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados. Os protocolos clínicos e laboratoriais podem ser visualizados nos APÊNDICES B, C e D.

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Os procedimentos clínicos foram realizados na Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, mediante a prévia aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa 13396213.1.0000.0075 (ANEXO A) desta instituição e após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por cada paciente (APÊNDICE A). Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Pesquisas Aplicadas à Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4.2 SELEÇÃO DE PACIENTES

Foram selecionados 50 dentes permanentes unirradiculares, birradiculares ou multirradiculares, em condições que justificassem a realização do tratamento endodôntico, com infecção endodôntica primária assintomática e rarefação óssea periapical visível radiograficamente na raiz de maior volume – nos dentes multirradiculares.

Foram excluídos desta pesquisa dentes que apresentavam bolsa periodontal

superior a 4 mm, perda de tecido dentário que impossibilite o isolamento absoluto, apicigênese incompleta, raízes com comprimento inferior a 15 mm ou superior a 25mm, curvaturas superiores a 25°, ou alterações na luz do canal radicular visíveis radiograficamente, como calcificações ou reabsorções. Não puderam participar desta pesquisa pacientes com alterações sistêmicas relevantes, como doenças degenerativas crônicas, processos infecciosos, doenças autoimunes ou imunodeficiências induzidas ou adquiridas. Também foi necessária a ausência de uso de antibióticos nos 90 dias anteriores ao início da pesquisa.

Posteriormente, os pacientes foram divididos de forma randomizada em dois grupos distintos, de acordo com o sistema de irrigação a ser utilizado durante a terapia: PUI – irrigação ultrassônica passiva (n=25) e irrigação convencional (n=25). A randomização foi realizada por meio de um sistema eletrônico de randomização online (Research Randomizer, www.randomizer.org), e o operador só tinha conhecimento da técnica de irrigação a ser utilizada no momento da irrigação.

A organização dos procedimentos clínicos e de coleta podem ser melhor visualizados no organograma representado na Figura 4.1.

Figura 4.1 – Organograma dos procedimentos clínicos e de coleta do tratamento endodôntico

4.3 PREPARO DOS CANAIS RADICULARES E COLETAS MICROBIOLÓGICAS

Como o objetivo desta pesquisa era avaliar as alterações promovidas por procedimentos endodônticos na microbiota e endotoxinas do canal radicular, grande importância foi dada não somente ao processo de esterilização do material a ser utilizado, mas também ao de despirogenização.

Todos os instrumentos endodônticos e cones de papel absorvente utilizados foram adquiridos já livres de pirogênicos e pré-esterilizados pelo fabricante. Além disso, instrumentos clínicos metálicos eram processados e esterilizados em calor úmido a 121° C por 15 minutos. Após esta primeira esterilização, estes instrumentais eram transferidos para caixas metálicas e passavam por novo processo de esterilização e despirogenização em calor seco a 180° C por 4 horas (Hagman, 2012). Materiais termo sensíveis como pontas de irrigação e aspiração eram esterilizados por 20kGy de irradiação de raios Gama com Cobalto 60 por 6 horas.

As substâncias químicas utilizadas durante o tratamento endodôntico eram adquiridas sempre da mesma farmácia de manipulação e renovadas a cada semana a fim de mantê-las na mesma concentração e livres de contaminantes.

Nos dentes birradiculares e multirradiculares, as coletas foram realizadas nos canais de maior volume. Os orifícios de entradas dos outros canais eram selados com cimento endodôntico temporário a fim de se evitar a contaminação durante as coletas. Realizavam-se, então, os procedimentos endodônticos e de coletas no canal pesquisado. Após a conclusão destes procedimentos, este canal era selado provisoriamente e procedia-se com a realização do tratamento endodôntico dos outros canais.

Após o exame clínico e radiográfico inicial, os pacientes recebiam 10mL de antisséptico bucal para bochechar por 1 minuto. Então, os dentes eram anestesiados e procedia-se com o isolamento absoluto com arco plástico (SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), lençol de borracha (SSwhite), grampos metálicos adequados (SSwhite) e barreira gengival (Top Dam, FGM, São Paulo, SP, Brasil). A desinfecção do campo operatório e da coroa do dente era realizada com swabs esterilizados (Berkshire Corporation, North Carolina, Estados Unidos da América) embebidos em peróxido de

hidrogênio 30% por 30s, seguido por hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl, Fórmula e Ação farmácia de manipulação, São Paulo, SP, Brasil), por mais 30s, sendo este neutralizado por tiosulfato de sódio 5%.

Realizou-se a cirurgia de acesso em duas etapas, com auxílio de brocas diamantadas esféricas 1015HL (Microdont Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil) em alta-rotação, refrigerados com auxílio de seringas de 10mL (BD Company, São Paulo, SP, Brasil) e soro fisiológico esterilizado e apirogênico (Laboratórios B. Braun, São Gonçalo, RJ, Brasil), tomando-se o cuidado de não acessar a câmara pulpar. Após este procedimento, a coroa dental e o campo operatório eram novamente desinfetados e finalizava-se a cirurgia de acesso com novas brocas esterilizadas e apirogênicas, refrigeradas com soro fisiológico. Coletas da coroa dental e imediações da câmara pulpar eram realizadas para comprovar a eficácia das manobras de desinfecção. Comprovava-se a ausência de bactérias no campo operatório por meio de PCR convencional utilizando *primers* universais para o domínio *Bacteria*.

Ao término destes procedimentos, a câmara pulpar era aspirada e o canal radicular preenchido com solução salina esterilizada e apirogênica. O comprimento real de trabalho (CRT) era estabelecido com um instrumento tipo K número 10 (Dentsply Maillefer, Baillagues, Suíça) em 1,0mm aquém do forame apical, com auxílio de localizador foraminal (J. Morita Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Um instrumento tipo H número 15 era pressionado contra as paredes do canal para criar raspas de dentina e suspender bactérias e endotoxinas na solução. Cinco cones de papel número 15 esterilizados e apirogênicos eram introduzidos individualmente no canal para coletar o conteúdo inicial de bactérias e de endotoxinas (S1), sendo mantidos em posição por 1 minuto cada. O primeiro cone era depositado em tubo de vidro esterilizado e apirogênico, para posterior análise de endotoxinas. A parte ativa da lima utilizada e os demais cones eram depositados em microtubos esterilizados contendo 300µL de solução RNA later (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos da América), para análise de bactérias.

Solução de NaOCl 2,5% era depositada na câmara pulpar e levada progressivamente no sentido coroa-ápice com um instrumento tipo K número 10 (Dentsply Maillefer), agitando a substância, de modo a permitir um contato mais rápido

do NaOCl com o conteúdo do canal. Este processo era repetido, até se alcançar o CRT estabelecido.

Após a odontometria e o esvaziamento do canal, instrumentos manuais do tipo K eram levados sem pressão até o CRT, em ordem crescente de diâmetro - iniciando do instrumento número 10 ao número 40 (Dentsply Maillefer). O primeiro instrumento que demonstrasse travamento no CRT era utilizado como base para a escolha do instrumento Reciproc (VDW GmbH, Munique, Alemanha) a ser utilizado. Se este diâmetro fosse compatível com instrumentos 10 ou 15, o dente era excluído da pesquisa, mas para não prejudicar o paciente, o tratamento era continuado, utilizando-se instrumento Reciproc R25 no preparo do canal. Caso houvesse travamento nas limas 20, 25 ou 30, o instrumento Reciproc R40 era escolhido. Já o instrumento Reciproc R50 era utilizado em canais cujo instrumento inicial de referência era de número 35 ou 40. Todo o PQC era realizado na presença de NaOCl 2,5% com a seguinte cinemática: o instrumento era acionado por motor VDW-silver (VDW GmbH) ajustado em movimento reciprocante, seguindo sequências de três ciclos de penetração/retrocesso, de forma a aprofundar o preparo a cada ciclo, ao término da sequência, o instrumento era limpo com uma gaze esterilizada, e o canal irrigado com NaOCl 2,5%. O CRT era alcançado apenas no último ciclo do preparo do canal.

Durante o PQC, a irrigação dos canais foi realizada com seringas plásticas esterilizadas e apirogênicas de 10mL e pontas de irrigação endodônticas com diâmetro de 30G e saída em meia cana lateral (Endo-EZE - Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, Estados Unidos da América). A substância extravasada dos canais era aspirada por meio de cânulas de aspiração (SurgiTip - Ultradent Products Inc) acopladas à bomba à vácuo odontológica. Foram utilizados 10mL de NaOCl antes de cada ciclo de instrumentação, assim, o volume total de substância empregada durante o PQC era de 30mL. Ao término do preparo químico mecânico os canais radiculares recebiam nova irrigação com 10mL de NaOCl 2,5%. As pontas irrigadoras eram posicionadas à aproximadamente 2mm aquém do CRT e utilizadas com movimento de vai e vem, com amplitude de aproximadamente 2mm.

Aspirava-se o conteúdo do canal com pontas *Capillary tips* 0,014" e 0,019" (Ultradent Products Inc.) e nova irrigação com 5mL de tiosulfato de sódio 5% por 1 minuto era realizada. O canal era aspirado novamente, seco com cones de papel

absorventes e preenchido com soro fisiológico esterilizado e apirogênico. Procedia-se então com nova coleta microbiológica (S2), como descrito anteriormente.

Após a finalização do PQC, um cartão pré-randomizado que indicava o protocolo de irrigação final a ser usado, PUI ou irrigação convencional, era removido de um envelope.

No grupo PUI, realizava-se irrigação ultrassônica passiva com 2mL de NaOCl 2,5% com um inserto liso Irrisonic de 0,2mm de diâmetro e conicidade .01 (Helse, Ribeirão Preto, SP, Brasil), acionado por aparelho de ultrassom (CVDentus, São José dos Campos, SP, Brasil) ajustado em 10% de potência. A ponta do inserto era posicionada à 2 mm aquém do CRT, evitando-se o contato com as paredes do canal, e ativada por 30 segundos. A solução de NaOCl 2,5% era renovada (2mL) e ativada por mais 30s. Repetia-se estes procedimentos e vezes com 2mL de EDTA-T 17% e, novamente, duas vezes com 2mL de NaOCl 2,5%, totalizando 3min de ativação.

No grupo IC, a irrigação era realizada utilizando-se os mesmos volumes e tempos de irrigação das soluções descritas no grupo PUI, com seringas plásticas e pontas de irrigação endodôntica com diâmetro de 30G e saída lateral (Endo-EZE - Ultradent Products Inc.).

Em ambos os grupos, após os três ciclos, o conteúdo do canal era aspirado com pontas *Capillary tips* 0,014" e 0,019" e nova irrigação com 5mL de tiosulfato de sódio 5% por 1 minuto era realizada. Os canais eram então aspirados e secos novamente, e preenchidos com soro fisiológico esterilizado e apirogênico para a realização de uma nova coleta (S3).

Após a coleta canais radiculares procedia-se com a secagem do canal, com pontas de papel absorvente, e o preenchimento com Ca(OH)_2 veiculado em glicerina (Calen, SSwhite). Radiografias periapicais eram realizadas a fim de confirmar o completo preenchimento do canal radicular pela medicação intracanal. As aberturas coronárias eram seladas com uma camada de 2mm de espessura de obturador provisório endodôntico (Dentalville, Joinville, SC, Brasil) e uma camada de cimento de ionômero de vidro (Vidrion R).

Após o período de 14 dias, os procedimentos de isolamento absoluto, abertura coronária e desinfecção do campo operatório eram realizados seguindo o mesmo

protocolo utilizado na primeira sessão. A medicação intracanal era removida utilizando 10mL de EDTA 17% e leve agitação com limas tipo K número 15. Então, uma quarta coleta (S4) era realizada seguindo os mesmos procedimentos realizados nas coletas anteriores. Feito isso, os canais eram irrigados com 10mL de NaOCl 2,5% e instrumentados novamente com um instrumento idêntico ao utilizado na primeira sessão. Procedia-se com nova irrigação com 10mL de NaOCl 2,5%, seguido por 10mL de EDTA-T 17%, com seringa e pontas de irrigação. Então, realizava-se nova coleta (S5) com os mesmos procedimentos descritos anteriormente e os canais eram obturados por meio de técnica de condensação lateral de guta-percha e cimento AH-Plus (Dentsply Maillefer). As aberturas coronárias eram seladas com resina composta (Z350, 3M Corporation, St. Paul, MN, Estados Unidos da América) e uma radiografia final de tratamento era realizada.

4.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DE BACTÉRIAS E ENDOTOXINAS

Até o momento da análise, os microtubos contendo as amostras bacterianas eram armazenados em freezer a -80°C, e os tubos de vidro com as amostras de endotoxinas ficaram estocados em freezer a -20°C. Os protocolos de todos os procedimentos laboratoriais realizados podem ser visualizados no APÊNDICE D

4.4.1 Extração de DNA

As amostras endodônticas mantidas em RNA later eram descongeladas e homogeneizadas por agitação durante 1 min. Realizou-se a extração de DNA com o kit de purificação MasterPure (Epicentre, Madison, WI, Estados Unidos da América) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.4.2 Reação em cadeia de polimerase em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas com *primers* universais para a região conservada do gene 16S rRNA específicos do domínio *Bacteria*. A sequência utilizada para os *primers* foram: *Forward*: 5'-CCA TGA AGT CGG AAT CGC TAG-3' e *Reverse*: 5'-GCT TGA CGG GCG GTG T-3'. As reações eram realizadas em placas de 96 poços com um volume total de 20 µL contendo: 10 µL Power SYBR Green Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos da América), 0,5 µL de cada primer, 2 µL do DNA extraído das amostras e H₂O.

O ciclo de amplificação foi: 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de denaturação a 95°C por 15s, anelamento a 60°C por 1 min e extensão a 95°C por 15s. As reações foram feitas utilizando o termociclador *Step One Plus* (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos da América) e os resultados analisados pelo software ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Todas as amostras foram corridas em triplicata, utilizando-se para análise o valor médio entre elas.

Para a realização da curva padrão, foram utilizadas diluições de concentrações conhecidas de plasmídeos que contêm o gene 16S rRNA, clonados após reação de PCR convencional. Cada concentração foi testada em triplicata para obtenção da curva com a maior eficiência e coerência possível.

4.4.3 Teste quantitativo cinético turbidimétrico de *Limulus Amebocyte Lisate*

As amostras endodônticas coletadas em S1, S2, S3 e S4 foram descongeladas a 37°C por 10 min. Um mililitro de água apirogênica era depositada em cada tubo contendo a amostra e homogeneizada por agitação durante 1 min.

A quantidade de endotoxinas foi analisada pelo teste quantitativo cinético turbidimétrico de LAL (*Limulus Amebocyte Lisate*) (Lonza, Walkersville, MD, Estados Unidos da América), em quadruplicata para todas as coletas do conteúdo do canal radicular.

Diluições da endotoxina padrão de *Escherichia coli* foram realizadas em concentrações de 0,01, 0,1, 1 e 10 EU/mL, as quais representam os padrões de comparação das amostras (curva- padrão). Em uma placa apirogênica de 96 poços, eram adicionados os padrões de endotoxina, as amostras coletadas do canal radicular e os controles positivos. O teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância da endotoxina era medida individualmente com um leitor de placa. Como a absorbância é diretamente proporcional à concentração de endotoxinas presentes nas amostras, esta concentração era determinada a partir da curva-padrão. Se necessário, diluições seriadas eram realizadas para permitir uma melhor leitura dos resultados.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram tabulados de acordo com o grupo de tratamento e variável estudada, e foram analisados estatisticamente com auxílio do software BioEstat 5.3 (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – Tefé, Amazonas, Brasil).

A análise de aderência foi realizada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov com intervalo de significância de 5% ($\alpha=0,05$). Observaram-se distribuições não-normais entre os grupos analisados, desta forma, optou-se pela realização de testes não-paramétricos numéricos para analisar as hipóteses experimentais. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5%.

Por se tratarem dos mesmos dentes em diferentes momentos do tratamento endodôntico, as análises intragrupo foram realizadas com teste de Wilcoxon para amostras relacionadas. Já as comparações entre os dois grupos foram realizadas com o teste de Mann-Whitney, para a análise quantitativa de bactérias e endotoxinas, e teste Exato de Fischer para a análise qualitativa (incidência de amostras livres de DNA bacteriano).

5 RESULTADOS

Durante o processamento laboratorial das amostras, 5 casos de cada grupo tiveram que ser excluídos. Assim, cada grupo foi composto por 20 dentes, dos quais 14 dentes unirradiculares e 6 dentes bi ou multirradiculares. As características clínicas de cada caso podem ser visualizadas na seção de APÊNDICES.

A análise por PCR convencional das amostras do campo operatório não detectou a presença de DNA bacteriano, confirmando a eficácia dos procedimentos de desinfecção do campo.

Para a melhor visualização e compreensão dos resultados obtidos, os dados foram organizados em tabelas separadas para bactérias e endotoxinas.

5.1 ANÁLISES DOS NÍVEIS DE BACTÉRIAS

Todas as amostras iniciais estudadas foram positivas para a presença de DNA bacteriano. A tabela 5.1 mostra as medianas das quantidades de cópias de DNA bacteriano detectadas nas amostras nas diferentes etapas do tratamento endodôntico para os dois grupos experimentais. Pode-se observar também o percentual de redução entre cada momento do tratamento e o valor de p de cada comparação, calculado na análise estatística. Em ambos os grupos, houve diminuição significativa no número de bactérias entre uma etapa do tratamento endodôntico e a etapa seguinte ($p < 0,005$), exceto entre as amostras realizadas após a remoção da medicação intracanal (S4) e após a reinstrumentação (S5) ($p = 0,1595$ e $p = 0,2383$, para os grupos PUI e IC, respectivamente).

Tabela 5.1 – Quantidade de bactérias inicial e após cada etapa do tratamento endodôntico, e percentuais de redução entre cada etapa

GRUPO	MEDIANAS					
	S1	S2	S3	S4	S5	
PUI	2.2×10^6	1.7×10^4	4.9×10^3	2.1×10^3	1.2×10^3	
	99,22% p<0,0001		71,18% p<0,001	57,14% p<0,05	42,86% p=0,06	
	99,77% p<0,0001			75,51% p<0,001		
			99,95% p<0,0001			
IC	1.6×10^6	5.2×10^4	1.3×10^4	3.4×10^3	3.1×10^3	
	99,67% p<0,0001		75,00% p<0,001	73,85% p<0,05	8,82% p=0,1303	
	99,19% p<0,0001			76,15% p<0,001		
			99,80% p<0,0001			

A tabela 5.2 demonstra as medianas das quantidades de bactérias dos grupos PUI e IC, após cada etapa do tratamento endodôntico, juntamente com o valor de p obtido na comparação estatística entre ambos. Nas amostras S1, S2, S4 e S5, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos ($p > 0,05$). Nas amostras S3, no entanto, observa-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$), sendo que as amostras do grupo PUI apresentaram menor número de bactérias que as amostra do grupo IC.

Tabela 5.2 – Medianas das quantidades de bactérias em cada momento do tratamento e valor de p da comparação entre os grupos PUI e IC

	PUI	IC	p
S1	2.2×10^6	1.6×10^6	0,33
S2	1.7×10^4	5.2×10^4	0,50
S3	4.9×10^3	1.3×10^4	<0,05
S4	2.1×10^3	3.4×10^3	0,36
S5	1.2×10^3	3.1×10^3	0,12

A tabela 5.3 demonstra a incidência de amostras contendo DNA bacteriano em cada grupo. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Tabela 5.3 – Ocorrência de DNA bacteriano nas amostras dos grupos PUI e IC.

	PUI	IC	p
S1	20 (100%)	20 (100%)	1
S2	16 (80%)	16 (80%)	1
S3	13 (65%)	15 (75%)	0,59
S4	11 (55%)	13 (65%)	0,49
S5	11 (55%)	13 (65%)	0,49

5.2 ANÁLISES DOS NÍVEIS DE ENDOTOXINAS

Todos as amostras iniciais estudadas apresentavam resultados positivos para a presença de endotoxinas. A tabela 5.4 mostra as medianas das concentrações de endotoxinas nas amostras realizadas nas diferentes etapas do tratamento endodôntico para os dois grupos experimentais. Pode-se observar também o percentual de redução entre cada momento do tratamento e o valor de p de cada comparação, calculado na análise estatística. Em ambos os grupos, houve diminuição significativa na concentração de endotoxinas entre uma etapa do tratamento endodôntico e a etapa posterior ($p < 0,005$).

Tabela 5.4 – Concentração de endotoxinas inicial e após cada etapa do tratamento endodôntico, e percentuais de redução entre cada etapa

GRUPO	MEDIANAS			
	S1	S2	S3	S4
PUI	59,25	13,39	7,3	0,38
	<div> <div>77,41%</div> <div>p<0,001</div> </div>			<div> <div>45,46%</div> <div>p<0,05</div> </div>
	<div> <div>87,68%</div> <div>p<0,001</div> </div>			<div> <div>60,78%</div> <div>p<0,001</div> </div>
	<div> <div>99,36%</div> <div>p<0,001</div> </div>			
IC	52,5	11,1	5,75	1,2
	<div> <div>78,86%</div> <div>p<0,001</div> </div>			<div> <div>48,20%</div> <div>p<0,05</div> </div>
	<div> <div>89,05%</div> <div>p<0,001</div> </div>			<div> <div>57,03%</div> <div>p<0,05</div> </div>
	<div> <div>97,71%</div> <div>p<0,001</div> </div>			

A análise intergrupos pode ser visualizada na tabela 5.5 que mostra as medianas das concentrações de endotoxinas dos grupos PUI e IC após cada etapa do tratamento endodôntico, juntamente com o valor de p obtido na comparação estatística entre ambos. Não ocorreram, em nenhum dos momentos observados, diferenças estatística significantes entre os grupos ($p>0,05$). O gráfico 5.1 representa a diminuição do nível de endotoxinas em cada momento do tratamento para os dois grupos.

Tabela 5.5 – Medianas das concentrações de endotoxinas (em EU/mL) em cada momento do tratamento e valor de p da comparação entre os grupos PUI e IC

	PUI	IC	p
S1	59,25	52,5	0,35
S2	13,39	11,1	0,10
S3	7,3	5,75	0,48
S4	0,38	1,2	0,36

Gráfico 5.1 – comparação entre os grupos PUI e IC quanto às concentrações de endotoxinas (em EU/mL) durante o tratamento endodôntico

A ocorrência de endotoxinas nas amostras analisadas pode ser visualizada na tabela 5.6. A análise estatística não demonstrou diferença significativa entre os grupos experimentais em nenhum momento do tratamento endodôntico ($p>0,05$).

Tabela 5.6 – Ocorrência de endotoxinas nas amostras dos grupos PUI e IC.

	PUI	IC	p
S1	20 (100%)	20 (100%)	1
S2	20 (100%)	20 (100%)	1
S3	17 (85%)	18 (90%)	0,84
S4	13 (65%)	13 (65%)	1

6 DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho e por meio de comparações com a revisão da literatura atual, discute-se a importância dos dados obtidos, relacionando-os com fatores pertinentes à metodologia aplicada e à observações realizadas em outros estudos.

6.1 DA METODOLOGIA

Cinquenta pacientes portadores de dentes com periodontite apical primária com necessidade de tratamento endodôntico foram selecionados para participar deste estudo. Critérios de inclusão e exclusão foram estabelecidos de acordo com outros trabalhos clínicos previamente publicados (Vianna et al., 2006; Rôças; Siqueira Jr., 2011; Martinho et al., 2014), que também fizeram uso de tecnologias de quantificação de microrganismos ou endotoxinas para analisar a eficiência de diferentes técnicas e substâncias utilizadas durante a terapia endodôntica. Optou-se pela inclusão de dentes uni, bi e multirradiculares devido ao alto número de sujeitos da pesquisa e à dificuldade em se obter casos clínicos que se enquadrassem em todos os critérios de inclusão. Outros trabalhos na literatura também relatam a inclusão de todos os grupamentos dentários em suas populações (Paiva et al., 2013; Sousa et al., 2014; Martinho et al., 2014).

O PQC foi realizado com instrumentos endodônticos reciprocantes Reciproc. Estes instrumentos foram introduzidos recentemente para prática endodôntica e são caracterizados por sua cinemática de ativação que, segundo o fabricante, consiste em ciclos de uma rotação de 150° no sentido anti-horário seguida por uma rotação de 30° no sentido horário. A diferença de 120° entre cada movimento permite que as espiras do instrumento, durante a primeira rotação, cortem a dentina, e o retrocesso, por sua vez, diminui a tensão elástica sobre o metal, aumentando sua resistência à fratura cíclica (Gavini et al., 2012). Além disso, esses instrumentos foram idealizados para serem utilizados uma única vez, não permitindo uma nova esterilização. Este fato é

importante uma vez que, segundo o fabricante, os instrumentos já são comercializados livres de micro-organismos e agentes pirogênicos, diminuindo assim, a chance de contaminação das amostras por parte dos instrumentos.

Diversos trabalhos foram publicados recentemente acerca da eficácia destes instrumentos na desinfecção de canais radiculares (Alves et al., 2012; Machado et al., 2013; Basmaci; Oztan; Kiyani, 2013). Estes trabalhos demonstram que os instrumentos endodônticos reciprocantes são tão eficazes quanto os instrumentos de rotação contínua e a instrumentação com técnica manual na diminuição de micro-organismos do canal radicular. Mais recentemente, Martinho et al. (2014) observou que os instrumentos reciprocantes foram tão eficazes quanto os instrumentos rotatórios na diminuição de endotoxinas de canais radiculares de dentes portadores de periodontite apical.

A substância química utilizada nesta pesquisa durante a fase de preparo do canal radicular foi o NaOCl 2,5%, devido à sua eficácia na desinfecção de canais radiculares, característica já amplamente estudada e comprovada (Siqueira Jr. et al., 2007a; b; Tirali et al., 2009; Basmaci et al., 2013; Nakamura et al., 2013). Quanto à sua ação sobre endotoxinas bacterianas no canal radicular, no entanto, diversos trabalhos demonstraram que esta substância é pouco eficaz em inativá-las (Buck et al., 2001; Tanomaru et al., 2003; Silva et al., 2004; Oliveira et al., 2007).

As principais finalidades do EDTA 17% - outra substância utilizada nesta pesquisa – na terapêutica endodôntica são auxiliar na limpeza dos canais radiculares e atuar na remoção do magma dentinário resultante do PQC (De Deus et al., 2006; Andrabi et al., 2013). Em decorrência disto, são poucos os trabalhos que avaliem seu potencial antimicrobiano e de redução de endotoxinas. Siqueira Jr. et al. (1998) avaliaram o efeito antimicrobiano do EDTA 17%, ácido cítrico 10%, NaOCl em três diferentes concentrações (0,5%, 2,5% e 4%) e CHX 0,2% e 2%, por meio de halos de inibição em placas de Petri contendo culturas de bactérias de canais radiculares. Observaram que o EDTA 17% e o ácido cítrico 10% possuem ação antimicrobiana superior ao NaOCl 0,5% e inferior ao NaOCl 2,5% e 4%, e ao CHX 0,2% e 2%.

Já Sousa et al. (2014) avaliaram os efeitos dos procedimentos realizados durante o tratamento endodôntico de canais de dentes com periodontite apical primária, na concentração de endotoxinas, ao término do PQC e logo após a irrigação

final com 5mL de EDTA 17% por 3 minutos. Os autores observaram que o uso do EDTA não auxiliou significativamente na diminuição de endotoxinas dos canais radiculares. Assim, o uso do EDTA 17% neste trabalho teve como principal objetivo proporcionar uma maior limpeza às paredes do canal radicular, sem a pretensão de embuti-lo à desempenhar ação na redução de endotoxinas ou bactérias, cabendo esta última, ao NaOCl 2,5%.

A irrigação entre os ciclos de instrumentação do PQC foi realizada com seringas plásticas descartáveis de 10mL e agulhas endodônticas de 30G com saída lateral em meia cana. Estes mesmos materiais foram utilizados na irrigação final do grupo IC e para levar as substâncias ao interior dos canais radiculares no grupo PUI. Estudos realizados por meio de fluidodinâmica computacional demonstraram que agulhas com este tipo de ponta são mais seguras que agulhas de ponta reta ou de ponta biselada, em relação à extrusão de líquidos em sentido apical (Boutsioukis et al. 2010; Shen et al. 2010). Estes mesmos estudos demonstraram que este tipo de ponta é mais eficaz na substituição de irrigantes na porção apical do canal radicular do que as agulhas com ponta fechada e saída lateral. Além disso, Guerreiro-Tanomaru et al. (2013) observaram que agulhas com diâmetro de 30G são mais eficazes do que similares com maior diâmetro na limpeza das paredes do canal radicular, durante e após o PQC.

No grupo PUI, realizou-se a irrigação final com insertos lisos, e um protocolo que totalizava 3 minutos de ativação ultrassônica – 2 ciclos de 30s com NaOCl 2,5%, 2 ciclos de 30s com EDTA 17% e 2 ciclos de 30s com NaOCl 2,5%. De acordo com van der Sluis et al. (2005) e Munley e Goodell (2007), insertos lisos são tão eficazes quanto limas endodônticas em relação à limpeza proporcionada ao canal radicular durante a PUI. Com a vantagem de apresentarem um menor risco de gerar deformações ou perfurações no canal (Mayer et al., 2002). Não há um consenso sobre o tempo ideal de aplicação da PUI para a obtenção de melhores resultados com relação à limpeza do canal radicular. Na literatura, podem ser observados períodos que variam entre 30s a 3 minutos (Beus et al., 2012; Mancini et al., 2013; Paiva et al., 2013). Optou-se por utilizar um protocolo com prolongado período de irrigação, diminuindo, assim, a chance de obterem-se resultados inexpressivos causados por falta de ativação ultrassônica.

O método de coleta empregado fez uso de cones de papel pré-esterilizados e livres de pirogênicos, os quais eram mantidos por um minuto cada no interior dos canais radiculares após a suspensão do conteúdo microbiano com auxílio de limas tipo Hedström número 15. Essa metodologia é amplamente utilizada em estudos que avaliam o efeito dos procedimentos endodônticos no conteúdo microbiológico dos canais radiculares, havendo diversos trabalhos publicados que a utilizaram (Vianna et al., 2006; Martinho et al., 2010; Rôças et al., 2013). Uma de suas limitações é o fato de que a amostragem é representada somente pelo conteúdo da luz do canal e de áreas das paredes do canal em que o instrumento endodôntico, utilizado para realizar a coleta, teve contato. Assim, porções do canal em que a própria anatomia interna dentária dificultavam ou, até, impossibilitavam a ação do instrumento não foram representadas. Deve-se lembrar, no entanto, de que se trata de uma pesquisa *in vivo* na qual a manutenção do dente e a restauração à sua função eram objetivos a serem alcançados, impossibilitando métodos de coleta mais invasivos ou destrutivos.

Para cada coleta, a parte ativa da lima Hedström utilizada e 4 cones de papel foram utilizados para a análise de bactérias, enquanto apenas 1 cone foi utilizado para a análise de endotoxinas. Esta diferença existe em decorrência dos métodos de análise empregados. Enquanto o PCR em tempo real possui uma extensão dinâmica de leitura de até 10^{11} sequências de ácido nucleicos em uma mesma amostra (Kubista et al., 2006), o teste turbidimétrico cinético de LAL tem um alcance máximo de 100 unidades de endotoxinas por mililitro, segundo o fabricante. A utilização de uma maior quantidade de cones, por coleta de endotoxinas, acarretaria no aumento da concentração de endotoxinas e outros produtos, criando a necessidade de realizar-se mais diluições por amostra. Isto aumentaria a chance de erros durante os procedimentos laboratoriais e dificultaria a leitura das placas, além de aumentar substancialmente o gasto de material.

A análise quantitativa do conteúdo de bactérias dos canais radiculares foi realizada por meio de PCR em tempo real, técnica molecular amplamente utilizada para este fim (Vianna et al., 2006; Sakamoto et al., 2007; Rôças; Lima; Siqueira Jr., 2013; Paiva et al., 2013). Uma das vantagens desta técnica sobre as técnicas de cultura e contagem de UFC é a possibilidade de se quantificar tanto as bactérias cultiváveis quanto as não cultiváveis presentes em uma amostra, uma vez que primer utilizado é específico para o domínio *Bacteria*. Discute-se, entretanto, que esta

metodologia de análise está sujeita a “falsos positivos”, quantificando, além dos DNAs de bactérias viáveis, também alguns fragmentos de DNAs de bactéria mortas durante o processo de desinfecção, extrapolando, desta forma, a quantidade de bactérias que a amostra realmente possui. Young et al. (2007) demonstraram que, mesmo após um ano, o DNA de células de *E. faecalis* mortas por calor era captado por PCR. No entanto, a exposição deste DNA ou do DNA de bactérias viáveis à NaOCl 1% era suficiente para sua eliminação. Além disso, Willians et al. (2006) demonstraram que o qPCR foi tão capaz em detectar DNA bacteriano quanto o PCR de transcriptase reversa, técnica molecular que constata apenas micro-organismos viáveis pela detecção do RNA mensageiro, comprovando, assim, a viabilidade da análise por qPCR como técnica de quantificação de micro-organismos, mesmo após a exposição à agentes antimicrobianos.

A quantificação de endotoxinas das amostras coletadas foi realizada por meio do teste quantitativo cinético turbidimétrico de LAL. Martinho et al. (2011) compararam a eficiência deste teste com o teste quantitativo cinético cromogênico e com o teste cromogênico endpoint, na quantificação de endotoxinas de canais radiculares de dentes com polpa mortificada. Os autores observaram que tanto o teste cinético cromogênico quanto o teste cinético turbidimétrico são mais precisos e possuem melhor reprodutibilidade que o teste cromogênico endpoint. Altas concentrações de outros materiais biológicos como proteínas, ácidos nucleicos e peptideoglicanos podem interferir nos resultados (Wildefeuer *et al.*, 1974; Sullivan; Watson, 1975; Dahlén; Bergenholtz, 1980). Para evitar tais interferências o fabricante recomenda adicionar uma concentração conhecida de endotoxina de *E. coli* a cada amostra (método de *spike*). Além disso, diluições seriadas até 10^{-3} foram realizadas e a análise de cada amostra foi feita em quadruplicata.

A análise de correlação entre as quantidade de micro-organismos e endotoxinas nas diferentes fases do tratamento endodôntico não foi realizada. A complexidade da microbiota das afecções endodônticas faz com que este tipo de análise seja impossibilitada para esta pesquisa, uma vez que as bactérias presentes no interior de cada canal analisado são desconhecidas. Sabe-se que as endotoxinas bacterianas são componentes da parede externa da membrana celular de bactérias Gram-negativas (Dahlén; Bergenholtz, 1980). Como o primer utilizado foi

desenvolvido para detectar o DNA do domínio *Bacteria* não há como saber qual é a proporção exata de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas em cada amostra.

6.2 DOS RESULTADOS – REDUÇÃO BACTERIANA

Todas as amostras iniciais (S1) apresentaram quantidades significativas de bactérias, as medianas obtidas foram de $2,2 \times 10^6$ e $1,6 \times 10^6$ para os grupos PUI e IC, respectivamente. Estes valores estão em conformidade com outros trabalhos que utilizaram a mesma metodologia de análise (Vianna et al., 2006; Sakamoto et al., 2007).

Observou-se redução significativa entre as coletas S1 e S2 para ambos os grupos. Enquanto no grupo PUI a média de redução foi de 99,22%, no grupo IC este valor foi de 99,67%. Diferenças estatísticas não foram observadas entre os grupos. A drástica redução na quantidade de bactérias de S1 para S2 pode ser explicada pela ação mecânica dos instrumentos reciprocantes juntamente com a ação química e de arraste da irrigação com NaOCl 2,5%. O fato da redução encontrada neste trabalho ser coerente com o resultado publicado em ensaios similares que utilizaram instrumentos rotatórios ou manuais (Sakamoto et al., 2007; Rôças; Lima; Siqueira Jr., 2013; Paiva et al., 2013) demonstra que o PQC com instrumentos Reciproc e NaOCl 2,5% foi eficaz em reduzir o conteúdo bacteriano do canal radicular.

As medianas da quantidade de bactérias observadas em S3 foram de $4,9 \times 10^3$ e $1,3 \times 10^4$, para os grupos PUI e IC, respectivamente. Considerando a quantidade observada em S1, a média de redução obtida no grupo PUI foi de 99,77%, enquanto que a média do grupo IC foi de 99,19%. Ao se comparar as reduções obtidas entre S2 e S3 a redução no grupo PUI foi de 71,18%, e no grupo IC foi de 75%. Nesta comparação, a análise estatística demonstrou a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, de forma que o grupo PUI demonstrou os melhores resultados de redução microbiana. Isto evidencia a importância da coleta realizada após o PQC (S2) quando se objetiva investigar protocolos de irrigação. Com relação à incidência de leituras positivas para DNA bacteriano nas amostras, no entanto, não foi observada diferença estatística significativa entre as técnicas.

Não há um consenso na literatura quanto a contribuição da PUI na redução de bactérias do canal radicular em comparação à irrigação convencional com seringas. Enquanto alguns trabalhos (Townsend; Maki, 2009; Harrison et al., 2010; Cachovan et al., 2013) demonstram um aumento da eficiência antimicrobiana dos procedimentos endodônticos com o uso da PUI, outros autores observaram que a ativação ultrassônica passiva não contribuiu para este aumento (Bhuva et al., 2010; Alves et al., 2011; Gründling et al., 2011). Ao se considerar apenas trabalhos *in vivo* que fizeram uso de técnicas moleculares, Paiva et al. (2012) observaram que a PUI foi tão eficaz quanto a IC na redução microbiana dos canais radiculares. Um fator que dificulta a comparação dos resultados obtidos nesta pesquisa com os resultados de outros trabalhos da literatura atual, é a grande diversidade de protocolos de irrigação utilizados. Enquanto Paiva et al. (2012) utilizaram protocolos de irrigação de 1 minuto, Beus et al. (2012) preconizou uma irrigação por 3 minutos. Em ambos os trabalhos, apesar dos grupos analisados em cada um não diferirem entre si em relação ao tempo de contato da substância com o canal radicular, as substâncias químicas utilizadas em cada protocolo variavam, acrescentando, assim, um novo fator de variação aos estudos. Nesta pesquisa, diferentemente, optou-se por utilizar os mesmos tempos de irrigação com as mesmas substâncias nos dois protocolos, assim, o único fator de variação estudado foi a ativação ultrassônica.

A alta sensibilidade da técnica de qPCR é o provável fator pelo qual não se pôde observar diferença significativa na incidência de amostras com leituras negativas. O trabalho de Beus et al. (2012) fez uso de técnicas de cultura para comparar o efeito antimicrobiano da PUI e da irrigação convencional, e observaram que as quantidades de canais com culturas negativas não diferiram entre as técnicas, corroborando os resultados encontrados no presente trabalho. Além disso, Vianna et al. (2006) analisaram a capacidade antimicrobiana do NaOCl e da CHX *in vivo*, com técnicas de cultura e qPCR, e observaram que as técnicas moleculares detectaram uma quantidade muito maior de bactérias do que as culturas, mesmo em amostras nas quais não foram observadas crescimento bacteriano.

A utilização da PUI após o PQC vem sendo recomendada devido ao seu efeito de potencializar a ação das substâncias químicas por meio de fenômenos físicos como a microcorrenteza acústica (Ahmad et al., 1987) e microcavitação (Roy et al., 1994). Estes fenômenos aumentam o arraste de matéria orgânica e inorgânica,

promovendo melhor limpeza, principalmente em áreas cujo acesso dos instrumentos endodônticos é dificultado, como istmos e canais laterais (van der Sluis et al., 2006; Rödiger et al., 2010; Paqué; Boessler; Zehnder, 2011). O turbilhonamento promovido pela microcorrenteza acústica pode ter aumentado o contato do NaOCl com micro-organismos, resultando em maior redução microbiana. Pesquisas *in vivo* que incluam somente canais com característica anatômicas que dificultem o devido debridamento mecânico durante o PQC - tais como istmos e canais com secção transversal oval – são necessários para melhor analisar os efeitos da PUI nestas condições.

Apesar do EDTA possuir uma capacidade antimicrobiana limitada, sua ação na limpeza do canal radicular pode ter auxiliado no processo de desinfecção. Nakamura et al. (2014), em pesquisa realizada em dentes extraídos, observaram que o uso alternado de ácido cítrico 15% e NaOCl 1% foi tão eficaz quanto o PQC com NaOCl 5,25% sozinho na desinfecção de canais radiculares contaminados com biofilme misto de *E.faecalis* e *C.albicans*, mostrando que a limpeza das paredes de dentina contribui com sua desinfecção. Diversos trabalhos mostram que o uso da PUI contribui com a ação das substâncias desmineralizantes, promovendo maior limpeza e redução do magma dentinário, quando comparada à IC (Kuah et al., 2009; Amato et al., 2011; Ribeiro et al. (2012). Isto resulta numa maior quantidade de túbulos dentinários desobstruídos (Goel; Tewari, 2009) e maior área de dentina livre de restos inorgânicos. Estes fatores poderiam contribuir para a ação antimicrobiana do NaOCl, uma vez que esta substância poderia entrar em contato com maior número de micro-organismos. No entanto, isto não foi capaz de promover uma maior incidência de amostras livres de DNA.

A análise das amostras S4 mostrou diminuição significativa na quantidade de bactérias em relação a S3 para ambos os grupos, enquanto no grupo PUI a redução foi de 57,14% o grupo IC resultou numa redução de 73,85%. Esta redução no número de micro-organismos está de acordo com outros trabalhos na literatura que também utilizaram o Ca(OH)_2 como medicação intracanal (Sakamoto et al., 2007; Siqueira Jr. et al., 2007a; b; Rôças; Siqueira Jr., 2011; Paiva et al., 2013) e pode ser explicada pelo seu elevado poder antimicrobiano que, em solução, dissocia-se em íons Ca^+ e OH^- , o que leva à elevação do pH do meio até níveis próximos a 11 (Pérez; Franchi; Péli, 2001; Ardesna; Qualtrough; Worthington, 2002), causando danos à membrana

citoplasmática e ao DNA bacteriano, e desnaturação de proteínas (Mohammadi; Dummer, 2011).

Observou-se, no entanto, que o Ca(OH)_2 não foi capaz de aumentar significativamente a incidência de DNA bacteriano nas amostras coletadas. Outro trabalhos que utilizaram métodos moleculares para detecção de micro-organismos após o uso do Ca(OH)_2 intracanal também demonstraram a capacidade limitada desta medicação em eliminar bactérias *in vivo* (Sakamoto et al., 2007a; b; Rôças; Siqueira, 2011; Paiva et al., 2013). Alguns micro-organismo, dentre eles o *E.faecalis*, são capazes de suportar a elevações do pH do meio em que se encontram (Evans et al., 2002). Além disso Distel et al. (2002) demonstraram que algumas bactérias podem até proliferar-se em condições de pH elevado. Outra explicação é o fato de muitas bactérias agruparem-se formando complexos biofilmes que aumentam sua resistência à antimicrobianos e diminuem sua susceptibilidade à alterações ambientais (Chávez de Paz et al., 2007). Trabalhos clínicos prospectivos de acompanhamento radiográfico devem ser realizados a fim de se aumentar a compreensão destes resultados e as implicações no sucesso do tratamento.

Não foi observada diferença significativa na redução de bactérias entre as amostras S4 e S5, o que mostra a ineficácia da re-instrumentação, após a remoção da medicação intracanal, em diminuir o conteúdo bacteriano do canal radicular. Durante a re-instrumentação, foram utilizados instrumentos endodônticos idênticos aos empregados durante o PQC, com a mesma cinemática de aplicação. Desta forma, pode-se inferir que a ação mecânica destes instrumentos sobre a dentina dos canais radiculares já instrumentados foi insuficiente para promover alterações significativas no conteúdo bacteriano intracanal. No entanto, estudos do efeitos de procedimentos antibacterianos complementares à medicação intracanal são necessários a fim de se analisar esta hipótese.

6.3 DOS RESULTADOS – ENDOTOXINAS

Endotoxinas foram observadas em todas as coletas iniciais (S1), em ambos os grupos. As medianas das quantidades de endotoxinas recuperadas em S1 foram de

59,25EU/mL e 52,5EU/mL para o grupo PUI e IC, respectivamente. Estes valores são similares aos encontrados em outros trabalhos (Martinho et al., 2010; Sousa et al., 2014).

Em ambos os grupos, as reduções na concentração de endotoxinas observadas entre a primeira e a segunda coleta foram significativas, correspondendo à 77,41% no grupo PUI e 78,86% no grupo IC, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Como observado por Marinho et al. (2012), a grande diminuição na concentração de endotoxinas do interior dos canais radiculares deve-se principalmente à ação mecânica dos instrumentos endodônticos, auxiliada pelo fluxo hidrodinâmico da irrigação com o NaOCl 2,5%, realizada após cada ciclo de instrumentação. É improvável que a natureza química da substância utilizada tenha contribuído de forma significativa para esta redução, uma vez que a ineficácia do NaOCl em neutralizar endotoxinas já foi comprovada (Buck et al., 2001; Tanomaru et al., 2003; Silva et al., 2004; Oliveira et al., 2007).

Nos dois grupos, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as coletas realizadas logo após o PQC (S2) e ao término da irrigação final (S3). Uma possível explicação é a limpeza proporcionada pelos procedimentos de irrigação com o NaOCl 2,5% e o EDTA 17%. Credita-se a diminuição da concentração destes produtos bacterianos, durante a etapa de irrigação do canal, meramente ao fluxo hidrodinâmico das substâncias químicas utilizadas, uma vez que nenhuma delas apresenta-se eficaz na inativação de endotoxinas. Sabe-se que a irrigação realizada com estas substâncias após o PQC, contribui com a limpeza das paredes dentinárias do canal radicular, pela remoção química e arraste mecânico do magma dentinário, restos orgânicos e micro-organismos, juntamente com seus subprodutos (Andrabi et al., 2013; de Deus et al., 2006). Assim, a diminuição observada pode representar a quantidade de endotoxinas removidas juntamente com esses remanescentes do PQC e endotoxinas não aderidas a nenhum substrato.

Pesquisas recentes têm mostrado a maior eficácia da irrigação ultrassônica passiva na limpeza das paredes do canal radicular (Mayers; Peters; Barbakow, 2002; van der Sluis et al., 2006; Goel; Tewari, 2009; Kuah et al., 2009; Rödig et al., 2010; Amato et al., 2011; Paqué et al., 2011; Ribeiro et al., 2012; Andrabi et al., 2013; Mancini et al., 2013) e na diminuição de micro-organismos (Harrison et al., 2010;

Townsend; Maki, 2009; Cachovan et al., 2013), quando comparada à irrigação convencional com seringas. O mesmo não pôde ser observado neste trabalho, em relação às endotoxinas. Uma possível explicação para este fato é a propriedade das endotoxinas de se aderirem aos tecidos mineralizados (Marks; Popoff, 1988). Essa ligação pode ser resistente o suficiente para resistir ao turbilhonamento das substâncias químicas causado pela microcorrenteza acústica gerada pela ativação ultrassônica. Além disso, as endotoxinas podem penetrar nos túbulos dentinários e se instalar na dentina (Horiba et al., 1990; Nissan et al., 1995; Oliveira et al., 2005), o que poderia abrigá-las do fluxo de substâncias durante a irrigação e dificultar sua remoção. Assim, apesar da PUI remover maior quantidade de matéria inorgânica do que a IC, isto pode não ter sido suficiente para resultar em diferença significativa na redução de endotoxinas.

As medianas de concentrações de endotoxinas recuperadas em S4, após o uso de Ca(OH)_2 por 14 dias, foram de 0,38EU/mL e 1,2 EU/mL para os grupos PUI e IC, respectivamente. Sendo que, em ambos os grupos, em 7 dos 20 casos analisados a concentração de endotoxinas foi inferior a 0,01EU/mL. Ao se considerar o níveis de endotoxinas observadas inicialmente (S1), as médias de redução foram de 99,36% e 97,71% para os grupos PUI e IC, respectivamente. Já ao se comparar os valores obtidos em S4 com os valores observados nas coletas realizadas imediatamente após a irrigação final (S3), as medianas de redução foram de 60,78% (PUI) e 57,03% (IC).

A redução considerável na concentração de endotoxinas em ambos os grupos, após o uso de Ca(OH)_2 é corroborada por diversos outros estudos que mostraram o potencial da pasta de Ca(OH)_2 em reduzir a quantidade de endotoxinas do interior do canal radicular. De acordo com Safavi e Nichols (1993), o Ca(OH)_2 hidrolisa a molécula de lipídio A da estrutura das endotoxinas, liberando ácidos graxos. Em outro estudo, Safavi e Nichols (1994) demonstraram que o Ca(OH)_2 inativa o potencial tóxico das endotoxinas de *P.intermedia* pela hidrólise do lipídio A em ácidos graxos e amino açúcares atóxicos. Além disso, Nelson-Filho et al. (2002), Silva et al. (2002) e Tanomaru et al. (2003) demonstraram que o uso do Ca(OH)_2 como medicação intracanal inibiu a ação de endotoxinas bacterianas na formação de lesões periapicais em dentes de cães. Da mesma forma, Xavier et al. (2013) demonstraram resultados semelhantes ao analisar o nível de endotoxinas de canais radiculares de dentes portadores de polpa mortificada em tratamentos realizados em uma ou duas sessões,

utilizando NaOCl 2,5% e CHX gel 2% como substância auxiliar ao preparo químico cirúrgico e Ca(OH)_2 por 14 dias como medicação intracanal, nos casos realizados em duas sessões. Os autores observaram que o NaOCl 2,5% e a CHX 2% demonstraram capacidades similares quanto à redução de endotoxinas, enquanto que os dentes que receberam o Ca(OH)_2 proporcionaram os menores valores de endotoxinas.

6.4 CONSIDERAÇÕES COMPLEMENTARES

O objetivo desta pesquisa clínica foi avaliar, por meio de métodos moleculares, os efeitos da irrigação ultrassônica passiva e da medicação de Ca(OH)_2 no conteúdo bacteriano e de endotoxinas de canais radiculares de dentes portadores de periodontite apical primária. Quanto ao uso da PUI sobre o conteúdo de endotoxinas, manteve-se a hipótese de nulidade, uma vez que esta técnica mostrou-se tão eficaz quanto a irrigação convencional com seringas. Já com relação à desinfecção, comprovou-se a hipótese experimental, pois a irrigação final com a PUI obteve maior redução de bactérias do que a IC. Além disso, a medicação intracanal com pasta de Ca(OH)_2 foi eficaz em reduzir o conteúdo de endotoxinas e de bactérias.

Estes dados são de extrema importância para o auxiliar o endodontista clínico no momento de se escolher a melhor abordagem terapêutica ao realizar o tratamento de seus pacientes. A terceira coleta (S3) foi realizada logo após o preparo químico-cirúrgico, momento em que o profissional pode optar em concluir o tratamento, seguindo para a obturação do canal radicular, ou realizar o tratamento em duas sessões, com a utilização de uma medicação intracanal. Ao optar pela realização do tratamento endodôntico em uma única sessão, o profissional deve ter em mente que as quantidades de endotoxinas e bactérias encontradas no interior do canal é superior ao que seria encontrado caso utilizasse uma medicação a base de Ca(OH)_2 . A relevância destes fatos, no entanto, deve ser melhor investigada por meio de pesquisas prospectivas de acompanhamento clínico e radiográfico que correlacionem a quantidade de micro-organismos e endotoxinas presentes no canal radicular no momento da obturação, ao prognóstico clínico do tratamento endodôntico.

Além disso, a PUI mostrou-se mais eficiente do que a IC em aprimorar a redução bacteriana alcançada durante o PQC, evidenciando sua importância como procedimento complementar à irrigação convencional, não apenas na limpeza dos canais radiculares, como demonstrado por outros trabalhos (Mayers; Peters; Barbakow, 2002; van der Sluis et al., 2006; Goel; Tewari, 2009; Kuah et al., 2009; Rödiger et al., 2010; Amato et al., 2011; Paqué et al., 2011; Ribeiro et al., 2012; Andrabi et al., 2013; Mancini et al., 2013), mas também na sua antissepsia. Os fenômenos acústicos gerados pela ativação sônica do inserto foram os prováveis mecanismos que proporcionaram estes resultados, incrementando os efeitos das substâncias químicas sobre o conteúdo do canal radicular após o PQC. Cabe ainda estudar *in vivo* se seus efeitos antimicrobianos são eficazes em dentes cuja anatomia demonstre regiões de difícil acesso aos instrumentos endodônticos, tais como istmos e canais com achatamento proximal.

No entanto, a ativação ultrassônica não foi capaz de potencializar a ação dos irrigantes endodônticos sobre as endotoxinas bacterianas. É provável que esta diferença entre os resultados alcançados pela PUI sobre bactérias e endotoxinas esteja relacionada à natureza das substâncias utilizadas. Como já ressaltado, tanto o NaOCl quanto o EDTA não possuem eficácia significativa sobre as endotoxinas (Buttler; Crawford, 1982; Buck et al., 2001; Tanomaru et al., 2003; Silva et al., 2004), mas o NaOCl é altamente eficaz contra bactérias (Siqueira Jr. et al., 2007a; b; Tirali et al., 2009; Basmaci et al., 2013; Nakamura et al., 2013). Assim, o uso de substâncias como o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ou polimixina B (Oliveira et al., 2005; 2007; 2012) é necessário para reduzir a quantidade de endotoxinas do canal radicular.

Desta substâncias, o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ já é rotineiramente utilizado na endodontia. Sua eficácia, no entanto, está relacionada ao seu tempo de permanência no canal radicular (Pérez; Franchi; Péli, 2001; Ardeshtna; Qualtrough; Worthington, 2002; Mohammadi; Dummer, 2011). Alguns estudos tem sido realizados no intuito de diminuir o tempo necessário para que ocorra a elevação do pH na dentina. Duarte et al. (2012) avaliaram as alterações de pH e concentração de íons Ca^{+} em cavidades que simulavam reabsorções externas em 46 dentes bovinos medicados com 2 diferentes pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Em metade dos espécimes, a medicação foi submetida a ativação ultrassônica logo após a sua inserção. Após os períodos de 7, 14 e 30 dias, observou-se que o pH das raízes submetidas à ativação ultrassônica elevou-se

significativamente mais do que nas não ativadas, independentemente da formulação da medicação. Oliveira et al. (2007) avaliaram os efeitos de diferentes irrigantes endodônticos sobre a quantidade de endotoxinas em canais radiculares em dentes humanos unirradiculares extraídos, por meio do teste de LAL e produção de IgM em culturas de macrófagos. Entre estes irrigantes, uma solução aquosa de hidróxido de cálcio 0,14% (água de cal) foi utilizada, e demonstrou-se tão eficaz quanto a polimixina B na redução de endotoxinas. Assim, é oportuna a realização de pesquisas *in vivo* com PUI e água de cal, no intuito de investigar se esta associação seria capaz de promover redução significativa de endotoxinas imediatamente após o PQC.

Cada etapa da terapia endodôntica foi capaz de diminuir os níveis de bactérias e endotoxinas em relação à etapa anterior do tratamento, independentemente do grupo analisado. Isto mostra a importância da correta execução de todos os procedimentos endodônticos, sem dar excessiva ênfase a alguma conduta específica. Ainda assim, mesmo com a utilização da PUI, quantidades significativas de micro-organismos e subprodutos podem permanecer no interior dos canais radiculares. Embora os níveis mínimos de remanescentes microbianos nos canais radiculares que possibilitem a cura ou a manutenção da saúde perirradicular sejam desconhecidos, não se deve ignorar que, mesmo com a permanência de micro-organismos no canal radicular após a correta execução do tratamento endodôntico, o índice de sucesso da é relativamente alto, chegando a alcançar patamares de 80% a 94% (Torabinejad et al., 2007, Ng et al., 2011, Ricucci et al., 2011), o que evidencia a eficácia e previsibilidade do tratamento endodôntico atual. Mesmo assim, esforços devem ser realizados no intuito de desenvolver pesquisas que visem estipular os níveis mínimos aceitáveis de infectantes no canal radicular e procedimentos para tornar a terapia endodôntica ainda mais segura e eficaz.

7 CONCLUSÕES

Diante de todos os resultados obtidos e análises realizadas, e dentro das perspectivas e limitações das metodologias utilizadas, conclui-se, a respeito da utilização da irrigação ultrassônica passiva e medicação intracanal de hidróxido de cálcio na redução de bactérias e endotoxinas de canais radiculares de dentes com periodontite apical, que:

- a irrigação ultrassônica passiva não foi mais eficaz do que a irrigação convencional em reduzir a quantidade de endotoxinas do interior dos canais radiculares;
- a complementação dos procedimentos de antissepsia do canal radicular com o uso de irrigação ultrassônica passiva foi mais eficaz do que a irrigação convencional com seringas em reduzir a quantidade de bactérias dos canais radiculares;
- com relação à incidência de amostras livres de DNA bacteriano após o preparo químico-cirúrgico, a irrigação ultrassônica passiva foi tão eficaz quanto a irrigação convencional;
- cada etapa do tratamento endodôntico foi eficaz em aprimorar a redução de bactérias e endotoxinas dos canais radiculares alcançada durante a etapa anterior.

REFERÊNCIAS¹

Ahmad M, Pitt Ford TJ, Crum LA. Ultrasonic debridement of root canals: an insight into the mechanisms involved. *J Endod*. 1987 Mar;13(3):93-101.

Alves FR, Almeida BM, Neves MA, Moreno JO, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Disinfecting oval-shaped root canals: effectiveness of different supplementary approaches. *J Endod*. 2011 Apr;37(4):496-501.

Alves FR, Rôças IN, Almeida BM, Neves MA, Zoffoli J, Siqueira JF Jr. Quantitative molecular and culture analyses of bacterial elimination in oval-shaped root canals by a single-file instrumentation technique. *Int Endod J*. 2012 Sep;45(9):871-7.

Amato M, Vanoni-Heineken I, Hecker H, Weiger R. Curved versus straight root canals: the benefit of activated irrigation techniques on dentin debris removal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Apr;111(4):529-34.

Andrabi SM, Kumar A, Mishra SK, Tewari RK, Alam S, Siddiqui S. Effect of manual dynamic activation on smear layer removal efficacy of ethylenediaminetetraacetic acid and SmearClear: an in vitro scanning electron microscopic study. *Aust Endod J*. 2013 Dec;39(3):131-6.

Ardeshtna SM, Qualtrough AJ, Worthington HV. An in vitro comparison of pH changes in root dentine following canal dressing with calcium hydroxide points and a conventional calcium hydroxide paste. *Int Endod J*. 2002 Mar;35(3):239-44.

Basmaci F, Oztan MD, Kiyan M. Ex vivo evaluation of various instrumentation techniques and irrigants in reducing *E. faecalis* within root canals. *Int Endod J*. 2013 Sep;46(9):823-30.

Beus C, Safavi K, Stratton J, Kaufman B. Comparison of the effect of two endodontic irrigation protocols on the elimination of bacteria from root canal system: a prospective, randomized clinical trial. *J Endod*. 2012 Nov;38(11):1479-83.

Bhuva B, Patel S, Wilson R, Niazi S, Beighton D, Mannocci F. The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intraradicular *Enterococcus faecalis* biofilms in extracted single-rooted human teeth. *Int Endod J*. 2010 Mar;43(3):241-50.

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

Boutsioukis, Verhaagen, Versluis, Kastrinakis, Wesselink, van der Sluis. Evaluation of irrigant flow in the root canal using different needle types by an unsteady computational fluid dynamics model. *J Endod*. 2010 May;36(5):875-9.

Buck RA, Cai J, Eleazer PD, Staat RH, Hurst HE. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. *J Endod*. 2001 May;27(5):325-7.

Cachovan G, Schiffner U, Altenhof S, Guentsch A, Pfister W, Eick S. Comparative antibacterial efficacies of hydrodynamic and ultrasonic irrigation systems in vitro. *J Endod*. 2013 Sep;39(9):1171-5.

Dahlén G, Hofstad T. Endotoxic activities of lipopolysaccharides of microorganisms isolated from an infected root canal in *Macaca cynomolgus*. *Scand J Dent Res*. 1977 May;85(4):272-8.

De-Deus G, Paciornik S, Mauricio MH. Evaluation of the effect of EDTA, EDTAC and citric acid on the microhardness of root dentine. *Int Endod J*. 2006 May;39(5):401-7.

Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod*. 2002 Oct;28(10):689-93.

Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Dahlén G, Svensäter G. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. *Int Endod J*. 2007 May;40(5):344-55.

Dahlén G, Bergenholtz G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *J Dent Res*. 1980 Jun;59(6):1033-40.

Duarte MA, Balan NV, Zeferino MA, et al. Effect of ultrasonic activation on pH and calcium released by calcium hydroxide pastes in simulated external root resorption. *J Endod*. 2012 Jun;38(6):834-7.

Endo MS, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Oct;31(10):2575-83.

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2002 Mar;35(3):221-8.

Gavini G, Caldeira CL, Akisue E, Candeiro GT, Kawakami DA. Resistance to flexural fatigue of Reciproc R25 files under continuous rotation and reciprocating movement. *J Endod*. 2012 May;38(5):684-7.

Goel S, Tewari S. Smear layer removal with passive ultrasonic irrigation and the NaviTip FX: a scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Sep;108(3):465-70.

Gründling GL, Zechin JG, Jardim WM, de Oliveira SD, de Figueiredo JA. Effect of ultrasonics on *Enterococcus faecalis* biofilm in a bovine tooth model. *J Endod*. 2011 Aug;37(8):1128-33.

Guerreiro-Tanomaru JM, Loiola LE, Morgental RD, Leonardo R de T, Tanomaru-Filho M. Efficacy of four irrigation needles in cleaning the apical third of root canals. *Braz Dent J*. 2013;24(1):21-4.

Hagman DE. Sterilization. In: Allen LV. Remington: The science and practice of pharmacy, 22nd ed. Philadelphia, PA: Pharmaceutical Press, pp. 776-802.

Harrison AJ, Chivatxaranukul P, Parashos P, Messer HH. The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals. *Int Endod J*. 2010 Nov;43(11):968-77.

Hong CY, Lin SK, Kok SH, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med*. 2004 Mar;33(3):162-9.

Horiba N, Maekawa Y, Matsumoto T, Nakamura H. A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. *J Endod*. 1990 Jul;16(7):331-4.

Kuah HG, Lui JN, Tseng PS, Chen NN. The effect of EDTA with and without ultrasonics on removal of the smear layer. *J Endod*. 2009 Mar;35(3):393-6.

Machado ME, Nabeshima CK, Leonardo MF, Reis FA, Britto ML, Cai S. Influence of reciprocating single-file and rotary instrumentation on bacterial reduction on infected root canals. *Int Endod J*. 2013 Nov;46(11):1083-7.

Mancini M, Cerroni L, Iorio L, Armellini E, Conte G, Cianconi L. Smear layer removal and canal cleanliness using different irrigation systems (EndoActivator, EndoVac, and passive ultrasonic irrigation): field emission scanning electron microscopic evaluation in an in vitro study. *J Endod*. 2013 Nov;39(11):1456-60.

Marinho AC, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP. Influence of the apical enlargement size on the endotoxin level reduction of dental root canals. *J Appl Oral Sci.* 2012 Nov-Dec;20(6):661-6.

Marks SC Jr, Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat.* 1988 Sep;183(1):1-44.

Martinho FC, Chiesa WM, Marinho AC, et al. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. *J Endod.* 2010 Nov;36(11):1766-9.

Martinho FC, Chiesa WM, Zaia AA, et al. Comparison of endotoxin levels in previous studies on primary endodontic infections. *J Endod.* 2011 Feb;37(2):163-7.

Martinho FC, Gomes AP, Fernandes AM, et al. Clinical Comparison of the Effectiveness of Single-file Reciprocating Systems and Rotary Systems for Removal of Endotoxins and Cultivable Bacteria from Primarily Infected Root Canals. *J Endod.* 2014 May;40(5):625-9.

Mattison GD, Haddix JE, Kehoe JC, Progulski-Fox A. The effect of *Eikenella corrodens* endotoxin on periapical bone. *J Endod.* 1987 Dec;13(12):559-65.

Mayer BE, Peters OA, Barbakow F. Effects of rotary instruments and ultrasonic irrigation on debris and smear layer scores: a scanning electron microscopic study. *Int Endod J.* 2002 Jul;35(7):582-9.

Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J.* 2011 Aug;44(8):697-730.

Munley PJ, Goodell GG. Comparison of passive ultrasonic debridement between fluted and nonfluted instruments in root canals. *J Endod.* 2007 May;33(5):578-80.

Nakamura VC, Cai S, Candeiro GT, Ferrari PH, Caldeira CL, Gavini G. Ex vivo evaluation of the effects of several root canal preparation techniques and irrigation regimens on a mixed microbial infection. *Int Endod J.* 2013 Mar;46(3):217-24.

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

Ng YL, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part 1: periapical health. *Int Endod J*. 2011 Jul;44(7):583-609. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01872.x. Epub 2011 Mar 2.

Nissan R, Segal H, Pashley D, Stevens R, Trowbridge H. Ability of bacterial endotoxin to diffuse through human dentin. *J Endod*. 1995 Feb;21(2):62-4.

Oliveira LD, Carvalho CA, Valera MC, Koga-Ito CY, Jorge AO. Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules. *Braz Oral Res*. 2005 Jan-Mar;19(1):5-10.

Oliveira LD, Leão MV, Carvalho CA, et al. In vitro effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. *J Dent*. 2005 Feb;33(2):107-14.

Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Valera MC. In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Jul;104(1):135-42.

Oliveira LD, Carvalho CA, Carvalho AS, Alves JS, Valera MC, Jorge AO. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. *J Endod*. 2012 Aug;38(8):1053-7.

Paiva SS, Siqueira JF Jr, Rôças IN, et al. Molecular microbiological evaluation of passive ultrasonic activation as a supplementary disinfecting step: a clinical study. *J Endod*. 2013 Feb;39(2):190-4.

Paiva SS, Siqueira JF Jr, Rôças IN, et al. Supplementing the antimicrobial effects of chemomechanical debridement with either passive ultrasonic irrigation or a final rinse with chlorhexidine: a clinical study. *J Endod*. 2012 Sep;38(9):1202-6.

Paqué F, Boessler C, Zehnder M. Accumulated hard tissue debris levels in mesial roots of mandibular molars after sequential irrigation steps. *Int Endod J*. 2011 Feb;44(2):148-53.

Pérez F, Franchi M, Péli JF. Effect of calcium hydroxide form and placement on root dentine pH. *Int Endod J*. 2001 Sep;34(6):417-23.

Ribeiro EM, Silva-Sousa YT, Souza-Gabriel AE, Sousa-Neto MD, Lorencetti KT, Silva SR. Debris and smear removal in flattened root canals after use of different irrigant agitation protocols. *Microsc Res Tech*. 2012 Jun;75(6):781-90.

Ricucci D, Russo J, Rutberg M, Burleson JA, Spångberg LS. A prospective cohort study of endodontic treatments of 1,369 root canals: results after 5 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011 Dec;112(6):825-42.

Rôças IN, Lima KC, Siqueira JF Jr. Reduction in bacterial counts in infected root canals after rotary or hand nickel-titanium instrumentation--a clinical study. *Int Endod J.* 2013 Jul;46(7):681-7.

Rôças IN, Siqueira JF Jr. In vivo antimicrobial effects of endodontic treatment procedures as assessed by molecular microbiologic techniques. *J Endod.* 2011 Mar;37(3):304-10.

Rödig T, Bozkurt M, Konietzschke F, Hülsmann M. Comparison of the Vibringe system with syringe and passive ultrasonic irrigation in removing debris from simulated root canal irregularities. *J Endod.* 2010 Aug;36(8):1410-3.

Roy RA, Ahmad M, Crum LA. Physical mechanisms governing the hydrodynamic response of an oscillating ultrasonic file. *Int Endod J.* 1994 Jul;27(4):197-207.

Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J Endod.* 1994 Mar;20(3):127-9.

Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod.* 1993 Feb;19(2):76-8.

Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol.* 2007 Feb;22(1):19-23.

Shen Y, Gao Y, Qian W, et al.. Three-dimensional numeric simulation of root canal irrigant flow with different irrigation needles. *J Endod.* 2010 May;36(5):884-9.

Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. 1975. *J Endod.* 2006 Apr;32(4):293-5.

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

Silva LA, Leonardo MR, Assed S, Tanomaru Filho M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. *Braz Dent J*. 2004;15(2):109-14.

Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod*. 1998 Jun;24(6):414-6.

Siqueira JF Jr, Guimarães-Pinto T, Rôças IN. Effects of chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite and intracanal medication with calcium hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals. *J Endod*. 2007a Jul;33(7):800-5.

Siqueira JF Jr, Magalhães KM, Rôças IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *J Endod*. 2007b Jun;33(6):667-72.

Sousa EL, Martinho FC, Nascimento GG, Leite FR, Gomes BP. Quantification of endotoxins in infected root canals and acute apical abscess exudates: monitoring the effectiveness of root canal procedures in the reduction of endotoxins. *J Endod*. 2014 Feb;40(2):177-81.

Sullivan JD Jr, Watson SW. Purification and properties of the clotting enzyme from *Limulus* lysate. *Biochem Biophys Res Commun*. 1975 Sep 16;66(2):848-55.

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

Tirali RE, Turan Y, Akal N, Karahan ZC. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of NaOCl and Octenisept in elimination of endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Nov;108(5):117-20.

Torabinejad M, Anderson P, Bader J, Brown LJ, Chen LH, Goodacre CJ, Kattadiyil MT, Kutsenko D, Lozada J, Patel R, Petersen F, Puterman I, White SN. Outcomes of root canal treatment and restoration, implant-supported single crowns, fixed partial dentures, and extraction without replacement: a systematic review. *J Prosthet Dent*. 2007 Oct;98(4):285-311.

Townsend C, Maki J. An in vitro comparison of new irrigation and agitation techniques to ultrasonic agitation in removing bacteria from a simulated root canal. *J Endod*. 2009 Jul;35(7):1040-3.

van der Sluis LW, Gambarini G, Wu MK, Wesselink PR. The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation. *Int Endod J*. 2006 Jun;39(6):472-6.

van der Sluis LW, Wu MK, Wesselink PR. A comparison between a smooth wire and a K-file in removing artificially placed dentine debris from root canals in resin blocks during ultrasonic irrigation. *Int Endod J*. 2005 Sep;38(9):593-6.

Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J*. 2006 Jun;39(6):484-92.

Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Dec;22(6):411-8.

Wildfeuer A, Heymer B, Schleifer KH, Haferkamp O. Investigations on the specificity of the Limulus test for the detection of endotoxin. *Appl Microbiol*. 1974 Nov;28(5):867-71.

Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J Endod*. 2006 Aug;32(8):715-21.

Xavier AC, Martinho FC, Chung A, et al. One-visit versus two-visit root canal treatment: effectiveness in the removal of endotoxins and cultivable bacteria. *J Endod*. 2013 Aug;39(8):959-64.

Young G, Turner S, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Bacterial DNA persists for extended periods after cell death. *J Endod*. 2007 Dec;33(12):1417-20.

APÊNDICE A – Termo de esclarecimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: INFLUÊNCIA DA IRRIGAÇÃO ULTRASSÔNICA PASSIVA NA REDUÇÃO DE BACTÉRIAS E ENDOTOXINAS DOS CANAIS RADICULARES: UM ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Giulio Gavini

Equipe de pesquisa: Profa. Dra. Ericka T. Pinheiro, Prof. Ms. Vítor C. Nakamura

Instituição/Departamento: Faculdade de Odontologia da Universidade São Paulo – Departamento de Dentística

Telefone para contato: (11) 3091-7839 / (11) 94149-3250

Local da coleta de dados: Clínica Odontológica da FOU SP

O objetivo dessa pesquisa é comparar duas diferentes técnicas de irrigação quanto à diminuição de bactérias e endotoxinas do canal radicular. Para isso, serão tratados dentes que apresentam infecção do canal radicular. Durante o tratamento, será utilizada uma das seguintes técnicas de irrigação do canal: 1 – será utilizada uma seringa plástica descartável e pontas metálicas para irrigar o canal; 2 – também será utilizada uma seringa plástica descartável e pontas metálicas, mas, além disso, a substância dentro do canal será agitada com ajuda de um ultrassom. É importante ressaltar que estas duas técnicas já se mostraram eficientes na redução de bactérias do canal radicular em estudos já realizados, e são rotineiramente utilizados nos consultórios odontológicos para o tratamento de canal. Durante o tratamento, o pesquisador irá coletar amostras do conteúdo do canal. Ao término da primeira sessão do tratamento, o pesquisador irá colocar uma medicação de hidróxido de cálcio no interior do canal para aumentar a desinfecção proporcionada. Depois de duas semanas, o tratamento endodôntico será concluído e o dente restaurado. Caso necessário, o paciente será encaminhado para outras disciplinas para que possam ser realizados outros tratamentos. O tratamento será feito com anestesia para conforto do paciente, e serão realizadas apenas as radiografias necessárias para a realização do tratamento. O paciente terá o benefício direto do tratamento de canal realizado com diminuição da infecção do dente, garantindo melhor saúde bucal.

As informações obtidas na pesquisa são sigilosas e apenas para este estudo, e a identidade do paciente não será divulgada. O paciente tem o direito de saber informações durante o andamento da pesquisa que serão dadas pelo dentista. O paciente pode desistir em qualquer momento de participar da pesquisa sem prejuízos no tratamento que vinha recebendo. O paciente não terá qualquer despesa de tratamento de canal realizada, nem ajuda financeira para a realização da pesquisa. O dentista responsável, Vítor Cesar Nakamura, poderá ser encontrado no telefone (11) 3258-3963, ou na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária, São Paulo, SP – CEP. 05508-000 – Fone:(11) 3091-7960).

Após ler estas informações e de ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelo pesquisador concordo em participar de forma voluntária neste estudo.

Nome: _____

Endereço: _____

RG _____ tel. _____

São Paulo, _____ de _____ de 20____.

_____	_____
PACIENTE	PESQUISADOR

APÊNDICE B – Protocolo de desinfecção do campo operatório

- Após a anestesia do dente, proceder com o isolamento absoluto com grampo metálico e barreira gengival
- Com uma broca esférica diamantada, esterilizada e apirogênica, montada em motor de alta-rotação, remover todo o material restaurador (definitivo e temporário), tecido cariado, e esmalte sem suporte de dentina, **evitando trepanar a câmara pulpar**. Utilizar apenas irrigação com soro fisiológico esterilizado através de seringa descartável
- Com um swab esterilizado, realizar a desinfecção do campo operatório com água oxigenada 30% de forma excêntrica, iniciando pela coroa dentária em direção ao arco de isolamento
- Com outro swab esterilizado, proceder, da mesma forma, com a desinfecção com NaOCl 2,5%
- Concluir a cirurgia de acesso com novas brocas esterilizadas e soro fisiológico
- Realizar nova desinfecção do campo com swabs esterilizados, água oxigenada 30% e NaOCl 2,5%
- Neutralizar o NaOCl com um swab embebido em tiosulfato de sódio 5% por um minuto
- Com um cone de papel esterilizado, coletar uma amostra da parede interna da cirurgia de acesso, atentando para não introduzir o cone na câmara pulpar (controle de assepsia do campo operatório).

APÊNDICE C – Procedimentos de coletas de bactérias e endotoxinas do canal radicular

- Com auxílio de seringa descartável e agulha endodôntica de 30G Endo-EZE (Ultradent Products Inc), preencher o canal radicular com soro fisiológico esterilizado e apirogênico
- Aspirar a solução da câmara pulpar, mantendo somente a solução no interior do canal radicular
- Introduzir um instrumento tipo H número 15 até o CRT e, com movimentos suaves de limagem contra as paredes, suspender o conteúdo microbiano da dentina na solução
- Com auxílio de uma pinça hemostática, fraturar a lima entre a parte ativa e a porção intermediária
- Depositar a parte ativa da lima em um microtubo de 1,5mL contendo solução de transporte RNA later
- Introduzir um cone de papel número 15 até o CRT, mantendo-o em posição por um minuto
- Depositar este cone em um tubo de vidro esterilizado e apirogênico, com tampa, apropriado para a coleta de endotoxinas
- Repetir o procedimento de coleta com 5 novos cones de papel, mantendo-os individualmente no CRT por 1 minuto cada
- Depositar estes cones no mesmo microtubo no qual foi depositada a parte ativa da lima

OBSERVAÇÃO: nas coletas realizadas após o uso de alguma substância química, deve-se neutralizar a substância e secar o canal antes de se proceder com os procedimentos de coleta.

APÊNDICE D – Procedimentos laboratoriais

1 EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO

- Manter os microtubos contendo as amostras no gelo até o completo descongelamento do meio de transporte
- Homogeneizar cada amostra em agitador de vortex durante 1min a fim de desprender a maior quantidade possível de bactérias na solução
- Centrifugar as amostras em centrífuga refrigerada a 4°C e 13.000RPM por 10min
- Em um tubo tipo Falcon de 15mL estéril, preparar uma mistura de 300µL de Tissue e Cell Lysis (MasterPure DNA purification kit - Epicentre) e 2µL de Proteinase K (Life Technologies Corp), **em volume necessário para a quantidade de amostras a ser analisada, com sobra** (MIX-1)
- Remover as amostras da centrífuga e, com auxílio de pipetas de 1000µL, descartar o sobrenadante mantendo o pellet
- Adicionar 300µL do MIX-1 a cada amostra
- Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 10s
- Aquecer as amostras em banho-Maria a 65°C por 15 min, misturando-as em agitador de vortex por 10s a cada 5min
- Esfriar as amostras em gelo por 5min
- Adicionar 150µL de MPC Protein precipitation reagent (MasterPure DNA purification kit - Epicentre) a cada amostra
- Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 10s
- Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 10min
- Transferir o sobrenadante para microtubos de 1,5mL, esterilizados e devidamente identificados, e descartar o microtubo contendo o pellet
- Adicionar mais 25µL de MPC Protein precipitation reagent a cada amostra
- Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 10s
- Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 10min
- Transferir o novo sobrenadante para novos microtubos de 1,5mL, esterilizados e devidamente identificados, e descartar o microtubo contendo o pellet
- Adicionar 500µL de isopropanol 100% a cada microtubo e invertê-los 30/40 vezes
- Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 10min
- Descartar o isopropanol, com pipetas e ponteiras de 1000µL, atentando para não remover o pellet
- Acrescentar 500µL de etanol 70% ao pellet
- Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 10s
- Centrifugar a 4°C e 13.000RPM por 5min

- Retirar parte do etanol 70%, deixando apenas cerca de 50µL no fundo do microtubo
- Centrifugar novamente a 4°C e 13.000RPM por 5min
- Remover totalmente o etanol 70% com ponteiras de 200µL
- Manter os tubos abertos em temperatura ambiente para evaporar o remanescente de etanol
- Adicionar 35µL de TEBuffer (Life Technologies Corp) em cada amostra
- Hidratar as amostras, mantendo-as no gelo ou, preferencialmente, no termomixer (Eppendorf, Hauppauge, NY, EUA) a 4°C por 10 minutos
- Analisar a concentração de ácidos nucleicos no espectrofotômetro (NanoDrop 1000 – Thermo Fisher Scientific).

2 PCR CONVENCIONAL

A reação descrita a seguir foi padronizada para detecção de DNA bacteriano com uso de primers universais específicos para o domínio *Bacteria*. O volume total de cada reação é de 50µL, sendo o tamanho do produto de amplificação de 1500pb. Os primers utilizados foram baseados no trabalho de Shelburne et al (2000), na concentração de 0,4mM, sendo: *Forward*: 5'-CCA TGA AGT CGG AAT CGC TAG -3' e *Reverse*: 5'-GCT TGA CGG GCG GTG T-3'.

Para evitar contaminação das amostras de DNA, todos os procedimentos foram realizados em câmaras de fluxo laminar específicos para realização de PCR. Todos os materiais utilizados, com exceção dos tubos contendo as amostras e os reagentes, foram abertos dentro da câmara e permaneceram em seu interior durante o processo de desinfecção com luz ultravioleta.

- Manter os tubos contendo as amostras em gelo até o completo descongelamento da solução
- Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 15s
- Centrifugar as amostras por **5 segundos** em 1200RPM para coletá-las no fundo do microtubo
- Em uma estante resfriada para PCR, posicionar microtubos de 200µL, em número suficiente para a quantidade de amostras, controle positivo e controle negativo da reação, identificando-os devidamente
- Em um microtubo de 1,5mL realizar uma mistura (MIX-2), **com volume suficiente para todas as amostras, controles positivo e negativo** da reação, dos seguintes reagentes nas respectivas proporções:
 - PCR Buffer (Life Technologies Corp)..... 5µL
 - Mg₂ para PCR (Life Technologies Corp)..... 1,5µL
 - dNTP de trabalho (2,5mM; Life Technologies Corp) 4µL
 - Taq polimerase (Life Technologies Corp) 0,5µL
 - Ultrapure water 36µL
 - Primer universal *Forward* (Exxtend, Paulínia, SP, Brasil) 1µL

- Primer universal *Reverse* (Exxtend, Paulínia, SP, Brasil) 1µL
- Depositar 49µL do MIX-2 em cada microtubo de 200µL
- Adicionar 1µL de cada amostra no respectivo microtubo
- Adicionar 1µL da amostra de DNA correspondente ao controle positivo no respectivo microtubo
- No tubo a ser utilizado como controle negativo, adicionar 1µL de Ultrapure water.

2.1 AMPLIFICAÇÃO DO DNA EM TERMOCICLADOR

- Homogeneizar as soluções nos tubos para PCR em mini-centrífuga por 2s
- Posicionar as microtubos no termociclador (T-100 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA) e programar a corrida conforme descrito:
 - Etapa de denaturação – 95°C por 2 min
 - 36 ciclos de C95°C por 30s, 60°C por 1min, e 72°C por 1min
 - Extensão final a 72°C por 10min

2.2 ELETROFORE EM GEL DE AGAROSE

- Em um Becker contendo 80mL de tampão TAE 1X (0,8mL de TAE 50X + 39,2mL de H₂O), acrescentar 0,56g de agarose
- Levar ao micro-ondas por aproximadamente 45s, misturando a cada 20s sem levantar fervura
- Aguardar esfriar um pouco e acrescentar 4µL de GelRed (Biotium Inc, Haiyward, CA, USA)
- Despejar o gel de agarose ainda líquido em um suporte para eletroforese grande e posicionar o pente com o tamanho de casas apropriado
- Aguardar o líquido geleificar (aproximadamente 15 minutos)
- Remover o pente, e posiciona o suporte na cuba de eletroforese (BioRad Laboratories Inc.), com as casas voltada para o pólo negativo (fio preto)
- Encher a bandeja, cobrindo totalmente a placa de gel, com a solução de corrida (TAE 1X)
- Em um papel plastificado, depositar gotas de 2µL de tampão de corrida (Loading buffer), em quantidade igual ao número de amostras, incluindo os controles positivo e negativo, mais um, que será utilizado como marcador da eletroforese
- Misturar 5µL de marcador Mass Ladder 1kb (Life Technologies) à uma gota de corante e, com a mesma ponteira, levar a solução misturada à primeira casa da placa de gel de agarose
- Repetir o passo anterior para cada amostra, substituindo o marcador por 5µL de amostra
- Fechar a bandeja e conectá-la ao aparelho;

- Ligar o aparelho, ajustando a voltagem em 80V e 200mA e o timer em 40 minutos. Após a corrida, proceder com a leitura e documentação fotográfica do gel em luz ultravioleta.

3 PCR EM TEMPO REAL

Para evitar contaminação das amostras de DNA, todos os procedimentos devem ser realizados em câmaras de fluxo laminar específicos para realização de PCR. Todos os materiais utilizados, com exceção dos tubos contendo as amostras e os reagentes, deverão ser abertos dentro da câmara e permanecer em seu interior durante o processo de desinfecção com luz ultravioleta. Os procedimentos devem ser realizados com luvas sem talco para não comprometer a reação. Devem ser utilizadas apenas ponteiras com filtro, adquiridas em racks esterilizados e livres de DNases e RNases, assim como os microtubos.

3.1 PREPARO DA CURVA PADRÃO

Realizar diluições seriadas (1/10) de 10^7 a 10^0 a partir de uma solução “mãe” contendo plasmídios bacterianos em uma concentração de 10^8 cópias por μL . Ao calcular a quantidade necessária para o experimento, atentar para o fato de que em cada corrida do qPCR será utilizado $6\mu\text{L}$ de cada concentração.

3.2 PREPARO DA REAÇÃO

A reação descrita a seguir foi padronizada para quantificação de cópias de DNA bacteriano com uso de primers universais específicos para o domínio *Bacteria*. O volume total de cada reação é de $20\mu\text{L}$. Os primers utilizados foram baseados no trabalho de Shelburne et al (2000), na concentração de $0,1\text{mM}$, sendo: *Forward*: 5'-CCA TGA AGT CGG AAT CGC TAG -3' e *Reverse*: 5'-GCT TGA CGG GCG GTG T-3'. Todas as leituras, incluindo a curva padrão, devem ser realizadas em triplicata.

- Manter os microtubos contendo as amostras de DNA e as diluições da curva padrão em gelo até seu completo descongelamento
- Homogeneizar as amostras em agitador de vortex por 10s
- Levar à centrifuga por alguns segundos (somente o necessário para coletar todo o líquido no fundo do tubo)

- Em uma placa de qPCR de 96 poços, distribuir 2µL de cada amostra clínica, as amostras da curva padrão e o controle negativo da reação (DNase/RNase free Ultrapure distilled water) conforme a Figura 1
- Em microtubos de 1,5mL, preparar a seguinte reação (MIX-3), **em volume suficiente para as triplicatas de todas as amostras, curva padrão e controle negativo, com sobra:**
 - o Power SybrGreen PCR Master Mix (Life Technologies Corp)..... 10µL
 - o Primer universal *Forward* (Exxtend, Paulínia, SP, Brasil) 0,5µL
 - o Primer universal *Reverse* (Exxtend, Paulínia, SP, Brasil) 0,5µL
 - o Ultrapure water 7µL
- Distribuir 18µL do MIX-3 em cada poço
- Aplicar o adesivo ótico (MicroAmp Optical adhesive Film, Life Technologies), cobrindo todos os poços
- Levar a placa à centrífuga a 1200RPM por 1 minuto, em temperatura ambiente
- Posicionar a placa no termociclador Step One Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e programar a reação.

4 TESTE CINÉTICO TURBIDIMÉTRICO DE LAL

O teste cinético turbidimétrico de LAL foi realizado com o Kit de quantificação de endotoxinas Pyrogen 5000 (Lonza Group Ltd, Walkersville, MD, USA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante:

- Suspende as amostras de endotoxinas, nos próprios tubos de vidro que as contêm, em 1mL de água apirogênica (Lonza Group Ltd)
- Levar em banho Maria à 70°C por 10 minutos
- Em tubos de ensaio apirogênicos, fazer diluições (1/10) conforme as amostras a serem analisadas. Quanto mais endotoxinas, maior a quantidade de diluições necessárias
- Reconstituir a endotoxina padrão (Lonza Group Ltd) com água apirogênica na quantidade proposta pelo fabricante (atentar que cada lote de endotoxina necessita de uma quantidade específica de água para a devida reconstituição, a concentração de endotoxinas desta solução mãe é de 100EU/mL)
- Homogeneizar a endotoxina padrão por 15min no agitador de vortex
- Fazer diluições (1/10), na quantidade de 1mL, nas concentrações de 10, 1, 0,1 e 0,01EU/mL
- Em uma placa de ELISA de 96 poços, distribuir, em quadruplicatas, nos volumes de 100µL cada, o branco da reação (água apirogênica), diluições da curva padrão, e as amostras

- Incubar a placa no leitor de ELISA (ELX808LBS Absorbance Plate Reader – Lonza Group Ltd) por 10min a 37°C
- Reconstituir o LAL com a soluções tampão (LONZA Group Ltd)
- Despejar o LAL reconstituído em uma cuba para pipetador multicanal
- Remover a placa do leitor e, com um pipetador multicanal, contaminar os poços a serem analisados com 100µL do LAL reconstituído
- Posicionar a placa novamente no leitor e iniciar a corrida (tempo aproximado de 45 minutos).

APÊNDICE E – Tabelas de resultados indivíduos por grupo

Tabela 1 – Características individuais e níveis de DNA bacteriano e de endotoxinas dos dentes do grupo PUI

Paciente	Dente	Técnica de irrigação	Idade	Sexo	Diâmetro final	Bactérias					Endotoxinas (EU/mL)			
						S1	S2	S3	S4	S5	S1	S2	S3	S4
P4	24	PUI	35	FEMININO	40	854173	451428	22225	13912	13616	68.6	30.6	0	0
P5	13	PUI	43	FEMININO	40	1448097	135393	5001	0	0	83	12.2	6.87	3.29
P6	44	PUI	38	MASCULINO	40	3759639	567385	9847	3768	4095	72.7	8.6	9.96	1.8
P7	22	PUI	30	FEMININO	50	7606968	10265	11173	3467	4408	49.7	17.2	13.2	1.87
P12	24	PUI	61	FEMININO	40	32938292	0	0	0	0	22.3	15.2	0.78	0
P14	15	PUI	57	FEMININO	40	620042	14089	10924	4033	3144	115	27.9	19.4	7.96
P15	12	PUI	56	FEMININO	40	1866639	0	0	0	0	10.6	10.6	0	0
P16	11	PUI	55	FEMININO	50	1494057	7087	0	0	0	10	14.3	3.4	0.42
P20	36	PUI	18	FEMININO	50	1878812	26417	13411	5146	2186	75.9	24.6	3.1	7.31
P21	25	PUI	18	FEMININO	40	4231754	13378	7328	5855	4296	14	12.5	4.4	0
P26	34	PUI	34	FEMININO	40	10048189	8660	0	0	0	77	12.5	10	0.34
P27	11	PUI	31	MASCULINO	50	2881	60072	7962	4791	1777	78.6	17.6	11.3	9.3
P28	21	PUI	63	FEMININO	50	116066	285577	6467	6059	2144	16.1	10.8	18	3.37
P29	41	PUI	31	MASCULINO	40	10768250	0	0	0	0	49.9	18.5	8.4	0
P30	41	PUI	63	FEMININO	50	11675759	216136	0	0	0	14	13.1	9.2	0
P31	15	PUI	34	FEMININO	40	37065	0	0	0	0	13	0.05	0	0
P34	25	PUI	21	FEMININO	50	986772	20757	4787	2386	1548	83.1	9.88	6.2	0.28
P35	11	PUI	59	MASCULINO	50	10036136	10014	1832	0	0	309	36.1	0.19	0.13
P36	16	PUI	28	FEMININO	50	2645984	45685	6475	2648	3049	37.8	8.66	1.81	1.3
P45	11	PUI	18	MASCULINO	50	7475685	284658	2759	1748	2275	119	12.9	9.86	1.08

Tabela 2 – Características individuais e níveis de DNA bacteriano e de endotoxinas dos dentes do grupo IC

Paciente	Dente	Técnica de irrigação	Idade	Sexo	Diâmetro final	Bactérias					Endotoxinas (EU/mL)			
						S1	S2	S3	S4	S5	S1	S2	S3	S4
P1	15	IC	34	FEMININO	40	178905	2947	10638	45922	73325	11	0.02	0	0
P2	44	IC	18	FEMININO	40	9807470	95368	14659	9873	8457	21.8	0.09	0.11	0
P3	21	IC	43	FEMININO	50	1721662	35349	33564	140477	45966	132	13.67	9.28	3.58
P8	22	IC	56	MASCULINO	40	13658938	3047659	84639	4646	2659	15.3	19	14.8	11.6
P9	23	IC	27	FEMININO	50	855248	44075	37825	13214	8522	18.32	12.2	6.66	1.3
P10	23	IC	30	FEMININO	50	32343	126251	124995	70244	63806	52.9	10	3.48	0
P11	11	IC	56	MASCULINO	40	6784487	90213	10826	3898	3507	18.1	0.2	0.02	2.3
P13	14	IC	24	FEMININO	50	18949	0	0	0	0	10	0.15	0	0
P17	34	IC	58	FEMININO	50	457689	3486	3096	0	0	14.6	14	11.5	0
P18	17	IC	28	FEMININO	40	3043433	13255	7311	4563	4631	30.5	10	6.1	4.18
P19	25	IC	36	FEMININO	40	3748596	0	0	0	0	77	15.1	13.2	0.41
P22	22	IC	32	FEMININO	50	2575749	236750	62385	8938	7586	52.1	23.2	10	0
P23	14	IC	66	FEMININO	40	378460	0	0	0	0	19.6	0.8	0.17	0
P25	36	IC	28	MASCULINO	40	986648	53168	31169	3276	2135	110	15.5	13.3	3.93
P39	45	IC	74	FEMININO	50	46576365	99834	9769	0	0	160	0.12	0.2	0.17
P44	14	IC	57	FEMININO	50	107426	288018	86592	15331	14139	77	38	12.7	8.43
P46	45	IC	37	FEMININO	50	4657394	289448	38654	15760	9859	153	10	10.3	1.57
P47	21	IC	34	MASCULINO	50	1453705	52501	338466	28545	59189	85.7	6.67	5.4	3.2
P48	11	IC	19	FEMININO	50	137513	232972	0	0	0	195	20.4	3.65	1.1
P49	25	IC	58	FEMININO	50	2658440	0	0	0	0	169	53.9	5.14	2.9

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

<div><div><div>FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO</div><div> </div></div></div>	<div><div><div>FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO</div><div> </div></div></div>
<div>Contribuição do Parecer: 428.730</div>	<div>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</div>
<div><div>Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:</div><div>Nenhuma</div></div>	<div>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</div>
<div><div>Situação do Parecer:</div><div>Aprovado</div></div>	<div>Título da Pesquisa: influência da Irrigação Ultrassônica Passiva na Redução da Bactérias e Endotoxinas dos Canais Radiculares: Um Estudo Clínico Randomizado</div>
<div><div>Necessita Apreciação da CONEP:</div><div>Não</div></div>	<div>Pesquisador: Vitor Cesar Nakamura</div>
<div><div>Considerações Finais a critério do CEP:</div></div>	<div>Área Temática: Versão: 3</div>
	<div>CAAE: 1339213.1.0000.0075</div>
	<div>Instituição Proponente: FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENTO CIENT E TEC ODONTOLOGIA</div>
	<div>Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO</div>
	<div>DADOS DO PARECER</div>
	<div>Número do Parecer: 428.730</div>
	<div>Data da Relatoria: 18/10/2013</div>
	<div>Apresentação do Projeto:</div>
	<div>50 tratamentos endodônticos com perodontite apical primária serão realizados . 25 usando método tradicional de irrigação e 25 com o auxílio de ultra-som.</div>
	<div>Objetivo da Pesquisa:</div>
	<div>Avallar in vivo a eficácia do preparo químico-mecânico utilizando 2 protocolos de irrigação na redução de bactérias e endotoxinas de canais radiculares de dentes portadores de periodontite apical primária.</div>
	<div>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</div>
	<div>Os participantes terão o benefício do tratamento endodôntico e restaurador dentário.</div>
	<div>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:</div>
	<div>O projeto é importante pois agrega ao tratamento convencional uma outra metodologia no sentido de aumentar a eficiência do tratamento convencional.</div>
	<div>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</div>
	<div>O Termo está correto, apresenta linguagem técnica porém de fácil explicação aos participantes da pesquisa.</div>
	<div>Recomendações:</div>
	<div>Nenhuma</div>
<div><div>Endereço: Av Prof Lineu Prestes 227</div><div>Bairro: Cidade Universitária</div><div>UF: SP</div><div>Telefone: (11)3091-7950</div></div>	<div><div>Endereço: Av Prof Lineu Prestes 227</div><div>Bairro: Cidade Universitária</div><div>UF: SP</div><div>Telefone: (11)3091-7950</div></div>
<div><div>CEP: 05.500-900</div><div>Município: SAO PAULO</div><div>Fax: (11)3091-7914</div><div>E-mail: cep@usp.br</div></div>	<div><div>CEP: 05.508-900</div><div>Município: SAO PAULO</div><div>Fax: (11)3091-7914</div><div>E-mail: cep@usp.br</div></div>
<div>Página 02 de 04</div>	<div>Página 01 de 02</div>