LAÍS CUNHA PRADO DO NASCIMENTO

Avaliação da quantidade de bactérias e endotoxinas após o tratamento endodôntico de dentes com periodontite apical primária e a correlação com a indução de citocinas pró-inflamatórias em cultura de fibroblastos humanos

São Paulo

2018

LAÍS CUNHA PRADO DO NASCIMENTO

Avaliação da quantidade de bactérias e endotoxinas após o tratamento endodôntico de dentes com periodontite apical primária e a correlação com a indução de citocinas pró-inflamatórias em cultura de fibroblastos humanos

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia / Dentística para obter o título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Giulio Gavini
Coorientadora: Profa. Dra. Ericka Pinheiro

São Paulo

2018

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.

Catalogação-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Nascimento, Laís Cunha Prado do.
Avaliação da qualidade de bactérias e endotoxinas após o tratamento endodôntico de dentes com periodontite apical primária e a correlação com a indução de citocinas pró-inflamatórias em cultura de fibroblastos humanos / Laís Cunha Prado do Nascimento ; orientador Giulio Gavini; coorientadora Ericka Tavares Pinheiro. -- São Paulo, 2018.

117 p. : fig., 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. Infecção bacteriana. 3. Irrigantes do canal radicular. 4. Endotoxinas. 5. Citocinas. I. Gavini, Giulio. II. Pinheiro, Ericka Tavares. III. Título.

Prado LC. Avaliação da quantidade de bactérias e endotoxinas após o tratamento endodôntico de dentes com periodontite apical primária e a correlação com a indução de citocinas pró-inflamatórias em cultura de fibroblastos humanos. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 26/11/2018

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Oscar Faciola Pessoa

Instituição: UFPA Julgamento: APROVADA

Prof(a). Dr(a). Elaine Faga Iglecias

Instituição: FOUSP Julgamento: APROVADA

Prof(a). Dr(a). Carla Sipert

Instituição: FOUSP Julgamento: APROVADA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Angela e Geraldo, que sempre me apoiaram e incentivaram. Que mesmo longe se fizeram presentes, com muito amor e palavra de carinho. Vocês são meus tesouros, obrigada por tudo.

À minha irmã Marita, que esteve comigo em todos os momentos, me escutando e me dando colo. Minha melhor amiga, que torce e vibra com tudo em minha vida. Obrigada por você ser esta pessoa tão especial, que está ao meu lado independente da distância.

Ao meu marido Rodrigo, meu parceiro, meu grande amor e agora PAI do Bento, por tanto carinho e paciência. Por se doar incondicionalmente a nossa família, por me incentivar e me proteger. Obrigada por estar sempre ao meu lado e por tornar os meus sonhos, parte dos seus.

Ao Bento, todo a amor que existir em meu coração!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Giulio Gavini, meu grande espelho e exemplo. Por me incentivar nas horas certas e sempre ter um bom conselho. Por acreditar em mim desde o início e me tornar uma pessoa melhor. Sou grata a Deus por cruzar minha jornada com professores tão especiais, com caráter, humildade e sabedoria. Gratidão eterna.

À Profa Dra. Ericka Pinheiro, pela co-orientação dada durante toda a minha pós-graduação. Por me ensinar tudo que sei, por estar sempre presente em todas as vezes que precisei. Por me receber de braços abertos e me transferir o conhecimento que, com certeza, vou levar comigo para vida. Obrigada pela confiança.

À Profa Dra. Carla Sipert, pela ajuda na elaboração de parte do trabalho. Sem você isso não seria possível. Obrigada pela paciência, pelo ensinamento e convivência.

A todos os professores do Departamento de Endodontia, pelo convívio, atenção e conhecimentos partilhados. Sempre muito dispostos a ajudar.

Á minha grande amiga Amanda Silveira, minha companheira, minha parceira que esteve, está e estará em todos os momentos de minha vida. Não tenho como agradecer a Deus por esse presente tão especial e precioso. Te amo.

Às minhas amigas tão especiais, Sandra, Elaine e Laura, que estiveram mais próximas de mim, que me ajudaram, me incentivaram, me escutaram e foram essenciais nesse processo. Obrigada pela amizade, por sempre estarem dispostas a ajudar e pelo carinho de sempre. Que a distância jamais nos afaste. Vocês estarão sempre no meu coração. Amo vocês.

Aos meus amigos de Pós-graduação, todos, sem exeção, por toda ajuda e momentos compartilhados. Vocês tornaram a pós-graduação mais suave. Cada sorriso e palavra de carinho, está guardada em meu coração. Um beijo em cada um.

À secretaria do Departamento de Dentística, David e Selma, que sempre me ajudaram.

Às bibliotecárias, Glauci e Vânia, pela paciência e ajuda na normatização do trabalho. Vocês são especiais. Obrigada por todo cuidado e atenção.

A todos da minha família e amigos que torcem por mim, que dão carinho e incentivo. Pelas orações e energia positiva.

Agradeço pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo acolhimento nesses anos e pela excelência de seus professores e funcionários.

“Lembre-se de que os vencedores fazem aquilo que os perdedores não querem fazer”.

H. Jackson Brown Jr

RESUMO

Prado LC. Avaliação da quantidade de bactérias e endotoxinas após o tratamento endodôntico de dentes com periodontite apical primária e a correlação com a indução de citocinas pró-inflamatórias em cultura de fibroblastos humanos. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

Este estudo clínico avaliou a quantidade de bactérias e endotoxinas, antes e após o tratamento endodôntico utilizando ativação ultrassônica de solução de hidróxido de cálcio e sua correlação com a indução de citocinas pró-inflamatórias por fibroblastos humanos. Vinte e três pacientes com dentes com periodontite apical primária foram submetidos ao tratamento endodôntico. O preparo químico-cirúrgico (PQC) foi realizado com instrumentos reciprocantes, utilizando NaOCl 2,5% durante o preparo e EDTA 17% para remoção do magma dentinário; complementado com a ativação ultrassônica de uma solução de hidróxido de cálcio. 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 o protocolo de ativação ultrassônica (S3) e após a medicação intracanal (S4). As amostras foram analisadas por: PCR quantitativo (qPCR) utilizando iniciadores universais para quantificação de bactérias após extração de DNA; teste turbidimétrico de LAL para quantificação de endotoxinas; e ELISA para quantificação de citocinas (IL-1β, IL-6, CCL2) em cultura de fibroblastos humanos após indução com o conteúdo do canal radicular. Os dados foram analisados pelos seguintes testes estatísticos: teste de Wilcoxon e Q de Cochran para análise quantitativa de bactérias e endotoxinas; ANOVA e teste de Tukey, para quantificação dos níveis de citocinas; e teste de Pearson para correlação entre os níveis de endotoxinas e citocinas (todos com nível de significância de 5%). Bactérias e endotoxinas foram observadas em todas as amostras iniciais com uma mediana de $3,61 \times 10^4$ e 109 EU/ml, respectivamente. Após o preparo químico-cirúrgico, houve uma redução significativa ($p < 0,05$) dos níveis de DNA bacteriano (mediana $7,84 \times 10^3$) e endotoxina (mediana 20,2 EU/ml). Entretanto, não houve redução de DNA bacteriano após as etapas seguintes. Com relação a endotoxina, houve redução significativa ($p < 0,05$) após a medicação intracanal (9,58 EU/mL). Correlação positiva foi observado entre os níveis de endotoxina e a indução de citocinas pró-inflamatórias. Produção de IL-1β, IL-6, CCL2 foram observadas em todas as etapas do tratamento. Não houve diferença

estatística dos níveis de IL-1 β detectados nas diferentes amostras ($p > 0,05$). Houve diminuição significativa de IL-6 e CCL-2 entre S1 e S2 ($p < 0,05$). Entretanto, não houve redução dessas citocinas nas amostras S3 ou S4 em relação às amostras S2 ($p > 0,05$). Conclui-se que o PQC foi eficaz na redução de bactérias e endotoxinas dos canais radiculares; enquanto a medicação intracanal influenciou apenas na redução de endotoxina. As amostras após o PQC induziram menores níveis de IL-6 e CCL-2 em fibroblastos humanos do que as amostras antes do tratamento endodôntico. Por outro lado, as demais etapas do tratamento não foram capazes de promover uma redução adicional dessas citocinas.

Palavras-chave: Tratamento do canal radicular. Infecção bacteriana. Irrigantes do canal radicular. Endotoxinas. Citocina.

ABSTRACT

Prado LC. Evaluation of bacterial and endotoxin levels after root canal treatment with primary apical periodontitis teeth and its correlation with pro-inflammatory cytokines induction by human fibroblasts culture. [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

This clinical study analyzed bacteria and endotoxins levels before and after endodontic treatment using ultrasonic activation of a calcium hydroxide solution and an intracanal medication and its correlation with pro-inflammatory cytokines induction by human fibroblasts. Twenty-three patients with teeth with primary apical periodontitis were submitted to endodontic treatment. 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, supplemented with the ultrasonic activation of a solution of calcium hydroxide. The root canals were medicated with calcium hydroxide for 14 days and then obturated. Microbiological sampling were performed before (S1) and after the root canal preparation (S2), after ultrasonic activation protocol (S3) and after intracanal medication (S4). The samples were analyzed by quantitative PCR (qPCR) using universal primers quantification of bacteria after DNA extraction; LAL turbidimetric test for detection and determination of endotoxin and ELISA for evaluate the cytokine production (IL-1β, IL-6, CCL2) by humam fibroblasts culture. Data was analyzed by Wilcoxon and Q cochran tests for the quantitative analysis of bacteria and endotoxins. ANOVA and tukey test, with significance level of 5%, were used for quantification of cytokine levels and Pearson's test for correlation between endotoxins and cytokine levels. Bacteria and endotoxins were observed in all initial samples with a median of 3.61×10^4 and 109 EU/ml respectively. After root canal preparation, there was a significant reduction ($p<0,05$) of bacterial DNA (median 7.84×10^3) and endotoxin (median 20.2 EU/ml). However, there was no reduction of bacterial DNA after following steps. Regarding endotoxin, there was a significant reduction ($p <0.05$) after intracanal medication (9.58 EU / mL), A positive correlation was observed between endotoxins and cytokine induction. Production of IL-1β, IL-6, CCL2 were observed in all stages of treatment.. There was no statistical difference between the presence of IL-1β in each step of the treatment ($p >0.05$). There was a significant decrease in the presence of the proinflammatory cytokine IL-6 and CCL-2 between the initial stage of endodontic treatment (S1) and the next step (S2) ($p <0.05$). However, in the following steps (S3

and S4) there was no reduction ($p > 0.05$). It was concluded that the root canal preparation was effective in reducing bacteria and endotoxins, and intracanal medication only influenced in endotoxin reduction. Samples after the root canal preparation induced lower levels of IL-6 and CCL-2 in human fibroblasts than samples before endodontic treatment, whereas other stages of the endodontic treatment were not able to promote an additional reduction.

Keywords: Root canal therapy. Bacterial infection. Root canal irriants. Endotoxin. Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Organograma dos procedimentos clínicos e de coleta do tratamento endodôntico.....54

Figura 5.1 - Diagrama de fluxo do ensaio clínico 64

Figura 5.2 - Número de canais com presença de DNA bacteriano (reação de qPCR positiva) em cada etapa do tratamento endodôntico 67

Figura 5.3 - Niveis de concentrações de DNA bacteriano (mediana) durante as diferentes etapas do tratamento endodôntico.....68

Figura 5.4 - Número de canais com presença de LPS- endotoxina (reação de LAL positiva) em cada etapa do tratamento endodôntico 69

Figura 5.5 - Níveis de oncentrações de endotoxinas (em EU/mL) durante o tratamento endodôntico. 71

Figura 5.6 - Comparação da produção de IL-1 β por fibroblatos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento (S1- coleta inicial; S2- PQC; S3- irrigação final ; S4- medicação intracanal) 73

Figura 5.7 - Comparação da produção de IL-6 por fibroblatos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento (S1- coleta inicial; S2- PQC; S3- irrigação final ; S4- medicação intracanal).....75

Figura 5.8 - Comparação da produção de CCL-2 por fibroblatos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento (S1- coleta inicial; S2- PQC; S3- irrigação final ; S4- medicação intracanal).....77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ºC	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
LPS	lipopolissacarídeo
µL	microlitros
mL	mililitros
min	minutos
mm	milímetro
NaOCl	hipoclorito de sódio
PCR	Reação em cadeia de polimerase (do inglês *polymerase chain reaction)*
PQC	preparo químico-cirúrgico
PUI	irrigação ultrassônica passiva (do inglês *passive ultrasonic irrigation)*
qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa
RPM	Rotações por minuto
s	segundos
EU/mL	Unidade de endotoxina por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21
2 REVISÃO DE LITERATURA 23
2.1 AÇÃO DOS PROCEDIMENTOS ENDONDÔNTICOS SOBRE OS NÍVEIS DE BACTÉRIAS NOS CANAIS RADICULARES DE DENTES COM INFECÇÕES PRIMÁRIAS: ESTUDOS CLINICOS AVALIADOS POR MÉTODOS MOLECULARES 23
2.2 PAPEL DAS ENDOTOXINAS NAS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS PRIMÁRIAS 31
2.3 AÇÃO DO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO SOBRE OS EFEITOS CITOTÓXICOS DAS ENDOTOXINAS: ESTUDOS IN VITRO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS 37
2.4 AÇÃO DOS PROCEDIMENTOS ENDONDÔNTICOS SOBRE OS NÍVEIS E EFEITOS CITOTÓXICOS DE ENDOTOXINAS NOS CANAIS RADICULARES DE DENTES COM INFECÇÕES PRIMÁRIAS: ESTUDOS IN VIVO 40
2.4.1 Estudos em animais 40
2.4.2 Estudos clínicos 41
3 PROPOSIÇÃO 49
4 MATERIAL E MÉTODOS 51
4.1 ASPECTOS ÉTICOS 51
4.2 SELEÇÃO DOS PACIENTES 51
4.3 PREPARO DA SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO 54
4.4. PREPARO DOS CANAIS RADICULARES E COLETAS MICROBIOLÓGICAS 54
4.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DE BACTÉRIAS E ENDOTOXINAS 58
4.5.1 Extração de DNA. 58
4.5.2 Reação de cadeia em polimerase em tempo real. 58
4.5.3 Teste quantitativo cinético turbidimétrico de Limulus Amebocyte Lisate 59

4.6 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS PELA PRODUÇÃO DE CITOCINAS (IL-1B, IL-6 E CCL2) POR CULTURA DE FIBROBLASTOS DE LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO REPARO QUÍMICO-CIRÚRGICO DOS CANAIS RADICULARES 60
4.6.1 Obtenção de Fibroblastos de Ligamento Periodontal Humano.....60
4.6.2 Análise da produção de citocinas por ELISA.....60
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....62
5 RESULTADOS 63
6 DISCUSSÃO 79
7 CONCLUSÕES 91
REFERÊNCIAS 93
APÊNDICES.....105
ANEXO..... 115

1 INTRODUÇÃO

As bactérias e seus subprodutos desempenham papel crucial no estabelecimento e continuidade das doenças pulpares e periapicais. As bactérias Gram-negativas anaeróbias são os micro-organismos encontrados em maior quantidade nos canais radiculares infectados, principalmente durante a fase de rápida expansão da lesão. Essas bactérias, contêm endotoxinas na camada externa da parede celular, no qual são liberadas durante a multiplicação ou após a morte celular, e são responsáveis por diversos efeitos biológicos, como: ativação de macrófagos, liberação de mediadores inflamatórios e atração de osteoclastos com consequente reação inflamatória e reabsorção óssea na região periapical. Logo, os procedimentos e soluções químicas utilizados no tratamento de canal não devem apenas levar à morte bacteriana, mas também à inativação de suas endotoxinas.

A remoção de bactérias e seus subprodutos do sistema de canais radiculares é o principal objetivo do tratamento endodôntico em dentes com necrose pulpar e periodontite apical e em sua maior parte ocorre na etapa do preparo químico-ciúrgico (PQC) mediante a utilização conjunta de instrumentos endodônticos e substâncias químicas. O hipoclorito de sódio (NaOCl) tem sido amplamente utilizado devido à sua atividade solvente da matéria orgânica e ação eficaz contra um amplo espectro de bactérias, no entanto, não tem ação significativa sobre as endotoxinas bacterianas, e a eventual diminuição da sua concentração se dá simplesmente pelo arraste mecânico do irrigante no interior do canal.

Por outro lado, o hidróxido de cálcio apresenta um efeito neutralizador de endotoxinas, pois altera algumas propriedades biológicas do LPS bacteriano, como a capacidade de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células de defesa, principalmente quando utilizado como medicação intracanal. Estudos demonstram uma maior redução e neutralização de endotoxinas quando a água de cal (hidróxido de cálcio, 0,14%) foi utilizada durante o PQC. Logo, a utilização do hidróxido de cálcio como irrigante durante as etapas finais da instrumentação do canal radicular parece ser de grande importância, pois será capaz de neutralizar a maioria das endotoxinas após a morte bacteriana e reduzir seus efeitos citotóxicos.

Um importante instrumento na terapia endodôntica, tem sido a utilização do Ultrassom, o qual promove a agitação de soluções irrigantes no canal radicular, penetrando em área de complexidade anatômica resultando em uma maior capacidade de limpeza. A agitação de soluções irrigantes, como a solução de hidróxido de cálcio, pode favorecer a penetração das partículas de cálcio para dentro dos túbulos dentinários, proporcionando um aumento do pH e a redução de endotoxinas.

Portanto, é necessário avaliar in vivo a utilização de substâncias capazes de inativar endotoxinas, tais como hidróxido de cálcio, conjuntamente com ativação ultrassônica, em uma tentativa de aumentar o pH promovendo a redução das endotoxinas e analisar in vitro o controle da infecção pela inativação de seus efeitos tóxicos, aumentando portanto o sucesso do tratamento endodôntico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A diversidade microbiana e seus subprodutos, tem um papel fundamental no desenvolvimento da doença pulpar e periapical. Desta forma, os procedimentos endodônticos têm sido estudados quanto a eficácia na redução da microbiota nos canais radiculares.

2.1 AÇÃO DOS PROCEDIMENTOS ENDONDÔNTICOS SOBRE OS NÍVEIS DE BACTÉRIAS NOS CANAIS RADICULARES DE DENTES COM INFECÇÕES PRIMÁRIAS: ESTUDOS CLINICOS AVALIADOS POR MÉTODOS MOLECULARES

Vianna et al. (1) 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 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 livres de bactérias no grupo CHX.

Siqueira Jr. et al. (2) avaliaram a eficácia antimicrobiana do NaOCl 2,5% e da medicação intracanal de $Ca(OH)_2$ 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 $Ca(OH)_2$/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.

Sakamoto et al. (3) 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. Estreptococos foram as taxa mais prevalentes inclusive nas amostras de pós-tratamento.

Siqueira Jr. (4) estudaram a eficácia do NaOCl 2,5% e CHX 0,12% como irrigantes na redução bacteriana em canais radiculares de dentes infectados com periodontite apical. Foram selecionados 32 dentes com infecções primárias. Amostras bacterianas foram coletadas no início do estudo (S1) e após o preparo químico-cirúrgico usando NaOCl (n = 16) ou CHX (n = 16) como irrigantes (S2). Os isolados das amostras S2 foram identificados por meio de análise de seqüenciamento genético da região 16rRNA. Na S1, todos os canais foram positivos para as bactérias, e o número médio de bactérias por canal foi de $7,32 \times 10^5$ para o grupo NaOCl e $8,5 \times 10^5$ para o grupo de clorexidina. No S2, o número médio de bactérias em canais irrigados com NaOCl e clorexidina foi de $2,35 \times 10^3$ e 2×10^2 , respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos NaOCl e clorexidina em relação ao número de casos que produziram culturas negativas ($p = 0,72$) ou redução bacteriana quantitativa ($P = 0,609$). 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.

Blome et al. (5) avaliaram por método molecular quantitativo, a carga bacteriana promovida pelo preparo químico-cirúrgico com NaOCl 2% ou clorexidina 0,1% incluído

a fase de irrigação final com agitação ultrassônica e medicação intracanal com $Ca(OH)_2$. Vinte dentes apresentavam infecções primárias e 20 com infecções secundárias, necessitando de retratamento. Na coleta inicial, bactérias estavam presentes em maior quantidade nos casos de infecção primária, do que nos casos de infecção secundárias ($P < 0,05$). Após o preparo químico-cirúrgico com irrigação ultrassônica observou-se uma redução significativa do número de bactérias em infecções endodônticas primárias e secundárias, com valores de $2,3 \times 10^4$ e $6,4 \times 10^3$ bactérias, respectivamente. Após o uso da medicação intracanal por 14 dias , o número de bactérias permaneceu elevado nos canais radiculares: $8,6 \times 10^3$ bactérias nas infecções primárias e $7,1 \times 10^3$ nas secundárias. Conclui-se, portanto que o preparo químico-cirúrgico foi eficaz em promover uma redução bacteriana nos canais radiculares de pelo menos 95%.

Rôças et al. (6) identificaram as taxa bacterianas persistentes nos procedimentos do tratamento endodôntico utilizando método de RT-PCR e checkerboard por captura reversa. As amostras foram coletadas de canais infectados de 15 dentes com periodontite apical antes do tratamento (S1), após o preparo químico-cirúrgico com NaOCl como irrigante (S2), e após a medicação intracanal entre as sessões com uma pasta de $Ca(OH)_2$ (S3). As bactérias foram encontrados em todas as amostras S1. Níveis detectáveis de RNA ribossômico bacteriano, usado como um indicador de viabilidade, foram observadas em 60% dos casos após o preparo químico-mecânico e medicação intracanal após 53%. As taxa mais prevalentes em S1 foram *O. Uli* (67%), *Pyramidobacter piscolens* (60%), *Streptococcus sp* (53%), e *Bacteroidetes X083* (53%). *Streptococcus sp* (47%), *Fusobacterium nucleatum* (40%), e *O. uli* (33%) prevaleceram em S2. *Streptococcus sp* (47%), *P. acnes* (27%), e *O. uli* (27%) foram mais freqüentes em S3.

Rôças e Siqueira Jr (7) avaliaram por método molecular independente de cultura, os efeitos antimicrobianos do preparo químico- cirúrgico complementado por medicação intracanal, durante o tratamento de dentes com periodontite apical. Foram coletadas amostras de 24 canais radiculares necrosados, antes do químico- cirúrgico (S1), após o preparo químico-cirúrgico, utilizando 2,5% NaOCl como irrigante (S2), e depois de 7 dias com medicação de $Ca(OH)_2$ com glicerina (CHG) ou paramonoclorofenol canforado / glicerina (CHPG) (S3). As presenças de bactérias,

archea e fungos foram avaliadas por PCR, e identificações bacterianas foram realizadas pelo checkerboard de captura reversa com 28 candidatos a patógenos endodônticos. Todas as amostras deram positivas para bactérias em S1, mas negativas para *Archaea* e fungos. Os procedimentos de tratamento foram altamente eficazes na redução dos níveis de bactérias e número de taxa. No geral, 46% das amostras S2 e 62,5% das amostras S3 foram negativas para bactérias. Especificamente, as amostras de S2 e S3 produziram resultados negativos de PCR em, respectivamente, 50% e 58% dos canais medicados com CHG, e em 42% e 67% para os canais no grupo CHPG. Diversas taxa ainda foram encontrados em amostras S2 e S3, e os mais prevalentes foram *P. acnes* e *Streptococcus spp*. Os níveis de bactérias e o número de taxa foram substancialmente reduzidos após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal. No entanto, os níveis detectáveis de bactérias persistentes, indicam que novas estratégias deve ser tomadas para tornar mais eficaz o tratamento antimicrobiano.

Rôças e Siqueira Jr (8) compararam os efeitos antimicrobianos do NaOCl 2,5% CHX 0,12% usados como irrigantes durante o tratamento de dentes com periodontite apical. Amostras bacterianas de quarenta e sete dentes unirradiculares com necrose pulpar, foram coletadas antes (S1) e depois (S2) do preparo químico-cirúrgico utilizando NaOCl 2,5% (n = 30) ou CHX 0,12% (n = 17). A presença de bactérias, *Archaea* e de fungos foi avaliada por PCR convencional. Identificações bacterianas foram realizadas por checkerboard considerando segmentação de 28 patógenos endodônticos. Todas as amostras S1 de PCR, foram positivas para presença de bactérias, mas negativas para archaea e fungos. Ambos os protocolos baseados em CHX e NaOCl foram significativamente eficazes na redução dos níveis de bactérias e número de espécies. As espécies mais prevalente em amostras S2 do grupo NaOCl foram *Propionibacterium acnes, Streptococcus, Porphyromonas endodontalis e Selenomonas sputigena*. No grupo CHX, as taxa mais prevalentes em S2 foram *Dialister invisus, Actinomyces israelii, Prevotella baroniae, Propionibacterium acidifaciens*, e espécies de Streptococcus.

Paiva et al. (9) avaliaram *in vivo* os efeitos antimicrobianos de 2 técnicas diferentes de irrigação, 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 ativação ultrassônica 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.

Beus et al. (10) compararam *in vivo* os resultados da irrigação convencional com NaOCl 1% e da ativação ultrassônica 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 ativação ultrassônica 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. (11) avaliaram os efeitos antimicrobianos de procedimentos endodônticos utilizando análises de microbiologia molecular. Foram coletadas 14 amostras de canais radiculares necrosados de dentes com periodontite apical antes (S1) e após a instrumentação, com NaOCl (S2) como irrigante, e irrigação final com clorexidina (CHX) (S3) e depois de uma semana de medicação com $Ca(OH)_2$ (S4). Os parâmetros analisados foram os seguintes: incidência de resultados positivos para a presença de bactérias por meio de PCR de amplo espectro; impacto sobre as

estruturas da comunidade bacteriana por PCR- desnaturation Gradient Gel Electrophoresis (DGGE); dados quantitativos de redução bacteriana por qPCR; e identificação de bactérias persistentes por clonagem e sequenciamento. Todas as amostras S1 foram positivas para bactérias em todos os testes. Os procedimentos promoveram a diminuição da diversidade microbiana e reduziram significativamente a incidência de resultados positivos e as contagens bacterianas (P <0,05).

Paiva et al. (12) avaliaram os efeitos da ativação ultrassônica na redução de bactérias após o preparo químico-cirúrgico do canal radicular. Foram coletadas amostras de 10 dentes com periodontite apical antes (S1), após o preparo químico-cirúrgico com instrumentos BioRace e NaOCl 2,5% (S2) e depois da ativação ultrassônica com NaOCl 2,5% (S3). Foram avaliados 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 por qPCR e a identificação de espécies persistentes por clonagem de DNA e análise de biblioteca de clones. Os procedimentos endodônticos foram eficazes na redução da incidência de resultados positivos para as bactérias, o número de células bacterianas, e a diversidade bacteriana. Porém, a ativação ultrassônica mostrou-se ineficaz na melhora da desinfecção do canal radicular após o preparo químico-cirúrgico.

Rôças et al. (13) compararam a eficácia antibacteriana de duas técnicas de instrumentação, uma usando instrumentos manuais de níquel-titânio (NiTi) e outra por meio de instrumentos de NiTi rotatórios BioRaCe, em canais radiculares de dentes com periodontite apical. O irrigante de ambos os grupos foi NaOCl 2,5%. A análise qualitativa e quantitativa foi realizada por meio de culturas e PCR quantitativo em tempo real (qPCR) das amostras coletadas antes e após o PQC. Na análise de cultura, 45% e 35% dos canais eram ainda positivos para presença bacteriana após instrumentação manual e automatizada, respectivamente (P> 0,05). A comparação intergrupos de dados quantitativos não apresentou diferença significativa entre as duas técnicas. Porém, o preparo com instrumentos rotatórios resultou em menos casos qPCR-positivos (60%) do que a instrumentação manual (95%) (P = 0,01).

Rôças et al. (14) pesquisaram a susceptibilidade de sete filotípos bacterianos ainda não cultivados e uma espécie de difícil cultura, após os procedimentos químicos-

mecânicos. Canais radiculares de 28 dentes unirradiculares com periodontite apical foram preparados utilizando instrumentos rotatórios de níquel-titânio e NaOCl 2,5% como irrigante. Amostras de DNA coletadas antes (S1) e depois (S2) do preparo químico-cirúrgico foram submetidas à análise quantitativa do total de bactérias e das taxas mais prevalentes. *Bacteroidaceae sp. HOT-272* (24%) e *Fretibacterium fastidiosum* (20%) foram as espécies mais prevalentes em S1. Após o preparo químico -cirúrgico houve redução significativa no total de bacterias (P <0,001), mas 64% dos canais ainda foram positivos para a presença de bactérias. Apenas *Bacteroidaceae sp.* HOT-272 e *F. fastidiosum* foram detectados em S2 (cada um em uma amostra). A taxa de redução em ambos também foi altamente significativa (P <0,001). Os resultados confirmaram que várias bactérias ainda não cultivadas e de difícil crescimento podem estar associadas à periodontite apical e que os procedimentos químico-mecânico foram altamente eficazes na eliminação ou redução das taxas bacterianas.

Neves et al. (15) avaliaram *in vivo* a eficácia antibacteriana do instrumento self-adjusting file (SAF), utilizando métodos moleculares. Os canais radiculares de dentes unirradiculares com periodontite apical foram instrumentados com o sistema SAF sob irrigação contínua com NaOCl 2,5%. Extratos de DNA de amostras coletadas antes e após a instrumentação foram submetidos à análise quantitativa de contagens totais de bactérias e níveis de estreptococos por qPCR. O ensaio de hibridização de DNA-DNA por checkerboard foi utilizado para identificar as taxa bacterianas antes (S1) e após a instrumentação (S2). O SAF também foi comparada com instrumento de níquel-titânio utilizando a técnica de instrumentação manual para redução bacteriana total. O sistema SAF reduziu significativamente as contagens de bactérias totais. Quantitativamente, a redução de 99,9% no total das contagens bacterianas associadas ao sistema SAF foi superior à redução de 95,1% obtido pela instrumentação manual (P <0,001). O SAF resultou em e mais casos com resultados negativos de PCR para bactérias (54,5%) do que a instrumentação manual (4,5%) (P <0,001). Análise checkerboard revelou que alguns estreptococos anaeróbios e até mesmo bactérias ainda-não cultivadas podem resistir aos efeitos de procedimentos químico-cirúrgico.

Teles et al. (16) avaliaram através de qPCR e cultura, a redução bacteriana após o preparo quimico-cirurgico utilizando hipoclorito de sódio a 3% (NaOCl) e após 14

dias de medicação intracanal utilizando pasta de hidróxido de cálcio (Ca(OH)2) ou gel de clorexidina a 2% (CHX) em 69 dentes com necrose pulpar. Após o preparo quimico-cirurgico, houve uma redução de 99,1% em qPCR e de 98,5% em contagens anaeróbicas. A medicação intracanal não foi eficaz na redução bacteriana, quando feita comparação entre os grupos, o grupo Ca (OH) 2 apresentou 2,2 x 10^5 cópias de DNA e o grupo da CHX, 9,1x 10^6 cópias de DNA, ou seja, o grupo da pasta de Ca (OH) 2 apresentou melhor ação antibacteriana que o gel de CHX a 2%.

Ferreira et al. (17) determinaram através de hibridação DNA-DNA o perfil microbiológico resistente após o uso de $Ca(OH)_2$ ou $Ca(OH_)2$ com clorexidina de 20 canais radiculares com infecção primária. As espécies mais detectadas foram *C. ochracea* (70%) e *F. nucleatum ssp. vincentii* (70%) nas amostras iniciais. Após a instrumentação, *E. faecium* (60%) e após a medicação as espécies mais freqüentemente detectadas foram *F. nucleatum ssp. vincentii* (90%) e *E. faecium* (40%). Ambos os tratamentos diminuíram significativamente o número de espécies bacterianas em comparação com a amostra inicial. No entanto, esta redução foi significativamente maior no grupo do $Ca(OH)_2$ com clorexidina (P <0,05).

Neves et al. (18) compararam a eficácia anti-bacteriana de um sistema de instrumento único (Reciproc) e um sistema rotatório de múltiplos instrumentos (BioRaCe) em 60 dentes com periodontite apical primária. O DNA foi extraído das amostras, antes e depois o preparo químico-cirúrgico e submetido a análise quantitativa de bactérias totais e streptococci através do qPCR. Todas as amostras iniciais foram positivas para a presença de bactérias. Após a preparo químico-cirúrugico com Reciproc e BioRaCe, 16 (55%) e 15 (50%) dos canais radiculares ainda apresentavam bactérias detectáveis. Ambos os sistemas foram altamente efetivos na redução das contagens bacterianas totais (P <0,001), e não houve diferenças significantes entre eles (P> 0,05). Streptococci foram altamente freqüentes, e ambos os sistemas conseguiram reduzir significativamente seus níveis (P <0,001). Aproximadamente metade dos dentes ainda possuíam bactérias detectáveis após a utilização de amos os sistemas.

Rôças et al. (19) compararam os efeitos antimicrobianos da irrigação com hipoclorito de sódio a 2,5% (NaOCl) e clorhexidina a 2% (CHX) durante a preparo químico-cirúrgico de 50 dentes com periodontite apical. O DNA foi extraído das

amostras clínicas e a redução dos níveis de bactérias e *Streptococcus spp.* foi avaliada por meio de qPCR. Todas amostras de iniciais foram positivas para a presença de bactérias. Após a preparo químico-cirúrgico os canais radiculares ainda apresentavam bactérias detectáveis em 44% no grupo do NaOCl a 2,5% e 40% no grupo da CHX a 2%. Quanto às contagens bacterianas totais, foi detectada uma média de 3,7 x105 em amostras iniciais e 5,49 x 102 após preparo químico-cirúrgico no grupo NaOCl. No grupo da CHX foi detectada uma média de 8,77 x104 e 2,81 x103 antes e após o preparo químico-cirúrgico, respectivamente. Ambos os protocolos de irrigação foram altamente eficazes na redução dos níveis de *Streptococcus spp.* Não havendo diferença na eficácia antibacteriana entre as substâcias auxiliares NaOCl 2,5% e CHX 2%.

Nakamura et al. (20) analisou os efeitos dos procedimentos endodônticos e da irrigação ultrassônica passiva na redução de bactérias e endotoxinas de canais radiculares. Foram realizadas coletas microbiológicas de cinquenta pacientes com dentes com periodontite apical primária antes (S1) e após o PQC (S2), realizado com instrumentos reciprocantes e NaOCl 2,5% e EDTA 17%, após os protocolos de irrigação (S3) convencional (IC) e ultrassônica passiva e após 14 dias de medicação intracanal (S4). 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. 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 ativação ultrassônica foi capaz de reduzir significativamente mais o número de bactérias do que a IC ($p<0,05$).

2.2 PAPEL DAS ENDOTOXINAS NAS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS PRIMÁRIAS

Dahlén e Bergenholtz (21) avaliaram a atividade da endotoxina em dentes com necrose pulpar. Foram coletadas amostras de 13 canais radiculares com necrose pulpar e analisadas por meio da técnica de lisado de Limulus. Os resultados foram relacionados à presença de bactérias viáveis e lipopolissacarídeos extraídos de diferentes bactérias anaeróbias gram-negativas, e a diferentes níveis do exsudato inflamatório.Os autores concluíram que a atividade endotóxica das amostras do canal

radicular estava correlacionada com a presença e o número de bactérias gram-negativas no canal radicular.

Pitts et al. (22) investigaram o papel da endotoxina na inflamação periapical. Canais radiculares de dentes de cães foram divididos em dois grupos. Foram inoculadas endotoxinas R-595 de Salmonella Minnesota nos canais radiculares do grupo experimental e solução salina nos canais radiculares do grupo controle. Os exames radiográficos foram realizados semanalmente, e avaliações histológicas foram feitas em quatro a cinco semanas. As alterações radiográficas periapicais ocorreram num período mais curto de tempo e em grau mais severo com as raízes contendo endotoxina do que com as raízes contendo solução salina. A avaliação histológica mostrou maior destruição óssea periapical e uma resposta inflamatória mais acentuada. Os leucócitos polimorfonucleares foram as células predominantes. Os resultados indicam que as endotoxinas podem ter um papel na inflamação periapical e destruição óssea.

Horiba et al. (23) analisaram a distribuição da endotoxina na parede dentinária de canais radiculares infectados. Amostras das paredes da superfície pulpar do canal radicular até o lado cementário foram preparadas por um método abrasivo a partir de 30 dentes humanos extraídos (5 dentes sadios e 25 dentes com canais radiculares infectados). A endotoxina foi extraída com ácido cítrico e quantificada por meio de um método colorimétrico. A quantidade de endotoxina foi maior nos dentes infectados quando comparados com dentes sadios em todas as camadas. Nos canais radiculares infectados, a quantidade de endotoxina foi significantemente maior nas amostras próximas da superfície pulpar, até 300 µm, do que em amostras mais próximas do cemento.

Nissan et al. (24) avaliaram a capacidade de difusão da endotoxina através da dentina. Foram preparadas 5 cavidades com 0,5 mm de espessura de parede pulpar. A endotoxina foi introduzida no interior da cavidade oclusal e 0,1 mL de água apirogênica foi adicionada na câmara pulpar. A presença de endotoxina foi determinada pelo ensaio lisado do amebócito de *Limulus*. Em quatro espécimes, o aparecimento inicial de endotoxina na câmara pulpar variou de 15 minutos a 4h30 minutos. Em um espécime nenhuma endotoxina foi detectada na câmara pulpar. Os resultados indicaram que a endotoxina foi capaz de penetrar 0,5 mm de dentina.

Khabbaz et al. (25) analisaram a presença de endotoxinas em lesões cariosas de dentes sintomáticos (pulpite irreversível) e assintomáticos (pulpite irreversível); quantificaram a endotoxina e associaram a presença de endotoxinas com a dor aguda derivada de pulpites irreversíveis. Os grupos foram dividos em, G1: pulpite irreversível (9 dentes); G2: pulpite reversível (11 dentes); e G3: dentes hígidos (4 dentes). Foram coletadas amostras amostra da camada superficial da cárie e de uma camada mais profunda. Os testes foram realizados por meio do método quantitativo do Lisado do amebócito de *Limulus*. Os resultados indicaram presença de endotoxina em todas as amostras coletadas das lesões cariosas, porém, a quantidade de endotoxina foi significantemente maior na superfície da lesão, tanto nos dentes sintomáticos como nos assintomáticos. Na dentina hígida não foi detectada endotoxina. A quantidade de endotoxina foi significantemente maior nos dentes sintomáticos.

Khabbaz et al. (26) determinaram a presença de endotoxina em dentes humanos cariados e vitais, quantificaram a endotoxina e associaram a presença de endotoxina com a dor pulpar. Foram coletadas amostras de 28 dentes cariados (15 sintomáticos e 13 assintomáticos) e de 5 dentes não cariados (controle). A quantificação da endotoxina foi obtida pelo teste do lisado de amebócito de limulus. Os resultados detectaram a presença de endotoxina em todos os tecidos pulpares de dentes cariados. Em dentes hígidos não foi detectada endotoxina. A presença de endotoxina foi significantemente maior no grupo de dentes sintomáticos. Os autores concluem que a presença de endotoxinas no tecido pulpar de todos os dentes cariados indica que elas podem desempenhar um papel importante na patogênese das doenças pulpares. Já que um nível significantemente maior de endotoxina foi detectado em polpas de dentes sintomáticos é provável uma associação dos níveis de endotoxina com a dor.

Murakami et al. (27) sugerem que o LPS do *P. endodontalis* desempenha um importante papel na formação de abscessos através da expressão de citocinas inflamatórias. No estudo epidemiológico, mostraram que o LPS é detectado em níveis significantes no material infectado de pacientes com periodontite apical e abscesso odontogênico. Cento e vinte e três pacientes foram classificados em 3 grupos: fluido de canais radiculares não infectados, fluido de canais radiculares com contaminação bacteriana e secreção purulenta de abscessos maxilofaciais. As amostras foram coletadas e em seguida realizada a detecção do LPS do *P. endodontalis*. A

quantificação de TNF e interleucina 1 foi detectada pelo teste ELISA. O material infectado induziu a expressão de TNF. Um aumento significante foi observado nos níveis de interleucina 1 de canais infectados em cmparação com canais não infectados. Os resultados sugerem que o LPS do *P. endodontalis* possui um papel importante no mecanismo patogênico da formação de abscessos maxilofaciais através expressão de citocinas inflamatórias.

Jacinto et al. (28) avaliaram a concentração de endotoxina em 50 canais radiculares necrosados e investigaram relação entre a concentração de endotoxina e os sinais e sintomas endodônticos. A técnica de cultura foi utilizada para determinar o número de unidades formadoras de colônia (UFC) e o teste de LAL para quantificação da endotoxina. A presença de UFC foi detectada em todas as amostras. Amostras de casos sintomáticos tiveram uma média de 8,7 x 10^5 de UFC, enquanto para dentes assintomáticos a média foi de 5 x 10^3. Endotoxina foi detectada em todas as amostras analisadas. Os casos assintomáticos apresentaram menores níveis de endotoxina. Houve uma correlação positiva entre a concentração de endotoxina no canal radicular e a presença de sinais e sintomas endodônticos.

Oliveira et al. (29) avaliaram *in vitro* a capacidade e o período necessário de endotoxinas em se difundir através dos túbulos dentinários em direção a superfície radicular externa. Após o PQC até limas tipo K número 30, 30 dentes unirradiculares extraídos foram divididos em 2 grupos: grupo 1 – inoculados com endotoxina de *Escherichia coli*; grupos 2 – inoculados com água apirogênica. Após a inoculação, 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 através da produção de anticorpos (IgM) em cultura de linfócitos B. A endotoxina foi capaz de se difundir pelos túbulos dentinários em direção ao cemento, atingindo a região externa da raiz após o período 24 h.

Martinho et al. (30) investigaram o perfil microbiano e os níveis de endotoxina encontrados em canais radiculares com periodontite apical primária, determinaram a antigenicidade contra macrófagos através dos níveis de interleucina (IL) -1b e fator de necrose tumoral a (TNF-a) e avaliaram sua relação com os achados clínicos e radiográficos. Foram coletadas amostras de 21 canais radiculares. Foi ultilizado

técnica de PCR (16S rDNA) para a detecção das bactérias alvo, teste lisado de amebócito de Limulus (LAL) para quantificar a endotoxina e ensaio de imunoadsorção enzimática - Duoset-kit (ELISA) para quantificar citocinas. Prevotella nigrescens (13/21), Porphyromonas endodontilis (6/21) e Treponema socranskii (6/21) foram as espécies bacterianas gram-negativas mais frequentemente detectadas. Foi encontrada uma correlação entre o número de bactérias gram-negativas e os níveis de IL-1β / TNF-a . Níveis mais elevados de IL-1β e conteúdo de endotoxinas foram relacionados ao maior tamanho da área radiolúcida. A antigenicidade do conteúdo endodôntico não está relacionada apenas à quantidade de endotoxina encontrada no canal radicular, mas também ao número de diferentes espécies de bactérias gram-negativas envolvidas na infecção.

Martinho et al. (31) investigaram a correlação entre diferentes sinais / sintomas clínicos e características radiográficas de acordo com os níveis de interleucina (IL) -1β, fator de necrose tumoral a (TNF-a), IL-6, IL-10, prostaglandina E2 (PGE2) produzidas por macrófagos estimulados por conteúdo endodôntico coletados a partir canais radiculares com infecção endodôntica primária. Foram coletadas amostras de 21 canais radiculares e a presença de exsudato, dor à palpação, sensibilidade à percussão e o tamanho da lesão radiográfica foram registrados. A detecção bacteriana foi detectada pelo PCR, o teste de lisado de amebócito de limulus (LAL) quantificou a endotoxinas e as quantidades de citocinas foram medidas por ensaio imunoenzimático. Bactérias e endotoxinas foram detectadas em 100% das amostras. IL-6 e TNF-a foram correlacionados com lesão radiogáfica e exudato, respectivamente. Sinais/sintomas clínicos e achados radiográficos foram correlacionados com PGE2, IL-1β e TNF-a, enquanto IL-6 e PGE2 foram correlacionados com dor a palpação. Os autores sugerem diferentes papéis para cada citocina no desenvolvimento da periodontite apical.

Martinho et al. (32) investigaram a presença de diferentes espécies bacterianas Gram-negativas e os níveis de endotoxinas encontradas na infecção endodôntica primária, determinando os níveis de interleucina (IL) -1β, IL-6, IL- 10, e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), e avaliaram sua relação com os achados clínicos e radiográficos. Foram coletadas amostras de 21 canais radiculares. Foi ultilizado técnica de PCR para a detecção das bactérias, o ensaio de lisado de amebócitos de Limulus foi utilizado para medir endotoxinas e as citocinas pró-inflamatórias foram

medidas pelo teste ELISA. Todas as amostras foram positivas para DNA bacteriano (21/21). Prevotella nigrescens (57,2%) foi a espécie mais freqüente. Níveis mais elevados de endotoxinas foram encontrados em dentes com dor à palpação e exsudação. Correlações positivas foram encontradas entre as endotoxinas e os níveis de TNF-α e IL-1β. Os níveis de endotoxina foram encontrados como um fator de risco para exsudação e sugerem um númenro maior de espécies bacterianas Gram-negativas para a presença de uma área maior de destruição óssea. Os autores concluíram que espécies bacterianas Gram-negativas e endotoxinas desempenham um papel importante no desenvolvimento de sinais / sintomas e na gravidade da destruição óssea.

Cardoso et al. (33) correlacionaram os níveis de endotoxinas e contagens bacterianas encontradas na infecção endodôntica primária com o volume de destruição óssea periapical determinado pela análise de tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC). Os níveis de bactérias e endotoxinas também foram correlacionados com o desenvolvimento de características clínicas. Vinte e quatro canais radiculares com periodontite apical primária foram selecionados. Aspectos clínicos como dor à palpação, dor à percussão e episódio prévio de dor foram registrados. O volume de destruição óssea periapical foi determinado por análise CBCT. As endotoxinas foram quantificadas usando o ensaio de lisado de amebócito limulus (teste KQCL), e a contagem bacteriana (unidades formadoras de colônias [UFCs] / mL) foi determinada por meio de técnicas de cultura anaeróbica. Endotoxinas e bactérias foram detectadas em 100% das amostras do canal radicular (24 de 24), com mediana de 10,92 unidades de endotoxinas (UE) / mL e 7,5 105 UFC / mL, respectivamente. O volume mediano de destruição óssea determinado pela análise da TCFC foi de 100 mm3 (10-450 mm3). Houve uma correlação positiva entre níveis mais elevados de endotoxinas presentes na infecção do canal radicular e maior volume de destruição óssea. Níveis mais elevados de endotoxinas também foram correlacionados com a presença de dor.

Martinho et al. (34) compararam a atividade biológica dos lipopolissacarídeos (LPS) de *F. nucleatum* e *P. gingivalis* isolados de canais radiculares infectados, com os níveis de IL-1β e TNF- α produzidos por macrófagos. Todos os LPS induziram uma produção significativa de IL-1β e TNF-α. F. nucleatum induziu uma maior expressão de ambas as citocinas em comparação com P. gingivalis ($p < 0,05$). *F. nucleatum* e *P.*

gingivalis LPS apresentaram diferentes padrões de ativação contra macrófagos visto pela produção de IL-1β e TNF-α, o que pode contribuir para a imunopatogênese da periodontite apical.

2.3 AÇÃO DO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO SOBRE OS EFEITOS CITOTÓXICOS DAS ENDOTOXINAS: ESTUDOS *IN VITRO* DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Barthel el al. (35) analisaram a liberação do TNF- α por monócitos após a exposição do LPS da *Escherichia coli* ao tratamento com hidróxido de cálcio [$Ca(OH)_2$]. Foram coletados monócitos do sangue periférico de um doador saudável, incubados e diferentes concentrações de LPS foram adicionadas. O teste ELISA foi utlizado para quantificar a liberação do TNF- α. O estudo concluiu que o $Ca(OH)_2$ é capaz de inibir a capacidade dos monócitos do sangue periférico humano de produzir TNF- α estimulados pelo LPS da E. coli.

Grunfeld et al. (1999) (36) analisaram a capacidade de lipoproteínas ativadas por macrófagos, na inibição dos efeitos tóxicos do ácido lipoteicóico (LTA). As lipoproteínas foram obtidas do plasma sanguíneo de doadores voluntários saudáveis. As células foram plaqueadas e ativadas com LPS ou LTA. Foram utilizados os testes de LAL quantificação de endotoxinas e o teste ELISA para verificação da produção do TNF. Os resultados mostraram que os macrófagos ativados por LTA estimularam a produção do fator de necrose tumoral (TNF), porém em menor quantidade quando comparado pela ativação com LPS. Quando uma dose efetiva de LTA foi misturada com lipoproteínas do plasma humano, a capacidade de produção do TNF foi inibida. As lipoproteínas podem impedir a ativação de macrófago para micro-organismos gram-negativos e para gram-positivos.

Safavi e Nichols (1993) (37) avaliaram os efeitos do hidróxido de cálcio sobre LPS bacteriano. Ácidos graxos livres foram quantificados em amostras de LPS de *Salmonella typhimurium* tratadas com hidróxido de cálcio ou água apirogênica, ou mantidas sem tratamento, por um período de 7 dias à 37ºC. As amostras foram

analisadas sob cromatografia a gás e esptrometria de massa e o tratamento com hidróxido de cálcio em LPS demonstrou libertar quantidades elevadas ácidos graxos livres. 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) (38) avaliaram se o tratamento de LPS com hidróxido de cálcio altera a sua ação biológica. Culturas de células de monócitos foram estimuladas com LPS ou LPS tratado com hidróxido de cálcio e os sobrenadantes de cultura foram analisadas quanto ao conteúdo de prostaglandina E2 por espectrometria de massa e cromatografia a gás. A prostaglandina E2 foi identificada em sobrenadantes de monócitos estimulados por LPS, mas não naqueles estimulados com LPS tratado com hidróxido de cálcio. Concluiu-se que o tratamento com $Ca(OH)_2$ pode alterar as propriedades biológicas dos LPS bacterianos.

Buck et al. (2001) (39) avaliaram os efeitos de substâncias irrigantes e do hidróxido de cálcio sobre o 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%. 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. A inatividade do LPS foi medida por quantificação da libertação de ácidos graxos livres. As substância irrigantes avaliadas mostraram pouco efeito sobre o LPS. Já o $Ca(OH)_2$ a longo prazo inativou o LPS por hidrólise de ligações éster nas cadeias de ácidos graxos do lípidio A.

Queiroz et al. (2008) (40) avaliaram a capacidade do hidróxido de cálcio em neutralizar o lipopolissacarídeo (LPS) de *P. aeruginosa*, através da liberação de óxido nítrico (NO) e TNF- alfa em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos. As células peritoneais foram expostas a uma solução de LPS e à suspensão LPS/hidróxido de cálcio em duas concentrações (50 mg/25 mg e 25 mg/25 mg). Após 8 horas de incubação, foi utilizado o reagente de Griess para quantificação do NO liberado. Após 24 horas, as células foram coradas os valores de absorbância obtidos. A presença de $Ca(OH)_2$ nas duas concentrações avaliadas reduziu significativamente a liberação de NO e TNF-alfa. Logo, o LPS bacteriano representa um forte estímulo para liberação destas citocinas, mas o hidróxido de cálcio é capaz de neutralizar esse

efeito.

Guo et al. (2014) (41) analisaram os efeitos do hidróxido de cálcio na virulência e no mecanismo de destruição óssea induzida por LPS de P. endodontalis. Foram utilizados teste de viabilidade celular, RT-PCR, imunofluorescência, ensaio de luciferase, ensaio imunoenzimático Western blotting, coloração de fosfatase ácida resistente ao tartarato e análises microtomográficas computadorizadas (µct) e histológicas. O autores detectaram que o hidróxido de cálcio resgatou a viabilidade de células MC3T3-E1 suprimida por LPS, e a atividade do fator nuclear-κB (NF-κB) nessas células, resultando na redução da expressão de interleucina-6 e fator de necrose tumoral-α. Além disso, o hidróxido de cálcio inibiu a osteoclastogênese induzida por LPS. O hidróxido de cálcio também resgatou a osteoclastogênese induzida por LPS e destruição óssea em calvária de camundongo. Concluiram, portanto, que o hidróxido de cálcio suprime a destruição óssea atenuando a virulência do LPS de P. endodontalis nas células ósseas.

Karapinar et al (2016) (42) avaliaram os efeitos pró-anti-inflamatórios do NAC e hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$) em macrófagos humanos estimulados com LPS. A citotoxicidade celular foi medida por análise de citometria de fluxo. NAC e $Ca(OH)_2$ foram aplicados na presença ou ausência de lipopolisacarídeos (LPS) para períodos de tempo de 4, 8 e 24h. Os níveis de proteína e mRNA do factor de necrose tumoral alfa (TNF-a) e do factor de crescimento transformante-beta1 (TGF-p1) foram determinados utilizando ELISA e qRT-PCR. Em células estimuladas por LPS, os níveis de TNF-α e mRNA foram reduzidos nas primeiras 4h, enquanto os níveis de TGF-β1 mRNA aumentaram nas 24 horas após o tratamento com $Ca(OH)_2$ e NAC. Em células não estimuladas com LPS, o nível de proteína TNF-α foi significativamente diminuído por NAC e $Ca(OH)_2$ na 4ª hora. Concluiu-se que NAC, semelhante ao $Ca(OH)_2$, tem propriedades anti-inflamatórias e pode ser considerado um agente terapêutico alternativo ao $Ca(OH)_2$.

Marinho et al. (2018) (43) avaliaram a influência de substâncias químicas auxiliares e medicação com hidróxido de cálcio ($CaOH_2$) na detecção de LPS/ lipídeo A e sua capacidade em ativar o receptor Toll-like 4 (TLR4). Fusobacterium nucleatum foram expostos a diferentes agentes antimicrobianos 1) soluções de hipoclorito de sódio a 5,25% , 2,5% e 1% (NaOCl), 2% de clorhexidina (CHX) (gel e solução) e 17%

de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA); 2) Medicação intracanal: pasta de $CaOH_2$ (1h, 24h, 7 dias, 14 dias e 30 dias); 3) Combinação de substâncias: a) 2.5% de NaOCl (1h), seguido de 17% de EDTA (3 min) e $CaOH_2$ (7 dias); b) 2% de CHX (1h), depois, 17% de EDTA (3 min) seguido de $CaOH_2$ (7 dias). A solução salina foi usada como controle. As amostras foram submetidas ao isolamento de LPS e à purificação de lipídios A. Os picos Lipidio A foram avaliados por MALDI-TOF MS enquanto que as bandas LPS por separação SDS-PAGE e coloração à prata. Ativação de TLR4 determinou atividades de função LPS. O tratamento com NaOCl a 5,25% levou à ausência de picos de lípido A e de bandas de LPS. LPS tratado com NaOCl 5,5% não ativaram TLR4 ($p < .0001$). A adição de $CaOH_2$ durante 7 dias às células tratadas com NaOCl 2,5% ou CHX 2% levou à ausência de bandas de lipídeo A e LPS, levando a uma menor ativação de TLR4.

2.4 AÇÃO DOS PROCEDIMENTOS ENDONDÔNTICOS SOBRE OS NÍVEIS E EFEITOS CITOTÓXICOS DE ENDOTOXINAS NOS CANAIS RADICULARES DE DENTES COM INFECÇÕES PRIMÁRIAS: ESTUDOS *IN VIVO*

Endotoxina apresenta um papel importante na patogênese das doenças periapicais. Diversos trabalhos avaliaram a ação das diferentes etapas do tratamento endodôntico sobre as endotoxinas no canal radicular.

2.4.1 Estudos em animais

Nelson-Filho et al. (2002) (44) analisaram através de radiografias, 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: grupo 1 –LPS; grupo 2 – LPS + $Ca(OH)_2$; grupo 3 – solução salina; grupo 4 –lesões apicais induzidas por 30 dias sem nenhum tratamento. Condições periapicais foram analisadas quanto a presença e tamanho de lesões ósseas. Lesões periapicais similares foram observados nos grupos

1 e 4. A lâmina dura nos grupos 2 e 3 apresentava-se intacta. A endotoxina bacteriana causou lesões periapicais visíveis radiograficamente, mas quando associada com $Ca(OH)_2$, a endotoxina foi neutralizada.

Silva et al. (2002) (45) avaliaram os efeitos de LPS bacteriano em tecidos apicais e periapicais de dentes de cães. Após a remoção da polpa, 60 pré-molares de cães foram divididos em quatro grupos segundo a substância inoculada nos canais radiculares: grupo 1 –LPS; grupo 2 - LPS + $Ca(OH)_2$; grupo 3 - solução salina; grupo 4 – indução de lesão periapical sem tratamento. Após 30 dias, os dentes foram 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. Características histológicas similares foi detectado nos grupos 2 e 3. A endotoxina bacteriana foi capaz de gerar lesões periapicais e que o $Ca(OH)_2$ foi eficiente na neutralização do LPS.

Tanomaru et al. (2003) (46) analisaram o efeito do preparo químico-cirúrgico com diferentes soluções irrigadoras e medicação intracanal com pasta de hidróxido de cálcio em canais radiculares de cães contaminados com LPS bacteriano. Cento e quarenta pré-molares de sete cães foram inoculados com LPS de *E.c*oli por 10 dias. As soluções irrigantes utilizadas durante o PQC foram: grupo 1 – NaOCl 1%; grupo 2 - NaOCl 2,5 %; grupo 3 - NaOCl 5 %; grupo 4 - CHX 2%; grupo 5 - solução salina; grupo 6 - a solução de LPS foi mantida no canal radicular durante todo o experimento; grupo 7 - PQC com solução salina e medicação com $Ca(OH)_2$. Após 60 dias os tecidos periapicais foram processados e avaliados histologicamente. Os grupos 1 à 6 apresentaram maior quantidade de infiltrado inflamatório, maior espessamento do ligamento periodontal e reabsorção óssea, quando comparado com o grupo 7 (tratado com medicação de $Ca(OH)_2$).

Hong et al. (2004) (47) estudaram o papel da endotoxina bacteriana na indução de reabsorção óssea periapical, e a ação da polimixina B sobre estas endotoxinas. A exposição das endotoxinas isoladas de *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas endodontalis*, em culturas de macrófagos, estimulou a produção de interleucina-1α (IL-1α) e fator de necrose tumoral α (TNFα), e a adição de polimixina B às endotoxinas inibiram a produção destes mediadores. Um modelo de doença da lesão periapical foi

estabelecido em ratos Wistar, a administração de polimixina B reduziu a extensão da reabsorção óssea associada à lesão entre 76% a 80%.

2.4.2 Etudos clínicos

Schein e Schilder (1975) (48) detectaram e quantificaram os níveis de endotoxina presentes nos canais radiculares de 40 dentes de pacientes com indicação de tratamento endodôntico em diferentes diagnóstico pulpar, através do teste cinético de LAL. Observou-se que dentes com necrose pulpar apresentam maiores concentrações de endotoxinas quando comparados com dentes com polpa viva e que a concentração de endotoxina é maior em dentes com sintomatologia clínica. Além disso, dentes com lesão periapical apresentaram quantidades mais elevadas de endotoxinas do que dentes sem lesão.

Vianna et al. (2007) (49) determinaram a quantidade de endotoxinas e bactérias cultiváveis em 24 canais radiculares com necrose pulpar, antes (S1) e após o preparo químico-cirúrgico com gel de clorexidina a 2% (S2), e depois de 7 dias de medicação intracanal (S3) com três medicamentos diferentes: $CaOH_2$, CHX gel 2% e $CaOH_2$ + CHX gel 2%. Utilizou-se o teste de LAL para quantificação de endotoxinas e técnica de cultura para isolar, identificar e quantificar as bactérias. Endotoxinas e bactérias estavam presentes em 100% das amostras iniciais, após o PQC, foi observada uma redução média de endotoxinas de 44,4%. Oito (33,3%) canais radiculares foram positivos para cultura com uma redução média de bactérias de 99,96%. Depois de 7 dias de medicação intracanal, a concentração de endotoxinas diminuiu apenas 1,4% em comparação com S2 e as bactérias residuais foram recuperadas por meio de análise de cultura em 13 casos (54,1%). Nenhuma diferença significativa foi observada entre as diferentes medicações intracanal.

Martinho e Gomes (2008) (50) avaliaram a quantidade de entoxinas e bactérias cultiváveis em 24 dentes com necrose pulpar, antes (S1) e após o preparo químico-cirúrgico (S2), e investigaram a possível correlação de endotoxinas e bactérias com a presença de sintomatologia clínica. Foi utilizado o teste LAL para quantificar as endotoxinas e a técnica de cultura para quantificar as bactérias. LPS e bactérias foram

detectados em 100% das amostras iniciais (S1). Após o PQC (S2), foi observada uma redução média de endotoxina de 59,99% e redução da carga bacteriana de 99,78%. O PQC foi eficaz na redução de bactérias, porém menos eficaz contra redução de endotoxinas. Níveis mais elevados de LPS foram encontrados em dentes com sintomatologia clínica.

Gomes et al. (2009) (51) avaliaram a redução de LPS em 54 dentes com periodontite apical, antes (S1) e após o PQC(S2) com NaOCl a 2,5% ou CHX em gel a 2%. Foi utilizado o teste LAL para quantificar a endotoxina. Foi detectado LPS em 100% das amostras analisadas. Após o PQC houve uma redução na quantidade de o conteúdo de LPS, com maior redução no grupo do NaOCl a 2,5%.Porém ambos os grupos não foram eficazes na eliminação de endotoxina nos canais radiculares com infecção primária.

Martinho et al. (2010) (52) avaliaram a remoção de endotoxinas de canais radiculares de 21 dentes com periodontite apical primária, antes (S1) e após o PQC (S2) com instrumentos rotatórios, NaOCl 2,5% e EDTA 17%. As amostras foram analisadas pelo teste cinético de LAL para quantificação de endotoxinas. O teste de indicou que as endotoxinas estavam presentes em 100 % dos canais radiculares analosados, antes e após o preparo dos canais. A análise dos dados quantitativos detectou uma redução significativa de endotoxina após o PQC (98,06 %) em relação a coleta inicial.

Martinho et al. (2011) (53) realizaram um estudo comparativo de métodos de análise de endotoxina, para determinar o mais aplicável em infecões endodônticas primárias. Vinte e uma amostras de canais radiculares foram analisadas através do teste cromogênico endpoint de LAL (QCL), teste quantitativo cinético cromogênico de LAL (KQCL), e teste cinético turbidimétrico de LAL (Turbidimétrico). Todos os três métodos foram eficazes na recuperação da endotoxina da infecção do canal radicular. Independentemente do método, a endotoxina foi detectada em 100% dos canais analsados. Não foi observada diferença significante entre os testes cinéticos KQCL e Turbidimétrico. Já o QCL demonstrou um valor médio significativamente maior que os dois outros testes. Assim, concluiu-se que os testes KQCL e Turbidimétricos foram mais precisos e com melhor reprodutibilidade que o teste QCL.

Endo et al. (2012) (54) avaliaram *in vivo* da quantidade de bactérias e endotoxinas em 15 canais radiculares de dentes com periodontite apical secundária, antes (S1) e após (S2) o PQC, por meio de cultura, PCR 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%. Níveis de endotoxina encontrados em canais radiculares infectados estavam relacionados a um tamanho maior de área radiolúcida na região periapical.

Oliveira et al. (2012) (55) investigaram os efeitos do tratamento endodôntico, utilizando diferentes irrigantes em endotoxinas de canais radiculares com necrose pulpar e avaliaram os efeitos citotóxicos. Amostras de 36 canais radiculares foram coletadas antes (S1) e após a instrumentação (S2), após o uso de EDTA e após medicação intracanal (S4), 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; grupo 3 (controle): CHX + solução salina. As Endotoxinas foram quantificadas pelo teste de LAL e os efeitos citotóxicos avaliados pela produção de citocinas (interleucina 1ß [IL- 1ß] e TNFα) 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%). A medicação intracanal (CHX + hidróxido de cálcio) promoveu uma importante neutralização de 99,2% para 100%. O conteúdo inicial do canal radicular induziu uma maior produção de TNFα e IL- 1ß em comparação com as amostras obtidas após o tratamento.

Xavier et al. (2013) (56) compararam a eficácia de tratamentos endodônticos realizados em uma ou duas visitas, na redução de endotoxinas e bactérias cultiváveis de canais radiculares infectados. Quarenta e oito canais radiculares de dentes com periodontite apical foram 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. Foi utilizado o teste de LAL para quantificar endotoxinas e técnica de cultura para determinar as contagens bacterianas. Endotoxinas e bactérias cultiváveis foram detectados em 100 % das amostras iniciais. Não foram encontradas diferenças na redução da carga bacteriana ao comparar os grupos de tratamento de 1 e 2 sessões, independentemente do irrigante utilizado. Em relação à quantidade de

endotoxinas, os tratamentos realizados em duas sessões foram significativamente mais eficazes quando comparados com uma sessão.

Martinho et al. (2014) (57) realizaram um estudo comparando a eficácia dos sistemas reciprocantes de instrumento único e sistemas rotatórios na remoção de endotoxinas e bactérias cultiváveis de canais radiculares com periodontite apical. 48 pacientes com dentes com periodontite apical primária foram aleatoriamente divididos em 4 grupos: Waveone; Reciproc; ProTaper; e Mtwo. As amostras foram coletadas antes e após o PQC e analisadas por meio de cultura para determinar a contagem de UFCs e do teste do teste de LAL, para quantificar as endotoxinas. Endotoxinas e bactérias cultiváveis foram recuperados em 100% das amostras iniciais. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de redução de endotoxinas e bactérias, em ambos os sistemas. Todos os sistemas analisados mostraram eficácia similar na redução de endotoxinas e bactérias cultiváveis em canais radiculares infectados.

Sousa et al. (2014) (58) avaliaram os níveis de endotoxinas em canais radiculares contaminados e em exsudato de abscessos periapicais agudos, assim como a eficácia dos procedimentos endodônticos na redução de endotoxinas no canal radicular. Amostras de 10 canais radiculares de dentes com periodontite apical e exsudato foram coletados 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). Foi utilizado o teste cinético turbidimétrico de LAL para a quantificação de endotoxinas. Endotoxinas foram detectados em 100% das amostras iniciais com valores médios de 175 EU/mL e de 41,5 EU/mL, para exsudato e canal radicular, respectivamente. Após o PQC, endotoxinas foram reduzidos a um valor médio de 0,54 EU/mL. Irrigação final com EDTA não apresentou eficácia significativa na redução dos níveis de endotoxina (0,37 EU / mL). No entanto, a medicação intracanal por 30 dias reduziu as endotoxinas para valores médios de 0,03EU/mL. O uso da medicação intracanal promoveu maior redução dos níveis de endotoxina em canas radiculares após o PQC.

Adl et al. (2015) (59) analisaram a eficácia da medição intracanal a base de hidróxido de cálcio por 7 dias, sobre a quantidade de LPS em dentes com periodontite apical. Foram coletadas amostras de 25 canais antes (S1), após o PQC (S2) e após a medicação intracanal por 7 dias (S3). O teste de LAL foi usado para quantificar o

LPS. LPS esteve presente em 100% dos canais radiculares nas amostras inicias, após o PQC (S2) e após a medicação intracanal (S3). Uma redução significativa (29,54%) foi encontrada após o PQC e entre S2 e S3 (25,26%) Apesar da redução da quantidade de endotoxina após o PQC e medicação intracanal, valores relativamente elevados de endotoxina permaneceram nos canais radiculares.

Carvalho et al (2016) (60) analisaram os efeitos do tratamento endodôntico utilizando diferentes irrigantes (solução de hidróxido de cálcio + NaOCl e polimixina B + NaOCl) e medicação intracanal na redução de endotoxinas em dentes com infecção endodôntica primária. Amostras de 33 canais radiculares foram coletadas antes (S1), após a instrumentação (S2), após o uso de EDTA (S3) e após medicação intracanal (S4), por 14 dias. Os canais radiculares foram divididos em 3 grupos: grupo 1: NaOCl 2,5%+ solução de hidróxido de cálcio a 0,14%; grupo 2: NaOCl 2,5% + polimixina B e controle NaOCl 2,5%. As endotoxinas foram quantificadas pelo teste de LAL. As endotoxinas foram detectadas em 100% das coletas iniciais. O grupo NaOCl + PmB apresentou a maior redução de endotoxina após instrumentação (76,17%), semelhante ao grupo NaOCl + LW (67,64%, $p < 0,05$) e diferente do grupo NaOCl (42,17%, $p < 0,05$). Após o período de medicação intracanal (S4), houve aumento significativo da neutralização das endotoxinas.

Cavalli et al. (2017) (61) correlacionaram o perfil microbiológico e os níveis de endotoxinas encontrados na infecção endodôntica primária com a presença de características clínicas e avaliaram a remoção de micro-organismos e endotoxinas utilizando sistemas rotatório, recíprocante e híbridos para o PQP. As amostras de 33 canais radiculares foram coletadas antes (S1) e após o PQC (S2) e submetidas a técnica de cultura e ao teste de hibridação DNA-DNA para analisar o perfil microbiológico e ao teste de LAL para quantificação de endotoxinas. A técnica de cultura mostrou diferenças estatísticas na redução das unidades formadoras de colônias / mL em os sistemas testados ($P < 0,05$), porém sem diferença significante entre os grupos. As espécies mais detectadas foram C. ochracea (53%) e F. nucleatum (53%) em S1 e F. nucleatum (50%) e L. buccalis (50%) em S2. Quanto à redução das endotoxinas em S2, Mtwo apresentou os melhores resultados (95,05%) seguidos pelos grupos Genius (91,85%) e Reciproc (64,68%), mas não houve diferença estatística entre os grupos. Características clíncas foram associadas a presença de micro-organismos específicos.

Herrera et al. (2017) (62) avaliaram a influência da ativação ultrassônica do EDTA 17% após o PQC, na redução de LPS e bactérias cultiváveis em dentes com periodontite apical. Amostras de 25 canais radiculares foram feitas antes (S1), após (S2) o PQC, após EDTA (S3); G1- com atividade ultrassônica e G2- sem ativação ultra-sônica. A técnica de cultura foi utilizada para determinar o número de unidades formadoras de colônias (CFU) e o teste de LAL para medir os níveis de endotoxina. Endotoxinas e bactérias cultiváveis foram recuperadas em 100% das amostras iniciais (S1). O PQC foi eficaz na redução de endotoxinas e carga bacteriana. Maior redução de endotoxina foram detectado com a ativação ultrasônica do EDTA (0,02 EU mL) em comparação com o grupo sem ativação (1,13 EU mL). Em relação à redução bacteriana, não foi encontrada diferença estatisticamente significante em S3, independentemente do grupo. A ativação ultrasônica do EDTA foi eficaz na redução dos níveis de endotoxina nos canais radiculares com periodontite apical.

Martinho et al. (2018) (63) compararam a eficácia de medicações intracanais de 7 e 14 dias na redução de bactérias / endotoxinas de canais radiculares infectados e determinou sua antigenicidade contra macrófagos através dos níveis de citocinas. Setenta e dois dentes foram coletados e aleatoriamente divididos em seis grupos de acordo com a medicação e tempo de aplicação: grupos de 7 dias = G1, Ca (OH) 2 + solução salina (SSL); G2, gel de Ca (OH) 2 + clorexidina a 2% (CHX); e G3, gel de 2% de CHX e grupos de 14 dias = G4, Ca (OH) 2 + SSL; G5, gel de Ca (OH) 2 + 2% de CHX; e G6, 2% de gel de CHX. Técnicas de cultura foram usadas para determinar as contagens bacterianas e o teste de lisado de amebócito (LAL) limulus para quantificar as endotoxinas. IL-1, TNF-a e PGE2 foram medidos por ensaio ELISA. Não foram encontradas diferenças com relação à redução bacteriana, entre grupos. Os protocolos CHX (G3 e G6) exibiram a menor efetividade contra endotoxinas. Todos os protocolos foram eficazes na redução dos níveis citocinas. O protocolo CHX de 7 dias (G3) exibiu a menor eficácia na redução dos níveis da maioria das citocinas. Os autores cocluíram que todas as medicações intracanal de 7 e 14 dias foram eficazes na redução de bactérias e endotoxinas, bem como na redução dos níveis de citocinas inflamatórias, com CHX mostrando eficácia limitada contra endotoxinas.

3 PROPOSIÇÃO

Diante da revisão da literatura atual apresentada, observa-se a importância da realização de trabalhos clínicos que avaliem o potencial de redução e neutralização do efeito citotóxico das endotoxinas através da a indução de citocinas pró-inflamatórias por fibroblastos humanos. Assim, propõe-se com este trabalho os objetivos descritos neste capítulo.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a quantidade de bactérias e endotoxinas, antes e após o tratamento endodôntico de dentes portadores de periodontite apical primária utilizando ativação ultrassônica de solução aquosa de hidróxido de cálcio, e sua correlação com a indução de citocinas pró-inflamatórias por fibroblastos humanos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a quantidade de bactérias e LPS nos canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento endodôntico: PQC, ativação da solução de hidróxido de cálcio e medicação intracanal com pasta de hidróxido de cálcio.
- Determinar a quantidade de citocinas pró-inflamatórias em cultura de fibroblastos humanos induzidos pelo conteúdo do canal radicular nas diferentes etapas do tratamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada nesta pesquisa baseou-se em diversos 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 91273618.7.0000.0075 (ANEXO A) desta instituição e após o consentimento livre e esclarecido de 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 DOS PACIENTES

A seleção da amostra para esse estudo foi realizada de acordo com os critérios determinados por Beus et al. (2012) (10), em um estudo clínico randomizado prévio.

Foram selecionados 27 dentes permanentes unirradiculares, birradiculares ou multirradiculares, em condições que justificassem a realização do tratamento endodôntico, com infecção endodôntica primária e rarefação óssea periapical visível radiograficamente.

Foram excluídos desta pesquisa dentes que apresentaram bolsa periodontal

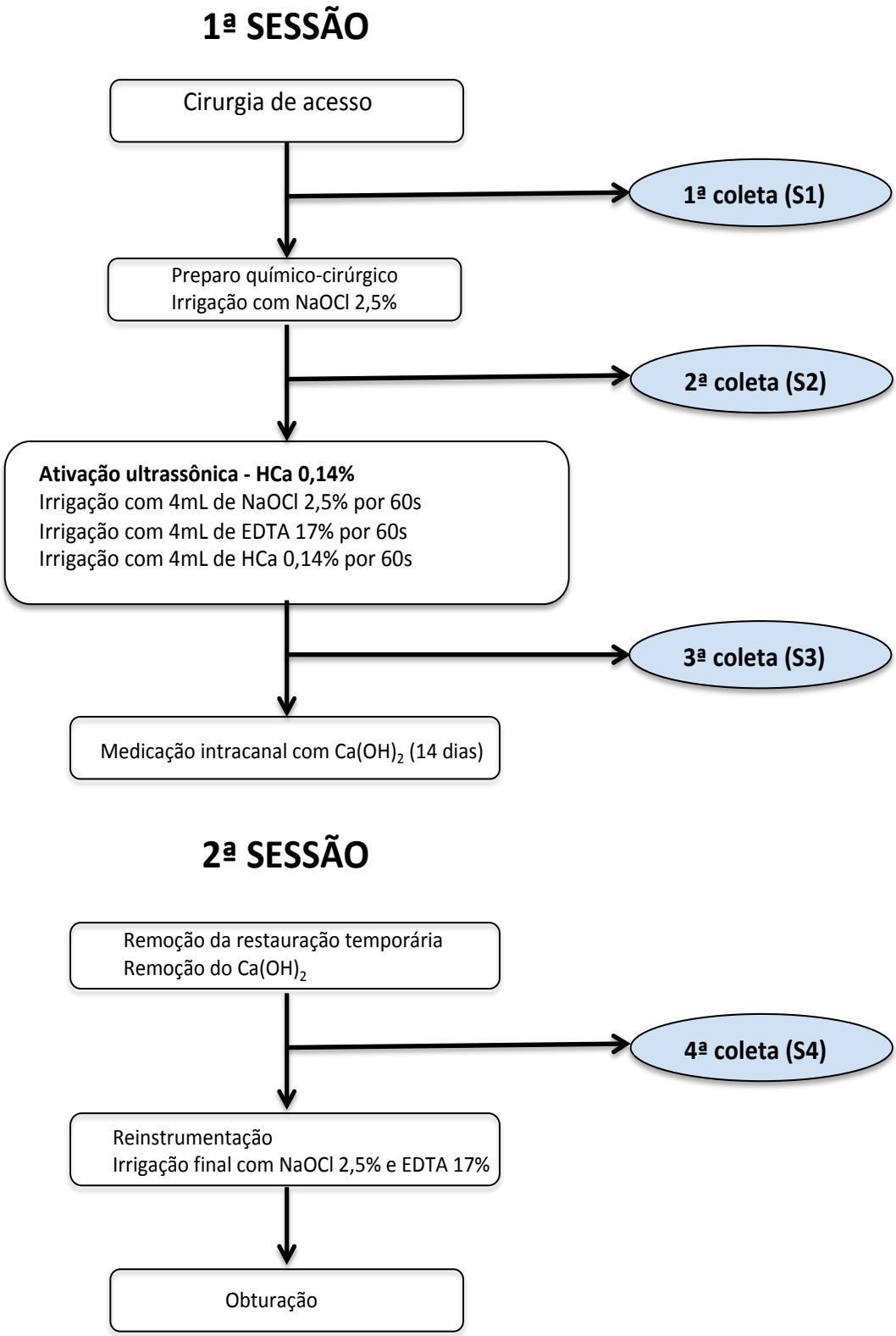
superior a 4 mm, raízes com comprimento inferior a 15 mm ou superior a 25mm, apicigênese incompleta, perda de tecido dentário que impossibilite o isolamento absoluto, ou alterações na luz do canal radicular visíveis radiograficamente, como calcificações ou reabsorções.

Pacientes com alterações sistêmicas relevantes, como doenças degenerativas crônicas, processos infecciosos, doenças autoimunes ou imunodeficiências induzidas ou adquiridas não puderam ser incluídos nesta pesquisa. Também foi necessária a ausência de uso de antibióticos nos 90 dias anteriores ao início da pesquisa.

Foi realizado o cáculo amostral no programa Graphpad Prism, utilizando como base os dados do estudo piloto. O teste bilateral para amostras relacionadas, nível de significâcia de 0,05% e poder de teste de 0,85 resultou em um tamanho de amostra de 22 casos.

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

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



Fonte: a autora

4.3 PREPARO DA SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO

A solução de hidróxido de cálcio foi preparada por dissolução de 0.14g de pó de hidróxido de cálcio (JT Baker ®) em 100ml de água destilada estéril à temperatura ambiente, até que uma fase líquida e uma fase sólida foi obtida. A fase líquida sobrenadante foi ajustada a pH 12,5 e utilizada posteriormente, descartando a fase sólida (Weckwerth et al., 2012) (64).

4.4 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 121º 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 180º C por 4 horas (Hagman, 2012) (65). 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.

Após o exame clínico e radiográfico inicial, os pacientes receberam 10mL de antisséptico bucal para bochechar por 1 minuto. Então, os dentes foram anestesiados e foi procedido o isolamento absoluto com arco plástico (SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), lençol de borracha (SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), grampos metálicos adequados (SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e barreira gengival (Top Dam, FGM, Brasil). A antissepsia do campo operatório e da coroa do dente foi realizada com

swabs esterilizados (Berkshire Corporation, North Carolina, USA) 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 tiossulfato de sódio 5%.

Realizou-se a cirurgia de acesso em duas etapas com auxílio de brocas diamantadas esféricas 1015 (Microdont Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil) em alta-rotação refrigerados com auxílio de seringas de 20mL (BD Company, São Paulo, SP, Brasil) e soro fisiológico esterilizados e apirogênicos (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 foram novamente desinfetados como descrito anteriormente e a cirurgia de acesso foi finalizada com novas brocas esterilizadas e apirogênicas, refrigeradas com soro fisiológico esterilizado e apirogênico. Foram realizadas coletas da coroa do dente e imediações da câmara pulpar para comprovar a eficácia das manobras de antissepsia. A ausência de bactérias no campo operatório foi comprovada por meio de PCR convencional utilizando *primers* universais para o domínio *Bacteria*. Caso houvesse presença de bactérias na amostra, o dente e as amostras coletadas subsequentemente foram excluídos da pesquisa.

Ao término destes procedimentos, a câmara pulpar foi aspirada e o canal radicular foi preenchido com solução salina esterilizada e apirogênica. A odontometria foi realizada com um Instrumento tipo K (Dentsply Maillefer, Baillagues, Suíça) que melhor se ajustasse no canal radicular, tendo como medida 1,0mm aquém do forame apical, com auxílio de localizador foraminal (J. Morita Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Um instrumento tipo H número 15 foi pressionado contra as paredes do canal para suspender bactérias e endotoxinas na solução. Quatro cones de papel número 15 esterilizados e apirogênicos foram introduzidos no canal para coletar o conteúdo inicial de bactérias e de endotoxinas (S1), sendo mantidos em posição por 1 minuto cada. O primeiro cone foi introduzido em criotubo esterilizado e apirogênico (Equiplex Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânica, GO, Brasil), para posterior análise de endotoxinas. A parte ativa da lima utilizada e os demais cones foram inseridos em criotubos esterilizados contendo 300uL de solução RNA later, para análise de bactérias.

Foi depositada solução de NaOCl 2,5% na câmara pulpar e levada progressivamente no sentido coroa-ápice com um instrumento tipo K número 10 (Dentsply Maillefer, Baillagues, Suíça), agitando a substância, de modo a permitir um contato mais rápido do NaOCl com o conteúdo do canal. Este processo foi repetido, até o comprimento real de trabalho (CRT) estabelecido a 1,0mm aquém do forame apical.

Após a odontometria e o esvaziamento do canal, instrumentos manuais do tipo K foram levados sem pressão até CRT, em ordem crescente de diâmetro - iniciando do instrumento número 10 ao número 40 (Dentsply Maillefer, Baillagues, Suíça). O primeiro instrumento que demonstrasse travamento no CRT foi 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, utilizava-se instrumento Reciproc R25 e finalizava o preparo do canal com lima rotatória Mtwo 35/.04 (VDW GmbH, Munique, Alemanha). Caso houvesse travamento nas limas 20, 25 ou 30, o instrumento Reciproc R40 foi escolhido. Já o instrumento Reciproc R50 foi utilizado em canais cujo instrumento inicial de referência seja de número 35 ou 40. Todo o PQM foi realizado na presença de NaOCl 2,5% com a seguinte cinemática: o instrumento foi acionado por motor VDW-silver (VDW GmbH, Munique, Alemanha), seguindo sequências de três ciclos de penetração/retrocesso, de forma a aprofundar o preparo a cada ciclo, ao término da sequência, o instrumento foi limpo com uma gaze esterilizada, e o canal foi irrigado com NaOCl 2,5%.

Durante o PQC, a irrigação dos canais foi realizada com seringas plásticas esterilizadas e apirogênicas de 10,0mL e pontas de irrigação endodôntica com diâmetro de 30G e saída lateral para substância (Endo-EZE - Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, Estados Unidos da América). A substância extravasada dos canais foi aspirada por meio de cânulas de aspiração (SurgiTip - Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, Estados Unidos da América) acopladas à bomba à vácuo odontológica. Foram utilizados 10 mL de NaOCl antes de cada ciclo de instrumentação, assim, o volume total de substância empregada durante o PQC foi de 30 mL. Ao término do preparo químico mecânico os canais radiculares receberam nova irrigação com 10mL de NaOCl 2,5%. As pontas irrigadoras foram posicionadas à 2 mm aquém do CRT e utilizadas com movimento de vai e vem, com amplitude de aproximadamente 2mm.

O conteúdo do canal foi então aspirado com pontas *Capillary tips* 0,014”e 0,019” (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, Estados Unidos da América) e foi realizada irrigação com 5ml de tiossulfato de sódio 5% por 1 minuto. O canal foi preenchido com soro fisiológico esterilizado e apirogênico e nova coleta (S2) foi realizada como descrito anteriormente.

Após a finalização do PQC, foi realizado o protocolo de irrigação final com Solução de Hidróxido de Cálcio. No qual foi feito a irrigação ultrassônica com 2mL de NaOCl 2,5% utilizando um inserto liso Irrisonic de 0,2mm de diâmetro e conicidade 01 (Helse, Ribeirão Preto, SP, Brasil), acionada por aparelho de ultrassom (CVDentus, São José dos Campos, SP, Brasil) ajustado em 10% de potência. A ponta do inserto foi posicionada 2 mm aquém do CRT, com o cuidado de não encostar em nenhuma parede do canal e ativada por 30 segundos. A solução de NaOCl 2,5% foi renovada (2 mL) e ativada por mais 30s. Estes procedimentos foram repetidos com 4 mL de EDTA 17% e posteriormente irrigado com 2ml de solução de Hidróxido de Cálcio 0,14% e ativada por 30s. A solução foi renovada (2ml) e ativada por mais 30 segundos, totalizando 3 minutos. Após os três ciclos, o conteúdo do canal foi aspirado com pontas *Capillary tips* 0,014”e 0,019” e foi realizada irrigação com 5ml de EDTA 17% por 1 minuto. Os canais foram preenchidos com soro fisiológico esterilizado e apirogênico e nova coleta foi realizada (S3).

Os canais radiculares foram então preenchidos com Hidróxido de Cálcio (Ultracal® XS Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA) e tiveram suas aberturas coronárias seladas com uma camada de obturador provisório à base de óxido de zinco (Dentalvile, Joinville, SC, Brasil) e uma camada de cimento de ionômero de vidro (Vidrion R, SSwhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Após o período de 14 dias, os procedimentos de isolamento absoluto, abertura coronária e desinfecção do campo operatório foram realizados seguindo o mesmo protocolo utilizado na primeira sessão. A medicação intracanal foi removida utilizando 10mL de EDTA 17% agitando com uma lima de fino calibre, #15 e então, uma quarta coleta (S4) foi realizada seguindo os mesmos procedimentos realizados nas coletas anteriores. Posteriormente, o canal foi reinstrumentado com instrumento de tamanho semelhante ao selecionado anteriormente e irrigado com 10ml de NaOCl a 2,5%. Feito isso, os canais foram irrigados com 10mL de NaOCl 2,5%, seguido por 10mL de EDTA

17%, com seringa e pontas de irrigação, e obturados por meio de técnica de condensação lateral de guta-percha e cimento AH-Plus (Dentsply Maillefer, Baillagues, Suiça).

As aberturas coronárias foram seladas com resina composta (Z100, 3M Corporation, St. Paul, MN, EUA).

4.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DE BACTÉRIAS E ENDOTOXINAS

Os criotubos contendo as amostras bacterianas eram armazenados em freezer a -80º C e os tubos de vidro contendo as amostras de endotoxina ficaram estocados em -20º C, até o momento em que foram realizadas as análises. Os protocolos dos procedimentos laboratoriais realizados estão no APÊNDICE D.

4.5.1 Extração de DNA

As amostras endodônticas mantidas em RNAlater foram descongeladas a 37°C por 10 min e homogeneizadas por agitação durante 1 min. A extração de DNA foi realizada com o kit de purificação MasterPure (Epicentre, Madison, WI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.5.2 Reação de cadeia em polimerase em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas com *primers* universais para a região conservada do gene16S rRNA específicos do domíno *Bacteria*. A sequência utilizada para os *primers* serão: *Forward*: 5'-CCA TGA AGT CGG AAT CGC TAG-3' e *Reverse*: 5'-GCT TGA CGG GCG GTG T-3'. As reações foram realizadas em placas de 96 poços com um volume total de 20 µL contendo: 10 µL Power SYBR Green

Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,5 µL de cada primer, 4 µL do DNA extraído das amostras e H2O.

O ciclo de amplificação foi: 95ºC por 10 min, seguido por 40 ciclos de denaturação a 95ºC por 15 s, anelamento a 60ºC por 1 min e extensão a 95ºC por 15 s. As reações foram feitas utilizando o termociclador *Step One Plus* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e os resultados analisados pelo software ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 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.

4.5.3 Teste quantitativo cinético turbidimétrico de Limulus Amebocyte Lisate

As amostras endodônticas coletadas foram descongeladas a 37°C por 10 min. Um mililitro de água ápirogênica foi adicionado em cada criotubo contento as amostras e homogeneizadas por agitação durante 1 min.

A quantidade de endotoxinas foi analisada pelo teste quantitativo cinético turbidimétrico de LAL (*Limulus Amebocyte Lisate*) (Lonza, Walkersville, MD, EUA). Este teste foi realizado em triplicata para todas as coletas do conteúdo do canal radicular.

Diluições da endotoxina padrão de *Escherichia coli* foram realizadas em concentrações de 0,001, 0,01, 0,1 e 10 EU/mL, as quais representarão os padrões de comparação das amostras (curva padrão). Em uma placa apirogênica de 96 poços, foram 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 foi medida individualmente com um leitor de placa. Como a absorbância é diretamente proporcional à concentração de

endotoxinas presentes nas amostras, esta concentração foi determinada a partir da curva padrão.

4.6 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS PELA PRODUÇÃO DE CITOCINAS (IL-1β, IL-6 E CCL2) POR CULTURA DE FIBROBLASTOS DE LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO

Foi realizado o cáculo amostral no programa Bioestat versão 5.0, utilizando como base os dados do estudo prévio (55). O teste bilateral para amostras relacionadas, nível de significâcia de 0,05% e poder de teste de 0,85 resultou em um tamanho de amostra de 4 casos. Foram consideradas possível perdas e com isso foi selecionado 5 pacientes aleatórios para análise das amostras.

4.6.1 Obtenção de Fibroblastos de Ligamento Periodontal Humano

Células Fibroblásticas do ligamento periodontal (PDL) foram obtidas do biobanco de células do laboratório de Pesquisa Básica no departamento de Dentística na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP, São Paulo, SP) e foram mantidas em meio DMEM (LGCBio, São Paulo, SP, Brasil) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen do Brasil, São Paulo, SP). O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias e as células permaneceram em estufa a 37ºC com 5% de CO_2.

4.6.2 Análise da produção de citocinas por ELISA

Para os testes, uma suspensão de células foi preparada por remoção enzimática com solução de tripsina (Invitrogen, Thermofisher). Em seguida, o meio de cultura contendo as células foi transferido para tubos e centrifugada a 1200 rpm durante 5 minutos a 25° C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em DMEM + 10% de FBS. Foram utilizadas placas de 96 poços para o ensaio de viabilidade e de 24 poços para a coleta de sobrenadante. As células foram semeadas a 1,25 x 10^4 e 8

x 10^4 células/poço respectivamente. Após 24h estas células foram ativadas com as amostras recolhidas a partir dos canais radiculares e incubadas a 37° C numa atmosfera de 5% de CO_2.

O preparo do inóculo foi feito por meio da uma diluição em igual volume (1:1) do conteúdo dos cones em água ultrapure com DMEM 2x concentrado. Esta solução foi então diluída mais 5x para a obtenção de uma solução de conteúdo de canais radiculares diluída 10x (60ul do conteúdo + 60ul DMEM 2X 20% SBF + 480ul DMEM 10% SBF). A partir da diluição de 1/10, foi feita diluição seriada de ½ para o ensaio de viabilidade celular (triplicata), com volume final de 100ul.

A citotoxicidade do estímulo frente às células de LP foi avaliada por meio de ensaio empregando brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Molecular Probes, Life Technologies), conforme descrito por estudos prévios (66, 67). Após o estímulo, foi realizada incubação com solução de MTT (5 mg/mL) e meio de cultura por 4 h a 37º C, a solução foi descartada e os cristais de formazan foram dissolvidos em solução de dimetilsulfóxido (Synth). A leitura em espectrofotômetro foi realizada após 30 min a 570 nm (Synergy H1, Biotek, Winooski, EUA). Com base neste ensaio, foi escolhida a diluição de 1/10 para o ensaio seguinte.

Em placas de 24 poços, as células foram estimuladas com 500 uL da solução de 1/10 do conteúdo dos canais radiculares por 24 h. Os sobrenadantes foram então recolhidos, centrifugados a 1000 x g por 5 min a 4ºC e armazenados em freezer -20ºC.

As citocinas IL-1β, IL-6, CCL2 foram quantificadas no sobrenadante das células por *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). O kit DuoSet ELISA Development Systems (R & D Systems, Minneapolis, USA) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Assim, placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos de detecção anti-IL-1 β, anti- IL-6, ou anti-CCL2 (R&D Systems INC, Marquette, NE) e mantidas *overnight* em temperatura ambiente (TA). No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS contendo Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com soro albumina bovina (BSA, 0,1%) por 2 h a TA. Após, as placas foram lavadas com PBS-T e receberam os sobrenadantes da cultura de células (50uL por poço) ou os padrões das citocinas com concentrações conhecidas (curva-padrão). Após incubação a TA por duas horas, as placas foram novamente lavadas (PBS-T) e em seguida, receberam

anticorpos de captura marcados com biotina (50 µL por poço). Após duas horas de incubação, as placas foram novamente lavadas e foi adicionada estreptavidina conjugada com peroxidase (R&D Systems), mantidas por 20 minutos ao abrigo da luz. Em seguida, a reação foi revelada com solução de substrato cromogênico que contém Reagente A (peróxido de hidrogênio) e Reagente B (tetrametilbenzidina) (R&D Systems) e, após 20 minutos, a reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 2N. A absorbância foi lida a 450 nm e 540 nm em espectrofotômetro Synergy HT e as quantificações foram realizadas utilizando-se dos valores das curvas padrão. Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância e teste de Tukey, adotando um nível de significância de 5%.

Uma análise complementar (Teste de Pearson) foi realizada para verificar uma possível correlação entre os níveis de endotoxinas e citocinas encontrados.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram tabulados de acordo com a variável estudada, e foram analisados estatisticamente com o 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% (α=0,05).

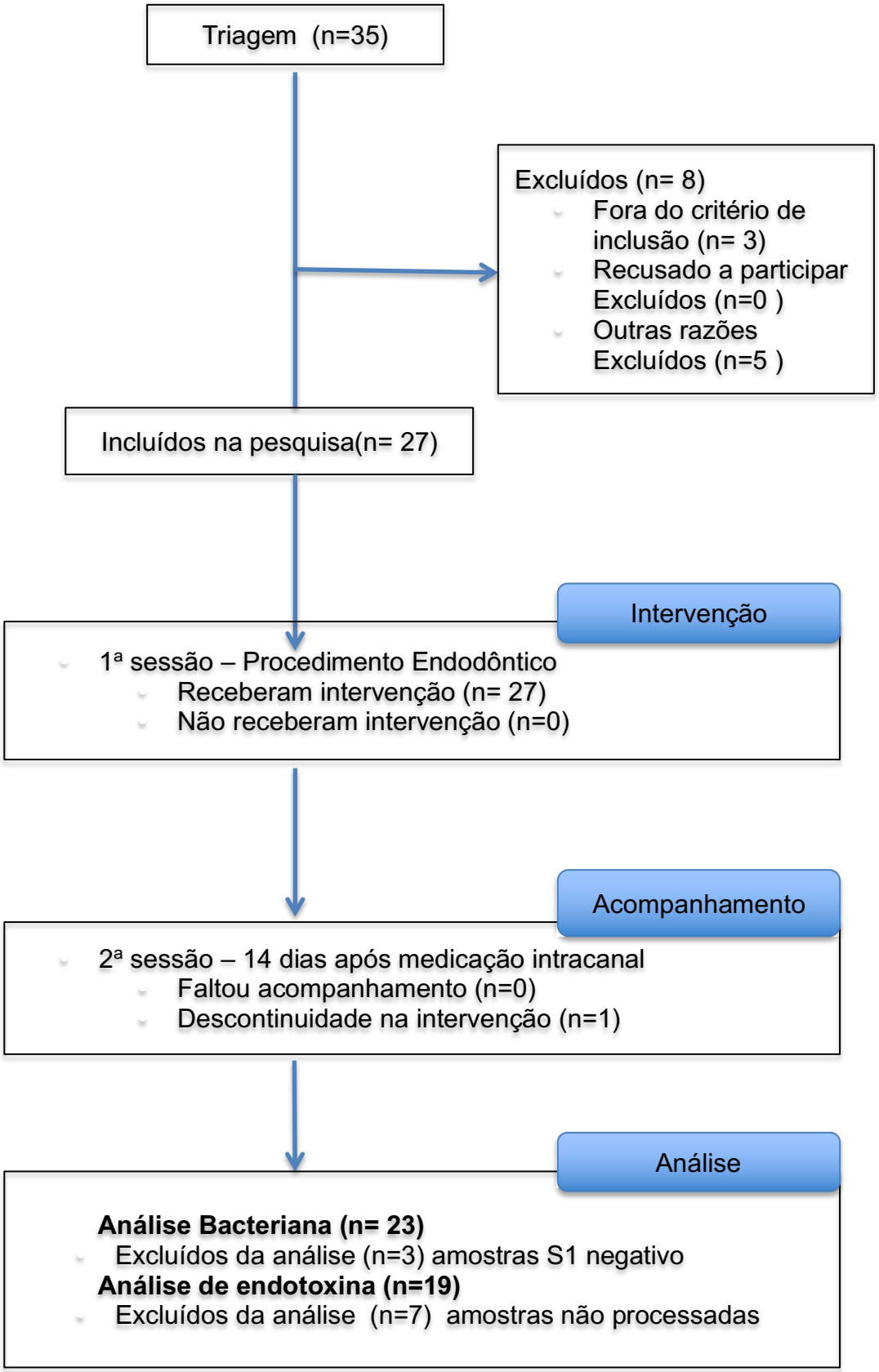
Observaram-se distribuições não-normais, desta forma, optou-se pela realização de testes não-paramétricos numéricos para analisar as hipóteses experimentais. Todos as análises foram realizadas com nível de significância de 5%.

Por se tratarem dos mesmos dentes em diferentes momentos do tratamento endodôntico, as análises intragrupo entre cada etapa do tratamento foram realizadas com teste de Wilcoxon (signed rank test) para amostras relacionadas. Já as comparações entre a taxa de detecção nas diferentes etapas do tratamento utilizou-se o teste Q de cochran.

5 RESULTADOS

Dos 35 pacientes com infecções endodônticas primárias examinados, 27 participantes foram incluídos no estudo. Desses pacientes, 3 foram excluídos da análise bacteriana devido ao fato das amostras inicias apresentarem valores próximos ao negativo. Por sua vez, a análise de LPS foi realizada em apenas 19 desses pacientes. Um diagrama de fluxo ilustrando o ensaio clínico, com os motivos das exclusões, está apresentado na figura 5.1.

Figura 5.1 Diagrama de fluxo do ensaio clínico



Fonte: a autora

5.1 DADOS CLÍNICOS DOS DENTES TRATADOS ENDODONTICAMENTE

As características clínicas dos dentes analisados com amostras microbiológicas podem ser visualizadas na tabela 5.1.

Tabela 5.1 Distribuição de 23 casos segundo idade, gênero, localização do dente, grupo dental, sintomas clínicos e diâmetro apical inicial e final

Características clínicas			
		N	**%**
Idade	< 20	4	17,39
	20 - 40	15	65,21
	> 40	4	17,39
Gênero	Masculino	10	43,47
	Feminino	13	56,52
Localização do dente	Maxila	16	69,56
	Mandíbula	7	30,43
Grupo Dental	Anterior	8	34,78
	Pré-molar	9	39,13
	Molar	6	26,08
Diâmetro apical inicial	0,15mm	4	17,39
	0,20/ 0,25mm	12	52,17
	0,30/ 0,40mm	7	30,43
Diâmetro apical final	(0,35mm)	4	17,39
	(0,40 mm)	12	52,17
	(0,50 mm)	7	30,43

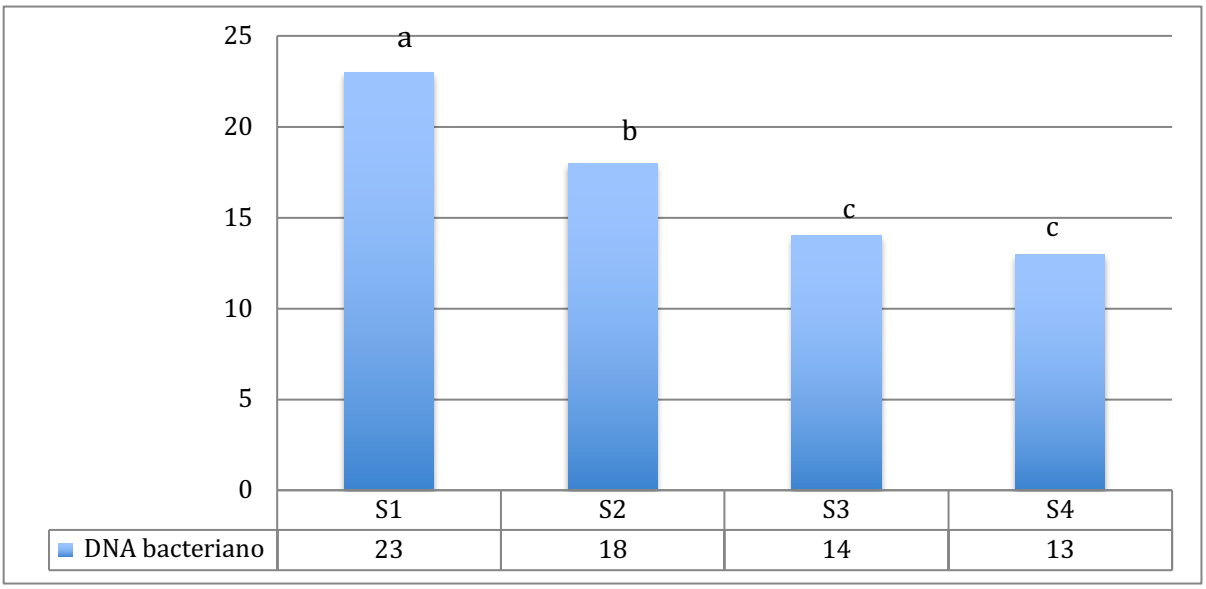
Fonte: a autora

5.2 NÍVEIS DE BACTÉRIAS NAS DIFERENTES ETAPAS DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO: ANÁLISE POR qPCR BASEADO EM DNA

A análise por PCR convencional das amostras do campo operatório não revelou a presença de DNA bacteriano, confirmando a eficácia dos procedimentos de desinfecção do campo. Portanto, todos os casos foram incluídos para análise.

A figura 5.2, mostra a o número de canais com presença de DNA bacteriano (reação de qPCR positiva) em cada etapa do tratamento endodôntico. Após o PQC, bactérias foram detectadas em 78,26% (18/23) das amostras S2, sendo observada uma redução significativa do número de canais infectados em relação às amostras S1 (p= 0.04). Após o protocolo de irrigação final, bactérias foram detectadas em 60,86% (14/23) das amostras S3, com uma redução significativa quando comparada à S2 (p= 0.04). Entretanto, após a medicação intracanal, DNA bacteriano permaneceu em níveis detectáveis em 56,52% (13/23) das amostras S4 (p= 1.0).

Figura 5.2 Número de canais com presença de DNA bacteriano (reação de qPCR positiva) em cada etapa do tratamento endodôntico



Fonte: a autora.

Número de canais com presença de DNA bacteriano (reação de qPCR positiva). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre amostras. Houve diminuição do número de canais infectados entre as amostras S1-S2 e S2-S3 (Q de Cochran e Teste de Wilcoxon, $P < 0,05$).

A tabela 5.2 mostra a mediana e intervalos dos níveis de DNA bacteriano detectados nas amostras em diferentes etapas do tratamento endodôntico. O valor mediano do número de cópias de DNA bacteriano nas amostras iniciais foi de $3,61 \times 10^4$ (intervalo,14×10^3 - $4,02 \times 10^7$). Após o o PQC, o número de cópias de DNA bacteriano nas amostras reduziu para $7,84 \times 10^3$ (intervalo, 0 - $8,19 \times 10^4$) ($p<0,05$). Após o protocolo de irrigação final (S3) e medicação intracanal (S4), os níveis de DNA bacteriano foram: $3,21 \times 10^3$ (intervalo, 0 - $1,26 \times 10^5$) e $3,49 \times 10^3$ (intervalo, 0 - $1,69 \times 10^5$), respectivamente. Não houve redução estatisticamente significativa entre essas amostras e as amostras S2 ($p> 0,05$). Os níveis de DNA bacteriano em cada momento do tratamento são representados na figura 5.3.

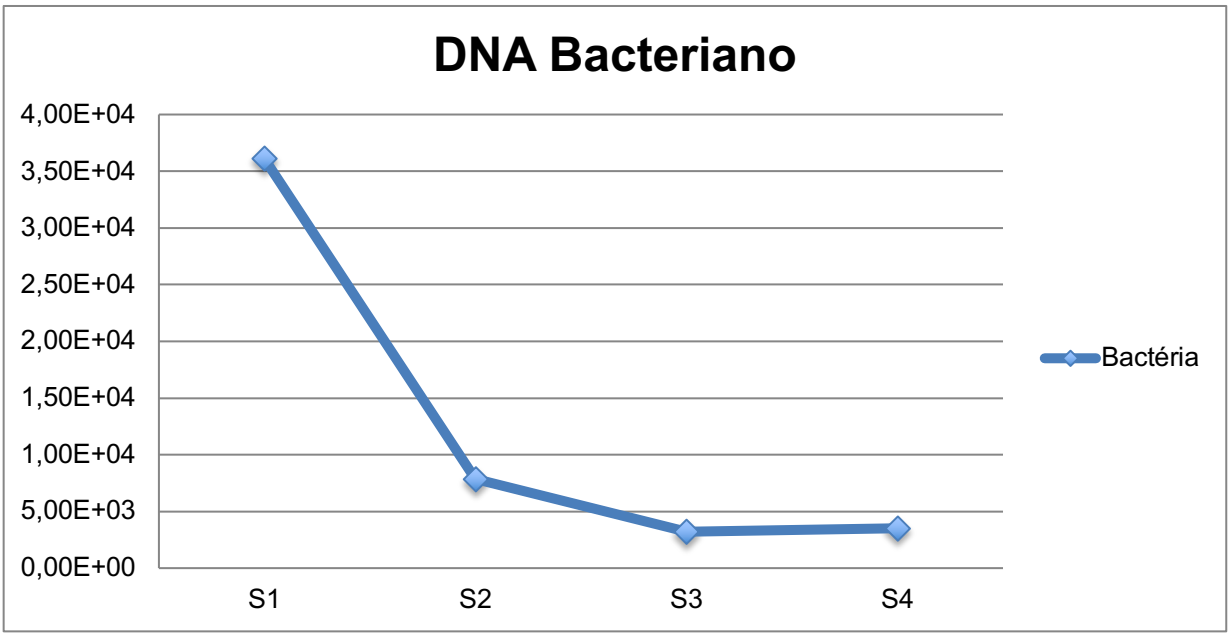
Tabela 5.2 Níveis de DNA bacteriano (mediana e intervalo) em 23 amostras de canais radiculares com infecções endodônticas primárias antes (S1) e após o preparo do canal radicular (S2), após o protocolos de irrigação final (S3) e após a medicação com hidróxido de cálcio (S4)

Bactérias	Amostras			
	S1	**S2**	**S3**	**S4**
Mediana (Intervalo)	$3,61 \times 10^4$ [a] ($5,14 \times 10^3$ - $4,02 \times 10^7$)	$7,84 \times 10^3$ [b] (0 - $8,19 \times 10^4$)	$3,21 \times 10^3$ [b] (0 - $1,26 \times 10^5$)	$3,49 \times 10^3$ [b] (0 - $1,69 \times 10^5$)

Fonte: a autora

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre amostras.
Houve diminuição significativa na concentração bacteriana entre as amostras S1-S2 (teste de Wilcoxon signed rank, $P < 0,05$).

Figura 5.3 Niveis de DNA bacteriano (mediana) durante as diferentes etapas do tratamento endodôntico

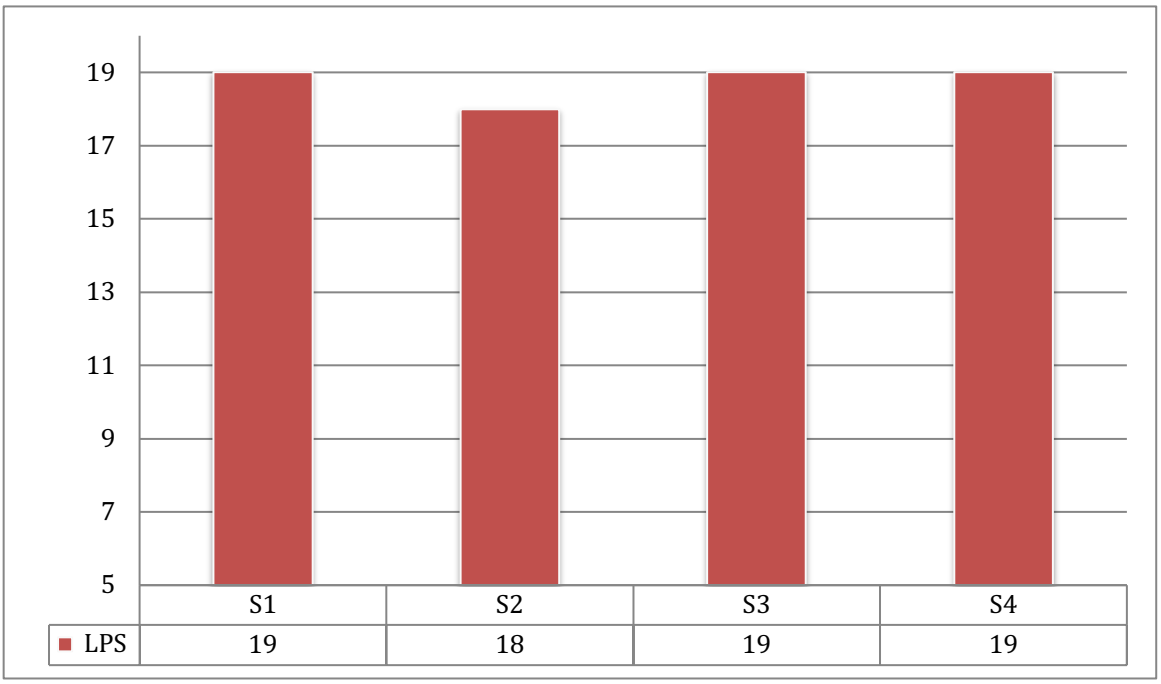


Fonte: a autora

5.3 NÍVEIS DE ENDOTOXINAS NAS DIFERENTES ETAPAS DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO: ANÁLISE POR LAL

A figura 5.4, mostra o número de canais com presença LPS bacteriano (ensaio LAL positivo) em cada etapa do tratamento endodôntico. LPS foi detectado em todas as amostras analisadas, com exceção de uma amostra S2.

Figura 5.4 Número de canais com presença de LPS- endotoxina (reação de LAL positiva) em cada etapa do tratamento endodôntico



Fonte: a autora

Número de canais com presença de LPS (reação de qPCR positiva). Não houve diminuição do número de canais infectados (Q de Cochran, P > 0,05).

A tabela 5.3 mostra os níveis de LPS detectados nas amostras em diferentes etapas do tratamento endodôntico. Os níveis de LPS sofreram uma redução significante (p<0,0001) de S1 para S2, 109EU/mL e 20,2EU/mL, respectivamente. Após o protocolo de irrigação final (S3) os níveis se mantiveram semelhantes não sendo observada diferença significante dos níveis de LPS (20,8EU/mL); quando comparada às amostras S2 (p=0,16). Por outro lado, houve diminuição significativa na concentração de LPS após o uso da medicação intracanal (9,58EU/mL; p=0,02). A figura 5.5 representa a diminuição dos níveis de LPS em cada momento do tratamento.

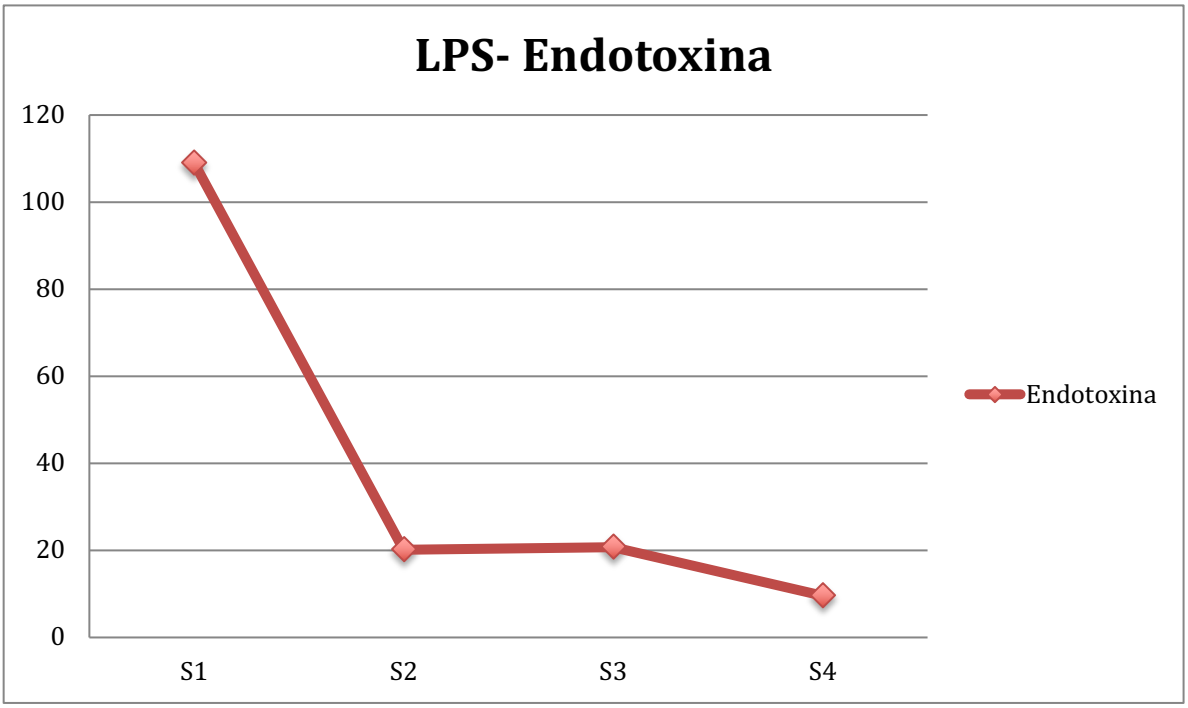
Tabela 5.3 Níveis de Endotoxina (mediana e intervalo) em 19 amostras de canais radiculares com infecções endodônticas primárias antes (S1) e após o preparo do canal radicular (S2), após o protocolos de irrigação final (S3) e após a medicação com hidróxido de cálcio (S4)

	Amostras			
Endotoxina	**S1**	**S2**	**S3**	**S4**
Mediana (Intervalo)	109 [a] (33,8 - 293)	20,2 [bc] (0-86,9)	20,8 [b] (0,08-197)	9,58 [c] (1,2-137)

Fonte: a autora

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre amostras.
Houve diminuição significativa na concentração de endotoxina entre as amostras entre as amostras S1-S2 e S3-S4 (teste de Wilcoxon signed rank (P < 0,0001).

Figura 5.5 Níveis de concentrações de endotoxinas (em EU/mL) durante o tratamento endodôntico.



Fonte: a autora

5.4 EFEITO CITOTÓXICO DAS AMOSTRAS DOS CANAIS RADICULARES NAS DIFERENTES ETAPAS DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO: ANÁLISE DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS POR CÉLULAS DE FIBROBLASTOS

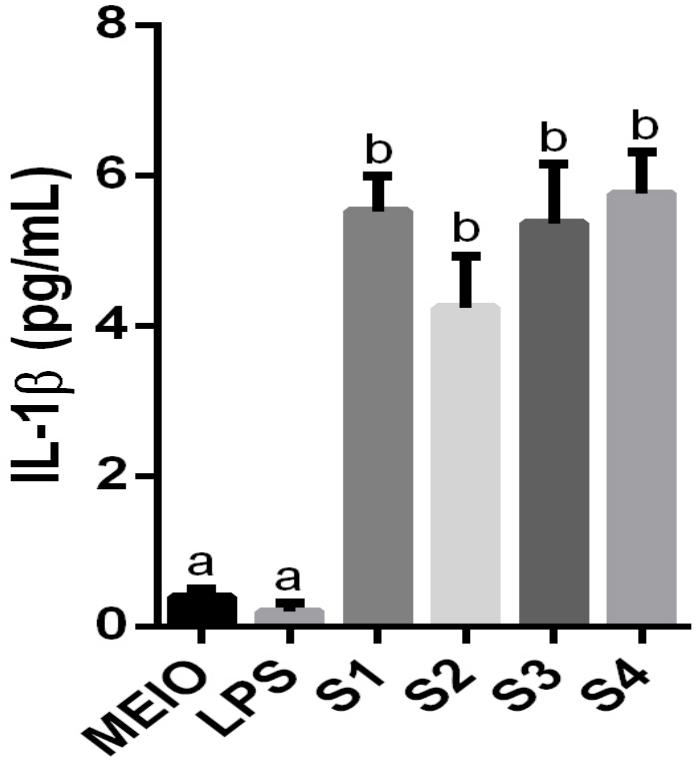
Foi realizada a estatística descritiva para níveis de IL-1β, IL-6 e CCL-2 produzidos por fibroblastos humanos estimulados pelas amostras dos canais radiculares. No grupo controle positivo as células foram ativadas com uma concentração conhecida de endotoxina (1 ug/mL) e, no grupo controle negativo, as células não receberam ativação por coletas ou endotoxinas.

5.4.1 Produção de IL-1β

IL-1β foram detectados em todas as diferentes etapas do tratamento endodôntico após estimulação por fibroblastos com conteúdo do canal radicular. A média do nível de IL-1β na etapa inical (S1) foi de 5,47 pg / mL, após o preparo químico cirúrgico (S2) a média de IL-1β reduziu para 4,42 pg / mL. Entretanto após o protocolo de irrigação houve um aumento da média de produção de IL-1β para 5,60 pg / mL (S3) e logo após a medicação intracanal (S4) a média de produção da citocina foi de 6,12 pg / mL.

Pode-se observar diferença estatisticamente significativa entre as coletas e os grupos controle positivo e negativo ($p<0,05$), evidenciando que a produção da citocina IL-1β estimulada por fibroblatos não depende exclusivamente de LPS, mas do conteúdo do canal radicular como um todo. Não houve diferença estatística entre a presença de Il-1 β entre cada etapa do tratamento (S1, S2, S3 e S4) ($p>0,05$), porém a produção dessa citocina se manteve elevada após as diferentes etapas do tratamento endodôntico. A comparação da produção de Il-1 β por fibroblatos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento está representada na figura 5.6.

Figura 5.6 Comparação da produção de IL-1 β por fibroblatos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento (S1- coleta inicial; S2- PQC; S3- irrigação final ; S4- medicação intracanal)



Fonte: a autora

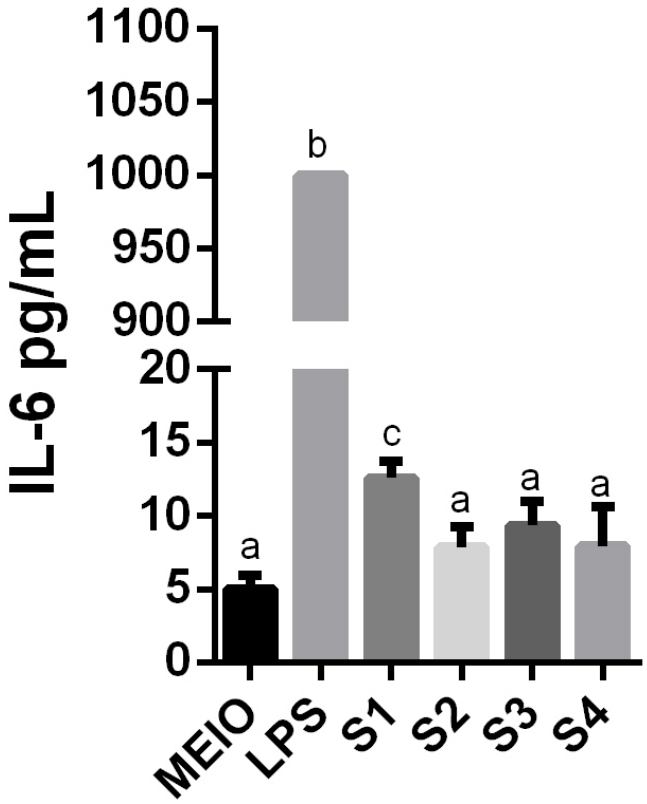
*letras diferentes representam diferença estatística (p<0,05)

5.4.2 Produção de IL-6

IL-6 foram detectados em todas as diferentes etapas do tratamento endodôntico após estimulação por fibroblastos com conteúdo do canal radicular. A média do nível de IL-1β na etapa inical (S1) foi de 12,58 pg / mL, após o preparo químico cirúrgico (S2) a média de IL-1β reduziu para 7,87 pg / mL. Entretanto após o protocolo de irrigação houve um aumento da média de produção de IL-1β para 9,35 pg / mL (S3) e logo após a medicação intracanal (S4) a média de produção da citocina reduziu para 7,95 pg / mL

Pode-se observar diferença estatisticamente significativa entre as coletas e os grupos controle positivo e negativo ($p<0,05$). Houve diminuição significativa da presença da citocina pró-inflamatória IL-6 entre a etapa inicial do tratamento endodôntico (S1) e a etapa seguinte (S2) ($p<0,05$). Entretanto após o PQC (S2) não houve redução significativa quando comparado com o protocolo de irrigação final (S3) e medicação intracanal (S4). Após o PQC houve uma redução da capacidade de estimulação da célula de produzir a citocina, em níveis semelhantes ao controle negativo (meio). A comparação da produção de IL-6 por fibroblatos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento está representada na figura 5.7.

Figura 5.7 Comparação da produção de IL-6 por fibroblatos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento (S1- coleta inicial; S2- PQC; S3- irrigação final ; S4- medicação intracanal)



Fonte: a autora

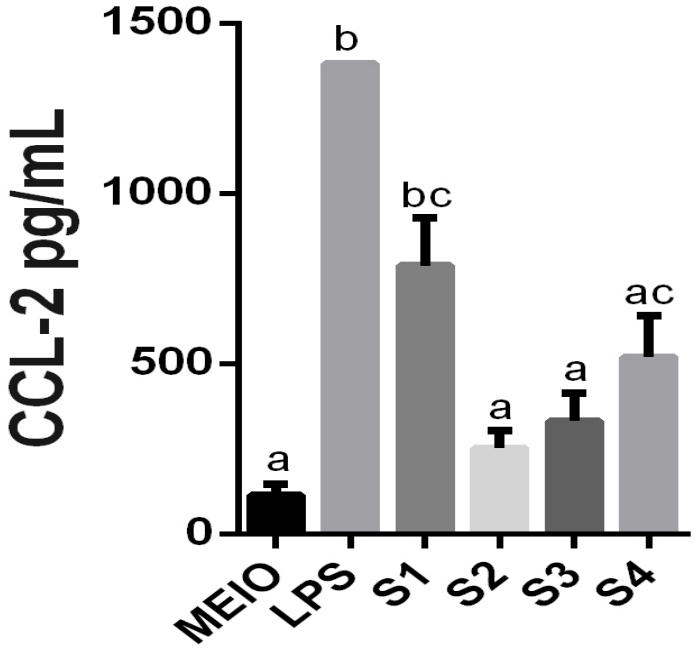
*letras diferentes representam diferença estatística (p<0,05)

5.4.3 Produção de CCL-2

CCL-2 foram detectados em todas as diferentes etapas do tratamento endodôntico após estimulação por fibroblastos com conteúdo do canal radicular. A média do nível de CCL-2 na etapa inical (S1) foi de 788,6 pg / mL, após o preparo químico cirúrgico (S2) a média de CCL-2 reduziu para 251,7 pg / mL. Entretanto após o protocolo de irrigação houve um aumento da média de produção de CCL-2 para 331,4 pg / mL (S3) e logo após a medicação intracanal (S4) a média de produção da citocina foi de 519,8 pg / mL.

Pode-se observar diferença estatisticamente significativa entre as coletas e grupos controle positivo e negativo ($p<0,05$). A etapa inicial foi capaz de estimular a célula a produzir quantidades de citocinas iguais ao controle positivo ($p>0,05$). Houve diminuição significativa da presença da citocina pró-inflamatória CCL-2 entre a etapa inicial do tratamento endodôntico (S1) e a etapa seguinte (S2) ($p<0,05$). Entretanto após o protocolo de irrigação final (S2) não houve redução significativa quando comparado com a etapa seguinte (S3). Logo, após a etapa S1 e S2 houve uma redução da capacidade de estimulação da célula de produzir a citocina em níveis iguais ao controle negativo (meio) ($P <0,05$). Após a medicação intracanal (S4), houve um aumento da presença de CCL-2, sendo estatisticamente significante quando comparado com a etapa anterior ($P <0,05$) porém não havendo diferença estatística com a etapa inicial (S1) ($p>0,05$). A comparação da produção de CCL-2 por fibroblatos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento está representada na Figura 5.8.

Figura 5.8 Comparação da produção de CCL-2 por fibroblatos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares nas diferentes etapas do tratamento (S1- coleta inicial; S2- PQC; S3- irrigação final ; S4- medicação intracanal)



Fonte: a autora

*letras diferentes representam diferença estatística ($p<0,05$)

5.4.4 Teste de correlação entre a concentração de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β, IL-6 e CCL-2) produzidas por fibroblastos e os níveis de endotoxina nos canais radiculares.

De uma forma geral, houve uma correlação entre os níveis de endotoxinas nos canais radiculares e os níveis de citocinas produzidos por fibroblastos (valores de *r* positivos).

Especificamente, houve uma correlação positiva entre a produção de IL-1 β e os níveis de endotoxinas nas amostras S2 (r = 0,3154), S3 (r = 0,5321) e S4 (r = 0,3224).

Em relação à produção de IL-6, houve uma correlação positiva com os níveis de endotoxinas em todas as amostras: S1 (r = 0,4841), S2 (r = 0,6423), S3 (r = 0,797) e S4 (r = 0,5715).

Em relação à produção de CCL-2 por fibroblastos, houve uma correlação positiva entre os níveis de endotoxinas nas amostras S1 (r = 0,7195), S2 (r = 0,463) e S3 (r = 0,9611). Nas amostras S4, essa correlação foi próxima a 0 (r = 0,0227).

6 DISCUSSÃO

6.1 NÍVEIS DE BACTÉRIAS APÓS DIFERENTES ETAPAS DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO

Os critérios de inclusão e exclusão dos vinte e três pacientes portadores de dentes com periodontite apical primária com necessidade de tratamento endodôntico, selecionados para esta pesquisa, foram estabelecidos de acordo com outros trabalhos clínicos previamente publicados (1, 7, 20). Foram incluídos dentes uni, bi e multirradiculares, devido à dificuldade em se obter casos clínicos que se enquadrassem em todos os critérios de inclusão. Vários trabalhos na literatura também relatam a inclusão de todos os grupamentos dentários (12, 20).

O método de coleta utilizado nessa pesquisa, no qual cones de papel absorvente pré-esterilizados e apirogênicos, eram mantidos por um minuto no interior dos canais radiculares após a suspensão do conteúdo microbiano com auxílio de limas tipo Hedström, foi semelhante ao de diversos trabalhos na literatura (1, 13, 20). Apesar de existirem limitações do método, pois apenas o conteúdo do canal principal e o local em que o instrumento endodôntico agiu é coletado, o principal objetivo dos trabalhos *in vivo* é a manutenção do dente e a restauração à sua função, impossibilitando neste caso, métodos de coletas invasivos.

Todas as amostras de controle desinfecção do campo operatório deram resultados negativos nas reações de PCR utilizando iniciadores universais para o domínio *Bacteria*. Esses resultados indicam que o protocolo utilizado para desinfecção do campo operatório foi eficaz, confirmando estudos prévios (20, 51, 68) .

No presente estudo, a análise do conteúdo de bactérias totais apresentaram resultados positivos nas coletas S1 nos ensaios de qPCR, corroborando com estudos právios que utilizaram métodos moleculares baseados em DNA (1, 3, 5, 7-9, 11-13, 15, 16, 19, 20). Uma das vantagens desta técnica sobre as técnicas dependentes de cultura é contagem de UFC e a possibilidade de se quantificar tanto as bactérias cultiváveis quanto as não cultiváveis.

Após o preparo químico-cirúrgico, 78,26% (18/23 canais radiculares) das amostras foram positivas para os ensaios de qPCR baseados em DNA, concordando com estudos estudos moleculares prévios que detectaram DNA bacteriano em 67% a 94% dos casos após o preparo dos canais radiculares (1, 3, 9, 20). Porém, outros estudos utilizando qPCR baseados em DNA encontraram uma menor prevalência de amostras positivas após o preparo químico-cirúrgico, aproximadamente 40% (19). As diferenças entre os resultados dos estudos anteriores podem estar relacionadas a diversos fatores variáveis durante o procedimento: o momento da coleta dos canais radiculares (antes ou após a irrigação final), técnica de instrumentação, tipo de instrumento, substância química auxiliar e o volume utilizado.

Na análise quantitativa realizada por qPCR baseado em DNA, o número de cópias de DNA sofreu uma redução significante após o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares: de $3{,}61 \times 10^4$ (S1) para $7{,}84 \times 10^3$ (S2). Estudos moleculares anteriores mostratram que o preparo químico-cirúrgico com instrumentos mecanizados e irrigação com NaOCl a 2,5%, promoveu uma grande redução no total de bactérias dos canais radiculares (3, 12-15, 18, 20). A grande redução na quantidade e de bactérias de S1 para S2 pode ser explicada pela ação mecânica dos instrumentos reciprocantes juntamente com a ação físico-química da irrigação com NaOCl 2,5%.

A mediana da quantidade de bactérias observadas em S3 foi de $3{,}21 \times 10^3$. Considerando a quantidade observada em S1, a média de redução obtida foi de 91%. Ao se comparar as reduções obtidas entre S2 e S3 a redução foi de 59%. A análise estatística demonstrou não haver diferença significativa na redução dos níveis de bactérias entre S2 e S3; isto evidencia a importância da coleta realizada após o PQC (S2) quando se objetiva investigar protocolos de irrigação. Estudos prévios confirmaram os achados no qual a ativação ultrassônica não contribuiu para a redução da quantidade de bactérias (69, 70); já outros trabalhos demostraram que o uso da ativação ultrassônica foi eficaz nesta redução (20, 71). Os resultados do presente estudo demonstram que apesar do procedimento complementar de desinfeção não reduzir de forma significativa a quantidade de DNA, o mesmo foi eficaz em reduzir a frequência de canais radiculares infectados, onde observou-se uma redução estatisticamente significativa de S2 para S3: 18 para 14 canais radiculares. Logo, o protocolo de irrigação final tende a auxiliar na desinfecção dos canais radiculares.

Diversos trabalhos na literatura utilizam diferentes protocolos de irrigação final. Paiva et al. (12) utilizaram protocolos de irrigação de 1 minuto, já Beus et al. (10) preconizou uma irrigação por 3 minutos, essa variável dificulta a comparação dos resultados obtidos. Outro importante fator são as diferentes substâncias químicas utilizadas em cada protocolo. Nesta pesquisa, optou-se por utilizar a solução de hidróxido de cálcio afim de melhorar suas propriedades, porém, sabe-se que a principal ação do $Ca(OH)_2$ é sobre endotoxinas (29, 37, 44). Outros fatores que devem ser considerados variáveis entre os estudos são o tempo de ativação do protocolo de ativação ultrassônica e os métodos de análise.

No presente estudo foi utilizado método baseado em DNA, no qual foi observado que após a utilização da ativação ultrassônica, como procedimento auxiliar de desinfecção, não houve redução de cópias de DNA, porém a ativação ultrassônica pode ser importante no metabolismo das bactérias. Em estudos prévios no qual utilizaram métodos baseados em rRNA concluíram que este método pode ser usado para determinar a viabilidade celular pois o rRNA é mais abundante e menos estável quando comparado com rDNA (68, 72). Além disso, como o número de rRNA transcritos depende do metabolismo das bactérias, a razão do número de cópias de rRNA sobre o número de cópias de rDNA tem sido utilizada para pesquisar a atividade metabólica bacteriana (68, 73).

Nardello (73) realizou a quantificação de bactérias por qPCR baseado em rDNA e rRNA (ensaio de RT-qPCR) e após o preparo químico-cirúrgico, detectou uma maior prevalência de casos positivos para bactérias totais (93%) com a utilização de qPCR baseado em rRNA quando comparado ao método baseado em rDNA (87%). A razão rRNA/rDNA revelou que embora o preparo químico-cirúrgico tenha promovido uma redução do metabolismo bacteriano em relação às amostras iniciais, as bactérias persistentes continuam viáveis nos canais radiculares.

Prado (74) identificou a presença e a viabilidade de *Propionibacterium acnes* antes e após os procedimentos endodônticos, utilizando o método de reação de cadeia de polimerase (PCR) baseado em RNA ribossômico (rRNA) e seus respectivos genes (rDNA). Apos a medicação intracanal, *P. acnes* foi detectada em 10% dos casos nos ensaios baseados em rRNA, enquanto o método baseado em rDNA não detectou

essa espécie. Logo, é necessário estudos com métodos de análise diferentes que comprovem a eficácia do ativação ultrassônica no metabolismo das bactérias.

Na análise das amostras após a medicação intracanal com pasta de $Ca(OH)_2$, das 14 amostras positivas em S3, 13 permaneceram positivas em S4 nas reações de qPCR baseadas em DNA. Não houve diminuição significativa na quantidade de bactérias em relação às amostras S3 ($p>0,05$). Esses dados estão de acordo com os achados de Sakamoto et al. (3) que relataram uma alta prevalência de reações qPCR positivas (67% dos casos positivos) após o preparo químico-cirúrgico e medicação intracanal em dentes com infecções endodônticas primárias. No entanto, estudos anteriores que demostraram significativa redução no número de micro-organismos após utilização do $Ca(OH)_2$ como medicação intracanal 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 (75, 76), causando danos à membrana citoplasmática e ao DNA bacteriano, e desnaturação de proteínas (77).

Os estudos que avaliaram o efeito antimicrobiano da medicação intracanal por qPCR baseado em DNA são limitados e apresentam uma variação quanto ao uso e à composição da pasta de $Ca(OH)_2$, utilizando diferentes veículos (soro fisiológico, polietilenoglicol, metilcelulose ou paramonoclorofenol canforado e glicerina) em diferentes tempos de atuação (7 a 25 dias). Esses fatores tornam difícil a comparação direta entre os resultados obtidos pelos diferentes estudos.

Observou-se, no presente estudo, que o uso da medicação intracanal com $Ca(OH)_2$ por 14 dias não contribuiu para uma significativa redução do número de cópias de DNA bacteriano nas amostras coletadas após o preparo químico-cirúrgico e protocolo de irrigação. Esses dados corroboram com estudos *in vivo* que demonstraram a capacidade limitada do $Ca(OH)_2$ em eliminar bactérias dos canais radiculares (3, 5, 8, 11, 16).

Estudos prévios mostraram a capacidade de diversos micro-organismos, dentre eles o *E. faecalis*, em suportar a elevações do pH do meio em que se encontram (78) e até mesmo proliferar-se em condições de pH elevado (79). Outro importante fato, seria a o aumento da resistência aos antimicrobianos, diminuindo a susceptibilidade à alterações ambientais, devido às bactérias agruparem-se formando complexos biofilmes (80). No entanto, estudos *in vivo* do efeito de procedimentos antibacterianos

complementares à medicação intracanal, assim como o uso de novas medicações e sua ativação, são necessários a fim de se analisar esta hipótese. Além disso, estudos clínicos de acompanhamento radiográfico e tomográfico devem ser realizados para aumentar a compreensão destes resultados e as implicações no sucesso do tratamento.

6.2 NÍVEIS DE ENDOTOXINAS APÓS DIFERENTES ETAPAS DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO

No presente estudo, o teste quantitativo cinético turbidimétrico de LAL foi utilizado para a quantificação de endotoxinas das amostras coletadas. Martinho et al. (53) compararam a eficiência do teste LAL 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 concluíram que o teste cinético cromogênico e o teste cinético turbidimétrico são mais precisos e apresentam melhor reprodutibilidade quando comparado ao teste cromogênico endpoint.

Neste trabalho, todas as amostras apresentaram resultados positivos em S1, o que está de acordo com estudos anteriores (50-53, 58, 68). A mediana das quantidades de endotoxinas recuperadas em S1 foi de 109 EU/mL.

A redução na concentração de endotoxinas observadas entre a primeira e a segunda coleta foram significativas, correspondendo à 81,46%. Estes dados estão de acordo com estudos clínicos prévios que avaliaram a eficácia do preparo quimico-cirúrgico utilizando a irrigação com NaOCl a 2,5% (52, 53, 57, 62). Marinho et al. (81), relataram que a ação mecânica dos instrumentos endodônticos e fluxo hidrodinâmico da substância auxiliar (NaOCl) são responsáveis pela grande redução na concentração de endotoxinas no interior dos canais radiculares. Sabe-se que a natureza química da substância utilizada não atua na redução das endotoxinas, visto que já foi comprovada a ineficácia do NaOCl em neutralizar endotoxinas (39, 45, 46, 82).

No presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente

significativas entre as concentrações de endotoxinas nas coletas realizadas logo após o PQC (S2) e ao término da irrigação final (S3): 20,2 EU/mL e 20,8 EU/mL, respectivamente.

Trabalhos anteriores demonstraram uma maior maior eficácia da irrigação ultrassônica passiva na limpeza das paredes do canal radicular (83-85) e na diminuição de micro-organismos (20), quando comparada à irrigação convencional com seringas. Já no presente estudo, o mesmo resultado não pôde ser observado, em relação às endotoxinas. Esses achados podem ser explicados pela capacidade das endotoxinas em se aderirem aos tecidos mineralizados (86), em penetrar nos túbulos dentinários e se aderir na dentina (29), resitindo, portanto a agitação das substâncias causada pela ativação ultrassônica e dificultando sua remoção.

Além disso, algumas das substâncias utilizadas no protocolo de irrigação final, NaOCl 2,5% e EDTA 17%, não possuem eficácia significativa na redução e inativação de endotoxinas (39, 45, 46). Já a solução de hidróxido de cálcio, utilizada neste trabalho, tem sido estudada com o objetivo de diminuir o tempo necessário para que ocorra a elevação do pH na dentina. Duarte et al. (87), 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 $Ca(OH)_2$. 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. (82), avaliaram os efeitos de diferente 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. Os resultados do presente estudo mostraram que uso da solução de hidróxido de cálcio ativado passivamente com ultrassom não contribuiu para uma redução adicional na concentração de endotoxina após o preparo químico-cirúrgico pois parece não haver uma importante alteração do ph devido a baixa concentração de ions Ca após a diluição e até mesmo pelo pouco tempo de ação da solução no canal radicular.

A mediana de concentração de endotoxinas em S4, após o uso de $Ca(OH)_2$ por 14 dias, foi de 9,58 EU/mL. Ao se considerar os níveis de endotoxinas observadas inicialmente (S1), a mediana de redução foi de 91,21% . Já ao se comparar os valores obtidos em S4 com os valores observados nas coletas realizadas imediatamente após a irrigação final (S3), a mediana de redução foi de 53,94%.

Os achados de redução na concentração de endotoxina após o uso de $Ca(OH)_2$ corroboram com estudos prévios que 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 (44-46). Xavier et al. (56), 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 $Ca(OH)_2$ por 14 dias como medicação intracanal, nos casos realizados em duas sessões. Os autores observaram que os dentes que receberam o $Ca(OH)_2$ obtiveram os menores valores de endotoxinas. De acordo com Safavi e Nichols (37), o $Ca(OH)_2$ hidrolisa a porção lipídica da endotoxina resultando na liberação de ácidos graxos. Em outro estudo, demonstraram $Ca(OH)_2$ pode alterar as propriedades biológicas dos LPS bacterianos, inativando o potencial tóxico das endotoxinas de *P.intermedia* pela hidrólise do lipídio A em ácidos graxos e amino açúcares atóxicos (38).

Neste trabalho, o uso do $Ca(OH)_2$ como medicação intracanal diminuiu os níveis de LPS, porém não foi eficaz na redução dos níveis de DNA bacteriano. Essa correlação sugere que nos canais radiculares analisados em S4, há uma maior proporção de bactérias Gram-positivas em relação às bactérias Gram-negativas, indicando uma possível seleção microbiana. Siqueira e Rôças (88), em estudo prévio sobre bactérias persistentes revelaram as espécies cultiváveis mais prevalentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção, sendo a grande maioria Gram-positivas, são exemplos: *Actinomyces naeslundii, Actinomyces odontolyticus, Anaerococcus prevotii, Eggerthela lenta, Enterococcus faecalis, Gemella morbillorum, Parvimonas micra, Propionibacterium acnes, Propionibacterium propionicum, Pseudoramibacter alactolyticus, grupo de Streptococcus anginosus, Streptococcus mitis.* Estudos utilizando esses métodos moleculares (89) confirmaram a prevalência de espécies Gram-positivas em infecções endodônticas persistentes após os procedimentos endodônticos.

6.3 EFEITO CITOTÓXICO DO CONTEÚDO DOS CANAIS RADICULARES NAS DIFERENTES ETAPAS DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO

Os dados obtidos no presente estudo revelaram que o conteúdo do canal radicular em amostras de infecções endodônticas primárias podem potencialmente estimular os fibroblastos a produzir diversas citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β, IL-6 e CCL-2), que mantem interrelações na cadeia inflamatória.

Este trabalho analisou a complexa antigenicidade do conteúdo do canal radicular, incluindo a detecção de bactérias e LPS, estimulando células de fibroblastos humanos, seguido por dosagem de IL-1 β, IL-6 e CCL-2.

No presente estudo, foi utilizado fibroblastos, que são as células mais abundantes no ligamento periodontal. Além de serem responsáveis pela produção dos componentes da matriz extracelular desempenham um papel fundamental na reação do periápice contra agentes microbiológicos (90). Sabe-se que componentes da parede celular da bactéria reagem com monócitos, macrófagos, bem como com fibroblastos, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β, IL-1 α, TNF-α, IL-6 e IL-8 (91, 92). Além da importância dessas células em estimular um resposta inflamatória pela produção de citocinas, as mesmas respondem a cada estímulo de maneria diferente, o que ocasiona não só uma produção distinta de citocinas mas também na via de ativação da resposta imune.

Bactérias e LPS foram detectados em 100% das amostras inciais dos canais radiculares infectados e são considerados como potentes indutores para fibroblastos na liberação de IL-1 β, IL-6 (47, 93) e CCL-2. A produção de citocinas IL-1 β (12,58 pg / mL), IL-6 (5,47 pg / mL) e CCL-2 (788,6 pg / mL) particularmente encontradas no presente estudo demostra o quanto os fibroblastos são reativos a estímulos do conteúdo endodôntico. No que diz respeito a antigenicidade, não só o LPS desempenha um papel de ativação de receptores como toll-like (TLRs) (94), mas também outros componentes da parede celular pertencentes a diversas espécies bacterianas possuem essa característica, tornando assim o conteúdo do canal, como um todo, ainda mais complexo e capaz de induzir fibroblastos.

No presente estudo, observou-se correlação positiva entre a presença de

endotoxina nos canais radiculares e a indução de citocinas pró-inflamatória pela célula de fibroblastos. Esses achados corroboram com outros estudos prévios que utilizaram célula tipo macrófagos (30, 95). Apenas para a citocina IL-1 β em S1, houve uma correlação negativa para LPS, visto que não é somente o LPS que ativa o inflamasoma e sim uma cascata complexa de eventos e diversos componentes bacterianos (96).

A IL-1β é um dos mediadores centrais de reações inflamatórias, sendo importante na resposta do hospedeiro a estímulos inflamatórios e infecciosos e fundamental na mediação da resposta imune celular. São primariamente produzidas por macrófagos e monócitos, assim como por células não imunológicas, fibroblastos e células endoteliais ativadas durante lesão celular, infecção, invasão e inflamação. Em baixa concentração, a IL- 1β atua como mediadora de inflamação local, agindo nas células endoteliais, aumentando a expressão de moléculas de superfície que medeiam a adesão de leucócitos (97). Quando secretada em maiores quantidades, podem ter consequências nocivas para o hospedeiro; tendo função no desenvolvimento e na manutenção da dor pós-operatória (98) e produzindo inflamação sistêmica, induzindo febre (99). Portanto, a produção de IL- 1β é rigorosamente controlada em diferentes níveis para garantir sua liberação adequada (96).

Plataformas moleculares contendo caspase-1, também chamadas de inflamasomas, controlam a liberação de IL- 1β que são ativadas com infecção ou estresse celular. O inflamassoma NLRP3 controla a atividade da caspase-1 e a liberação de IL- 1β no sistema imune inato (100). Zhang et al. (96), sugeriram que o inflamassoma NLRP3 pode desempenhar um papel importante nas respostas imunes pulpares e concluíram que a secreção de IL- 1β exige que o inflamassoma NLRP3 ative a caspase-1, que é necessária para o processamento da pró-IL-1 na sua forma madura. Logo, é possível associar esses resultados com os achados desse estudo, no qual o LPS somente não foi suficiente para induzir a secreção dessa citocina. Neste trabalho, o tratamento do canal radicular não interferiu na produção de citocina pró-inflamatória IL-1β. O conteúdo do canal radicular foi capaz de ativar a citocina e a mesma se manteve elevada em todas as etapas do tratamento endodôntico.

A IL-6 pode ser secretada por macrófagos ativados, adipócitos e células musculares esqueléticas (101). A produção de IL-6 pode ser estimulada por citocinas como IL-1β e TNF-α. Atua na imunidade inata e adaptativa, sendo estímulo para a

produção de neutrófilos e de proteínas de fase aguda e age na diferenciação de linfócitos B em plasmócitos (102). IL-6, possui tanto efeitos anti-inflamatórios quanto pró-inflamatórios. Gabay et al. (103), demonstraram que a IL-6 inibe a liberação de IL-1β e TNF-α, favorecendo a produção do receptor de TNF solúvel. Sendo considerada também uma citocina regulatória. Os resultados encontrados neste trabalho, mostram que a produção de citocinas IL-6 foi maior na coleta inicial S1, realizada imediatamente após a abertura coronária dos dentes com necrose pulpar e lesão periapical, demonstrando maior efeito citotóxico na presença de maiores quantidades de endotoxinas. Porém após o preparo químico-cirúrgico houve uma redução na produção dessa citocina pela célula, mantendo seus níveis baixos em todas as etapas subsequentes, sendo similar ao controle negativo. Outros estudos também encontraram redução de citocinas após o preparo químico-cirúrgico (47), ressaltando portanto, a importância do preparo químico-cirúrgico em reduzir niveis de bactérias, endotoxinas e produção de citocinas pró-inflamatórias.

A CCL2 é sintetizada por monócitos, células endoteliais, células musculares lisas, células epiteliais, osteoblastos e osteoclastos, tendo importante função no recrutamento de monócitos e macrófagos (104). Kim et al. (105) demostrataram a presença de CCL2 no processo de diferenciação de osteoclastos em osteoclastos maduros, comprovando que o processo de reabsorção óssea é aumentado na presença de CCL2. Já se foi observado, em estudos anteriores, níveis aumentados de CCL-2 em diversas condições inflamatórias associadas com reabsorção óssea como: doença periodontal (106), movimentação dentária ortodôntica (107), osteólise periapical (108) e artrite reumatóide (109). Na presente pesquisa, a produção de citocina CCL-2 foi detecada em altos níveis na coleta S1, sendo proporcional ao controle positivo (LPS), já o preparo químico-cirúrgico foi eficaz em reduzir a ativação da célula a produzir quantidades de citocina pró-inflamatória CCL-2 assim como o protocolo de irrigação final. Porém, após o uso do $Ca(OH)_2$ como medicação intracanal, houve uma tendência a aumentar a indução dessa citocina. Estatisticamente, esse aumento não foi significativo, mas estudos (35) também observaram aumento na concentração de endotoxinas e conseqüente elevação dos níveis de citocinas após o uso de medicação à base de hidróxido de cálcio. Barthel et al. (35) , sugere em seu estudo que os efeitos inibitórios do hidróxido de calico podem ser consumidos em altas concentrações de LPS, além disso, os autores acreditam

que a inativação do LPS exercida pelo hidróxido de cálcio é um processo limitado, fazendo com que bactérias sejam capazes de reativar seu potencial pró-inflamatório.

Em conclusão, podemos observer que o conteúdo do canal radicular é um potente estímulo para a produção de IL-1β, IL-6 e CCL-2 por fibroblastos. Novos estudos devem ser realizados para avaliar o efeito da terapia endodôntica no controle da infecção do conteúdo do canal radicular através da mensuração da produção de citocinas, quantificação de LPS e bactérias assim como seu metabolismo.

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos e dentro das perspectivas e limitações das metodologias utilizadas, conclui-se que:

- O PQC promoveu uma redução do número de canais radiculares infectados e dos níveis de bactérias e endotoxinas detectados nesses canais. Este também proporcionou uma redução dos níveis de IL-6 e CCL-2 produzidas por fibroblastos humanos.

- O protocolo de ativação ultrassônica de NaOCl 2,5%, EDTA 17% e solução de hidróxido de cálcio, utilizado após o PQC, promoveu uma redução adicional do número de canais radiculares infectados. Entretanto, este protocolo não promoveu uma redução dos níveis de bactérias e endotoxinas nos canais radiculares além daquela obtida pelo PQC. Consequentemente, o efeito citotóxico dessas amostras sobre cultura de fibroblastos humanos foi semelhante ao observado em amostras após o PQC.

- A medicação intracanal com pasta de hidróxido de cálcio promoveu a redução de endotoxinas nos canas radiculares; porém, não foi capaz de promover uma redução adicional nos níveis de bactérias. Da mesma forma, esta etapa do tratamento não proporcionou redução adicional dos níveis de citocinas pró-inflamatórias produzidas por fibroblastos humanos.

- Houve uma correlação positiva entre a presença de endotoxina nos canais radiculares e a indução de citocinas pró-inflamatória pelas células de fibroblastos.

REFERÊNCIAS[1]

1. 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;39(6):484-92.

2. Siqueira JF, 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. 2007;33(6):667-72.

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

4. Siqueira JF, Rôças IN, Paiva SS, Guimarães-Pinto T, Magalhães KM, Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007;104(1):122-30.

5. Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol. 2008;23(5):384-90.

6. Rôças IN, Siqueira JF. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. J Endod. 2010;36(1):45-52.

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

8. Rôças IN, Siqueira JF. Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. J Endod. 2011;37(2):143-50.

9. Paiva SS, Siqueira JF, Rôças IN, Carmo FL, Ferreira DC, Curvelo JA, et al. Supplementing the antimicrobial effects of chemomechanical debridement with either

[1] De acordo com Estilo Vancouver.

passive ultrasonic irrigation or a final rinse with chlorhexidine: a clinical study. J Endod. 2012;38(9):1202-6.

10. 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;38(11):1479-83.

11. Paiva SS, Siqueira JF, Rôças IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC, et al. Clinical antimicrobial efficacy of NiTi rotary instrumentation with NaOCl irrigation, final rinse with chlorhexidine and interappointment medication: a molecular study. Int Endod J. 2013;46(3):225-33.

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

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

14. Rôças IN, Neves MA, Provenzano JC, Siqueira JF. Susceptibility of as-yet-uncultivated and difficult-to-culture bacteria to chemomechanical procedures. J Endod. 2014;40(1):33-7.

15. Neves MA, Rôças IN, Siqueira JF. Clinical antibacterial effectiveness of the self-adjusting file system. Int Endod J. 2014;47(4):356-65.

16. Teles AM, Manso MC, Loureiro S, Silva R, Madeira IG, Pina C, et al. Effectiveness of two intracanal dressings in adult Portuguese patients: a qPCR and anaerobic culture assessment. Int Endod J. 2014;47(1):32-40.

17. Ferreira NS, Martinho FC, Cardoso FG, Nascimento GG, Carvalho CA, Valera MC. Microbiological profile resistant to different intracanal medications in primary endodontic infections. J Endod. 2015;41(6):824-30.

18. Neves MA, Provenzano JC, Rôças IN, Siqueira JF. Clinical Antibacterial Effectiveness of Root Canal Preparation with Reciprocating Single-instrument or Continuously Rotating Multi-instrument Systems. J Endod. 2016;42(1):25-9.

19. Rôças IN, Provenzano JC, Neves MA, Siqueira JF. Disinfecting Effects of Rotary Instrumentation with Either 2.5% Sodium Hypochlorite or 2% Chlorhexidine as the Main Irrigant: A Randomized Clinical Study. J Endod. 2016;42(6):943-7.

20. Nakamura VC, Pinheiro ET, Prado LC, Silveira AC, Carvalho APL, Mayer MPA, et al. Effect of ultrasonic activation on the reduction of bacteria and endotoxins in root canals: a randomized clinical trial. Int Endod J. 2018;51 Suppl 1:e12-e22.

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

22. Pitts DL, Williams BL, Morton TH. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. J Endod. 1982;8(1):10-8.

23. 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;16(7):331-4.

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

25. Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in caries: association with pulpal pain. Int Endod J. 2000;33(2):132-7.

26. Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001;91(5):587-93.

27. Murakami Y, Hanazawa S, Tanaka S, Iwahashi H, Yamamoto Y, Fujisawa S. A possible mechanism of maxillofacial abscess formation: involvement of Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharide via the expression of inflammatory cytokines. Oral Microbiol Immunol. 2001;16(6):321-5.

28. Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. J Med Microbiol. 2005;54(Pt 8):777-83.

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

30. Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. J Endod. 2010;36(9):1467-74.

31. Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. J Endod. 2012;38(6):740-5.

32. Martinho FC, Leite FR, Chiesa WM, Nascimento GG, Feres M, Gomes BP. Signaling pathways activation by primary endodontic infectious contents and production of inflammatory mediators. J Endod. 2014;40(4):484-9.

33. Cardoso FG, Ferreira NS, Martinho FC, Nascimento GG, Manhães LR, Rocco MA, et al. Correlation between Volume of Apical Periodontitis Determined by Cone-beam Computed Tomography Analysis and Endotoxin Levels Found in Primary Root Canal Infection. J Endod. 2015;41(7):1015-9.

34. Martinho FC, Leite FR, Nóbrega LM, Endo MS, Nascimento GG, Darveau RP, et al. Comparison of Fusobacterium nucleatum and Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharides Clinically Isolated from Root Canal Infection in the Induction of Pro-Inflammatory Cytokines Secretion. Braz Dent J. 2016;27(2):202-7.

35. Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated Escherichia coli LPS. Int Endod J. 1997;30(3):155-9.

36. Grunfeld C, Marshall M, Shigenaga JK, Moser AH, Tobias P, Feingold KR. Lipoproteins inhibit macrophage activation by lipoteichoic acid. J Lipid Res. 1999;40(2):245-52.

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

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

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

40. Queiroz CES, Pappen FG, Lia RC, Zanin FP, Leonardo RT, IZ C. Ca(OH) 2 action on TNF-alpha and NO release in macrophage culture stimulated by Pseudomonas aeruginosa LPS. Rev odonto ciênc. 2008;23(3):225-28.

41. Guo J, Yang D, Okamura H, Teramachi J, Ochiai K, Qiu L, et al. Calcium hydroxide suppresses Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharide-induced bone destruction. J Dent Res. 2014;93(5):508-13.

42. Karapinar SP, Akkaya Ulum YZ, Ozcelik B, Dogan Buzoglu H, Ceyhan D, Balci Peynircioglu B, et al. The effect of N-acetylcysteine and calcium hydroxide on TNF-α and TGF- β 1 in lipopolysaccharide-activated macrophages. Arch Oral Biol 2016;68:48–54.

43. Marinho ACS, To TT, Darveau RP, Gomes BPFA. Detection and function of lipopolysaccharide and its purified lipid A after treatment with auxiliary chemical substances and calcium hydroxide dressings used in root canal treatment. Int Endod J. 2018.

44. 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;28(10):694-6.

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

46. 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;36(11):733-9.

47. Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. J Oral Pathol Med. 2004;33(3):162-9.

48. Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. J Endod. 1975;1(1):19-21.

49. 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;22(6):411-8.

50. Martinho FC, Gomes BP. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. J Endod. 2008;34(3):268-72.

51. Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. J Endod. 2009;35(10):1350-3.

52. Martinho FC, Chiesa WM, Marinho AC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, 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;36(11):1766-9.

53. Martinho FC, Chiesa WM, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Souza-Filho FJ, et al. Comparison of endotoxin levels in previous studies on primary endodontic infections. J Endod. 2011;37(2):163-7.

54. 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;31(10):2575-83.

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

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

57. Martinho FC, Gomes AP, Fernandes AM, Ferreira NS, Endo MS, Freitas LF, 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;40(5):625-9.

58. 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;40(2):177-81.

59. Adl A, Motamedifar M, Shams MS, Mirzaie A. Clinical investigation of the effect of calcium hydroxide intracanal dressing on bacterial lipopolysaccharide reduction from infected root canals. Aust Endod J. 2015;41(1):12-6.

60. Carvalho AS, Oliveira LD, Cardoso FG, Oliveira FE, Valera MC, Carvalho CA. Limewater and Polymyxin B Associated with NaOCl for Endotoxin Detoxification in Root Canal with Necrotic Pulp. Braz Dent J. 2016;27(5):573-7.

61. Cavalli D, Toia CC, Flores Orozco EI, Khoury RD, Cardoso FGDR, Alves MC, et al. Effectiveness in the Removal of Endotoxins and Microbiological Profile in Primary Endodontic Infections Using 3 Different Instrumentation Systems: A Randomized Clinical Study. J Endod. 2017;43(8):1237-45.

62. Herrera DR, Martinho FC, de-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, et al. Clinical efficacy of EDTA ultrasonic activation in the reduction of endotoxins and cultivable bacteria. Int Endod J. 2017;50(10):933-40.

63. Martinho FC, Gomes CC, Nascimento GG, Gomes APM, Leite FRM. Clinical comparison of the effectiveness of 7- and 14-day intracanal medications in root canal disinfection and inflammatory cytokines. Clin Oral Investig. 2018;22(1):523-30.

64. Weckwerth PH, Carnietto C, Weckwerth AC, Duarte MA, Kuga MC, Vivan RR. In vitro susceptibility of oral Candida albicans strains to different pH levels and calcium hydroxide saturated aqueous solution. Braz Dent J. 2012;23(3):192-8.

65. Hagman R. Clinical and molecular characteristics of pyometra in female dogs. Reprod Domest Anim. 2012;47 Suppl 6:323-5.

66. Sipert CR, Morandini AC, Modena KC, Dionísio TJ, Machado MA, Oliveira SH, et al. CCL3 and CXCL12 production in vitro by dental pulp fibroblasts from permanent and deciduous teeth stimulated by Porphyromonas gingivalis LPS. J Appl Oral Sci. 2013;21(2):99-105.

67. Yoshino P, Nishiyama CK, Modena KC, Santos CF, Sipert CR. In vitro cytotoxicity of white MTA, MTA Fillapex® and Portland cement on human periodontal ligament fibroblasts. Braz Dent J. 2013;24(2):111-6.

68. Pinheiro ET, Candeiro GT, Teixeira SR, Shin RC, Prado LC, Gavini G, et al. RNA-based Assay Demonstrated Enterococcus faecalis Metabolic Activity after Chemomechanical Procedures. J Endod. 2015;41(9):1441-4.

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

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;37(8):1128-33.

71. 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;43(11):968-77.

72. Matsuda K, Tsuji H, Asahara T, Kado Y, Nomoto K. Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. Appl Environ Microbiol. 2007;73(1):32-9.

73. Nardello L. Análise da atividade metabólica de bactérias persistentes após os procedimentos endodônticos de desinfecção: estudo molecular baseado em RNA e DNA. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2017.

74. Prado L. Estudo in vivo da susceptibilidade de bactérias Gram-positivas após procedimentos químico-cirúrgico e medicação intracanal pelo método de reação de cadeia de polimerase baseado em DNA e RNA. [dissertação].São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2014.

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

76. Ardeshna 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;35(3):239-44.

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

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

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

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

81. 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;20(6):661-6.

82. de 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;104(1):135-42.

83. 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;35(7):582-9.

84. 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;39(6):472-6.

85. Mancini M, Cerroni L, Iorio L, Armellin 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;39(11):1456-60.

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

87. Duarte MA, Balan NV, Zeferino MA, Vivan RR, Morais CA, Tanomaru-Filho M, et al. Effect of ultrasonic activation on pH and calcium released by calcium hydroxide pastes in simulated external root resorption. J Endod. 2012;38(6):834-7.

88. Siqueira JF, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. J Endod. 2008;34(11):1291-301.e3.

89. Siqueira JF, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. J Dent Res. 2009;88(11):969-81.

90. Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. Crit Rev Oral Biol Med. 1996;7(2):104-33.

91. Pezelj-Ribarić S, Magasić K, Prpić J, Miletić I, Karlović Z. Tumor necrosis factor-alpha in peripical tissue exudates of teeth with apical periodontitis. Mediators Inflamm. 2007;2007:69416.

92. Wang PL, Azuma Y, Shinohara M, Ohura K. Toll-like receptor 4-mediated signal pathway induced by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun. 2000;273(3):1161-7.

93. Garrison SW, Nichols FC. Gamma interferon modulation of prostaglandin E2 release from monocytes stimulated with lipopolysaccharides from Bacteroides intermedius, Bacteroides gingivalis, and Salmonella typhimurium. Oral Microbiol Immunol. 1988;3(3):138-43.

94. Jiang J, Zuo J, Hurst IR, Holliday LS. The synergistic effect of peptidoglycan and lipopolysaccaride on osteoclast formation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003;96(6):738-43.

95. Carvalho A. Estudo in vivo da ação do tratamento endodôntico sobre endotoxinas bacterianas em canais radiculares com polpa necrosada e avaliação dos efeitos citotóxicos. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2010.

96. Zhang A, Wang P, Ma X, Yin X, Li J, Wang H, et al. Mechanisms that lead to the regulation of NLRP3 inflammasome expression and activation in human dental pulp fibroblasts. Mol Immunol. 2015;66(2):253-62.

97. Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. J Clin Invest. 1991;88(5):1445-51.

98. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. Int Anesthesiol Clin. 2007;45(2):27-37.

99. Sims JE GM, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri J G, et al. Interleukin-1 signalling occurs exclusively via the type I receptor. Proc Natl Acad Sci. 1993;90:6155.

100. Cassel SL, Joly S, Sutterwala FS. The NLRP3 inflammasome: a sensor of immune danger signals. Semin Immunol. 2009;21(4):194-8.

101. Febbraio MA, Pedersen BK. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. FASEB J. 2002;16(11):1335-47.

102. Yoon WJ, Kim SS, Oh TH, Lee NH, Hyun CG. Abies koreana essential oil inhibits drug-resistant skin pathogen growth and LPS-induced inflammatory effects of murine macrophage. Lipids. 2009;44(5):471-6.

103. Gabay C, Cakir N, Moral F, Roux-Lombard P, Meyer O, Dayer JM, et al. Circulating levels of tumor necrosis factor soluble receptors in systemic lupus erythematosus are significantly higher than in other rheumatic diseases and correlate with disease activity. J Rheumatol. 1997;24(2):303-8.

104. Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. Clin Chim Acta. 2010;411(21-22):1570-9.

105. Kim MS, Day CJ, Morrison NA. MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor-{kappa}B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation. J Biol Chem. 2005;280(16):16163-9.

106. Kurtiş B, Tüter G, Serdar M, Akdemir P, Uygur C, Firatli E, et al. Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. J Periodontol. 2005;76(11):1849-55.

107. Garlet TP, Coelho U, Repeke CE, Silva JS, Cunha FeQ, Garlet GP. Differential expression of osteoblast and osteoclast chemmoatractants in compression and tension sides during orthodontic movement. Cytokine. 2008;42(3):330-5.

108. Garlet TP, Fukada SY, Saconato IF, Avila-Campos MJ, da Silva TA, Garlet GP, et al. CCR2 deficiency results in increased osteolysis in experimental periapical lesions in mice. J Endod. 2010;36(2):244-50.

109. Iwamoto T, Okamoto H, Toyama Y, Momohara S. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients. FEBS J. 2008;275(18):4448-55.

APÊNDICE A – Termo de esclarecimento livre e esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Título do estudo: Avaliação dos níveis de bactérias e seus subprodutos após um protocolo de tratamento endodôntico utilizando ativação ultrassônica de uma solução de hidróxido de cálcio e os efeitos citóxicos das endotoxinas nos canais radiculares com infecções primárias.

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Giulio Gavini

Equipe de pesquisa: Porfa. Dra. Ericka Tavares Pinheiros, Msc. Laís Cunha Prado.

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

Telefone para contato: (11) 3091-7839 / (11) 981590303

Local da coleta de dados: Clínica da Pós-Graduação da FOUSP

Você está sendo convidado a participar da pesquisa "**Avaliação dos níveis de bactérias e seus subprodutos após um protocolo de tratamento endodôntico utilizando ativação ultrassônica de uma solução de hidróxido de cálcio e os efeitos citóxicos das endotoxinas nos canais radiculares com infecções primárias**." que tem como objetivo avaliar o quanto o uso do ultrassom e de uma solução de hidróxido de cálcio consegue diminuir o número de bactérias, endotoxina e neutralizar os efeitos citotóxicos.

A pesquisa será realizada na Clínica da Pós Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, e serão selecionados pacientes da Clínica de Endodontia da FOUSP já em tratamento.

O procedimento consiste em, detectada no exame clínico e radiográfico a infecção do canal, estes pacientes serão convidados a participar da pesquisa permitindo a coleta do conteúdo que está dentro do canal durante todo o tratamento para a pesquisa. Os demais serão encaminhados para outras disciplinas para que possam ser realizados os tratamentos necessários.

O tratamento consiste em duas sessões, sendo que a primeira será feita o procedimento relacionado com o tratamento de canal, com o uso ou não da solução de hidróxido de cálcio e ultrassom e as coletas e na segunda sessão será feito o fechamento do canal, uma nova coleta e restauração do dente, finalizando o tratamento. O tratamento será feito com anestesia para conforto do paciente, e serão realizadas apenas as radiografias necessárias para a realização do tratamento. Anualmente o participante da pesquisa retornará à Clínica de Endodontia para controle do tratamento.

O risco deste tratamento é uma sensibilidade após as consultas de tratamento, que o pesquisador responsável estará à inteira disposição para solucionar. O benefício ao participante da pesquisa será o tratamento de canal garantindo melhor saúde bucal.

Aos participantes desta pesquisa são assegurados:

- Ressarcimento de todos os gastos;

- Assistência em virtude dos danos decorrentes da pesquisa;

- Indenização em casos de danos decorrentes da pesquisa;

- Acesso aos resultados dos exames radiográficos;

Rubrica Participante da Pesquisa

Rubrica do Pesquisador Responsável 1/2

- Os dados fornecidos serão confidenciais;

- Liberdade de retirada do Consentimento sem penalização por parte dos pesquisadores;

- Liberdade de recusar em participar do estudo sem penalização por parte dos pesquisadores responsáveis;

- Em caso de interrupção do estudo receberá assistência adequada de forma gratuita pelo tempo que for necessário;

O pesquisador responsável, Prof. Dr. Giulio Gavini, poderá ser encontrado no telefone (11) 981590303, ou na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

CEP-FOUSP - Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – Avenida Professor Lineu Prestes nº 2227 – 05508-000 – São Paulo – SP – Telefone (11) 3091.7960 – e-mail cepfo@usp.br. O horário de atendimento ao público e pesquisadores é: de segunda a sexta-feira das 9 as 12h e de 14 as 16h (exceto em feriados e recesso universitário). O Comitê é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. (Resolução CNS nº 466 de 2012).

Este termo está sendo elaborado em duas vias, sendo uma do participante da pesquisa e outra do pesquisador responsável.

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

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Nome do participante da pesquisa:
_____

Endereço:_____

_____ Telefone: ( ) _____

_____

Assinatura do Participante da pesquisa

_____

Assinatura do Pesquisador Responsável

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 tiossulfato 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 4ºC e 13.000RPM por 10min
- Em um tubo tipo Falcon de 15mL estéril, preparar uma mistura de 300µL de Tissue e Cell Lisys (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, Hauppage, NY, EUA) a 4ºC 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
    - Mg_2 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 – 95ºC por 2 min
  - 36 ciclos de C95ºC por 30s, 60ºC por 1min, e 72ºC por 1min
  - Extensão final a 72ºC 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 H_2O), 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 corrifa (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 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 6µl 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 20µL. Os primers utilizados foram baseados no trabalho de Shelburne et al (2000), na concentração de 0,1mM, 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 centrífuga 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**:

    - Power SybrGreen PCR Master Mix (Life Technologies Corp)..... 10µL
    - Primer universal *Forward* (Exxtend, Paulínia, SP, Brasil) 0,5µL
    - Primer universal *Reverse* (Exxtend, Paulínia, SP, Brasil) 0,5µL
    - 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 centrífuca 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 Pyrogent 5000 (Lonza Group Ltd, Walkersville, MD, USA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante:

- Suspender 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 70ºC 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 37ºC
- 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).

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação dos níveis de bactérias e seus subprodutos após um protocolo de tratamento endodôntico utilizando ativação ultrassônica de uma solução de hidróxido de cálcio e os efeitos citóxicos das endotoxinas nos canais radiculares com infecções primárias.

Pesquisador: Giulio Gavini
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 91273618.7.0000.0075
Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.745.561

Apresentação do Projeto:
As bactéria e seus subprodutos são um dos agentes etiológicos envolvidos na patogênese de doenças periapicais. O uso de hidróxido de cálcio como medicação intracanal apresenta um efeito neutralizador de endotoxinas. Para auxiliar no controle microbiano e na redução de endotoxinas, alguns procedimentos foram propostos, como a Irrigação Ultrassônica Passiva (PUI). O objetivo deste estudo clínico será investigar os efeitos do tratamento endodôntico, utilizando protocolo de irrigação, sobre as endotoxinas e seus efeitos citoxóxicos em canais radiculares com necrose pulpar e lesão periapical. Serão selecionados 22 pacientes com necessidade de tratamento endodôntico de dentes com periodontite apical primária. O PQM de todos os dentes será realizado com instrumentos reciprocantes. As soluções irrigadoras utilizadas serão: NaOCl 2,5%, durante o preparo; EDTA 17%, para remoção da smear layer e solução de hidróxido de cálcio 0,14% como irrigação final. Os canais radiculares serão preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio por 14 dias e obturados. Serão realizadas coletas microbiológicas dos canais radiculares antes (S1) e após o PQM (S2), após os diferentes protocolos de irrigação final (S3)e após a medicação intracanal (S4). As amostras serão analisadas por PCR quantitativo (PCR em Tempo Real), utilizando primers universais para o domínio Bacteria, para analisar a redução do total de bactérias após os

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

procedimentos de desinfecção; pelo teste de LAL (Limulus amebocyte lysate assay) para quantificação de endotoxinas; e para avaliação dos efeitos citotóxicos pela produção de citocinas (IL-1, IL-6, RANKL, OPG, MCSF) em cultura de Fibroblastos de Ligamento Periodontal pelo teste de ELISA (Duoset-Kit, R&D systems). Testes estatísticos apropriados serão realizados para avaliar o resultado dos testes microbiológicos e o grupo do tratamento (PUI/Solução de Hidróxido de cálcio 0,14%).

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a eficácia de uma solução de hidróxido de cálcio utilizando protocolo de irrigação ultrassônica passiva na redução de endotoxinas e neutralização de seus efeitos citotóxicos nos canais radiculares de dentes portadores de periodontite apical primária.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos minimos relacionados ao desconforto pós operatório, inerentes ao tratamento endodontico. Beneficios ligados ao diagnostico e tratamento das lesoes endodonticas do paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto bem estruturado, com forte embasamento cientifico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos apresentados adequadamente.

Recomendações:

Ajustar o cronograma com a primeira data posterior a aprovacao do CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A primeira data do cronograma é anterior a analise do projeto. Ajustar a data de inicio do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_950912.pdf	05/06/2018 16:32:16		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_LAISPRADO.pdf	05/06/2018 16:30:59	Giulio Gavini	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	projetolais.pdf	05/06/2018 16:30:33	Giulio Gavini	Aceito

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

Investigador	projetolais.pdf	05/06/2018 16:30:33	Giulio Gavini	Aceito
Outros	AutrizacaodePesquisaLAIS.pdf	28/05/2018 15:56:16	Giulio Gavini	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	AutorizacaoBiobancoLAIS.pdf	28/05/2018 15:54:41	Giulio Gavini	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoLAIS.pdf	28/05/2018 15:48:28	Giulio Gavini	Aceito

Situação do Parecer:
Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 29 de Junho de 2018

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br