



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL



LISA DANIELLY CURCINO ARAUJO

**PROBIÓTICO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* E
DO EFEITO *IN VIVO* NA PROGRESSÃO DE LESÕES PERIAPICAIS, POR
MEIO DE ANÁLISE MICROSCÓPICA**



Ribeirão Preto
2020

LISA DANIELLY CURCINO ARAUJO

**PROBIÓTICO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* E
DO EFEITO *IN VIVO* NA PROGRESSÃO DE LESÕES PERIAPICAIS, POR
MEIO DE ANÁLISE MICROSCÓPICA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

ORIENTADORA: PROFA. DRA. LÉA ASSED BEZERRA DA SILVA

VERSÃO CORRIGIDA

Ribeirão Preto
2020

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Araujo, Lisa Danielly Curcino

Probiótico: Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e do efeito *in vivo* na progressão de lesões periapicais, por meio de análise microscópica, 2020.

107p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão - Preto/USP – Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientador: da Silva, Léa Assed Bezerra

1. Lesão Periapical; 2. Probiótico; 3. Infecção endodôntica; 4. Micro-organismos

A versão corrigida se encontra disponível na unidade que aloja o programa.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Araujo LDC. **Probiótico: Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e do efeito *in vivo* na progressão de lesões periapicais, por meio de análise microscópica.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Odontopediatria.

Data da defesa: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva – Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

LISA DANIELLY CURCINO ARAUJO

- Nascimento** 21 de julho de 1994 – Maceió/AL
- Filiação** Fernando José Peixoto Araujo Santos
Daniela Curcino Araujo
- 2011-2017** Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alagoas- FOUFAL
- 2014-2015** Extensão Universitária
Práticas Coletivas em Saúde Bucal como Parte Integrante dos Cuidados em Saúde
Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alagoas-FOUFAL
- 2016-2017** Extensão Universitária
Projeto Cuidados em Saúde Bucal no Serviço de Convivência e Fortalecimento de Vínculos
Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alagoas-FOUFAL
- 2016-2017** Extensão Universitária
Projeto Sorriso de Plantão
Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alagoas-FOUFAL
- 2016-2018** Extensão Universitária
Ação de Extensão Trauma Dental
- 2018-2020** Pós-Graduação (Mestrado) em Odontologia
Área de concentração: Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP

DEDICATÓRIA

A Deus, pai eterno, pela presença em todos os momentos da minha vida. Obrigada senhor por ter me permitido chegar até aqui, só com a fé que tenho em Ti foi que consegui enfrentar tantos desafios que surgiram durante o decorrer do curso. A Maria, que passou a frente de toda a minha vida, gratidão imensa.

Aos meus avós, pela torcida, carinho e ternura. A distância aflorou ainda mais todo meu amor por vocês.

*Aos meus pais **Fernando Araujo e Daniela Araujo**, que mesmo com a distância e a saudade, me apoiaram nas minhas escolhas e a ir atrás dos meus sonhos. Não consigo definir o tamanho da minha imensa gratidão por vocês. Lição de vida e superação, vocês são os meus maiores exemplos. Obrigada por todo esforço, paciência, amor, carinho e sabedoria. Tenho muito orgulho de ser filha de vocês. Amo vocês!*

*Ao meu irmão **João Fernando**, por todos os momentos de alegria, companheirismo e cumplicidade. Obrigada pela torcida e pelo apoio. Te amo irmão!*

*Ao meu namorado **Leonardo Lobo**, não tenho como descrever em palavras o quanto sou grata por ter você em minha vida. Meu grande incentivador, obrigada por acreditar tanto no meu potencial e por ser meu lugar de paz nos momentos mais difíceis. Gratidão imensa por você, pelo seu amor e pela nossa cumplicidade e parceria nessa trajetória que escolhemos seguir juntos. Obrigada por tanto! Eu te amo!!*

*Aos meus amigos de **Ribeirão Preto**, por tantas pessoas que me confortaram diante de muitas dificuldades. Muito obrigada por me acolherem com tanto carinho!*

A todos os meus familiares e amigos que torceram tanto por mim e me deram força nos momentos que a saudade apertou! Obrigada por me incentivarem, amo vocês!

Aos familiares e amigos do meu namorado, muito obrigada pela torcida e incentivo!

Às crianças, por serem o motivo da minha dedicação e por sempre me fazerem acreditar na pureza e na inocência do ser humano.

Devo esta conquista a todos vocês!

Obrigada!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof.^a Dra. **Léa Assed Bezerra da Silva**, pela oportunidade de executar esse trabalho muito gratificante, fornecendo todo apoio e suporte para realização do mesmo. Gratidão por ser esse exemplo de profissional, e por compartilhar seu conhecimento.

À querida Prof.^a Dra. **Raquel Assed Bezerra Segato**, por ter me acolhido tão bem, pela paciência e confiança no decorrer do curso. Gratidão imensa por todo seu apoio!

Ao querido Prof. Dr. **Sérgio Luiz Salvador**, por ter me acolhido em seu laboratório. Muito obrigada por me incentivar e acreditar em mim!

Ao Prof. Dr. **Michel Messoria** e a Prof.^a Dra. **Flávia Furlaneto**, pelo apoio e parceria no decorrer deste trabalho. Obrigada por compartilhar um pouco do conhecimento de vocês.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual diretor **Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho** e do Vice-Diretor **Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva**.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Coordenadora **Prof.ª. Dr.ª. Raquel Assed Bezerra Segato**.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa concedida. Processo nº2018/22038-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Aos professores da disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto:

Ao **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, exemplo de mestre, obrigada pelas orientações durante o período do mestrado e por todo incentivo.

Ao **Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva**, pelo incentivo em trabalhos paralelos e por acreditar no meu potencial. Muito obrigada!

Aos docentes do Departamento de Clínica Infantil da FORP/USP **Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz**, **Profa. Dra. Aldevina Campos de Freitas**, **Profa. Dra. Andiana de Rossi Daldegan**, **Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho**, **Profa. Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano**, **Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto** pelos grandes ensinamentos na clínica e na vida acadêmica. Muito obrigada por tudo!

Aos professores da Universidade Federal de Alagoas, por toda dedicação e incentivo, em especial a querida professora **Daniela Maria Carvalho Pugliesi**, pelo incentivo e apoio na jornada da carreira acadêmica. Obrigada por ser esse exemplo de profissional a ser seguido.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto:

Dr.ª. Carolina Paes Torres Mantovani e **Dr.ª Marília Pacífico** muito obrigada pela ajuda, pelas orientações nas clínicas e por estarem sempre disponíveis a colaborar com a

minha aprendizagem. Agradeço pela convivência agradável e por dividirem experiências e conhecimentos.

Ao querido **Marco Antônio dos Santos**, obrigada pela convivência diária, pelo carinho, amizade e pela imensa ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Marco, sem você, não teria conseguido. Muito Obrigada!!!

A minha amiga querida **Nilza Leticia Magalhães**, obrigada por ser essa pessoa cheia de energia boa e jeito leve de ser. Pelo incentivo nas dificuldades, pelo apoio emocional e pela grande ajuda e participação nos trabalhos desenvolvidos durante esse período. Gratidão imensa por tudo!

Filomena Placciti, Matheus Zanela, Micheli Cristina Rovanholo, e Mary Carmessano pela dedicação, paciência, apoio, atenção e carinho durante todo o curso. Vocês são pessoas maravilhosas. Agradeço de coração por tudo.

À funcionária do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo **Marina Del Arco**, por tanto carinho e acolhimento no Laboratório. Obrigada por todo o conhecimento transmitido, por ser essa pessoa leve e maravilhosa, sempre disponível para nos ajudar. Gratidão!

A minha querida amiga e irmã-científica **Lana Kei Yamamoto**, não consigo descrever o quanto sou grata por ter ganhado uma irmã no mestrado. Obrigada por toda sua ajuda durante esse trabalho, mais ainda pela ajuda emocional durante todo o curso. Você é maravilhosa e te admiro demais.

A minha querida dupla do mestrado **Heloisa Vieira**, gratidão por todas as nossas parcerias nos trabalhos, pelos conselhos e conversas de desabafo. Você tem lugar guardadinho no meu coração.

A minha amiga mais animada **Thais Tedeschi**, obrigada por alegrar meus dias com seu jeito incrível de ser, de correr atrás dos seus sonhos e de ver o mundo. Você me inspira!

A **Laura Cotrim**, amiga mais parecida comigo no jeito desastrado, muito obrigada por todas as nossos momentos felizes, por todas as nossas conversas e desabafos. Você tem sempre um lugar no meu coração!

A minha querida amiga **Mariana Daltoé**, por ser esse ser incrível e com esse senso de humor maravilhoso. Obrigada por tanto carinho e companheirismo durante todo esse tempo. Você é maravilhosa!

Ao amigo **Luciano Aparecido**, obrigada por todos os momentos alegres e divertidos, e tantas risadas que demos juntos. Você é muito querido!

A **Marina Vilela**, por ser umas das primeiras pessoas a me incentivar nas apresentações orais. Obrigada por todo carinho e amizade.

A **Carolina Maschietto**, companheira em tantos momentos, gratidão por toda sua ajuda durante este trabalho e por todos os nossos momentos descontraídos. Não teria conseguido sem você!

Aos colegas do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, em especial a **Giselle Silva e Pedro Felix**, muito obrigada por todo o apoio que recebi de vocês durante o desenvolvimento deste trabalho e por partilhar um pouco das nossas angustias da pós-graduação.

Aos meus colegas de mestrado e aos alunos do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela agradável convivência, pelas conversas divertidas e pelos momentos compartilhados.

A todos aqueles que participaram direta ou indiretamente para que este trabalho se tornasse realidade.

RESUMO

Araujo, LDC. Probiótico: Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e do efeito *in vivo* na progressão de lesões periapicais, por meio de análise microscópica. Ribeirão Preto, 2020.107p. [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2020.

Os probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Pesquisas em relação ao uso de probióticos para tratamento de doenças na cavidade bucal tem apresentado resultados relevantes. Entretanto, poucos estudos relatam o efeito do uso de probióticos nas infecções pulpares e nenhum estudo *in vivo* utilizou os probióticos como solução irrigadora de canais radiculares. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana do probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019, por meio da técnica do poço, contra 10 micro-organismos podem ser encontrados envolvidos em infecções endodônticas. Além disso, foi avaliado *in vivo*, por meio da análise microscópica, o efeito desse probiótico quando utilizado como solução irrigadora de canais radiculares de dentes de ratos com lesões periapicais induzidas. Para a análise *in vitro*, foi feita a atividade antimicrobiana do probiótico sobre os *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactocaseibacillus casei*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*. Após 48 a 72 horas de incubação das placas de petri contendo meio de cultura, as cepas dos micro-organismos e o probiótico, as placas foram examinadas para avaliação da uniformidade do crescimento microbiano, presença de contaminantes e do halo de inibição. Após a inspeção visual, a leitura do halo de inibição foi realizada com auxílio de um paquímetro digital utilizando fonte de luz refletida para iluminar a placa invertida sobre um fundo preto e opaco após a remoção da tampa. Desse modo, foram obtidos 3 valores de cada inóculo bacteriano que foram somados e divididos por três para se obter a média dos valores. Já para a avaliação *in vivo*, os animais foram divididos em seis grupos de acordo com a solução irrigadora utilizada nos canais radiculares após abertura coronária e exposição do tecido pulpar, conforme segue: Grupo I (4 animais/ 8 dentes) dentes hígidos; Grupo II (4 animais/ 4 dentes): Hipoclorito de sódio à 2,5% como solução irrigadora (3 dias); Grupo III (4 animais/4 dentes): Probiótico como solução irrigadora (3 dias); Grupo IV (12 animais/ 24 dentes): Lesão periapical sem nenhum tratamento (7, 21 e 42 dias); Grupo V (12 animais/24 dentes): Hipoclorito de sódio à 2,5% como solução irrigadora (7, 21, 42 dias); Grupo VI (12 animais/24 dentes): Probiótico como solução irrigadora (7, 21, 42 dias). O probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (*B. lacti*) HN019 foi utilizado como solução irrigadora, formulada pela adição do probiótico a $2,7 \times 10^9$ UFC em meio aquoso, acrescida de 2,0% de carboximetilcelulose, com um volume final de 100µL. Para a administração local, os canais radiculares foram irrigados no dia 0 e dias 3, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a indução da lesão periapical. Após eutanásia dos animais, as mandíbulas foram submetidas ao processamento histotécnico, as lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) e analisadas em microscópica óptica para descrição das características do conteúdo do canal radicular e das regiões apical e periapical, paralelamente à análise morfométrica da área das lesões periapicais, em microscopia fluorescente. Foi realizada, ainda, a contagem de osteoclastos, empregando a histoenzimologia para Atividade da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP). Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio diferentes testes de acordo com a natureza dos dados. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 5%. Os resultados do estudo *in vitro* demonstraram que o probiótico *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 promoveu a inibição de todas as cepas dos patógenos avaliados, com exceção do *Candida albicans*, demonstrando atividade antimicrobiana sobre esses micro-organismos. Já os resultados do estudo *in vivo* da análise dos parâmetros histopatológicos demonstraram que os grupos III e VI, com probiótico como

solução irrigadora, apresentaram melhores resultados quando comparados ao grupo sem tratamento e com a irrigação de hipoclorito de sódio, mostrando menor quantidade de células inflamatórias e menor área da lesão. Em relação ao número de osteoclastos, foi observado diminuição apenas no grupo III, aos 3 dias ($p=0,0425$), e no grupo VI aos 21 dias ($p=0,0043$). Após as metodologias e os resultados obtidos, pode-se concluir que o probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 apresentou *in vitro* atividade antimicrobiana contra micro-organismos presentes em infecções endodônticas, além de apresentar, microscopicamente, um potencial terapêutico para administração local como solução irrigadora na progressão da lesão periapical, quando comparado ao hipoclorito de sódio.

Palavras-chave: infecção endodôntica, lesão periapical, probióticos, micro-organismos, solução irrigadora.

ABSTRACT

Araujo, LDC. Probiotic: Evaluation of in vitro antimicrobial activity and in vivo effect on the progression of periapical lesions, through microscopic analysis. Ribeirão Preto, 2020. 107p. [Master dissertation]. Ribeirão Preto: Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo; 2020.

Probiotics are living microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer health benefits to the host. Research regarding the use of probiotics to treat diseases in the oral cavity has shown relevant results. However, few studies report the effect of using probiotics on pulp infections and neither in vivo study has used probiotics as an irrigation solution for root canals. Thus, the objective of the present study was to evaluate, in vitro, the antimicrobial activity of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019, using the well technique, against 10 microorganisms that can be found involved in endodontic infections. In addition, it was evaluated in vivo, through microscopic analysis, the effect of this probiotic when used as an irrigation solution for root canals of rat's teeth with induced periapical lesions. For in vitro analysis, probiotic antimicrobial activity was performed on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactocaseibacillus casei*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*. After 48 to 72 hours of incubation of the petri dish containing culture medium, the strains of the microorganisms and the probiotic, the dishes were examined to assess the uniformity of microbial growth, the presence of contaminants and the halo of inhibition. After visual inspection, the inhibition halo was read with the aid of a digital caliper using a reflected light source to illuminate the inverted plate on a black and opaque background after removing the cover. Thus, 3 values of each bacterial inoculum were obtained, which were added and divided by three to obtain the average of the values. For the in vivo evaluation, the animals were divided into six groups according to the irrigating solution used in the root canals after coronary opening and exposure of the pulp tissue, as follows: Group I (4 animals / 8 teeth) healthy teeth; Group II (4 animals / 4 teeth): 2.5% sodium hypochlorite as an irrigating solution (3 days); Group III (4 animals / 4 teeth): Probiotic as an irrigating solution (3 days); Group IV (12 animals / 24 teeth): Periapical lesion without any treatment (7, 21 and 42 days); Group V (12 animals / 24 teeth): 2.5% sodium hypochlorite as an irrigating solution (7, 21, 42 days); Group VI (12 animals / 24 teeth): Probiotic as an irrigating solution (7, 21, 42 days). The probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (B. lacti) HN019 was used as an irrigating solution, formulated by adding the probiotic at 2.7×10^9 CFU in aqueous medium, plus 2.0% of carboxymethylcellulose, with a final volume of 100µL. For local administration, the root canals were irrigated on day 0 and days 3, 7, 14, 21, 28 and 35 days after induction of the periapical lesion. After euthanizing the animals, the mandibles were submitted to histotechnical processing, the slides stained in hematoxylin and eosin (HE) and analyzed in optical microscopy to describe the characteristics of the root canal content and the apical and periapical regions, in parallel to the morphometric analysis of the area periapical lesions, under fluorescent microscopy. Osteoclast counting was also performed, using histoenzymology for Tartrate Resistant Acid Phosphatase Activity (TRAP). The results obtained were submitted to statistical analysis through different tests according to the nature of the data. For all analyzes, the significance level of 5% was adopted. The results of the in vitro study demonstrated that the probiotic *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 promoted the inhibition of all strains of the pathogens evaluated, with the exception of *Candida albicans*, demonstrating antimicrobial activity on these microorganisms. The results of the in vivo study of the analysis of the histopathological parameters showed that groups III and VI, with probiotic as an irrigating solution, presented better results when compared to the group without treatment and with the irrigation of sodium hypochlorite, showing less inflammatory cells and smaller lesion area. Regarding the number of osteoclasts, a decrease was observed

only in group III, at 3 days ($p=0.0425$), and in group VI at 21 days ($p=0.0043$). After the methodologies and the results obtained, it can be concluded that the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 showed in vitro antimicrobial activity against microorganisms present in endodontic infections, besides presenting, microscopically, a therapeutic potential for local administration as an irrigating solution in the progression of periapical lesion, when compared to sodium hypochlorite.

Keywords: endodontic infection, periapical lesion, probiotics, microorganisms.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 PROPOSIÇÃO.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4 RESULTADOS.....	45
5 DISCUSSÃO.....	81
6 CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS.....	91
ANEXOS.....	107

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Na cavidade bucal, patógenos que fazem parte da microbiota bucal residente sobrevivem em simbiose. Por meio de uma cavidade decorrente da lesão de cárie, os patógenos invadem o canal radicular e desenvolvem um processo infeccioso até a região apical e periapical, paralelamente à ocorrência de um "shift" microbiano (Iqbal, 2012; Marsh, 2010; Allaker e Stephen; 2017; Samaranyake e Matsubara, 2017). A microbiota do canal radicular varia de acordo com o grau e tipo de infecção. Inicialmente, há a prevalência de bactérias facultativas, ou seja, aquelas que podem sobreviver em condições aeróbias ou anaeróbias. Na fase aeróbia, há a prevalência de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* e *Actinomyces viscosus* (Brooks, 2003; Siqueira e Rôças, 2005; Siqueira e Rôças, 2014; Samaranyake e Matsubara, 2017). Entretanto, com a persistência da patologia pulpar, há uma diminuição do oxigênio, tornando o meio predominantemente anaeróbio e, conseqüentemente, modificando aquele microbioma em anaeróbio, com prevalência de *Propionibacterium*, *Eubacteria*, *Arachnia*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Actinomyces* (Brooks, 2003; Siqueira e Rôças, 2014; Qian et al., 2019; Park et al., 2020).

A persistência dos micro-organismos no canal radicular e região apical e periapical poderá desencadear, pela ação do próprio micro-organismo nos tecidos bucais, assim como pelo efeito de seus produtos e subprodutos, como o lipopolissacarídeo (LPS ou endotoxina bacteriana), diversos eventos biológicos que levam a um processo inflamatório crônico e reabsorção óssea e de cemento-dentina (Silva et al., 2004). Encontrado em infecções, o *Enterococcus faecalis* é um micro-organismo anaeróbio com capacidade de resistir ao tratamento de canal radicular, particularmente pela sua bomba de prótons, que tem a capacidade de acidificar seu citoplasma, promovendo a sobrevivência desse micro-organismo em pH alcalino (Evans et al., 2002; Miranda et al., 2013; Sánchez-Sanhueza et al., 2020).

O sucesso do tratamento endodôntico depende de muitos fatores, podendo ser influenciado pela anatomia complexa dos canais radiculares de dentes decíduos e permanentes, incluindo o número, a curvatura e as ramificações dos canais, além da localização do forame apical, dificultando a completa desinfecção do sistema de canais radiculares (Peters, 2004; Estrela et al., 2014; Ahmad e Alenezi, 2016; Ahmed e Hashem, 2016; Hidalgo et al., 2017). Além disso, a presença de lesão periapical crônica, como consequência de infecção bacteriana proveniente da polpa dentária necrótica, está associada a uma maior taxa de insucesso após o tratamento endodôntico (Estrela et al., 2014; Hidalgo et al., 2016; Silva et al., 2017). Paralelamente, nos casos de dentes com necrose pulpar e lesão periapical, a infecção não está restrita ao canal principal, mas disseminada nas ramificações apicais, túbulos dentinários, cemento apical e biofilme extraradicular,

contribuindo, portanto, para uma limitada eliminação da contaminação somente com a realização do preparo biomecânico (Leonardo et al., 2008; Neelakantan et al., 2017; Siqueira-Júnior et al., 2018).

Assim, durante o tratamento endodôntico de dentes com lesão periapical recomenda-se que uma medicação intracanal seja utilizada, entre as sessões, para auxiliar na desinfecção do sistema de canais radiculares. As taxas de sucesso nesses casos são maiores com o uso de uma medicação intracanal antimicrobiana entre as sessões, em comparação ao tratamento efetuado em sessão única (Vera et al., 2012; Borsatto et al., 2016; Hidalgo et al., 2016; Silva et al., 2017).

O hidróxido de cálcio tem sido a medicação intracanal mais estudada, discutida e empregada tendo em vista suas excelentes propriedades, tais como ação antimicrobiana (Assed et al., 1996; Leonardo et al., 2000; Sangalli et al., 2018), anti-exsudativa (Heithersay, 1970; Allard et al., 1987; Sousa et al., 2014), indutora da formação de tecido mineralizado (Schroder, 1985; Leonardo et al., 2006; Da Silva et al., 2008; Silva et al., 2010; Nowicka et al., 2015; Hidalgo et al., 2016; Silva et al., 2017; Didilescu et al., 2018), além de apresentar biocompatibilidade (Nelson-Filho et al., 1999; Leonardo et al., 2006; Andolfatto et al., 2012; Lima et al., 2015; Zarei et al., 2016; Cintra et al., 2017), propriedade de dissolução de tecidos necróticos (Hasselgren et al., 1988; Andersen et al., 1992; Türkün et al., 1997; Zehnder et al., 2003; Slutzky-Goldberg et al., 2013), e de hidrólise do LPS (lipopolissacarídeos) bacteriano *in vitro* e *in vivo* (Safavi e Nichols, 1994; Barthel et al., 1997; Nelson-Filho et al., 2002; Silva et al., 2002; Tanomaru et al., 2003; Oliveira et al., 2005; Adl et al., 2015; Marinho et al., 2018), tornando-o a medicação intracanal de escolha durante o tratamento endodôntico (Holland et al., 2017). Para que o hidróxido de cálcio exerça essas funções em todo o sistema de canais radiculares este deverá permanecer, no interior dos canais radiculares, por no mínimo 14 dias, o que exigirá, portanto, a realização de duas sessões de tratamento (Leonardo et al., 2006). Também, estudos clínicos comprovando que o curativo intracanal com pasta à base de hidróxido de cálcio é necessário em casos de dentes com lesão periapical, previamente à obturação final dos canais radiculares (De Castro Rizzi-Maia et al., 2016; Silva et al., 2017).

Entretanto, na literatura específica há uma divergência em relação à necessidade de múltiplas sessões durante o tratamento endodôntico, uma vez que estudos clínicos e radiográficos não relatam diferenças significativas entre os tratamentos realizados em sessão única ou em múltiplas sessões (Bharuka e Mandroli, 2016; Chhabra et al., 2017) embora os estudos microscópicos, em modelos animais, demonstraram uma significativa diferença entre as técnicas com índices de sucesso muito superiores quando da utilização da medicação entre sessões (Plotino et al., 2016).

Atualmente, há a busca por técnicas complementares ao tratamento endodôntico, almejando alcançar uma taxa de sucesso comparável ou superior ao uso de medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio, entre as sessões. Assim, diferentes materiais e técnicas vêm sendo sugeridos na literatura específica como as pastas antibióticas (Adl et al., 2012, 2014; Pai et al., 2014, Lakhani et al., 2017; Arruda et al., 2018; de-Jesus-Soares et al., 2020), a associação do hidróxido de cálcio com agentes antimicrobianos como a clorexidina (De Rossi et al., 2005; Silva et al., 2008; Ito et al., 2011; Donyavi et al., 2016; Silva et al., 2017; Arruda et al., 2018, Barbosa et al., 2020; Siddharth et al., 2020), medicações baseadas em agentes naturais como a epigallocatequina-3-galato derivada do chá verde, (Lee et al., 2009; Ferreira 2013; Hong et al., 2015; Ramezanali et al., 2016, Agarwal et al., 2020).

Adicionalmente, para a etapa do preparo biomecânico, diferentes soluções irrigadoras são indicadas na literatura para o tratamento de canal radicular. Dentre elas, o hipoclorito de sódio é a solução frequentemente recomendada, mais estudada e comumente utilizada devido a sua ação antibacteriana e capacidade de dissolução de restos necróticos (Estrela et al., 2002; Teixeira et al., 2005; Miranda et al., 2013; Dioguardi et al., 2018; de-Jesus-Soares, 2020; Agarwal et al., 2020). Todavia, essa solução possui o inconveniente de ser tóxica quando em elevadas concentrações em tecidos vitais e de possuir um potencial causador de complicações quando não utilizado com aspiração concomitante e quando não respeitado o limite de instrumentação, sendo agressivo para os tecidos moles, capaz de corroer metais e causar lesões significativas em olhos, pele ou mucosa bucal (Lee et al., 2011; Al-Sebaei et al., 2015; Botton et al., 2016; Shetty et al., 2020). Um caso clínico publicado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou a ocorrência de enfisema aéreo relacionado ao extravasamento inadvertido da solução de hipoclorito de sódio durante tratamento endodôntico (Sermeño et al., 2009). Outro caso descrito por Tenore et al. (2018), descreveu a mesma ocorrência de enfisema subcutâneo após a irrigação de hipoclorito de sódio, demonstrando a agressividade do produto. Em 2019, Yamamoto-Silva e colaboradores descreveram um caso de extravasamento de hipoclorito de sódio em uma paciente que havia sido submetida a um tratamento endodôntico, resultando em uma ulcera química induzida pela solução.

Paralelamente, estudos demonstraram a utilização da clorexidina a 2% como solução irrigadora de canais radiculares, baseando-se na sua ação antibacteriana e antifúngica (Gomes et al., 2013; Donyavi et al., 2016; Tong et al., 2020). Entretanto, a clorexidina não apresenta capacidade de atuar em biofilmes, não inativa as endotoxinas (Gomes et al., 2013; Park et al., 2020), além de não possuir eficácia contra resíduos inorgânicos e orgânicos (Dioguardi et al., 2018).

Com o propósito de auxiliar a atividade irrigante em atingir o terço apical e estruturas anatômicas mais complexas, diferentes técnicas foram idealizadas utilizando sistemas sônicos e ultrasônicos, pressão negativa (Endovac) e variados tipos de laser, juntamente com soluções irrigadoras que produzem um movimento na área de irrigação, resultando em uma melhor limpeza comparado a técnica convencional (Dioguardini et al., 2018; Kumar et al., 2018; Hartmann et al., 2018; Liu T et al., 2018; Rodig et al., 2018; Susila e Minu, 2019; Jasrotia et al., 2019; Uzunoglu-Özyyürek et al., 2020).

Entretanto, até o momento ainda há uma busca crescente por substâncias que possibilitem ação antimicrobiana no canal radicular, reduzindo a probabilidade de ocasionar injúrias aos tecidos moles e ao paciente (Divia et al., 2018; Kermeoglu et al., 2018).

Nesse sentido, o uso terapêutico de probióticos cresceu notavelmente nos últimos anos, tanto na área médica como na odontológica (Keller et al., 2012; Mahasneh et al., 2017; McCabe e Parameswaran, 2018; Morales et al., 2020; Pudgar et al., 2020). Conceituado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), probióticos são "micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidade adequadas, conferem um benefício a saúde do hospedeiro" sendo reconhecido que estes fazem parte do sistema de defesa imunológica (Bohora e Kokate, 2017; Mahasneh et al., 2017). Consumido há mais de 1000 anos pela humanidade, estão presentes em produtos fermentados, como queijos, pães, iogurtes, e não fermentados, como carnes e frutas.

As bactérias benéficas a saúde estão relacionadas a prevenção e tratamento de alterações em diversos tecidos do organismo, atuando principalmente no trato gastrointestinal, como também em pele, sistema respiratório e na saúde mental (Nole et al, 2014; Meurman e Stamatova, 2017, Hajela et al., 2020; Li et al., 2020). Além disso, possuem um papel fundamental no equilíbrio do organismo e na manutenção da saúde bucal, interagindo com o microbioma oral e fornecendo o equilíbrio microbiano saudável (Mahasneh et al., 2017; Meurman e Stamatova, 2018; Zaura e Twetman, 2019; Stanisic et al., 2020).

Os principais mecanismos de ação são a adesão as superfícies, modificando a adesão de bactérias patógenas, co-agregação com microrganismos patogênicos, secreção de moléculas ativas e alteração da resposta imunoinflamatória (Walker, 2008; Travers et al., 2011; Mahasneh e Mahasneh, 2017; Tahuer et al., 2017; Martens et al., 2018).

Evidências científicas demonstram efeitos benéficos no uso de probióticos em diferentes processos na cavidade bucal, variando o tipo de cepa probiótica e conseqüentemente o efeito nos diversos estudos, como no tratamento da periodontite (Ricoldi et al., 2017; Morales et al., 2018; Schmitter et al., 2018; Stanisic et al., 2020), prevenção e tratamento de mucosites e peri-implantite (Galofré et al., 2018; Silva et al., 2020), efeito na reabsorção óssea durante o

movimento ortodôntico, prevenção de manchas brancas em pacientes ortodônticos (Pazzini et al., 2017; Khoroushi e Kachui, 2017; Alp e Baka, 2018), efeito profilático contra carcinoma de células escamosas (Aghazadeh et al., 2017; La Rosa et al., 2020), além da atuação na prevenção de lesões de cárie (Allaker e Stephen, 2017; Kumar et al., 2018; Lin et al., 2018; Villavicencio et al., 2018; Angarita-Díaz et al., 2020; Bustamante et al., 2020). Revisões sistemáticas da literatura destacam claras evidências dos benefícios obtidos após a utilização de probióticos como adjuvantes no tratamento periodontal (Gruner et al., 2016; Martin-Cabezas et al., 2016; Matsubara et al., 2016; Ikram et al., 2018; Vives-Soler et al., 2020).

Na Endodontia, apenas dois estudos avaliaram o efeito de probióticos no desenvolvimento de lesões periapicais induzidas em ratos. Em 2019, Cosme-Silva et al. descreveram que a suplementação sistêmica com *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus acidophilus* promoveu efeito significativo na severidade das lesões periapicais, demonstrando o efeito anti-inflamatório de probióticos no desenvolvimento de lesões periapicais. Posteriormente em 2020, Cosme-Silva et al. demonstraram que essa suplementação apresentou efeito positivo na redução do processo inflamatório e na reabsorção óssea presentes no desenvolvimento das lesões periapicais. Adicionalmente, Bohora e colaboradores, em 2019, demonstraram, o efeito inibitório de probiótico do grupo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* contra *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* em ambos os estágios planctônico e biofilme.

Em meio ao cenário atual, é importante destacar pesquisas a respeito do papel dos probióticos na Covid-19. Como já é um fato, os *Lactobacillus* desempenham um papel vital em distúrbios gastrointestinais e são conhecidos por sua capacidade antibacteriana e antiviral (Di Cerbo et al., 2016; Sunmola et al., 2019). A inibição do H1N1, HIV, Corona Gástrico e Rotavirus são comprovados por estudos in vitro e in vivo, sendo os probióticos responsáveis pela redução da carga viral (Hasan et al., 2020). Um estudo recente mostrou que pacientes com Covid-19 apresentaram disbiose com diminuição na contagem de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Xu et al., 2020). Assim, estudos tem proposto o uso de probióticos como uma terapia adjuvante para regulação da microbiota intestinal e reduzir o risco de infecções secundárias nesses pacientes (Akour, 2020; Dhar e Mohanty, 2020; Morais et al., 2020).

Pelo exposto, tendo em vista que poucos estudos avaliaram o efeito de probióticos na microbiota bucal, especificamente aquela relacionada às infecções endodônticas (Bohora et al., 2017; Bohora et al., 2019; El-Sayed et al., 2019; Cosme-Silva et al., 2019; Cosme-Silva et al., 2020), além das evidências científicas afirmando a relação dos mesmos com saúde óssea e sistema imune, o estudo do efeito dos probióticos utilizados como solução irrigadora é relevante a fim de que esses possam ser utilizados na prática clínica.

Proposição

2. PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana do probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (B. lacti) HN09, em relação a diferentes micro-organismos envolvidos na infecção do canal radicular, além da avaliação *in vivo* do efeito desse probiótico, utilizado como solução irrigadora em canais radiculares de dentes de ratos, na progressão da lesão periapical.

Objetivos Específicos

- Avaliação da atividade antimicrobiana do probiótico contra os micro-organismos *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*, por meio da técnica de poço.

- Análise em microscopia óptica para a descrição das características do conteúdo do canal radicular e das regiões apical e periapical, após a administração local de probiótico como solução irrigadora de canais radiculares de ratos.

- Mensuração da área microscópica correspondente às lesões periapicais, por microscopia de fluorescência, após a administração local de probiótico como solução irrigadora de canais radiculares de ratos.

- Marcação e contagem de osteoclastos, por meio da histoenzimologia para atividade da fosfatase ácida resistente ao tartarato, após a administração local de probiótico como solução irrigadora de canais radiculares de ratos.

Material e **M**étodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estudo *in vitro* para avaliação da atividade antimicrobiana de probiótico

Previamente ao início do estudo *in vivo*, foi realizada uma análise *in vitro* para avaliar a atividade antimicrobiana do probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 contra micro-organismos envolvidos em infecções endodônticas, utilizando a técnica do poço.

Foram selecionadas 10 cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC) por apresentarem estabilidade genética, além de serem padronizadas para o monitoramento de vários parâmetros principais no controle de qualidade (Tabela 1).

Tabela 1. Micro-organismos utilizados para a avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019.

Aeróbios	Microaerófilos	Anaeróbios
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 4083)	<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> (ATCC W83)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	<i>Streptococcus sobrinus</i> (ATCC 33478)	<i>Prevotella intermedia</i> (ATCC 25611)
<i>Candida albicans</i> (ATCC 1023)	<i>Lactobacillus casei</i> (ATCC 11578)	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (ATCC 49256)
		<i>Porphyromonas endodontalis</i> (ATCC 35406)

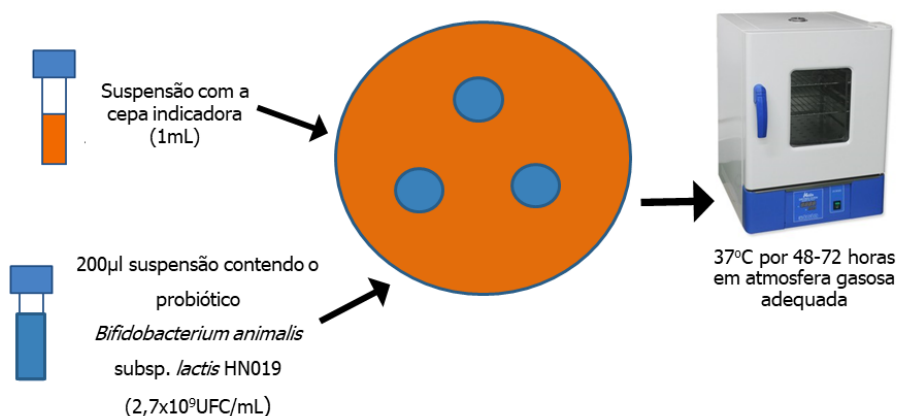
Foram utilizadas placas de Petri contendo meios de cultura específicos, de acordo com as exigências dos micro-organismos utilizados. Para os micro-organismos *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* foi utilizado o meio de cultura *Brain Heart Infusion* ágar (Difco). Para *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*, o meio de cultura utilizado foi o *Brain Heart Infusion* ágar (Difco) suplementado com hemina, menadiona e sangue desfibrinado de carneiro.

As cepas dos micro-organismos indicadores já desenvolvidas foram retiradas de seus respectivos meios de cultura, com auxílio de uma alça bacteriológica descartável. Em seguida, uma amostra de cada cepa foi individualmente dissolvida em um tubo de ensaio contendo caldo *Brain Heart Infusion* (Difco) ou caldo *Brain Heart Infusion* (Difco) suplementado com hemina e menadiona, de acordo com os diferentes tipos de micro-organismos, até atingirem densidade óptica (DO) correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. De cada solução padronizada, com auxílio de uma pipeta, 1,0mL foi retirado e dispensado de forma uniforme sobre a superfície

do ágar da placa de Petri, sendo mantidas em repouso em temperatura ambiente por 30 minutos. Com um tubo esterilizado de 15mm, foram efetuados três furos equidistantes na placa, e com uma pinça, retirou-se o ágar recortado. Dispensou-se, em cada poço, 50µL de ágar dissolvido para selamento. Após secagem, utilizando-se uma pipeta automática, 200µL da suspensão de probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 (HOWARU® Bifido Probiotics, DuPont™ Nutrition & Biosciences, EUA) foram adicionados em cada poço, na concentração da ordem de $2,7 \times 10^9$ UFC/mL. Em seguida, as placas foram recobertas por um papel de filtro, um pouco maior que o diâmetro da tampa, a fim reter a água de condensação, já que foram colocadas sem inverter e incubadas a 37°C em atmosfera gasosa adequada para cada micro-organismo. Para os aeróbios foi utilizada a estufa à 37°C; para os microaerófilos foi empregada jarra com chama de vela em estufa a 37°C; e para os anaeróbios, foi empregada jarra contendo gerador de anaerobiose GasPak EZ (GASPAK EZ Anaerobe Container System with indicator, Sparks, MD, EUA), em estufa a 37°C (Figura 1).

Após 48 a 72 horas de incubação, as placas foram examinadas para verificar se o crescimento obtido estava uniforme, se existia presença de contaminantes e se o diâmetro do halo de inibição estava bem definido. Após esta inspeção visual, a leitura foi realizada com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo®) utilizando fonte de luz refletida para iluminar a placa invertida sobre um fundo preto e opaco após a remoção da tampa, desconsiderando os 15mm do diâmetro do poço. Desse modo, foram obtidos 3 valores para cada inóculo bacteriano que foram somados e divididos por três para se obter a média aritmética dos valores.

Figura 1. Ilustração da técnica do poço, utilizada para avaliar a atividade microbiana do probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 sobre diferentes micro-organismos indicadores.



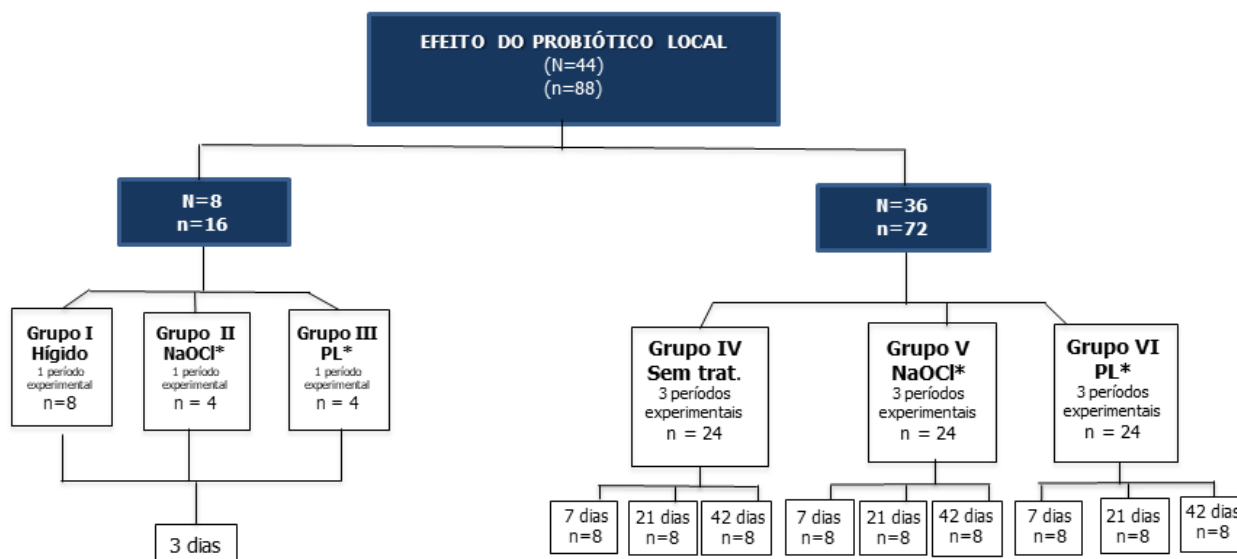
3.2 Estudo *in vivo* da administração local do probiótico como solução irrigadora

Inicialmente, o projeto foi submetido à apreciação pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) (Protocolo nº 2018.1.782.58.0), tendo sido aprovado (Anexo A).

Todos os procedimentos realizados nos animais foram conduzidos de acordo com as diretrizes éticas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto, e baseados no guia ARRIVE para estudos em animais (Kilkenny et al., 2010; Percie du Sert et al., 2020).

Para esse estudo, foram utilizados 44 ratos machos Wistar adultos (*Rattus norvegicus, albinus*), pesando 170-250g, adultos jovens, com 3 meses de idade, adquiridos do Biotério Central da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (4 animais por gaiola), com temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$) constantes, em ciclo de claro escuro de 12:12 horas, no Biotério I da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, com livre acesso à ração e água (Ricoldi et al., 2017). Os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais, conforme a Figura 2.

Figura 2. Distribuição dos grupos avaliados.



Legenda:

N=número de animais

n=número de amostras (dentes)

***NaOCl**= hipoclorito de sódio

***PL**= probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019

A distribuição dos grupos foi feita da seguinte forma: Grupo I (4 animais/ 8 dentes) dentes hígidos; Grupo II (4 animais/ 4 dentes): Hipoclorito de sódio à 2,5% como solução irrigadora (3 dias); Grupo III (4 animais/4 dentes): Probiótico como solução irrigadora (3 dias); Grupo IV (12 animais/ 24 dentes): Lesão periapical sem nenhum tratamento (7, 21 e 42 dias); Grupo V (12 animais/24 dentes): Hipoclorito de sódio à 2,5% como solução irrigadora (7, 21, 42 dias); Grupo VI (12 animais/24 dentes): Probiótico como solução irrigadora (7, 21, 42 dias).

3.2.1 Preparo da Solução Irrigadora com Probiótico

O probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 foi cultivado em meio MRS Agar (Man, Rogosa and Sharpe - D™ Lactobacilli MRS Broth, Sparks, MD, EUA) por 48 horas a 37°C sob condições de anaerobiose (GASPAK™ EZ Anaerobe Container System with indicator, Sparks, MD, EUA). A seguir, com auxílio de alça esterilizada, o inóculo bacteriano foi transferido para tubos de centrifugação tipo Falcon contendo pérolas de vidro e água destilada esterilizada. Após homogeneização em agitador de tubos (Phoenix AP 65, Araraquara, SP, Brasil), foi realizada a determinação da DO no comprimento de onda de 625nm em espectrofotômetro (Micronal - AJX -1000, São Paulo, SP, Brasil) e, então, a suspensão foi submetida à diluição decimal seriada até 10^{-9} , em solução salina tamponada fosfatada (PBS), com pH 7,0 (Chitprasert et al., 2012; Oliveira et al., 2017). Alíquotas diluídas de 50µL foram depositadas em placas de Petri contendo MRS Agar e semeadas com auxílio de bastão de vidro angulado esterilizado. Após a semeadura, as placas foram incubadas em anaerobiose, durante 48 horas, a 37°C. Após o período de incubação, foi realizada a contagem, em duplicata, do número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Desta forma, foi obtida a D.O. de 2,007 correspondente ao inóculo padronizado com $2,7 \times 10^9$ UFC/mL (Bauroei et al., 2012, Oliveira et al., 2017).

Assim, a solução irrigadora foi constituída por 100µL da suspensão contendo $2,7 \times 10^9$ UFC/mL de *B. animalis* subsp. *lactis* HN019, acrescida de 2,0% de carboximetilcelulose (Chitprasert et al., 2012), a que foi aplicado topicamente nos canais radiculares dos primeiros molares inferiores dos animais no dia 0 e nos dias 3, 7, 14, 21, 28 e 35 após a indução da lesão periapical (Oliveira et al., 2017).

3.2.2 Indução das Lesões Periapicais

A indução de lesão periapical foi realizada por meio de um modelo clássico já empregado em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (Kawashima et al., 1999; Sasaki et al., 2004; De Rossi et al., 2005; Silva et al., 2012; Bezerra da Silva et al., 2014; Oliveira et al., 2015; Oliveira et al., 2017) e adaptado para as especificidades do presente estudo.

Inicialmente, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de xilazina (Rompum, Bayer Animal Health, São Paulo, SP, Brasil; 10 mg/kg de peso corporal) e cetamina (Dopalen, Agribands Purina do Brasil Ltda., Paulínia, SP, Brasil; 80 mg/kg peso corporal). Em seguida, os animais foram imobilizados e montados numa mesa de retração da mandíbula, de forma que permaneceram com a boca aberta para adequada visualização dos molares inferiores (esquerdo e direito) (Figura 3). A abertura coronária foi realizada com o auxílio de broca esférica (nº 1/2 - KG Sorensen) montada em motor de baixa rotação e contra ângulo (Dabi Atlante Equipamentos Odontológicos), até que a entrada de acesso aos canais radiculares fosse visualizada e verificada com uma lima endodôntica tipo K número 10 (Maillefer S/A, Suíça), em direção a raiz distal, com exceção dos grupos II e III, em que a câmara pulpar era aberta sem inserção da lima no canal radicular, com irrigação das substâncias (hipoclorito e probiótico) para avaliar o efeito preventivo do uso do probiótico. A câmara pulpar é inicialmente exposta ao meio bucal para contaminação dos canais radiculares.

Figura 3. Mesa cirúrgica confeccionada especificamente para a realização de procedimentos odontológicos em dentes de ratos, a qual permite adequada visualização dos molares inferiores.



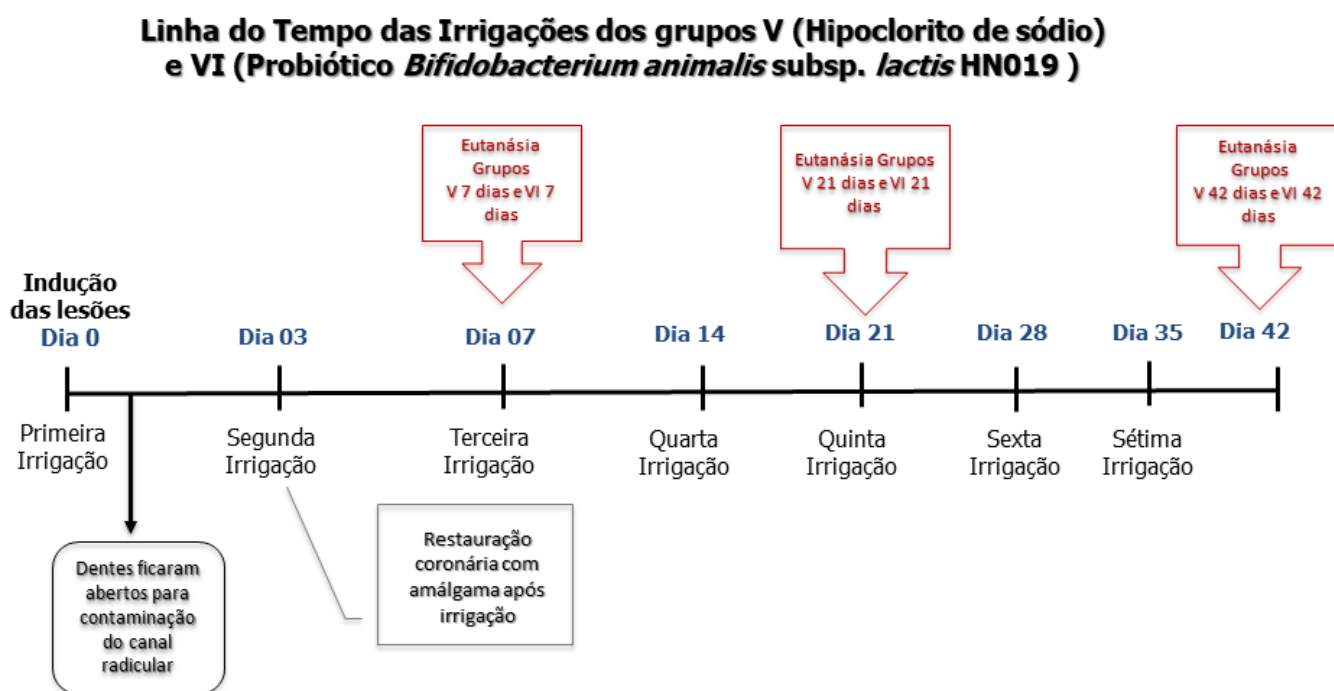
Em 3 dias, os grupos I, II e III foram eutanasiados. No grupo IV, após exposição da câmara pulpar, foi inserida uma lima para verificação dos canais que foram mantidos aberto em 7, 21 e 42 dias, para verificar a progressão da lesão sem nenhum tratamento (controle negativo).

Com exceção dos grupos que foram eutanasiados aos 3 dias e do grupo IV, após a irrigação no período 3 dias, o dente foi selado com amálgama de prata (Vallory SSWHITE) para evitar a extrusão do material irrigador. Para cada tempo de irrigação, os animais eram

novamente anestesiados e realizado o isolamento relativo dos dentes com roletes de algodão, a fim de evitar a deglutição de solução irrigadora pelo animal, seguido de novo selamento da coroa com amálgama de prata. Nos grupos controle II e V, as irrigações foram realizadas com 100µL de hipoclorito de sódio a 2,5% (NaOCl), e com a mesma quantidade do probiótico nos grupos experimentais III e VI.

Nos grupos sem indução de lesão periapical, as amostras foram obtidas somente no período de 3 dias, sendo as amostras nos demais grupos obtidos após períodos de 7, 21 e 42 dias (Figura 4).

Figura 4. Representação dos períodos experimentais para os diferentes grupos avaliados.



Após os períodos experimentais, os animais foram anestesiados e eutanasiados com uma dose letal de Isoflurano (Isoforine, Cristalia Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, SP, Brasil), sendo as mandíbulas dissecadas para posterior processamento histotécnico e análise microscópica.

3.2.3 Processamento Histotécnico e Avaliação Microscópica

Após a eutanásia dos animais, as mandíbulas foram removidas com tesoura cirúrgica esterilizada, fixadas por imersão em formol tamponado a 10% por 24 horas à temperatura ambiente e, em seguida, lavadas por, aproximadamente, 4 horas em água corrente. Para a

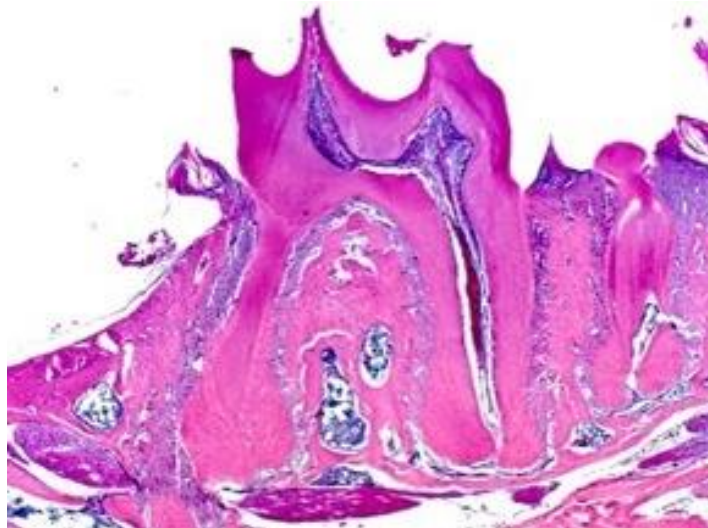
desmineralização das peças, foi utilizada solução à base de EDTA a 4,13% (pH 7-7,4). As peças foram mantidas nesta solução, à temperatura ambiente, trocada semanalmente, até sua completa desmineralização.

Após a desmineralização, as peças foram submetidas ao processamento histotécnico de rotina, sendo lavadas em água corrente por 2 horas, desidratadas em álcool de concentrações crescentes (70% e 95% por 30 minutos cada; 2 trocas de 100% por 20 minutos cada; e 2 trocas de álcool 100% por 40 minutos cada), diafanizadas em xilol (2 banhos de 20 minutos e 1 de 40 minutos) e incluídas em parafina. Os blocos contendo os dentes foram cortados longitudinalmente em micrótomo (Leica RM2145; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) no sentido méseo-distal. Cortes semi-seriados de 5µm, com intervalos de 15µm, foram obtidos em toda a extensão da lesão periapical, exceto na região do forame apical, onde todos os cortes foram coletados sem intervalos. Por amostra, foram obtidas de 15 a 25 lâminas, com 3 cortes em cada lâmina.

Inicialmente, os cortes de cada grupo experimental foram corados com hematoxilina e eosina (HE), como ilustrado na Figura 5, e submetidos à análise em microscopia óptica convencional, para descrição do conteúdo do canal radicular e das regiões apical e periapical.

Todas as análises foram realizadas no microscópio Axio Imager.M1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha), com câmera AxioCam MRc5 acoplada (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha). As análises foram realizadas apenas nas raízes distais dos primeiros molares inferiores, em cortes mostrando simultaneamente os terços coronário, médio e apical do canal radicular, o forame apical e o osso alveolar. Todas as análises foram realizadas por um único avaliador experiente, sem conhecimento prévio do grupo a ser analisado.

Figura 5. Fotomicrografia representativa de um 1º molar inferior hígido, onde se observa a polpa e o canal radicular distal amplo, reto e com paredes de espessura uniforme, até a região apical.



3.2.4 Análise Microscópica Descritiva do Conteúdo do Canal Radicular e das Regiões Apical e Periapical

No canal radicular foi analisado a presença de necrose (total ou parcial), presença ou ausência de infiltrado inflamatório e o conteúdo dos canais radiculares (presença ou ausência de tecido pulpar e restos necróticos). No cimento apical foram observadas as características das lacunas e o seu conteúdo (vazias ou contendo restos necróticos) e da superfície (regular ou irregular). Já no ligamento periodontal apical foi analisada a espessura (normal ou aumentada), e também as características do infiltrado celular inflamatório, presença de edema e de fibras colágenas. No osso alveolar foi analisada a ausência ou presença de reabsorção. Para esta avaliação foram utilizados os seguintes escores:

- Tecido pulpar = Escore 0: Tecido com aspecto de normalidade; Escore 1: Alteração suave no tecido; Escore 2: Alteração moderada no tecido e Escore 3: Alteração severa (necrose total da polpa).

- Infiltrado inflamatório = Escore 0: Ausência de infiltrado inflamatório; Escore 1: Presença de infiltrado suave; Escore 2: Presença de infiltrado moderado e Escore 3: Presença de infiltrado severo.

- Ligamento periodontal apical = Escore 0: Ligamento com aspecto de normalidade; Escore 1: Presença de aumento suave no ligamento; Escore 2: Presença de alteração moderada no ligamento e Escore 3: Presença de aumento severa do ligamento periodontal.

- Osso alveolar = Escore 0: Ausência de reabsorção; Escore 1: Presença de reabsorção.

- Cimento apical = Escore 0: Ausência de reabsorção; Escore 1: Presença de reabsorção.

3.2.5 Morfometria em Microscopia de Fluorescência

Conforme descrito por De Rossi et al. (2005), a avaliação morfométrica das lesões periapicais foi realizada nos espécimes corados com HE utilizando-se o microscópio Axio Imager.M1, em aumento de 5x, operando no modo fluorescente – filtro Alexa Fluor 488 (AF488, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha) – com as seguintes características: excitação de G365, refletores FT395 e emissão LP420. As áreas das lesões periapicais foram delineadas e medidas em mm^2 em software específico para uso com o microscópio AxioVision Rel, versão 4.8, Zeiss. Foram avaliados de 3 cortes centrais de cada espécime, obtendo-se a média para cada dente. A delimitação da lesão excluiu as estruturas intactas (ligamento periodontal, cimento e osso alveolar), facilmente identificadas pela forte fluorescência verde, e incluiu áreas de reabsorção, dissociação fibrilar e infiltrado inflamatório, identificadas pela ausência de fluorescência e aparência escurecida.

3.2.6 Histoenzimologia para Atividade da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP)

A atividade da TRAP foi utilizada para a marcação de células gigantes multinucleadas (Silva et al., 2012). Os cortes foram desparafinados (2 banhos de xilol de 5 minutos cada) e hidratados (álcool 100% por duas vezes de cinco minutos cada; alcoóis 95%, 70% e 50% por dois minutos cada e água destilada pelo mesmo período). A seguir, as lâminas foram colocadas em solução de álcool/acetona a 50% durante um minuto e os cortes foram secos à temperatura ambiente. Em seguida, a solução TRAP previamente preparada com uma solução de 10mL de tampão de ácido acético, contendo 1 ml de ácido acético, 6,8g de acetato de sódio trihidratado, 11,5g de tartarato de sódio e 1L de água deionizada (dd H₂O) associado a 0,1 mL de dimetilformamida, 5mg de Fast-red e 1mg de ácido fosfórico naftol AS-BI (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, EUA) foi pipetada sobre os cortes, que permaneceram protegidos da luz, em estufa a 37°C, pelo tempo suficiente para se observar a marcação (aproximadamente 1 minuto). Após a incubação, foi realizada a contra coloração com hematoxilina por 1 minuto. A seguir, as lâminas foram montadas e avaliadas em microscópio Axio Imager. M1 sob luz convencional para contagem do número de células TRAP-positivas presentes em lacunas de reabsorção em contato direto com o osso alveolar ao redor da lesão periapical, sendo expressas em número absoluto de células, padronizando área de limitação para contagem em todos os cortes, traçando uma linha paralela no ápice do dente, iniciando do lado esquerdo ao direito.

3.3 Análise Estatística

Para os valores em escore (análise em HE), as variáveis categóricas foram expressas como frequências e porcentagens, sendo a comparação entre os grupos submetida à análise de variância (one way ANOVA), utilizando o teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

Para os valores inteiros (análise TRAP e mensuração das lesões) foi realizada a análise de variância (one way ANOVA) utilizando o teste de Tukey. Para a análise dos dados de halo de inibição foi realizada o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn.

Os dados foram analisados usando-se o programa estatístico Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software Inc, San Diego, CA, EUA), com nível de significância de 5%.

Resultados

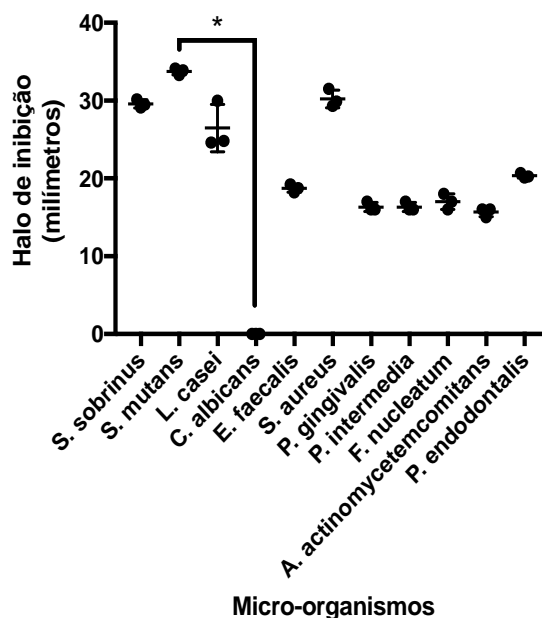
4. RESULTADOS

4.1 Estudo *in vitro* da Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Conforme ilustrado na Figura 6, os valores médios do halo de inibição em milímetros para cada micro-organismo foram de: *S. sobrinus*: 29,58; *S. mutans*: 33,75; *L. casei*: 24,47; *C. albicans*: 0; *E. faecalis*: 18,72; *S. aureus*: 30,23; *P. gingivalis*: 19,09; *P. intermedia*: 17,34; *F. nucleatum*: 15,67; *A. actinomycetemcomitans* (*A.a*): 15,67 e *P. endodontalis*: 20,31. A análise estatística dos dados evidenciou diferença estatística somente entre os valores dos halos de inibição do *S. mutans* e *C. albicans* ($p < 0,05$).

De forma geral, o probiótico *B. animalis* subsp. *lactis* HN019 promoveu a inibição de todas as cepas dos patógenos orais, com exceção do *Candida albicans*, demonstrando que o probiótico apresentou atividade antimicrobiana sobre esses micro-organismos.

Figura 6. Representação gráfica da análise estatística dos dados dos halos de inibição (atividade antimicrobiana) em milímetros, do probiótico *B. animalis* subsp. *lactis* HN019, pelo método de difusão em ágar. * representa diferença estatística.



4.2 Estudo *in vivo* da administração local do probiótico como solução irrigadora

Análise microscópica descritiva do conteúdo do canal radicular e das regiões apical e periapical

No grupo de dentes hígidos (Grupo I), após 3 dias sem irrigação do canal e sem abertura coronária, foi possível observar tecido pulpar normal, com camada odontoblástica íntegra e tecido conjuntivo normal, com ausência de infiltrado inflamatório e ligamento periodontal normal. O osso alveolar estava regular e com ausência de reabsorção. No grupo II, após 3 dias com abertura coronária recém realizada e com irrigação com hipoclorito de sódio, foi possível observar o tecido pulpar alterado moderadamente (100%) no terço cervical e médio, e infiltrado inflamatório moderado (100%) misto e focal, apenas na polpa. O ligamento periodontal estava normal (100%), e o osso alveolar e a superfície cementária eram regulares e com ausência de reabsorção (100%).

No grupo III, após 3 dias com abertura coronária recém realizada e irrigação com probiótico, foi possível observar um tecido pulpar normal (100%), com a integridade da camada odontoblástica e um infiltrado inflamatório ausente (100%). O ligamento periodontal estava normal (100%) e o osso alveolar era regular e sem reabsorção, da mesma forma que a superfície cementária (100%), demonstrando similaridade com o grupo I (Figura 7).

No grupo IV, após 7 dias com abertura coronária e sem nenhuma irrigação, foi possível observar tecido pulpar alterado, sendo que a alteração variou de moderada (87,5%) a severa (12,5%), principalmente nas regiões cervical e média, com infiltrado inflamatório moderado misto e difuso, com células inflamatórias localizadas principalmente no ápice dental, e ligamento periodontal levemente alterado em sua maioria. O osso alveolar e superfície cementária estavam regulares e sem reabsorção. Aos 21 dias, o tecido pulpar já estava necrosado, com infiltrado inflamatório misto e difuso, variando de severo (85,8%) a moderado (14,2%), e ligamento periodontal moderadamente alterado, com presença de lesão periapical. O osso alveolar estava irregular e com reabsorção e a superfície cementária estava regular e sem reabsorção, com presença de lesão periapical. Já aos 42 dias, o tecido pulpar estava totalmente necrosado, com infiltrado inflamatório misto severo (100%) presença de células mononucleadas e polimorfo nucleadas, e ligamento periodontal severamente alterado. O osso alveolar e superfície cementária estavam irregulares e com grandes reabsorções, evidenciando extensa lesão periapical (Figuras 8).

No grupo V, após 7 dias com abertura coronária acompanhada de irrigação com hipoclorito de sódio, foi possível observar tecido pulpar alterado, variando de suave (85,72%) a moderado (14,28%), com um infiltrado inflamatório suave e ligamento periodontal normal. O osso alveolar e a superfície cementária estavam regulares e sem reabsorção. Aos 21 dias,

foi possível observar o tecido pulpar em necrose total (100%), com infiltrado inflamatório misto e mononuclear, variando entre moderado (62,5%) e severo (37,5%). O ligamento periodontal estava moderadamente alterado e o osso alveolar estava irregular e com presença de reabsorções, evidenciando lesão periapical. Já a superfície cementária encontrava-se irregular, mas com ausência de reabsorção na maioria das amostras (62,5%). Aos 42 dias, foi possível observar necrose total do tecido pulpar (100%), com infiltrado inflamatório em sua maioria severo (62,5%), e ligamento periodontal alterado severamente. O osso alveolar e a superfície cementária estavam irregulares e com presença de reabsorção e extensa lesão periapical (Figuras 9).

No grupo VI, após 7 dias com abertura coronária e inserção da lima acompanhada de irrigação com probiótico, foi possível observar o tecido pulpar alterado levemente (75%), com infiltrado inflamatório suave (62,5%). O ligamento periodontal estava suavemente alterado, o osso alveolar e a superfície cementária estavam regulares, com ausência de reabsorção. Aos 21 dias, foi possível observar alteração do tecido pulpar, variando de moderada (50%) a severa (50%), demonstrando presença de lesão periapical, porém o infiltrado inflamatório era severo somente na região cervical, sendo muito suave e localizado no terço médio e ausente na região periapical (75%). O ligamento periodontal estava suavemente alterado, com a presença de fibras apicais sem alteração, e o osso alveolar juntamente com a superfície cementária estavam regulares e sem reabsorção. Aos 42 dias, foi possível observar necrose total do tecido pulpar, com presença de lesão periapical, porém, embora o infiltrado inflamatório fosse moderado, esse era focal e pequeno, circundado por tecido normal (62,5%). O ligamento periodontal estava alterado moderadamente, contudo, com intensidade de alteração menor, e o osso alveolar juntamente com a superfície cementária estavam irregulares e com presença de reabsorção (Figuras 10 e 11).

Assim, de acordo com os parâmetros microscópicos avaliados, os resultados descritos observados evidencia que o probiótico como solução irrigadora interferiu na progressão da lesão periapical, reduzindo o infiltrado inflamatório e o processo de reabsorção dos tecidos mineralizados.

As Tabelas 2 e 3 apresentam os escores obtidos nos diferentes grupos, em cada espécime. Ressalta-se que houve perda de alguns espécimes durante o processamento histotécnico.

Tabela 2. Dados obtidos após a análise descritiva macroscópica semi-quantitativa em relação ao tecido pulpar, infiltrado inflamatório e ligamento periodontal. Escore 0: Ausência de alteração ou estado de normalidade, Escore 1: suave alteração, Escore 2: Alteração moderada e Escore 3: alteração severa, descritos em porcentagem.

TECIDO PULPAR				
GRUPOS	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 3
Grupo I (n=8)	8(100%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Grupo II (n=4)	0(0%)	0(0%)	4(100%)	0,00%
Grupo III (n=4)	4(100%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Grupo IV 7 dias (n=8)	0(0%)	0(0%)	7(87,70%)	1(12,50%)
Grupo IV 21 dias (n=7)	0(0%)	0(0%)	1(14,20%)	6(85,80%)
Grupo IV 42 dias (n=8)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	8(100%)
Grupo V 7 dias (n=7)	0(0%)	6(85,80%)	1(14,20%)	0(0%)
Grupo V 21 dias (n=8)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	8(100%)
Grupo V 42 dias (n=8)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	8(100%)
Grupo VI 7 dias (n=8)	0(0%)	6(75,00%)	2(25,00%)	0(0%)
Grupo VI 21 dias (n=8)	0(0%)	0(0%)	4(50,00%)	4(50,00%)
Grupo VI 42 dias (n=8)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	8(100%)

INFILTRADO INFLAMÁTORIO				
GRUPOS	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 3
Grupo I (n=8)	8(100%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Grupo II (n=4)	0(0%)	0(0%)	4(100%)	0(0%)
Grupo III (n=4)	4(100%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Grupo IV 7 dias (n=8)	0(0%)	4(50%)	4(50%)	0(0%)
Grupo IV 21 dias (n=7)	0(0%)	0(0%)	7(100%)	0(0%)
Grupo IV 42 dias (n=8)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	8(100%)
Grupo V 7 dias (n=7)	1(14,29%)	5(71,42%)	1(14,29%)	0(0%)
Grupo V 21 dias (n=8)	0(0%)	0(0%)	5(62,50%)	3(37,50%)
Grupo V 42 dias (n=8)	0(0%)	0(0%)	3(37,50%)	5(62,50%)
Grupo VI 7 dias (n=8)	0(0%)	5(62,50%)	3(37,50%)	0(0%)
Grupo VI 21 dias (n=8)	0(0%)	6(75,00%)	1(12,50%)	1(12,50%)
Grupo VI 42 dias (n=8)	0(0%)	3(37,50%)	5(62,50%)	0(0%)

LIGAMENTO PERIODONTAL				
GRUPOS	Escore 0	Escore 1	Escore 2	Escore 3
Grupo I (n=8)	8(100%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Grupo II (n=4)	4(100%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Grupo III (n=4)	4(100%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Grupo IV 7 dias (n=8)	4(50,00%)	3(37,50%)	1(12,50%)	0(0%)
Grupo IV 21 dias (n=7)	0(0%)	3(42,90%)	4(57,10%)	0(0%)
Grupo IV 42 dias (n=8)	0(0%)	0(0%)	2(25,00%)	6(75,00%)
Grupo V 7 dias (n=7)	4(57,14%)	3(42,86%)	0(0%)	0(0%)
Grupo V 21 dias (n=8)	0(0%)	0(0%)	6(75,00%)	2(25,00%)
Grupo V 42 dias (n=8)	0(0%)	0(0%)	3(37,50%)	5(62,50%)
Grupo VI 7 dias (n=8)	0(0%)	7(87,50%)	1(12,50%)	0(0%)
Grupo VI 21 dias (n=8)	0(0%)	4(50,00%)	3(37,50%)	1(12,50%)
Grupo VI 42 dias (n=8)	1(12,50%)	1(12,50%)	6(75,00%)	0(0%)

Tabela 3. Dados obtidos após a análise descritiva macroscópica semi-quantitativa dos grupos em relação a reabsorção óssea e cementária. Escore 0: Ausência de alteração ou estado de normalidade, Escore 1: suave alteração, Escore 2: Alteração moderada e Escore 3: alteração severa, descritos em porcentagem.

REABSORÇÃO ÓSSEA		
GRUPOS	Ausente	Presente
Grupo I (n=8)	8(100%)	0(0%)
Grupo II (n=4)	4(100%)	0(0%)
Grupo III (n=4)	8(100%)	0(0%)
Grupo IV 7 dias (n=8)	8(100%)	0(0%)
Grupo IV 21 dias (n=7)	4(57,10%)	3(42,90%)
Grupo IV 42 dias (n=8)	0(0%)	8(100%)
Grupo V 7 dias (n=7)	7(100%)	0(0%)
Grupo V 21 dias (n=8)	0(0%)	8(100%)
Grupo V 42 dias (n=8)	1(12,50%)	8(87,50%)
Grupo VI 7 dias (n=8)	7(87,50%)	1(12,50%)
Grupo VI 21 dias (n=8)	6(75,00%)	2(25,00%)
Grupo VI 42 dias (n=8)	2(25,00%)	6(75,00%)

REABSORÇÃO CEMENTÁRIA		
GRUPOS	Ausente	Presente
Grupo I (n=8)	8(100%)	0(0%)
Grupo II (n=4)	4(100%)	0(0%)
Grupo III (n=4)	8(100%)	0(0%)
Grupo IV 7 dias (n=8)	7(87,50%)	1(12,50%)
Grupo IV 21 dias (n=7)	4(57,10%)	3(42,90%)
Grupo IV 42 dias (n=8)	0(0%)	7(100%)
Grupo V 7 dias (n=7)	7(100%)	0(0%)
Grupo V 21 dias (n=8)	5(62,50%)	3(37,50%)
Grupo V 42 dias (n=8)	1(12,50%)	7(87,50%)
Grupo VI 7 dias (n=8)	7(87,50%)	1(12,50%)
Grupo VI 21 dias (n=8)	8(100%)	0(0%)
Grupo VI 42 dias (n=8)	2(25,00%)	6(75,00%)

Figura 7. Fotomicrografias representativas dos Grupos I (dente hígido), II (hipoclorito de sódio à 2,5% como solução irrigadora) e III (probiótico como solução irrigadora) evidenciando os eventos microscópicos observados na análise descritiva das regiões apical e periapical de lâminas coradas em H&E.

- (A)** Visão panorâmica da região apical e periapical de dente hígido (grupo I), evidenciando a normalidade do tecido conjuntivo da polpa, com presença de camada odontoblástica, ligamento periodontal e osso alveolar íntegros (HE, Zeiss, 10x).
- (B)** Detalhe da imagem A, na qual observa-se tecido com aspecto de normalidade (HE, Zeiss, 20x).
- (C)** Visão panorâmica do grupo II, evidenciando alteração pulpar e infiltrado inflamatório, principalmente no terço médio, com desorganização da camada odontoblástica (HE, Zeiss, 10x).
- (D)** Detalhe da imagem C, com presença de suave infiltrado inflamatório na região do periápice e suave espessamento no ligamento periodontal (HE, Zeiss, 20x).
- (E)** Visão panorâmica do grupo III, demonstrando a presença da camada de odontoblastos na região da polpa, e integridade do tecido pulpar e ligamento periodontal levemente aumentado (HE, Zeiss, 10x).
- (F)** Detalhe da imagem E, evidenciando suave aumento do ligamento periodontal (HE, Zeiss, 20x)

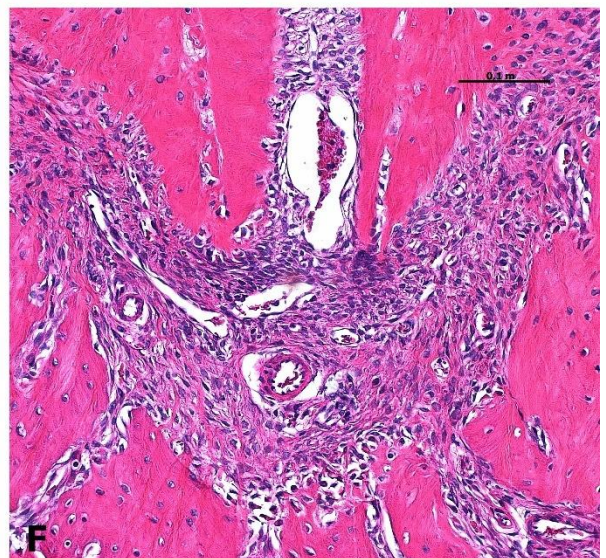
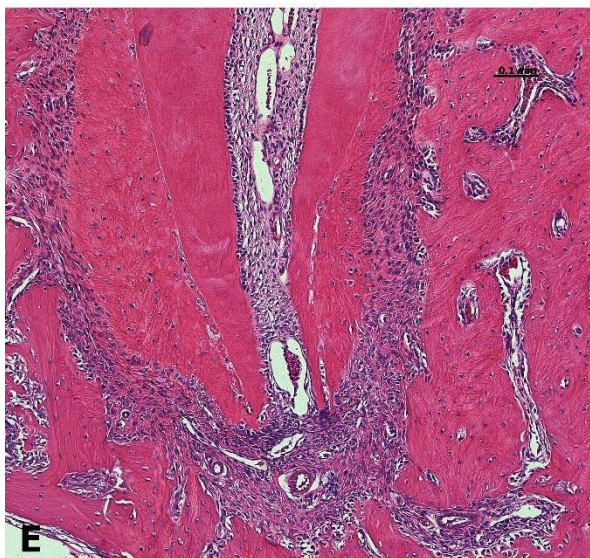
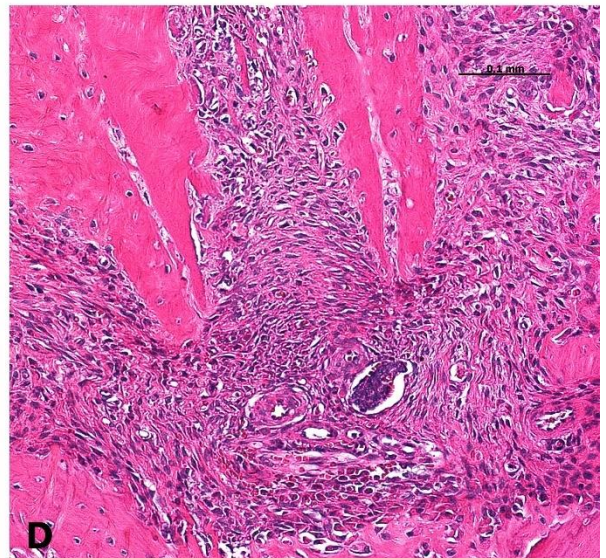
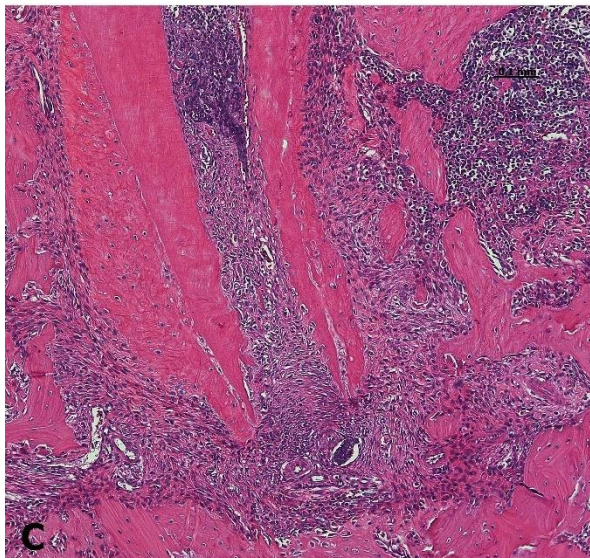
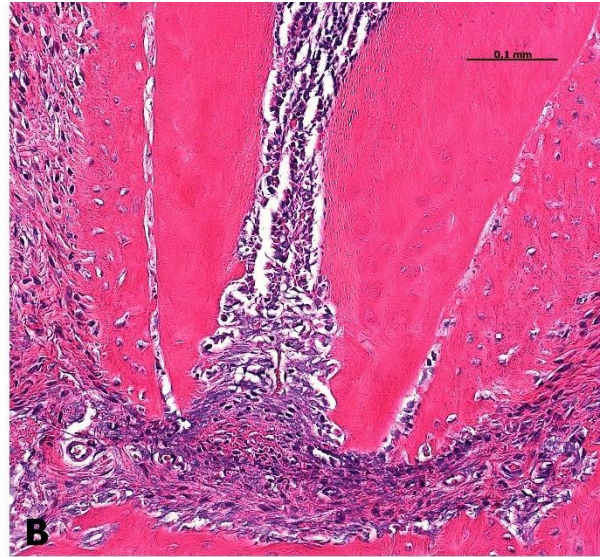
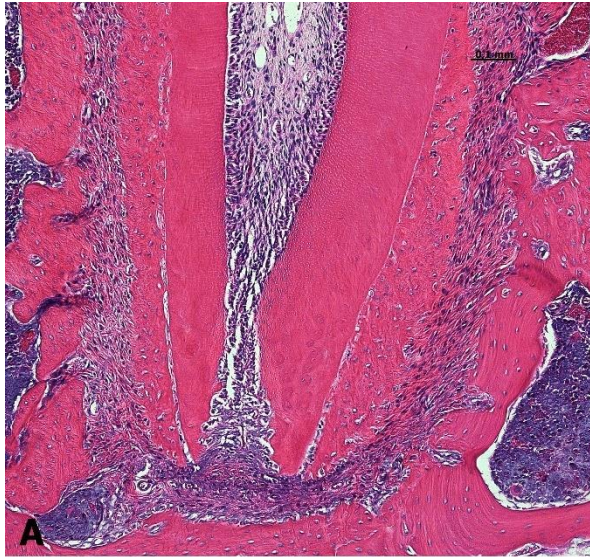


Figura 8. Fotomicrografias representativas do grupo IV (sem nenhum tratamento), mostrando os eventos microscópios na análise descritiva das lesões aos 7, 21 e 42 dias após indução da lesão periapical de lâminas coradas em H&E.

- (A)** Visão panorâmica do grupo IV aos 7 dias, evidenciando alteração pulpar com desestruturação da camada de odontoblastos e infiltrado inflamatório suave (HE, Zeiss, 10x).
- (B)** Detalhe da imagem A com presença suave de células inflamatórias e de osteoclastos (HE, Zeiss, 20x).
- (C)** Fotomicrografia do grupo IV aos 21 dias, demonstrando áreas de reabsorção óssea, infiltrado inflamatório moderado na região apical e ligamento periodontal severamente aumentado (HE, Zeiss, 10x)
- (D)** Detalhe da imagem C, evidenciando infiltrado inflamatório moderado na região apical e presença de osteoclastos na superfície óssea (HE, Zeiss, 20x).
- (E)** Fotomicrografia do grupo IV aos 42 dias, demonstrando áreas de reabsorção óssea e cementária, edema, infiltrado inflamatório e espessura do ligamento periodontal de graus severos (HE, Zeiss, 10x).
- (F)** Detalhe da imagem E, demonstrando infiltrado inflamatório severo, com células mononucleares e polimorfonucleares, dissociação fibrilar intensa e edema (HE, Zeiss, 40x).

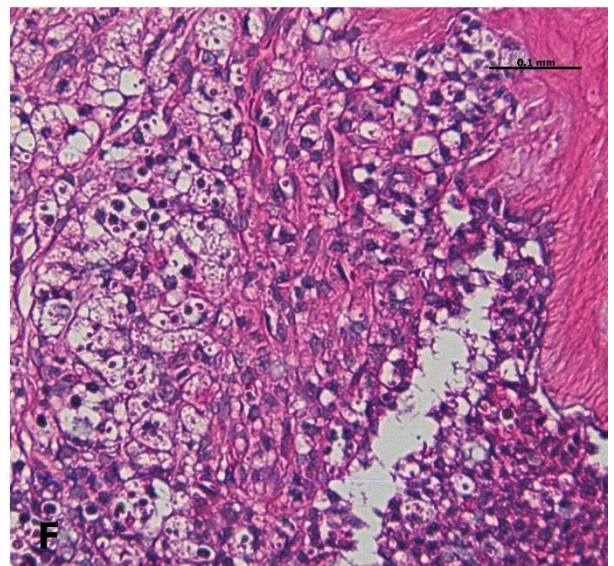
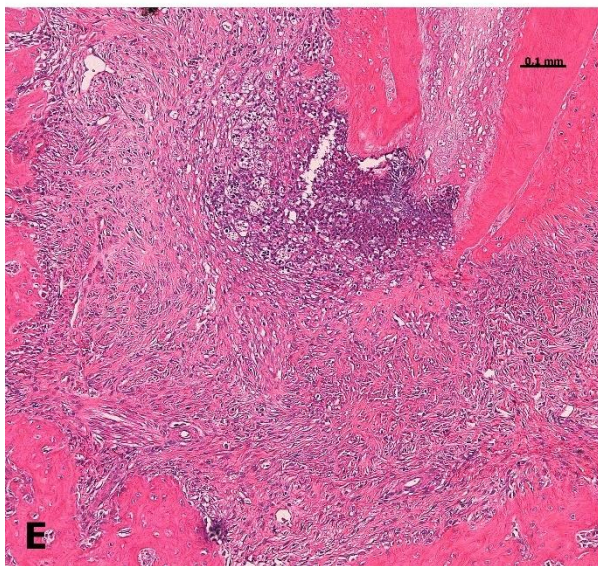
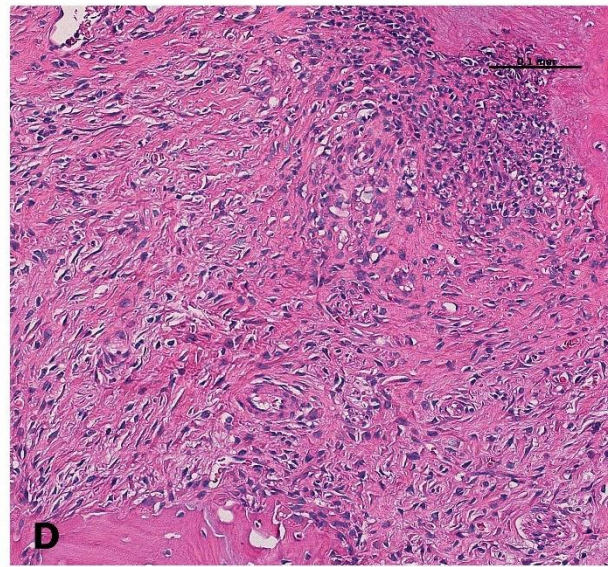
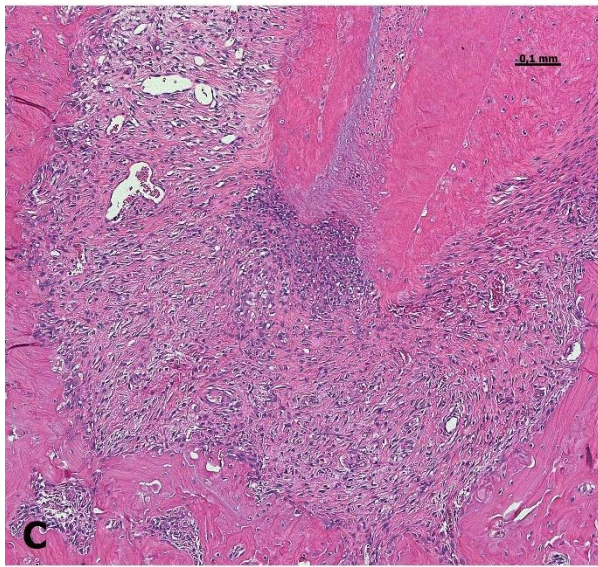
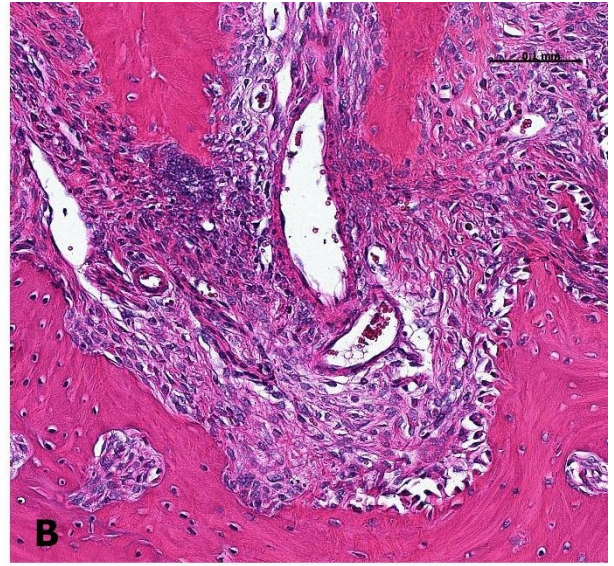
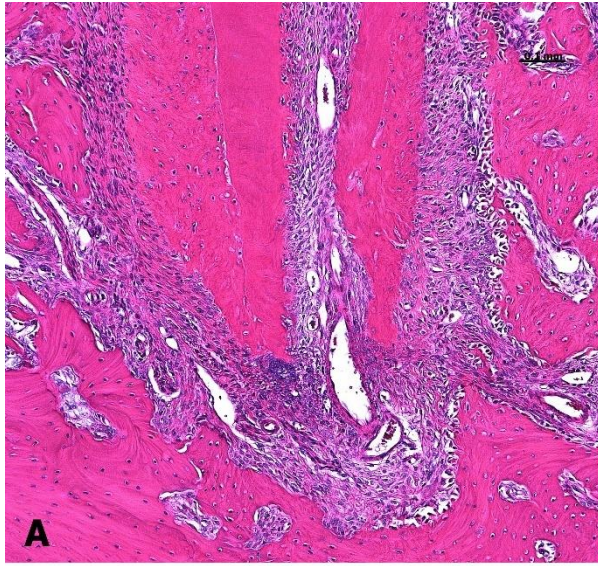


Figura 9. Fotomicrografias representativas do grupo V (irrigação com hipoclorito de sódio), evidenciando os eventos microscópicos aos 7, 21 e 42 dias após indução da lesão periapical de lâminas coradas em H&E.

- (A)** Visão panorâmica do grupo V aos 7 dias, evidenciando alteração na polpa com desestruturação da camada de odontoblastos, infiltrado inflamatório suave e aumento no ligamento periodontal (HE, Zeiss, 10x).
- (B)** Detalhe da imagem A com presença de células inflamatórias, restos epiteliais de malassez na região do ápice e suave presença de osteoclastos na superfície óssea (HE, Zeiss, 20x).
- (C)** Fotomicrografia do grupo V aos 21 dias, demonstrando áreas de reabsorção óssea e cementária, infiltrado inflamatório moderado na região apical e ligamento periodontal severamente aumentado (HE, Zeiss, 10x).
- (D)** Detalhe da imagem C, evidenciando o infiltrado inflamatório severo na região do ápice (HE, Zeiss, 20x).
- (E)** Fotomicrografia do grupo V em 42 dias, demonstrando áreas de intensa reabsorção óssea e cementária, ligamento periodontal severamente aumentado com desestruturação fibrilar, edema e infiltrado inflamatório severo (HE, Zeiss, 10x).
- (F)** Detalhe da imagem E, evidenciando o infiltrado inflamatório severo (HE, Zeiss, 40x).

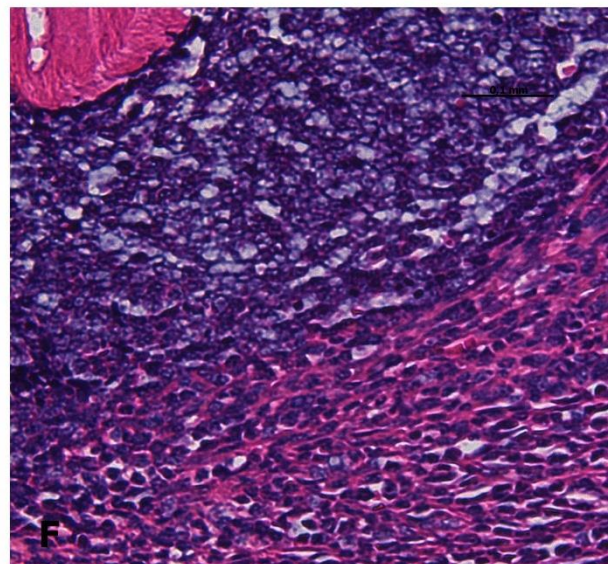
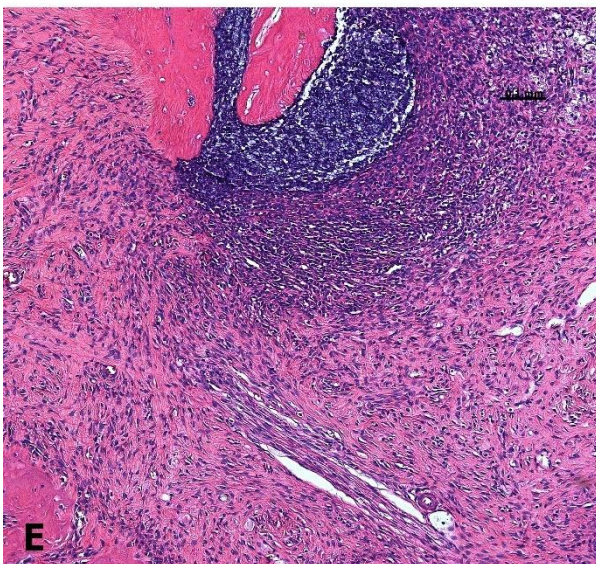
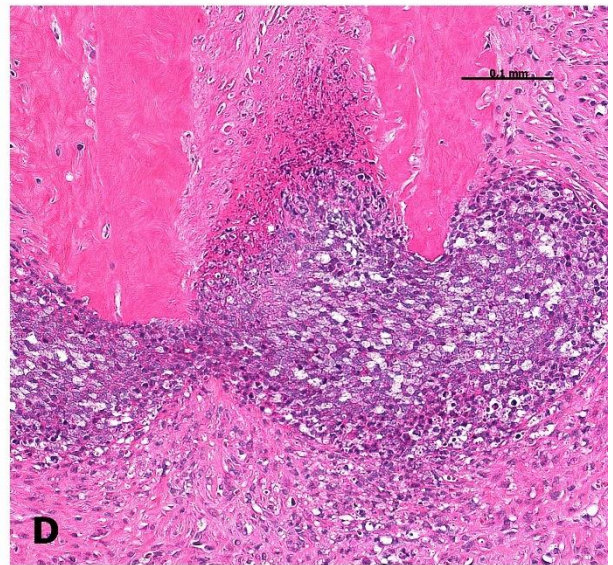
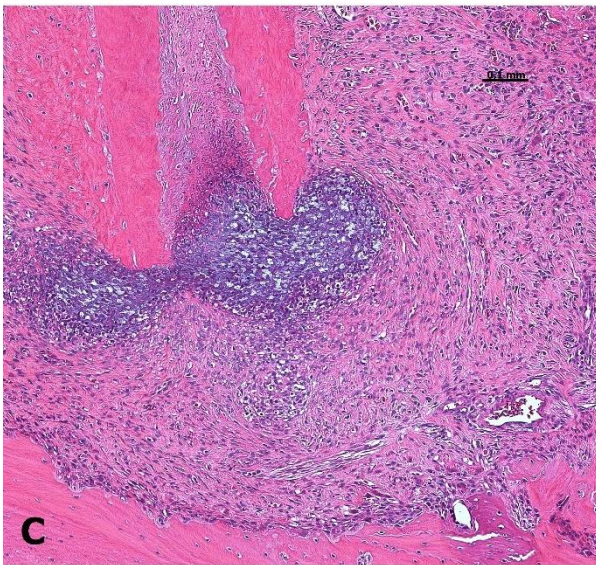
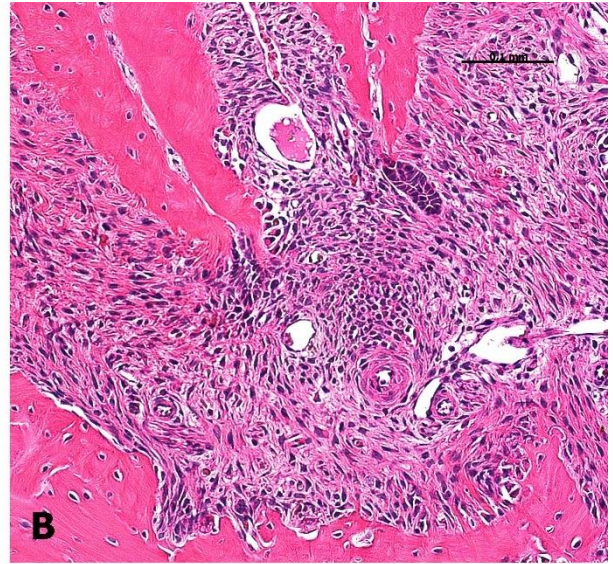
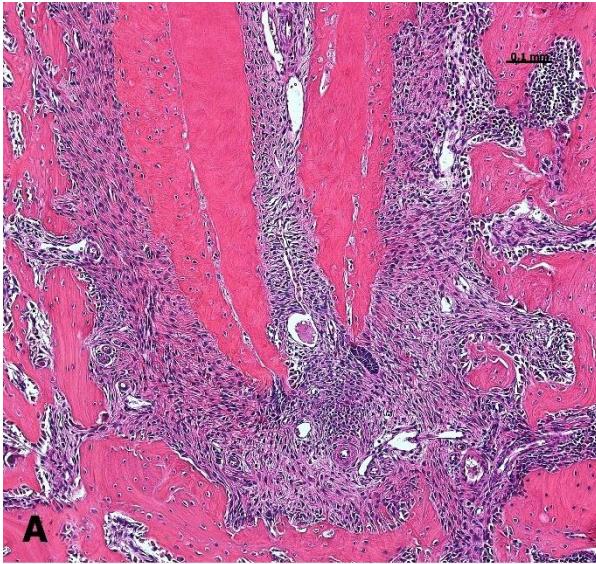


Figura 10. Fotomicrografias representativas de lâminas coradas em H&E. do Grupo VI (com lesão periapical e irrigação com probiótico), evidenciando mostrando os eventos microscópios na análise descritiva das lesões aos 7, 21 e 42 dias após indução da lesão periapical.

- (A)** Visão panorâmica do grupo VI aos 7 dias, evidenciando tecido pulpar íntegro, com presença da camada de odontoblastos, infiltrado inflamatório e aumento do ligamento periodontal suaves (HE, Zeiss, 10x).
- (B)** Detalhe da imagem A, evidenciando integridade das fibras colágenas e presença de vasos sanguíneos (HE, Zeiss, 20x).
- (C)** Fotomicrografia do grupo VI aos 21 dias, demonstrando infiltrado inflamatório suave e ligamento periodontal moderadamente aumentado, com preservação de fibras (HE, Zeiss, 10x).
- (D)** Detalhe da imagem C, evidenciando o infiltrado inflamatório suave e integridade das fibras colágenas (HE, Zeiss, 20x).
- (E)** Fotomicrografia do grupo VI aos 42 dias, com áreas reabsorção óssea suave, ligamento periodontal moderadamente aumentado, com presença regular de fibras e infiltrado inflamatório moderado (HE, Zeiss, 10x).
- (F)** Detalhe da imagem E, evidenciando a integridade de algumas fibras colágenas e presença de alguns vasos sanguíneos (HE, Zeiss, 20x).

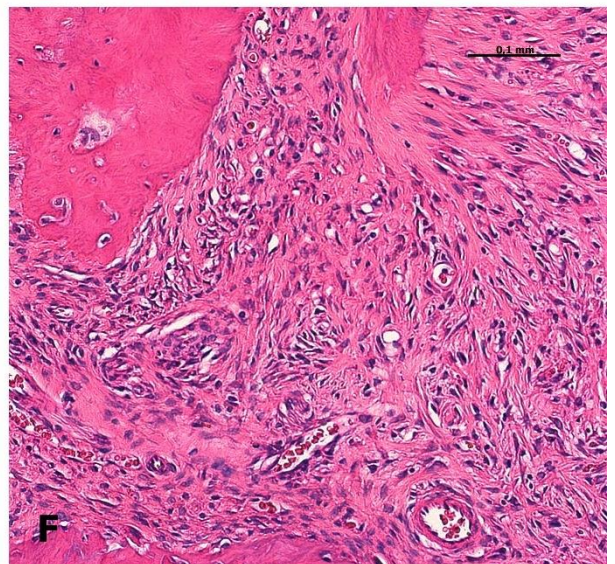
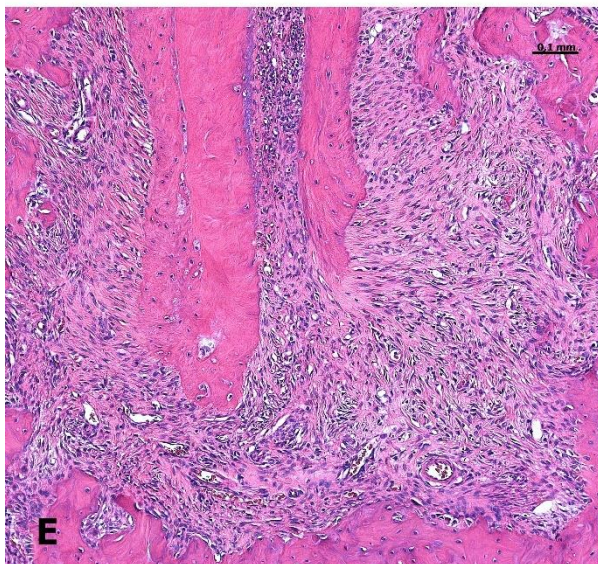
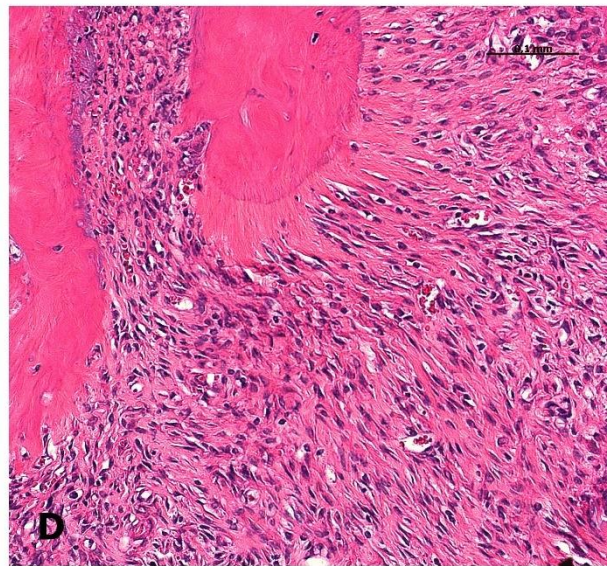
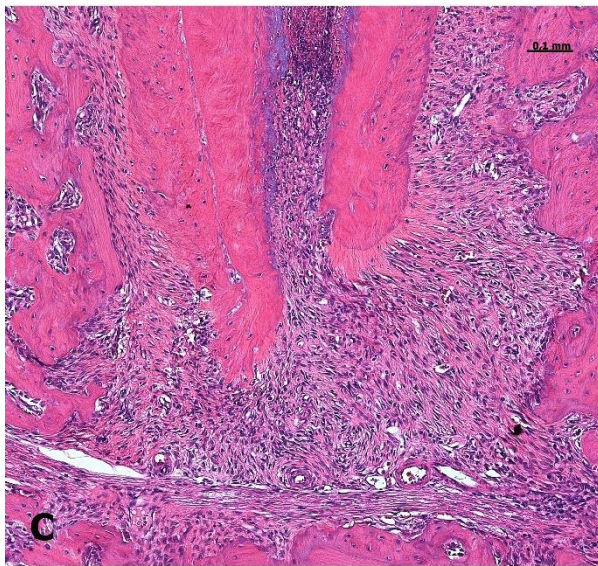
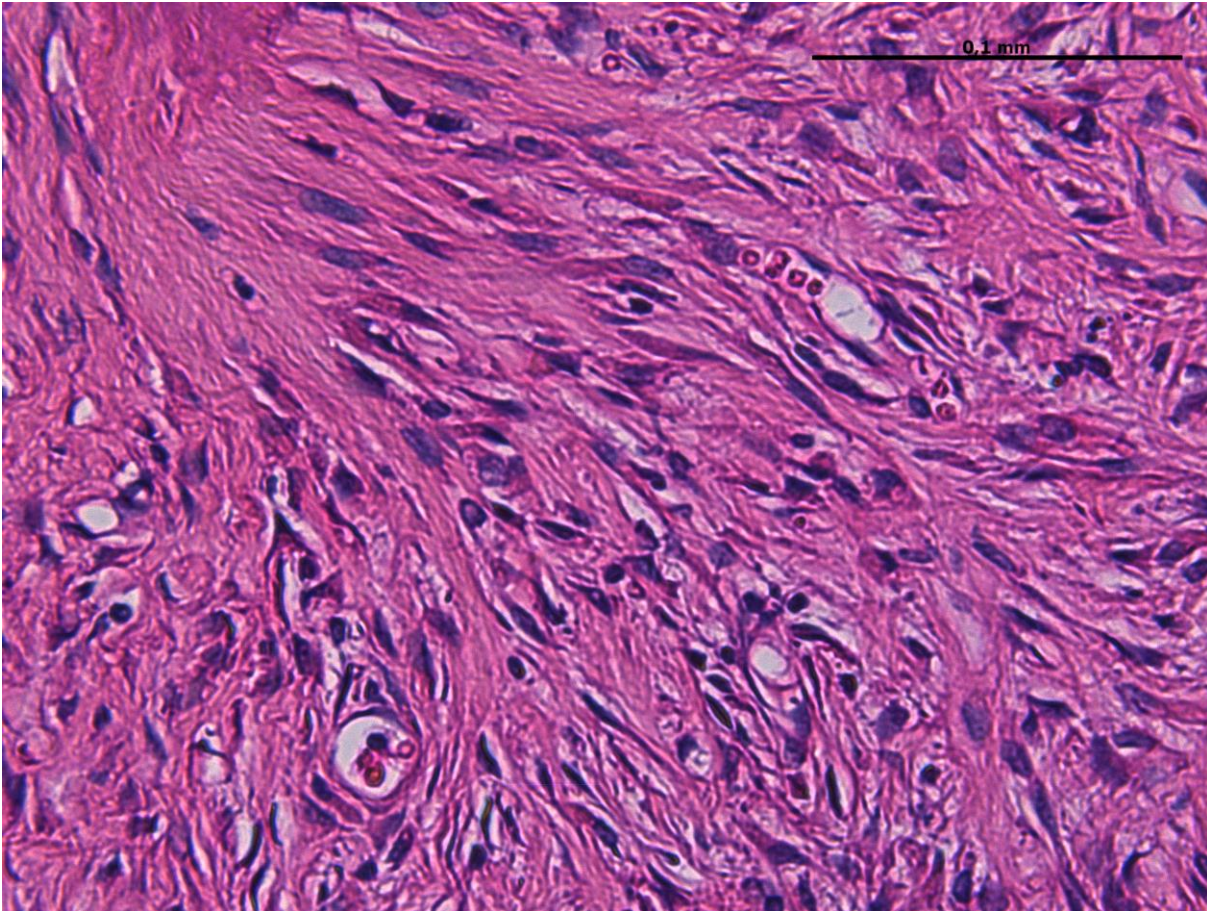


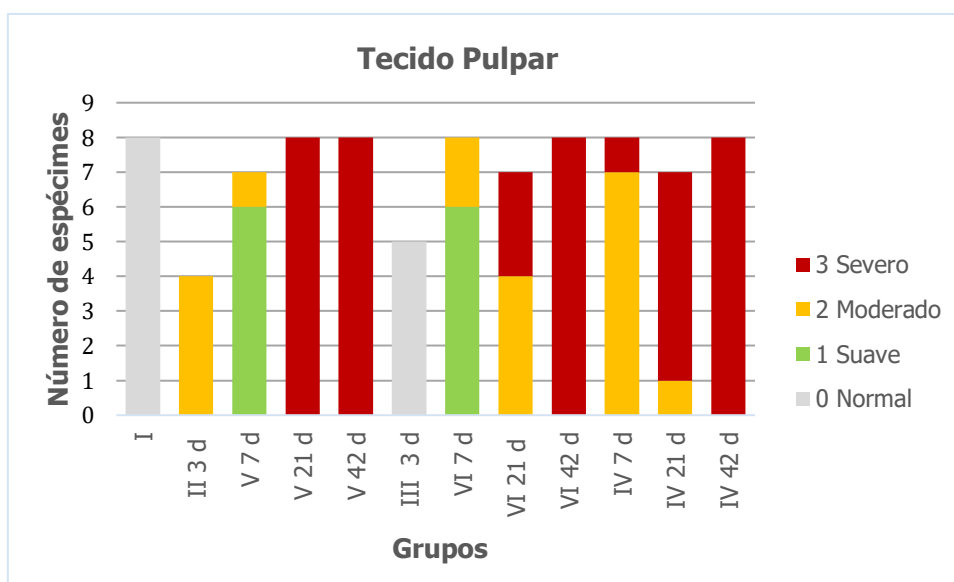
Figura 11. Fotomicrografia representativa de lâminas coradas em H&E do Grupo VI 42 dias, demonstrando a integridade das fibras colágenas e da matriz extracelular e presença reduzida de células inflamatórias (HE, Zeiss, 40x).



Em relação aos escores obtidos após análise do tecido pulpar, comparando os diferentes períodos experimentais do grupo sem tratamento (Grupo IV), observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo de 7 dias com relação aos períodos de 21 e de 42 dias ($p=0,0006$), que apresentaram os maiores escores. Em relação aos diferentes períodos experimentais com irrigação com NaOCl (Grupos II e V), observou-se diferença estatisticamente significativa entre o período de 7 dias, em comparação aos períodos de 21 e 42 dias ($p<0,0001$), que apresentaram os menores escores. Entre os diferentes períodos experimentais com irrigação com probiótico (Grupos III e VI), observou-se diferença significativa ($p<0,001$) entre o grupo de 3 dias, com relação aos períodos de 21 e de 42 dias, e entre os períodos de 7 e de 42 dias, o qual apresentou os maiores escores.

Comparando os grupos com NaOCl, o probiótico e sem tratamento em cada período (3, 7, 21 e 42 dias), observou-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,0003$) entre irrigação com NaOCl e probiótico apenas no período de 3 dias (sem lesão), sendo que o grupo irrigado com NaOCl apresentou os maiores escores. Com exceção do grupo III 3 dias, que apresentou apenas escore 0, os demais grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo de dentes hígidos ($p<0,0001$) (Figura 12).

Figura 12. Representação gráfica dos escores obtidos após análise do tecido pulpar de todos os grupos.



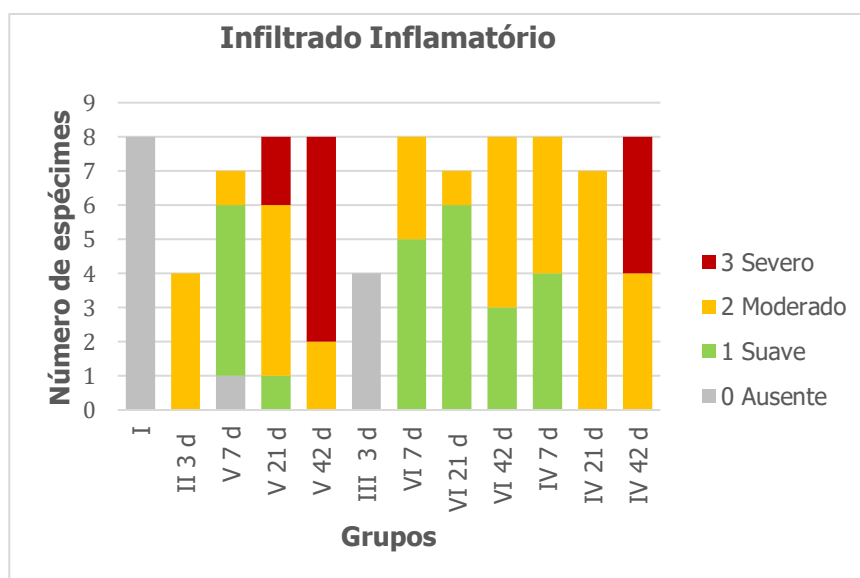
Assim, observou-se que o uso do probiótico local agiu de forma preventiva aos 3 dias, uma vez que o tecido pulpar apresentou alterações pouco significativa, nesse período, em comparação aos grupos onde foi utilizado o hipoclorito de sódio.

Em relação aos scores do infiltrado inflamatório, comparando os diferentes períodos experimentais do grupo sem tratamento (Grupo IV), observou-se diferença significativa entre 7 e 42 dias ($p=0,0041$). Já entre os grupos de 21 e 42 dias, não houve diferença estatística. Comparando os diferentes períodos experimentais com irrigação com NaOCl, observou-se diferença significativa entre os períodos de 7 e 42 dias ($p=0,0008$). Comparando os diferentes períodos experimentais com irrigação com probiótico, observou-se diferença significativa entre o grupo de 3 dias, com relação aos períodos de 7 e de 42 dias ($p=0,0026$). Com exceção do Grupo III aos 3 dias, que apresentou ausência de infiltrado inflamatório, os demais grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo de dentes hígidos ($p<0,05$).

Comparando os Grupos II e III aos 3 dias, observou-se diferença significativa, sendo que o grupo irrigado com NaOCl apresentou os maiores escores ($p=0,0006$). Entre os grupos IV, V e VI aos 7, 21 e 42 dias, observou-se que aos 7 dias, não houve diferença entre os grupos ($p=0,2337$), enquanto que aos 21 e 42 dias, o grupo probiótico apresentou diferença significativa com relação aos grupos sem tratamento (Grupo IV) e com irrigação com NaOCl ($p=0,0027$ e $0,0032$, respectivamente para 21 e 42 dias) (Figura 13).

Assim, evidenciou-se que o uso do probiótico local foi capaz de reduzir a magnitude do infiltrado inflamatório nos períodos iniciais (3 dias) e finais (21 e 42 dias) do desenvolvimento das lesões periapicais, em comparação com os outros grupos.

Figura 13. Representação gráfica dos escores relacionados ao infiltrado inflamatório de todos os grupos.



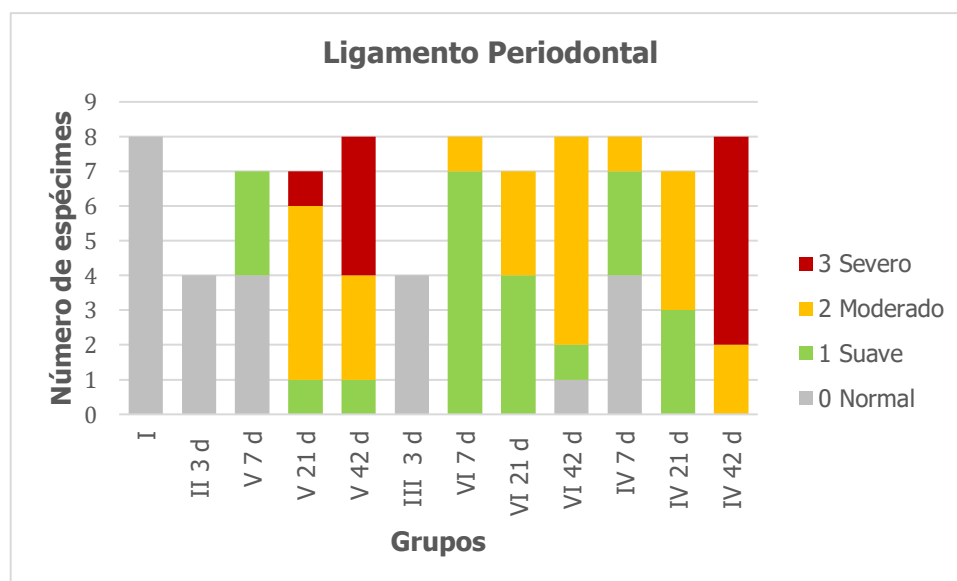
Em relação aos escores do ligamento periodontal, comparando os diferentes períodos experimentais do Grupo IV (sem tratamento), observou-se diferença significativa entre 7 e 42 dias ($p=0,0003$). Entre os diferentes períodos experimentais com irrigação com NaOCl, observou-se que os períodos de 3 e 7 dias foram estatisticamente diferentes dos períodos de 21 e de 42 dias ($p=0,0002$), os quais apresentaram os maiores escores de espessamento do ligamento periodontal. Na comparação dos diferentes períodos experimentais com irrigação com probiótico, observou-se diferença significativa apenas do grupo de 3 dias, em relação aos períodos de 21 e 42 dias ($p=0,0045$).

Os grupos I, II e III, aos 3 dias apresentaram apenas escore 0, com ligamento periodontal normal para todos os espécimes. Com exceção dos grupos V 7 dias e IV 7 dias, os demais grupos foram estatisticamente diferentes do grupo de dentes hígidos ($p<0,05$).

Aos 21 e 42 dias, apesar de uma tendência numérica de menores escores de espessamento do ligamento periodontal para os grupos que receberam irrigação com probiótico em relação aos demais, observou-se diferença significativa apenas entre o grupo sem tratamento e o grupo probiótico, aos 42 dias ($p=0,0097$) (Figura 14).

Verificou-se que, em geral, o probiótico local evidenciou tendência numérica de reduzir a espessura do ligamento periodontal, aos 21 e 42 dias, em comparação aos outros grupos.

Figura 14. Representação gráfica dos escores relacionados ao ligamento periodontal de todos os grupos.



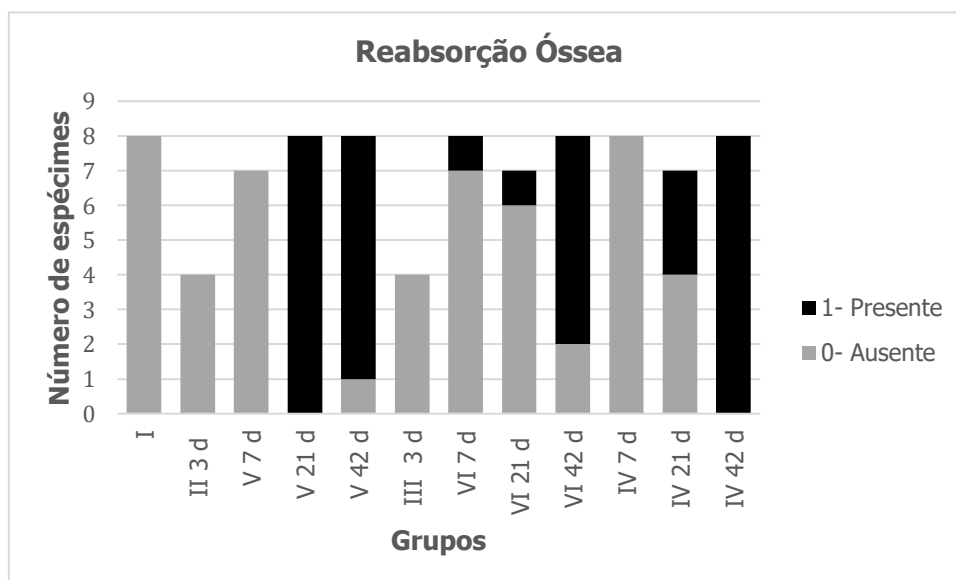
Em relação aos escores da reabsorção óssea, os Grupos I, II 3 dias, V 7 dias, III 3 dias e IV 7 dias apresentaram ausência de reabsorção óssea em todos os espécimes (100%). Os

grupos V 21 dias, V 42 dias, VI 42 dias e IV 42 dias foram estatisticamente diferentes do grupo de dentes hígido ($p < 0,05$).

Comparando os diferentes períodos do grupo com lesão sem tratamento, observou-se diferença significativa entre os períodos de 7 e de 42 dias ($p = 0,0004$). Entre os diferentes períodos experimentais com irrigação com NaOCl, observou-se que os períodos de 21 e de 42 dias foram estatisticamente diferentes dos períodos de 3 e de 7 dias ($p < 0,0001$). Em relação aos diferentes períodos experimentais com irrigação com probiótico, observou-se que apenas o período de 42 dias foi estatisticamente diferente dos períodos de 3 e de 7 dias ($p = 0,0028$), com maiores escores de reabsorção óssea aos 42 dias.

Comparando os grupos IV, V e VI aos 7, 21 e 42 dias, apesar da menor frequência de reabsorção óssea no grupo tratado com probiótico aos 21 e 42 dias, observou-se diferença estatisticamente significativa apenas entre o grupo que recebeu irrigação com NaOCl em relação ao grupo irrigado com probiótico aos 21 dias ($p = 0,0039$) (Figura 15).

Figura 15. Representação gráfica dos escores relacionados a reabsorção óssea de todos os grupos.



Quanto aos scores da reabsorção cementária, os grupos I, II 3 dias, V 7 dias, III 3 dias, VI 7 dias e VI 21 dias apresentaram ausência de reabsorção cementária em todos os espécimes (100%). Os grupos V 42 dias, VI 42 dias e IV 42 dias foram estatisticamente diferentes do grupo de dentes hígidos ($p < 0,05$).

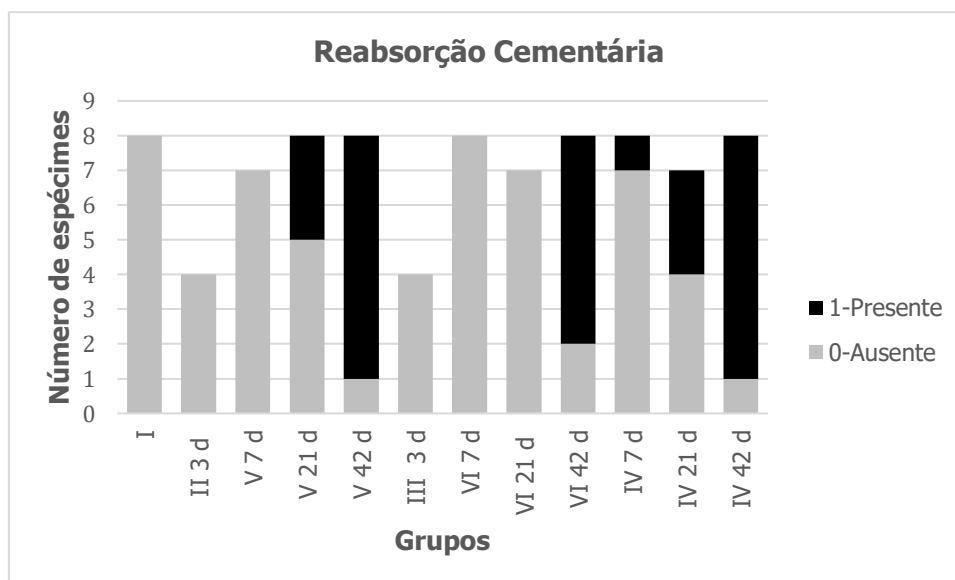
Comparando os diferentes períodos do grupo sem tratamento, observou-se diferença significativa entre os períodos de 7 e de 42 dias ($p = 0,0128$). Entre os diferentes períodos

experimentais com irrigação com NaOCl, observou-se que apenas o período de 42 dias foi estatisticamente diferente dos períodos de 3 e de 7 dias ($p=0,0003$). Já em relação aos diferentes períodos experimentais com irrigação com o probiótico, observou-se que o período de 42 dias foi estatisticamente diferente dos períodos de 3, 7 e de 21 dias ($p < 0,0001$), ou seja, no grupo que recebeu irrigação com probiótico, observou-se reabsorção cementária apenas no período de 42 dias.

Comparando os três grupos sem tratamento, tratamento com hipoclorito de sódio e probiótico aos 7, 21 e 42 dias, apesar da menor frequência de reabsorção cementária no grupo tratado com probiótico em todos os períodos, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 16).

Assim, com relação a reabsorções de tecidos mineralizados, foi possível inferir que o uso local do probiótico reduziu a reabsorção óssea aos 21 dias, porém não modulam a reabsorção cementária em nenhum dos períodos avaliados.

Figura 16. Representação gráfica dos escores relacionados a reabsorção cementária de todos os grupos.



Sumarizando, pela análise microscópica descritiva do canal radicular e das regiões apical e periapical, verificou-se que a progressão da lesão periapical foi crescente, em todos os grupos. Entretanto, foi possível destacar que o grupo que recebeu a administração do probiótico como solução irrigadora apresentou melhor resposta à infecção do canal radicular em todos os períodos experimentais analisados, quando comparado ao hipoclorito de sódio, principalmente em relação ao infiltrado inflamatório.

Mensuração da extensão da área microscópica correspondente às lesões periapicais, em microscopia de fluorescência

As lâminas submetidas à coloração por HE foram observadas em microscópio de fluorescência para mensuração da área das lesões periapicais nos diferentes períodos experimentais.

No Grupo I, tendo em vista que não foi efetuado a abertura coronária (dentes hígidos) o ligamento periodontal estava íntegro, sendo considerado que não houve formação de lesão periodontal (valor 0). Nos Grupo II e III (3 dias), observou apenas um suave espessamento do ligamento periodontal, com valores médios de 0,14mm² e 0,04mm², respectivamente, com diferença estatisticamente significativa entre os mesmos ($p < 0,0001$). O grupo III 3 dias não apresentou diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo hígido, demonstrando que este grupo teve menor alteração do ligamento periodontal. Os demais grupos foram estatisticamente diferentes do grupo hígido ($p < 0,001$) (Figura 18).

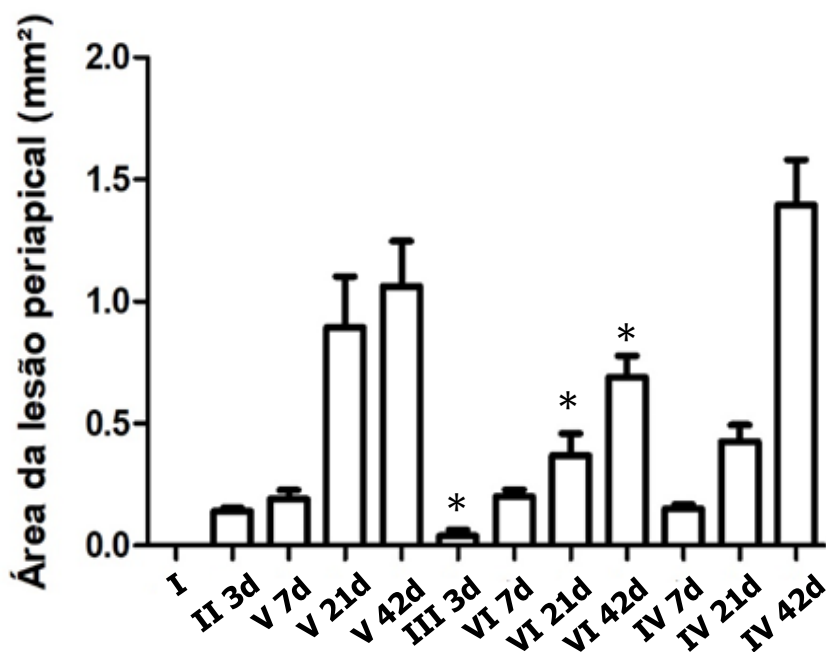
Nos grupos IV, V e VI observou-se aumento gradativo no tamanho das lesões no decorrer dos períodos de 7, 21 e 42 dias. No grupo IV os valores médios foram de 0,15 mm², 0,42mm² e 1,53mm², respectivamente, para os tempos experimentais. No grupo V obteve-se 0,23mm², 0,91mm² e 1,05mm² e no grupo VI obteve-se 0,2mm², 0,36mm² e 0,69mm², demonstrando que os grupos experimentais apresentaram um padrão de tempo-dependência e o probiótico teve o melhor resultado no período experimental de 21 e 42 dias (menores mensurações), demonstrando que o probiótico atuou benéficamente neste parâmetro.

Entre os diferentes períodos experimentais do Grupo IV (sem tratamento), observou-se que o período de 42 dias foi estatisticamente diferente dos períodos de 7 e de 21 dias ($p < 0,0001$). Em relação aos diferentes períodos experimentais com irrigação com NaOCl, observou-se que os períodos de 21 e de 42 dias, que apresentaram lesões periapicais maiores, foram estatisticamente diferentes dos períodos de 3 e de 7 dias ($p < 0,0001$). Já entre os diferentes períodos experimentais com irrigação com probiótico, observou-se que o período de 3 dias foi estatisticamente diferente dos períodos de 21 e de 42 dias, e que o período de 42 dias, o qual apresentou os maiores valores, foi estatisticamente diferente dos períodos de 7 e de 21 dias ($p = 0,0003$). O período de 7 dias não apresentou diferença estatística dos períodos de 3 e de 21 dias (Figura 19).

Comparando os Grupos IV, V e VI no período de 7 dias não se observou diferença estatística ($p = 0,3623$). Aos 21 dias, observou-se diferença significativa entre o grupo que recebeu irrigação com NaOCl e o grupo que recebeu irrigação com probiótico ($p = 0,0328$), o qual apresentou valores significativamente menores. Aos 42 dias houve diferença entre o grupo sem tratamento (IV) em relação ao grupo que foi tratado com probiótico (VI)

($p=0,0167$), que apresentou os menores valores de tamanho da lesão dentre todos os grupos neste período (Figura 17).

Figura 17. Representação gráfica da comparação dos grupos, com relação à área da lesão periodontal. Os asteriscos representam diferença estatística comparando os grupos dos probiótico com os demais ($p<0,05$).



Assim, observou-se que 21 e 42 dias após a indução das lesões periapicais, o uso do probiótico local ocasionou o desenvolvimento de lesões periapicais menores com relação aos grupos tratados com hipoclorito de sódio e com os grupos sem tratamento.

A Tabela 4 apresenta os valores mínimos e máximos, e a média, em mm^2 , e o desvio padrão das áreas das lesões periapicais obtidas nos diferentes grupos. Fotomicrografias representativas das imagens observadas em microscopia de fluorescência, nos diferentes grupos, estão ilustradas nas Figuras 18 e 19.

Tabela 4. Valores mínimos e máximos, e a média, em mm², das áreas das lesões periapicais obtidas nos diferentes grupos.

GRUPOS	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	MÉDIA EM MM²	DÉSVIO PADRÃO
Grupo I	0	0	0	0
Grupo II	0,11	0,18	0,14	0,02
Grupo III	0	0,09	0,04	0,04
Grupo IV 7 Dias	0,09	0,21	0,15	0,04
Grupo IV 21 Dias	0,20	0,70	0,42	0,17
Grupo IV 42 dias	0,45	1,92	1,3	0,52
Grupo V 7 dias	0,09	0,29	0,19	0,08
Grupo V 21 dias	0,34	1,38	0,89	0,58
Grupo V 42 dias	0,76	1,65	1,06	0,44
Grupo VI 7 dias	0,13	0,36	0,2	0,07
Grupo VI 21dias	0,10	0,73	0,36	0,24
Grupo VI 42 dias	0,37	0,93	0,69	0,22

Figura 18. Fotomicrografias de cortes microscópicos representativos dos Grupos I, II e III corados com hematoxilina e eosina e observados em microscopia de fluorescência.

(A) Fotomicrografia representativa do grupo I (Dente hígido) (HE, Zeiss, 5x).

(B) Fotomicrografia representativa do grupo II (abertura coronária e irrigação com hipoclorito de sódio, aos 3 dias) (HE, Zeiss, 5x).

(C) Fotomicrografia representativa do grupo III (abertura coronária e irrigação de probiótico, aos 3 dias) (HE, Zeiss, 5x).

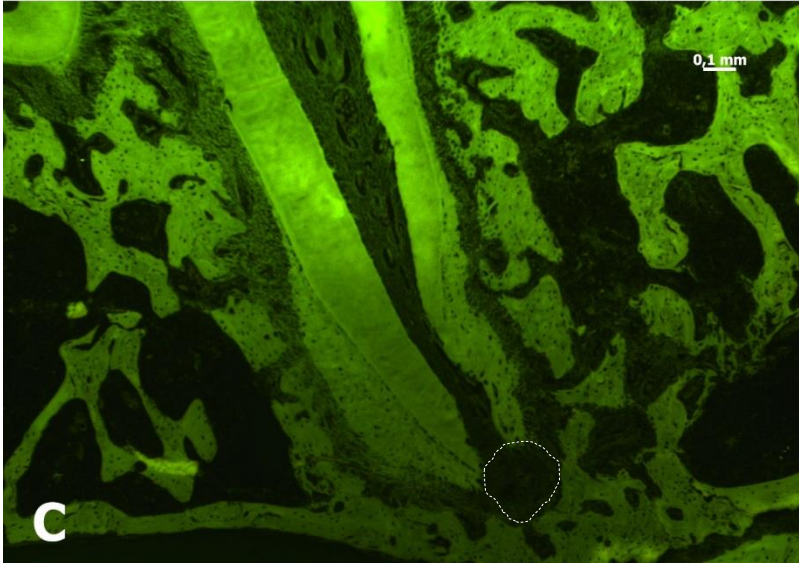
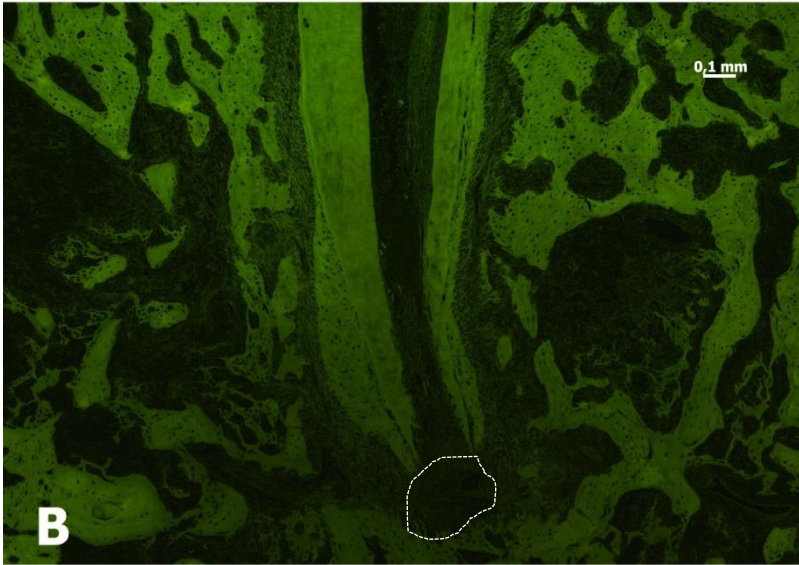
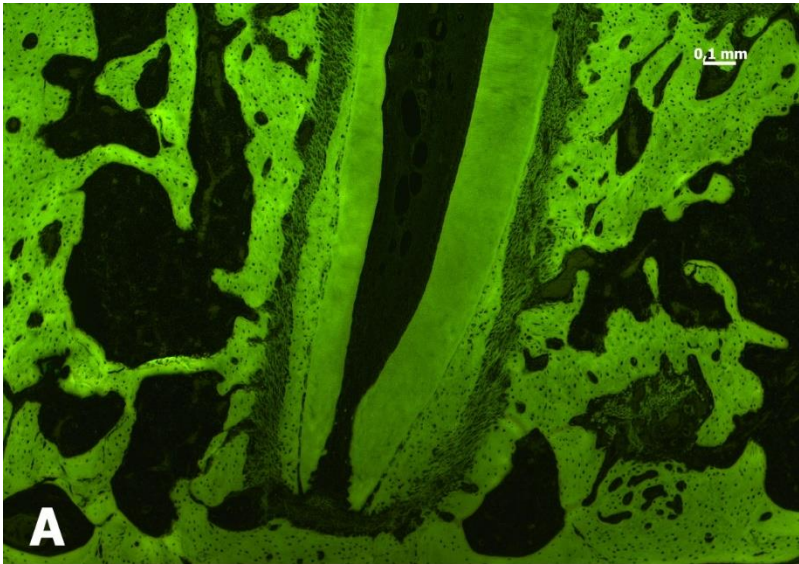
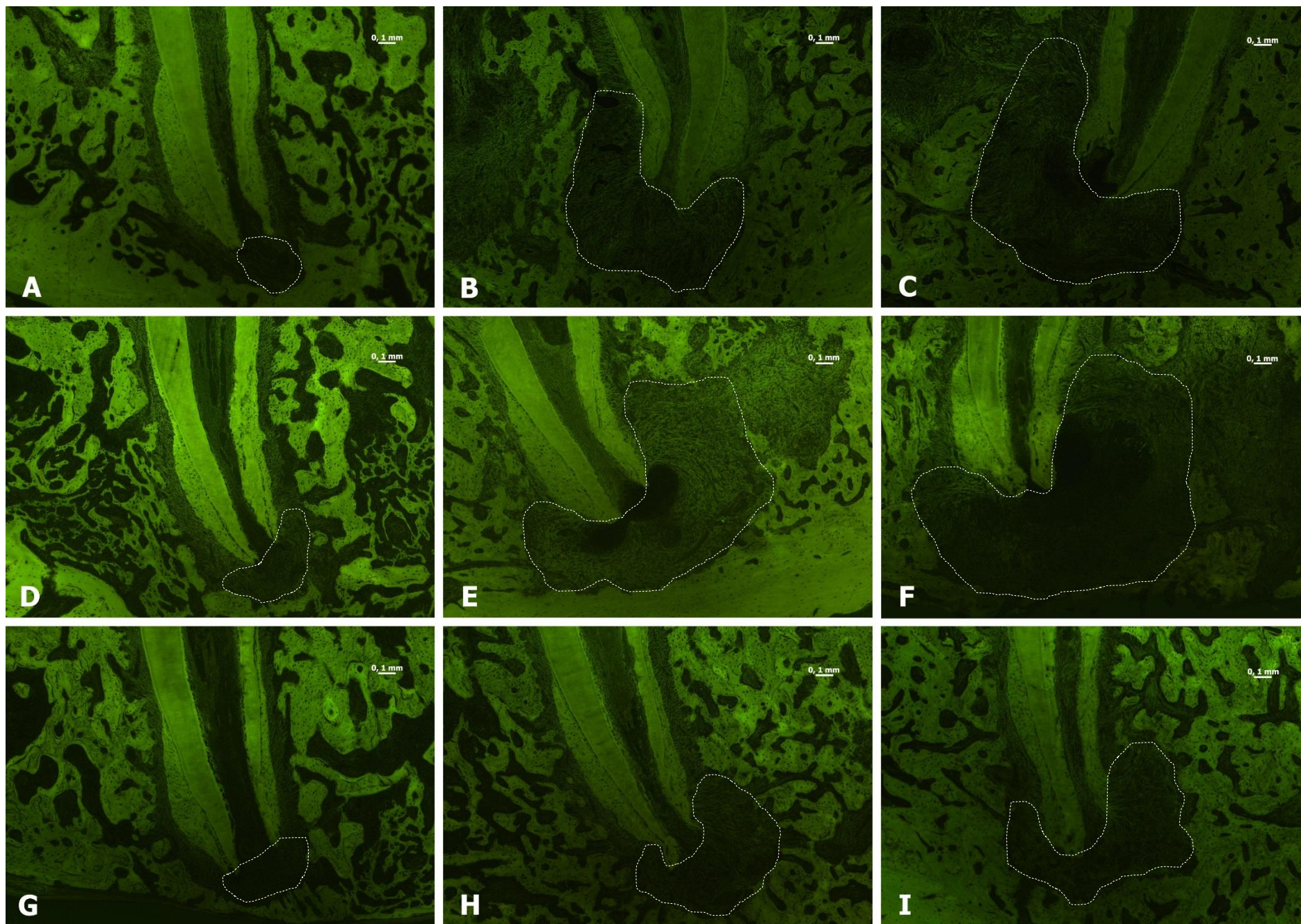


Figura 19. Fotomicrografias de cortes microscópicos representativos dos Grupos IV, V e VI aos 7, 21 e 42 dias, corados com hematoxilina e eosina e observados em microscopia de fluorescência.

- (A)** Fotomicrografia representativa do grupo IV (sem nenhum tratamento), aos 7 dias (HE, Zeiss, 5x).
- (B)** Fotomicrografia representativa do grupo IV (sem nenhum tratamento), aos 21 dias (HE, Zeiss, 5x).
- (C)** Fotomicrografia representativa do grupo IV (sem nenhum tratamento), aos 42 dias (HE, Zeiss, 5x).
- (D)** Fotomicrografia representativa do grupo V (irrigação de hipoclorito de sódio), aos 7 dias (HE, Zeiss, 5x).
- (E)** Fotomicrografia representativa do grupo V (irrigação de hipoclorito de sódio), aos 21 dias (HE, Zeiss, 5x).
- (F)** Fotomicrografia representativa do grupo V (irrigação de hipoclorito de sódio), aos 42 dias (HE, Zeiss, 5x).
- (G)** Fotomicrografia representativa do grupo VI (irrigação de probiótico), aos 7 dias (HE, Zeiss, 5x).
- (H)** Fotomicrografia representativa do grupo VI (irrigação de probiótico), aos 21 dias (HE, Zeiss, 5x).
- (I)** Fotomicrografia representativa do grupo VI (irrigação de probiótico), aos 42 dias (HE, Zeiss, 5x).



Histoenzimologia para atividade da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP)

A contagem de osteoclastos foi obtida após a realização da técnica de histoenzimologia para a marcação da proteína Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP).

Aos 3 dias, os grupos II (irrigação com hipoclorito de sódio) e III (irrigação com probiótico) foram estatisticamente diferentes do grupo hígido (que apresentou os menores valores de osteoclastos) e diferentes entre si ($p < 0,0001$), sendo que o grupo tratado com probiótico apresentou valores significativamente menores em comparação ao grupo tratado com hipoclorito de sódio. Os períodos de 3, 21 e 42 dias com irrigação com NaOCl ($p < 0,0001$), os períodos de 7, 21 e 42 dias que receberam irrigação com probiótico ($p = 0,0003$) e os períodos de 7, 21 e 42 dias do grupo sem tratamento ($p < 0,0001$) também apresentaram diferença estatística significativa quando comparado ao grupo hígido (Figura 20).

Comparando os diferentes períodos experimentais dos grupos com lesão periapical e sem tratamento (Grupo IV), observou-se diferença estatisticamente significativa entre todos os períodos ($p < 0,0001$), com o período de 21 dias apresentando os maiores valores e o período de 7 dias o menor número de osteoclastos. Entre os diferentes períodos experimentais com irrigação com NaOCl (Grupo V), observou-se que o período de 21 dias, que apresentou o maior número de osteoclastos, foi estatisticamente diferente do período de 7 dias ($p < 0,0001$). Já no Grupo IV (irrigação com probiótico), não foi observada diferença significativa entre os diferentes períodos experimentais ($p = 0,3746$) (Figura 20).

Quando os diferentes tratamentos foram comparados no mesmo período experimental, pode-se observar que aos 7 dias não houve diferença entre os grupos IV, V e VI ($p = 0,5591$). Aos 21 dias o grupo VI (irrigação com probiótico), que apresentou os menores valores de osteoclastos, foi estatisticamente diferente do grupo sem tratamento (Grupo IV) e do Grupo V (irrigação com hipoclorito de sódio). Já aos 42 dias, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos ($p = 0,0689$) (Figura 20).

De uma maneira geral, após a análise do número de osteoclastos por meio da histoenzimologia para a TRAP, pode-se observar que o período experimental de 21 dias apresentou um padrão em todos os grupos analisados, onde o número de osteoclastos atingiu número máximo e ocorreu um declínio em relação ao período de 42 dias, demonstrando que houve uma redução destas células com o decorrer do tempo.

As Figuras 21, 22 e 23 ilustram a marcação de osteoclastos.

Figura 20. Representação gráfica da comparação estatística entre todos os grupos em relação ao número de osteoclastos. Os asteriscos representam diferença estatística entre os grupos do probiótico com os demais ($p < 0,05$).

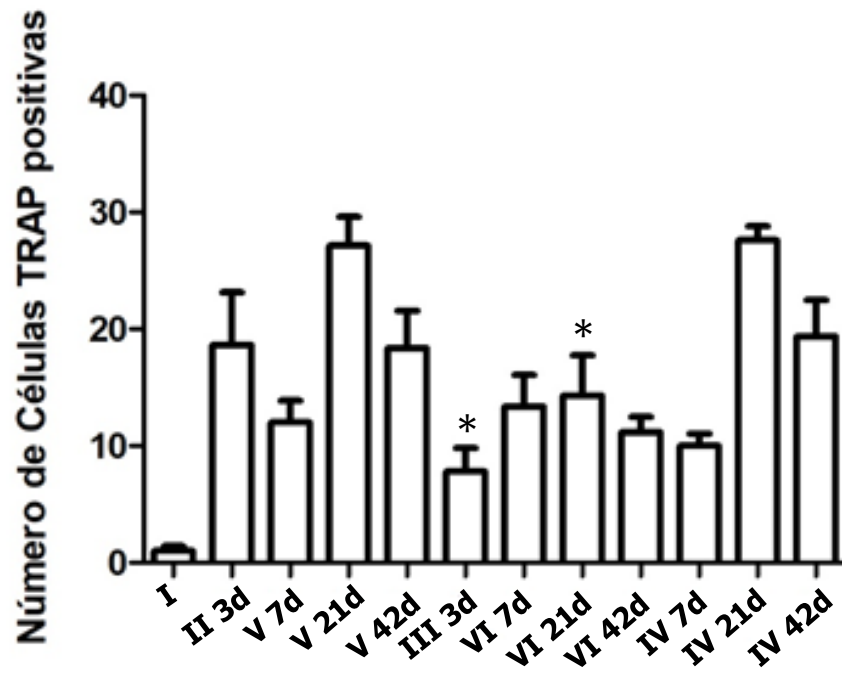


Figura 21. Fotomicrografias de cortes representativos dos Grupos I, II e III, aos 3 dias, corados por meio da técnica de histoenzimologia para a atividade da fosfatase resistente ao tartarato (TRAP), para identificação e contagem de células osteoclásticas.

- (A)** Fotomicrografia panorâmica do Grupo I (dente hígido), evidenciando osso alveolar sadio e presença reduzida de osteoclastos (Zeiss, 10x).
- (B)** Fotomicrografia panorâmica do Grupo II (abertura coronária e irrigação com hipoclorito de sódio), evidenciando osso alveolar sadio, porém com presença de osteoclastos (Zeiss, 10x).
- (C)** Fotomicrografia panorâmica do Grupo III (abertura coronária e irrigação com probiótico), evidenciando osso alveolar sadio e pequena presença de osteoclastos, semelhante às estruturas do dente hígido (Zeiss, 10x).

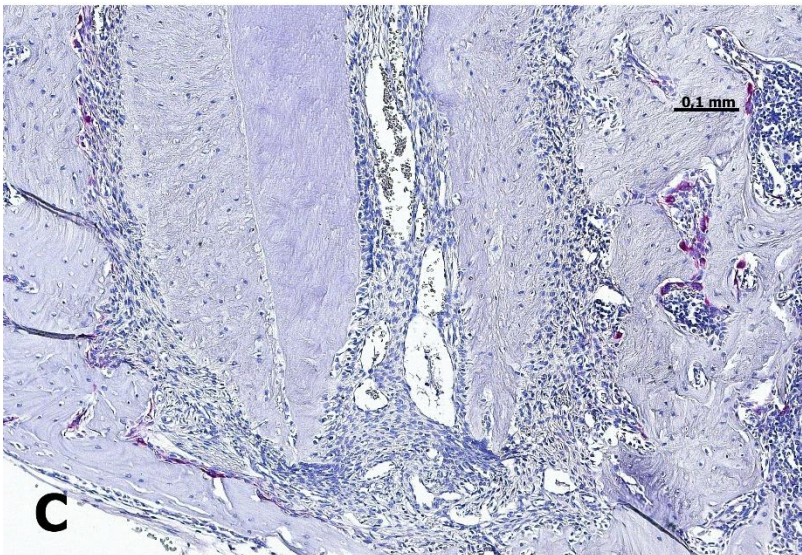
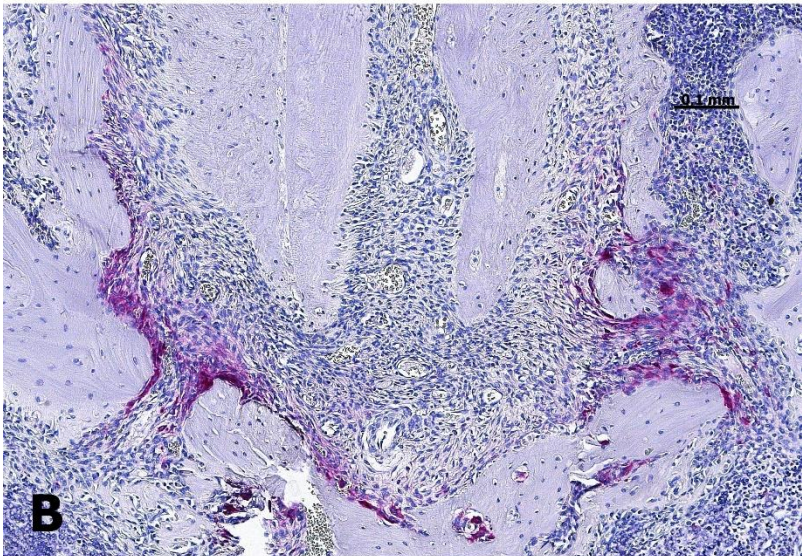
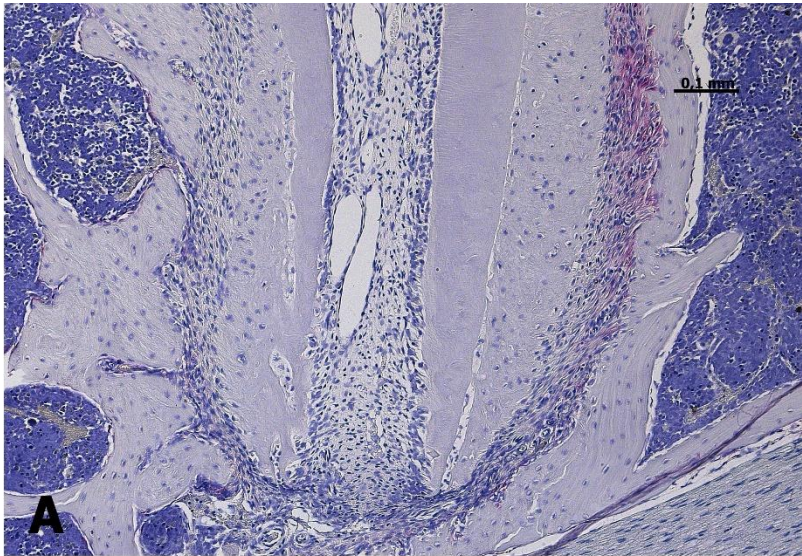


Figura 22. Fotomicrografias de cortes representativos dos Grupos IV, V e VI, aos 7, 21 e 42 dias, corados por meio da técnica de histoenzimologia para a atividade da Fosfatase Resistente ao Tartarato (TRAP), para identificação e contagem de células osteoclásticas.

- (A)** Fotomicrografia panorâmica do grupo IV (sem nenhum tratamento), aos 7 dias, evidenciando presença de osteoclastos (Zeiss, 10x).
- (B)** Fotomicrografia panorâmica do grupo IV (sem nenhum tratamento), aos 21 dias, evidenciando presença de osteoclastos em grande quantidade (Zeiss, 10x).
- (C)** Fotomicrografia panorâmica do grupo IV (sem nenhum tratamento), aos 42 dias, evidenciando presença moderada de osteoclastos (Zeiss, 10x).
- (D)** Fotomicrografia panorâmica do grupo V (com irrigação de hipoclorito de sódio), aos 7 dias, evidenciando presença de osteoclastos em quantidade moderada (Zeiss, 10x).
- (E)** Fotomicrografia panorâmica do grupo V (com irrigação de hipoclorito de sódio), aos 21 dias, evidenciando presença de osteoclastos em quantidade moderada (Zeiss, 10x).
- (F)** Fotomicrografia panorâmica do grupo V (com irrigação de hipoclorito de sódio), aos 42 dias, evidenciando presença moderada de osteoclastos (Zeiss, 10x).
- (G)** Fotomicrografia panorâmica do grupo VI (com irrigação de probiótico), aos 7 dias, evidenciando presença de osteoclastos em quantidade pequena (Zeiss, 10x).
- (H)** Fotomicrografia panorâmica do grupo VI (com irrigação de probiótico), aos 21 dias, evidenciando presença de osteoclastos em quantidade moderada (Zeiss, 10x).
- (I)** Fotomicrografia panorâmica do grupo VI (com irrigação de probiótico), aos 42 dias, evidenciando presença de osteoclastos em pequena quantidade (Zeiss, 10x).

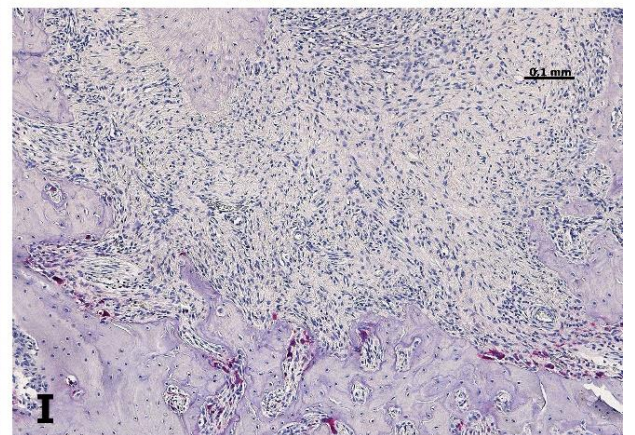
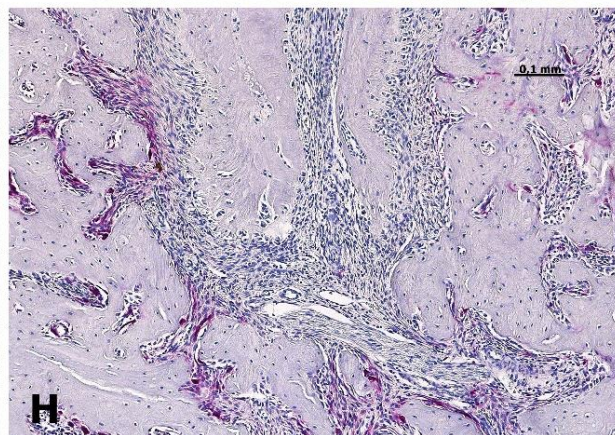
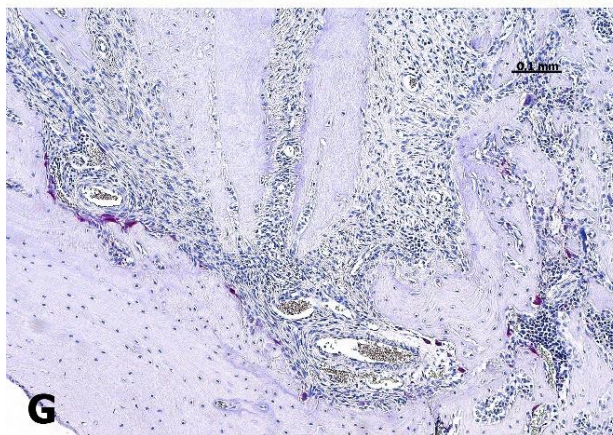
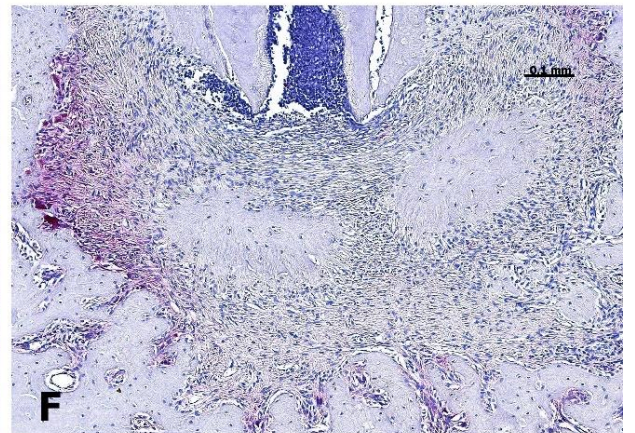
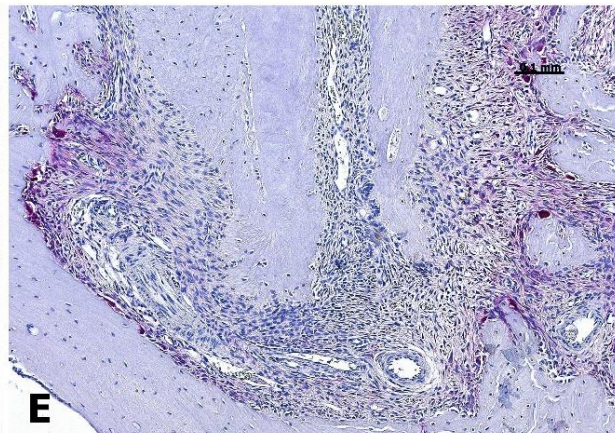
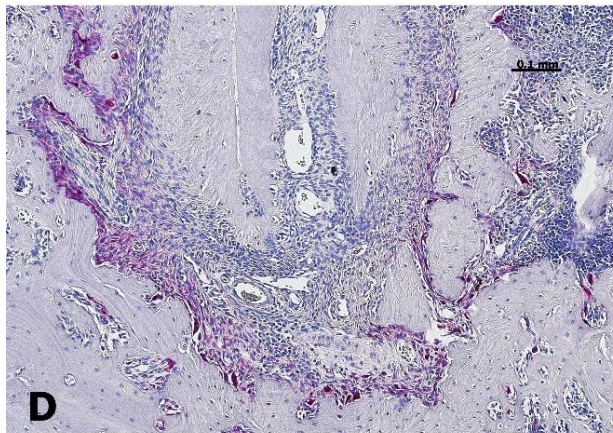
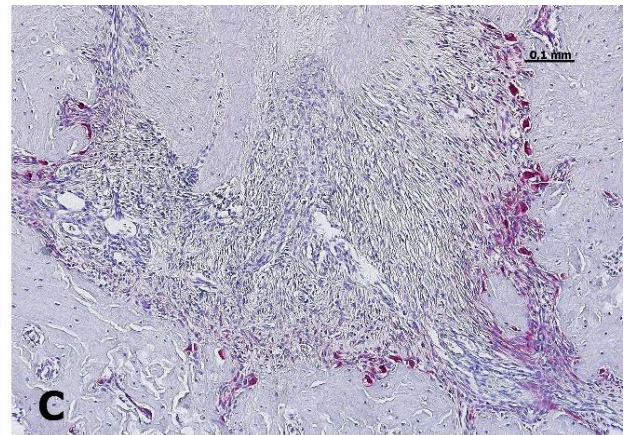
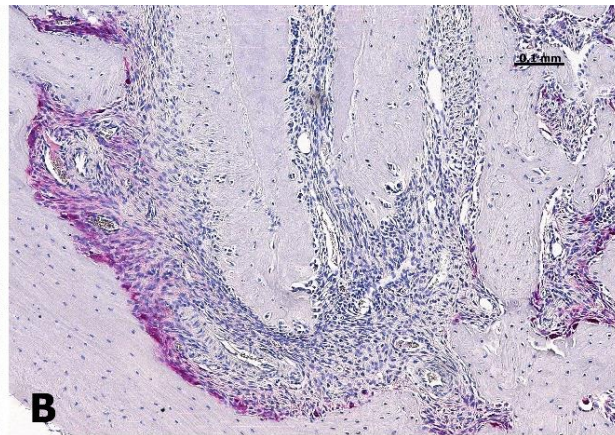
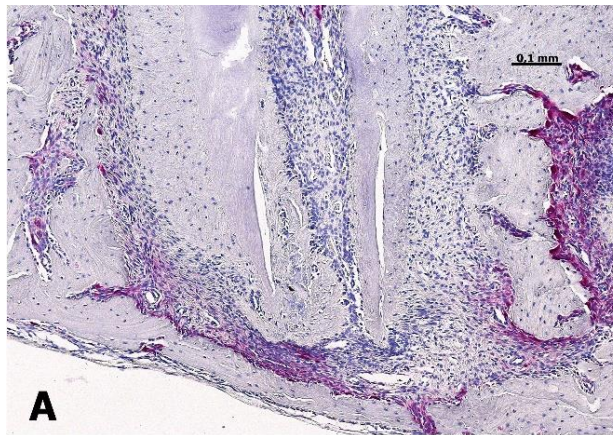
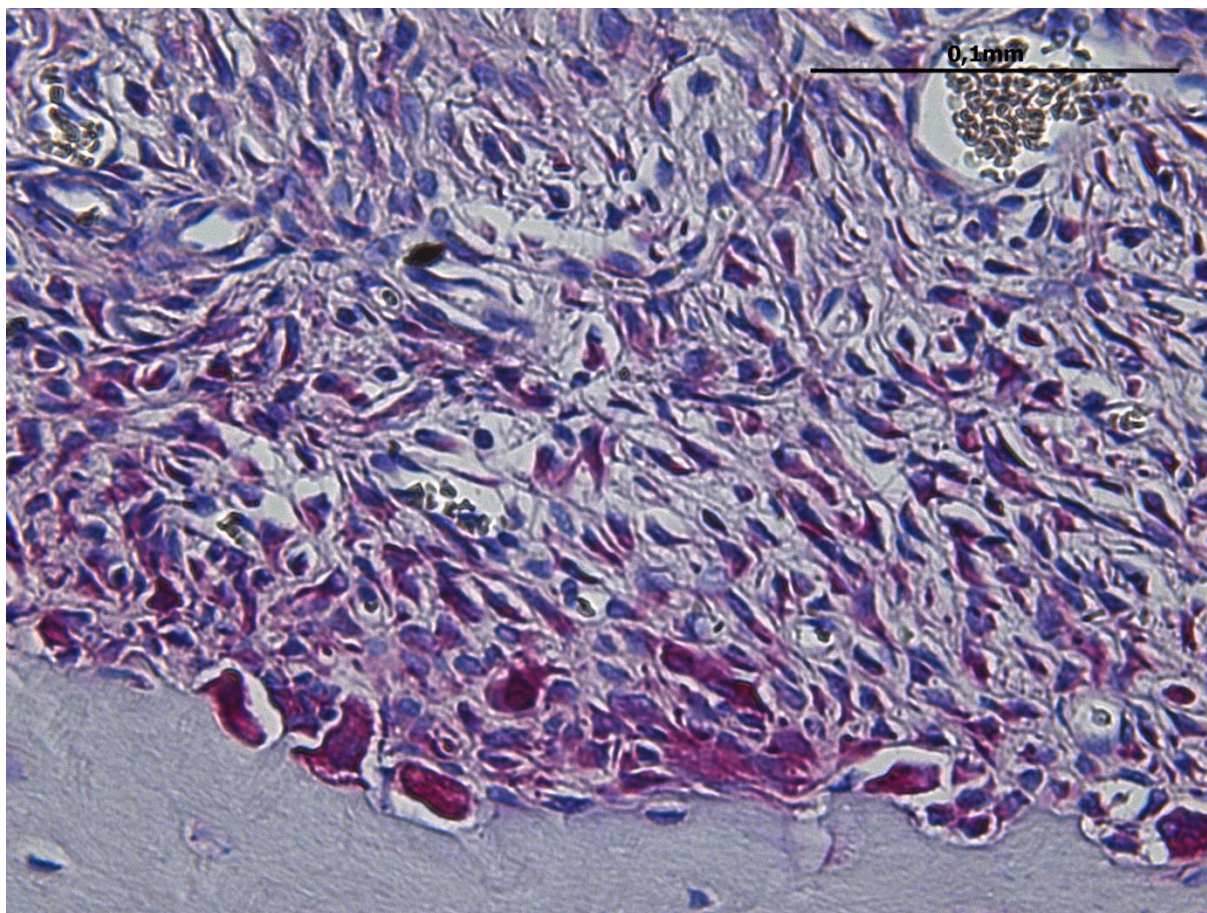


Figura 23. Fotomicrografias de cortes representativos dos osteoclastos em maior aumento do grupo IV (Zeiss, 40x).



Discussão

5 DISCUSSÃO

A avaliação do papel dos probióticos realizados em estudos anteriores, demonstraram apenas a sua ação sistêmica na lesão periapical (Cosme-Silva et al., 2019 e Cosme-Silva et al., 2020) ou como solução irrigadora *in vitro* (Bohora et al., 2017; Bohora et al., 2019; El-Sayed et al., 2019). No presente estudo, além da avaliação *in vitro*, analisou-se, pela primeira vez, a ação local *in vivo* do probiótico na lesão periapical, utilizando uma solução contendo *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 como agente de irrigação.

Em estudo realizado por El-Sayed et al., em 2019, foi analisado o efeito de solução irrigadora contendo *Lactobacillus rhamnosus* (B-445) como probiótico, no crescimento de *Enterococcus faecalis*, por meio de uma avaliação *in vitro* em dentes de humanos. Neste estudo o probiótico foi utilizado como grupo experimental, o NaOCl como controle positivo e a solução salina como controle negativo. Na contagem das unidades formadoras de colônias, utilizado para avaliar a ação do probiótico, observou-se que a contagem média de colônias de *L. rhamnosus* pós-irrigação foi significativamente maior que de *E. faecalis*, demonstrando que houve a possibilidade de competição pelo sítio de ligação e nutrição dos micro-organismos. Desse modo, esses autores mostraram que o probiótico utilizado possui um potencial efeito inibitório sobre o crescimento de *E. faecalis*, o que motiva a realização de pesquisas com o uso de probióticos localmente, como solução irrigadora de canais radiculares.

A escolha do probiótico utilizado foi baseada em estudos *in vivo* anteriores, os quais apresentaram resultados favoráveis ao reparo ósseo na área da Periodontia (Messora et al., 2016; Oliveira et al., 2016; Ricoldi et al., 2017). Além disso, a atividade antimicrobiana de cepas presentes na cavidade bucal e nas infecções endodônticas foi previamente avaliada *in vitro* no presente estudo, por meio da mensuração do halo de inibição do crescimento microbiano, demonstrando que o probiótico em questão apresentou potencial terapêutico. Os resultados do presente estudo *in vitro* concordam com os obtidos por Bohora e Kokate (2017) que avaliaram um conjunto de probióticos vendidos comercialmente contendo *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Saccharomyces boulardii* e *Streptococcus thermophilus*, contra *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, observando que os probióticos tiveram ação contra o *E. faecalis*.

Os micro-organismos e seus antígenos microbianos, presentes na infecção do canal radicular, podem estimular respostas do sistema imune no tecido periapical. A quantidade de patógenos, a interação com o sistema imune e seus estímulos inflamatórios podem influenciar e alterar a progressão da doença (Graunaite et al., 2011; Braz-Silva et al., 2019). Desse modo, a lesão periapical tende a ser crescente e agressiva com o decorrer do tempo, como demonstrado no presente estudo no grupo controle negativo IV (indução da lesão periapical

sem tratamento), em que a lesão aos 7 dias possuía pouco infiltrado inflamatório, quando comparado ao período de 42 dias do mesmo grupo ($p=0,0041$). Além disso a área da lesão apresentou progressão crescente, com diferença estatisticamente significante ($p<0,001$) entre os períodos de 7, 21 e 42 dias, podendo ser este fato decorrente da interação da resposta inflamatória com os antígenos microbianos.

Por outro lado, sabe-se que as soluções irrigadoras são imprescindíveis no tratamento endodôntico, pois possuem a finalidade de facilitar a instrumentação, dissolver o tecido pulpar, remover resíduos orgânicos e *smear layer*, além de diminuir a contaminação microbiana localizada na luz dos canais radiculares (Silva et al., 2004; Zehnder, 2006; Haapasalo et al., 2010; Silva et al., 2010; Tanomaru et al., 2015). O hipoclorito de sódio foi usado como controle positivo no presente estudo, devido à sua potente atividade antimicrobiana (Tanomaru et al., 2003). No entanto, quando estruído do canal, o hipoclorito de sódio pode resultar na oxidação do tecido circundante, ocasionando hemólise, ulceração, degeneração de fibroblastos e de células endoteliais, proporcionando maior inflamação (Sermeño et al., 2009; Tenore et al., 2018; Slaughter, 2019).

Na comparação da irrigação com hipoclorito de sódio com o grupo controle negativo (indução da lesão periapical), não se observou diferença estatística entre os grupos em relação a todos os parâmetros ($p>0,05$). Este resultado pode ser explicado pela falta da completa remoção do agente causal e pela impossibilidade de realizar o preparo biomecânico do canal radicular, devido às limitações do modelo animal (Siqueira-Junior et al., 2018).

É interessante ressaltar que nas mesmas limitações metodológicas do modelo animal empregadas nos outros grupos, ao analisarmos o grupo da irrigação com o probiótico foi observado que apesar da lesão periapical, havia um infiltrado inflamatório suave, fibras colágenas e matriz extracelular aparentemente com áreas de pouca destruição nos períodos de 21 ($p=0,0027$) e 42 dias ($p=0,0032$), em comparação com os grupos onde foi utilizada a irrigação com o hipoclorito de sódio e nos grupos sem nenhum tratamento. Além disso, histometricamente, o grupo da irrigação com probiótico apresentou menor área da lesão ($p<0,05$), em relação aos demais grupos, demonstrando efeito na progressão da lesão, paralisando o aumento da sua extensão e diminuindo sua intensidade inflamatória, possuiu um efeito protetor na perda óssea.

No presente estudo foi realizada, também, a avaliação do número de osteoclastos, por meio da atividade da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP), que demonstrou uma redução significativa no grupo da irrigação com o probiótico aos 3 dias (grupo III) em comparação com o hipoclorito de sódio ($p<0,05$). O grupo probiótico VI, que apresentou os menores valores de osteoclastos, foi estatisticamente diferente do grupo sem tratamento (IV)

e do grupo hipoclorito (V), aos 21 dias ($p=0,0043$). Entretanto, apesar de visualmente e numericamente notar-se uma leve diminuição de células TRAP-positivas nos outros períodos experimentais, não foi possível identificar diferença significativa entre os tempos de 7 e 42 ($p=0,5591$ e $p=0,0689$, respectivamente). Este resultado é discordante com os achados de Cohenca et al. (2015), que analisaram diferentes sistemas de irrigação, demonstrando que a irrigação convencional não diminuiu o número de osteoclastos na lesão periapical, porém corrobora com Pucinelli et al. (2017), que analisaram também diferentes sistemas de irrigação, demonstrando que houve diferença entre o número de osteoclastos na lesão periapical, em comparação ao grupo sem tratamento.

Considerando que este é o primeiro estudo *in vivo* analisando o uso local de probióticos no canal radicular de ratos como solução irrigadora, o mecanismo de ação do probiótico especificamente na lesão periapical ainda é desconhecido. Entretanto, uma possível explicação seria pela ocupação do probiótico no espaço do biofilme, que seria colonizado por microorganismos patogênicos, coagregando a este biofilme e diminuindo sua agressividade (Haukioja et al., 2006; Twetman et al., 2009). Outro fator que pode estar relacionado à ação do probiótico na lesão periapical é o da produção de compostos pelas bactérias probióticas com atividade antimicrobiana, como ácido lático, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e substâncias similares a bacteriocinas (Gordon, 2009). Alguns estudos demonstram uma ação antitoxinas do probiótico, pela interação físico-química do mesmo com as toxinas liberadas, resultando em toxicidade reduzida (Oelschlaeger, 2010, Markowiak et al., 2017). Essas interações de seus produtos com o tecido epitelial permitem que o probiótico seja capaz de alterar a resposta imunoinflamatória, modulando a resposta local e sistêmica, por meio de interações nas células dendríticas, resultando na ativação de Tregs (Células T regulatórias) que desempenham papel na manutenção das células epiteliais pela produção de TGF - β e IL - 10, e ainda capaz de agir na restauração da homeostase imunológica pela modulação dos receptores Th1 e Th2 (Walker, 2008; Travers et al., 2011; Mahasneh e Mahasneh, 2017; Tahuer et al., 2017; Martens et al., 2018).

Segundo Oliveira et al. (2016), a administração tópica do probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 na doença periodontal experimental em ratos apresentou um efeito protetor contra a perda óssea e inserção conjuntiva, concordando com os resultados do presente estudo, em que pôde ser observado o efeito protetor na reabsorção óssea periapical e manutenção do tecido conjuntivo nos grupos experimentais onde utilizou-se esse probiótico, reforçado pelo fato das lesões periapicais serem significativamente menores no grupo VI do que no grupo V.

Apesar da diferença da cepa probiótica, da metodologia utilizada e da via de administração do probiótico, o estudo de Cosme-Silva et al. (2019) pode ser utilizado como base de comparação para o presente trabalho, uma vez que também avaliou a atividade do probiótico sobre a lesão periapical. Com a administração sistêmica por meio de gavagem dos probióticos *Lactobacillus rhamnosus* ou *Lactobacillus acidophilus* sobre a lesão periapical, esses autores demonstraram que as células inflamatórias se apresentaram em menor número nos grupos onde se utilizou os probióticos, em comparação ao controle e, ainda, histometricamente, a área da lesão apresentou proporções menores, corroborando com os achados do presente estudo.

Embora os trabalhos com probióticos publicados na literatura específica ou relacionados a tratamentos endodônticos tenham em sua grande maioria resultados positivos, não devem ser transportados ainda aos seres humanos. Destaca-se o fato de que no presente estudo, não foi realizada a remoção dos micro-organismos e tecidos necróticos dos canais radiculares, por meio do preparo biomecânico, devido às condições e limitações do modelo animal. A ausência de disponibilidade de limas endodônticas de calibre compatível com o diâmetro do canal radicular de ratos representa uma possível limitação deste estudo já que, para limitar ainda mais a progressão da lesão periapical, este seria um passo imprescindível. Além disso, é necessário ressaltar que a eficácia da ação dos probióticos depende do tipo de cepa utilizada, da frequência, da dosagem e, também, do modelo experimental utilizado.

Todavia, informações importantes foram obtidas no presente estudo, em relação ao potencial terapêutico do probiótico *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019, na lesão periapical. Foi possível evidenciar que a administração local do probiótico ocasionou diminuição da quantidade de células inflamatórias e atenuou o quadro patológico que, por conseguinte, se apresentou com menor gravidade. Estes resultados constituem uma análise inicial e essencial para investigar esta possível nova solução irrigadora, à base de probiótico. Desse modo, novos estudos são necessários para explorar o mecanismo de ação dos probióticos nas alterações periapicais, a padronização das cepas, dosagem e protocolo empregado, para que esta venha a ser considerada como uma nova possibilidade, menos agressiva para o organismo e com bons resultados, para irrigação durante o tratamento endodôntico.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Com base nas metodologias empregadas e nos resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- o probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 possui um potencial terapêutico em relação aos principais micro-organismos presentes da infecção do canal radicular, evidenciado pela comprovada atividade antimicrobiana *in vitro*; e
- a administração local como solução irrigadora de canais radiculares do probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 demonstrou potencial de diminuição do infiltrado inflamatório e da área da lesão periapical formada quando comparado aos grupos de irrigação com hipoclorito de sódio e sem tratamento. Em relação ao número de células TRAP-positivas, ocorreu uma redução significativa nos grupos de irrigação com probióticos, principalmente aos 21 dias, em comparação com os grupos com lesão sem nenhum tratamento e irrigação com hipoclorito de sódio.

Referências

REFERÊNCIAS

- Adl A, Hamed S, Sedigh Shams M, Motamedifar M, Sobhnamayan F. The ability of triple antibiotic paste and calcium hydroxide in disinfection of dentinal tubules. *Iran Endod J.* 2014;9(2):123-126.
- 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):12-16.
- Adl A, Shojaee NS, Motamedifar M. A Comparison between the Antimicrobial Effects of Triple Antibiotic Paste and Calcium Hydroxide Against *Enterococcus Faecalis*. *Iran Endod J.* 2012;7(3):149-155.
- Agarwal S, Tyagi P, Deshpande A, Yadav S, Jain V, Rana KS. Comparison of antimicrobial efficacy of aqueous ozone, green tea, and normal saline as irrigants in pulpectomy procedures of primary teeth. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2020;38(2):164-170.
- Aghazadeh Z, Poralibaba F, Yari Khosroushahi A. The prophylactic effect of *Acetobacter syzygii* probiotic species against squamous cell carcinoma. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2017;11(4):208-214.
- Ahmad IA, Alenezi MA. Root and Root Canal Morphology of Maxillary First Premolars: A Literature Review and Clinical Considerations. *J Endod.* 2016;42(6):861-872.
- Ahmed HM, Hashem AA. Accessory roots and root canals in human anterior teeth: a review and clinical considerations. *Int Endod J.* 2016;49(8):724-736.
- Akour A. Probiotics and COVID-19: is there any link? *Lett Appl Microbiol.* 2020;10.1111/lam.13334 (online ahead of print).
- Allard U, Stromberg U, Stromberg T. Endodontic treatment of experimentally induced apical periodontitis in dogs. *Endod Dent Traumatol.* 1987;3(5):240-244.
- Allaker RP, Stephen AS. Use of Probiotics and Oral Health. *Curr Oral Health Rep.* 2017;4(4):309-318.
- Al-Sebaei MO, Halabi AO, EEl-Hakim I. Sodium hypochlorite accident resulting in life-threatening airway obstruction during root canal treatment: a case report. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry* 2015;7 :41–44.
- Alp S, Baka ZM. Effects of probiotics on salivary *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* levels in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2018 Oct;154(4):517-523.
- Andersen M, Lund A, Andreasen JO, Andreasen FM. In vitro solubility of human pulp tissue in calcium hydroxide and sodium hypochlorite. *Endod Dent Traumatol.* 1992;8(3):104-108.
- Andolfatto C, da Silva GF, Cornélio AL, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Faria G, Bonetti-Filho I, Cerri PS. Biocompatibility of intracanal medications based on calcium hydroxide. *ISRN Dent.* 2012;2012: 904963.
- Angarita-Díaz MP, Forero-Escobar D, Cerón-Bastidas XA, Cisneros-Hidalgo CA, Dávila-Narvaez F, Bedoya-Correa CM, Freitas SC, Cabrera-Arango CL, Melo-Colina R. Effects of a functional food supplemented with probiotics on biological factors related to dental caries in children: a pilot study. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2020;21(1):161-169.

Arruda MEF, Neves MAS, Diogenes A, Mdala I, Guilherme BPS, Siqueira JF Jr, Rôças IN. Infection Control in Teeth with Apical Periodontitis Using a Triple Antibiotic Solution or Calcium Hydroxide with Chlorhexidine: A Randomized Clinical Trial. *J Endod*. 2018;44(10):1474-1479.

Assed S, Ito IY, Leonardo MR, Silva LA, Lopatin DE. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. *Endod Dent Traumatol*. 1996;12(2):66-69.

Barouei J, Moussavi M, Hodgson DM. Effect of maternal Probiotic intervention on HPA axis, immunity and gut microbiota in a rat model of irritable bowel syndrome. *PLoS ONE* 2012;7(10): e46051.

Barbosa AFS, Mello LM, Teixeira FG, Rached-Júnior FJA, Trindade TF, Raucci-Neto W. Comparative Effect of Rotary Microbrush Combined with Different Chemical Irrigants on Root Dentin Microhardness, Roughness and Bond Strength to an Epoxy-based Sealer. *Oral Health Prev Dent*. 2020;18(3):555-562.

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):155-159.

Bezerra da Silva RA, Nelson-Filho P, Lucisano MP, De Rossi A, de Queiroz AM, Bezerra da Silva LA. MyD88 knockout mice develop initial enlarged periapical lesions with increased numbers of neutrophils. *Int Endod J*. 2014;47(7):675-686.

Bharuka SB, Mandroli PS. Single- versus two-visit pulpectomy treatment in primary teeth with apical periodontitis: A double-blind, parallel group, randomized controlled trial. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2016;34(4):383-390.

Bohora A, Kokate S. Evaluation of the role of probiotics in endodontic treatment: A preliminary study. *J Int Soc Prevent Communit Dent* 2017;7: 46-51.

Bohora AA, Kokate SR, Khedkar S, Vankudre A. Antimicrobial activity of probiotics against endodontic pathogens: - A preliminary study. *Indian J Med Microbiol*. 2019 Jan-Mar;37(1):5-11.

Borsatto MC, Correa-Afonso AM, Lucisano MP, Bezerra da Silva RA, Paula-Silva FW, Nelson-Filho P, Bezerra da Silva LA. One-session root canal treatment with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): an in vivo study. *Int Endod J*. 2016;49(6):511-518.

Botton G, Pires CW, Cadona FC, Machado AK, Azzolin VF, Cruz IBM, Sagrillo MR, Praetzel JR. Toxicity of irrigating solutions and pharmacological associations used in pulpectomy of primary teeth. *International Endodontic Journal* 2016; 49: 746–754.

Braz-Silva PH, Bergamini ML, Mardegan AP, De Rosa CS, Hasseus B, Jonasson P. Inflammatory profile of chronic apical periodontitis: a literature review. *Acta Odontologica Scandinavica* 2019; 77:173-180.

Brooks I. Microbiology and management of endodontic infections in children. *J Clin Pediatr Dent* 2003; 28(1): 13-18.

Bustamante M, Oomah BD, Mosi-Roa Y, Rubilar M, Burgos-Díaz C. Probiotics as an Adjunct Therapy for the Treatment of Halitosis, Dental Caries and Periodontitis. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2020;12(2):325-334.

Chitprasert P, Sudsai P, Rodklongtan A. Aluminum carboxymethyl cellulose–rice bran microcapsules: Enhancing survival of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5. *Carbohydr Polym* 2012;90(1):78-86.

Chhabra A, Dogra A, Garg N, Bhatia R, Sharma S, Thakur S. Clinical and radiographic assessment of periapical pathology in single versus multivisit root canal treatment: An in vivo study. *J Conserv Dent*. 2017;20(6):429-433.

Chaudhry S, Yadav S, Talwar S, Verma M. Effect of EndoActivator and Er,Cr:YSGG laser activation of Qmix, as final endodontic irrigant, on sealer penetration: A Confocal microscopic study. *J Clin Exp Dent*. 2017;9(2): e218-2.

Chiniforush N, Pourhajibagher M, Shahabi S, Kosarieh E, Bahador A. Can Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) Enhance the Endodontic Treatment?. *J Lasers Med Sci*. 2016;7(2):76-85.

Chrepa V, Kotsakis GA, Pagonis TC, Hargreaves KM. The effect of photodynamic therapy in root canal disinfection: a systematic review. *J Endod*. 2014;40(7):891-898.

Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz ÍO, de Araújo Lopes JM, Penha de Oliveira SH, Sivieri Araújo G, Gomes-Filho JE. Cytotoxicity, Biocompatibility, and Biomineralization of the New High-plasticity MTA Material. *J Endod*. 2017;43(5):774-778.

Cosme-Silva L, Dal-Fabbro R, Cintra LTA, Dos Santos VR, Duque C, Ervolino E, Mogami Bomfim S, Gomes-Filho JE. Systemic administration of probiotics reduces the severity of apical periodontitis. *Int Endod J* 2019; 52(12): 1738-1749.

Cosme-Silva L, Dal-Fabbro R, Cintra LTA, Ervolino E, Piazza F, Mogami Bomfim S, Duarte PCT, Junior VEDS, Gomes-Filho JE. Reduced bone resorption and inflammation in apical periodontitis evoked by dietary supplementation with probiotics in rats. *Int Endod J*. 2020;53(8):1084-1092.

Cohenca N, Romualdo PC, da Silva LA, da Silva RA, de Queiroz AM, De Rossi A, Nelson-Filho P. Tissue response to root canal irrigation systems in dogs' teeth with apical periodontitis. *Clin Oral Investig*. 2015 Jun;19(5):1147-1156.

Cohenca N, Silva LA, Silva RA, Nelson-Filho P, Heilborn C, Watanabe E, Saraiva MC. Microbiological evaluation of different irrigation protocols on root canal disinfection in teeth with apical periodontitis: an in vivo study. *Braz Dent J*. 2013;24(5):467-473.

Da Silva RA, Leonardo MR, da Silva LA, Faccioli LH, de Medeiros AI. Effect of a calcium hydroxide-based paste associated to chlorhexidine on RAW 264.7 macrophage cell line culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;106(5):e44-e51.

De Castro Rizzi-Maia C, Maia-Filho EM, Nelson-Filho P, Segato RA, de Queiroz AM, Paula-Silva FW, da Silva Pereira SM, Borges AH, da Silva LA. Single vs Two-session Root Canal Treatment: A Preliminary Randomized Clinical Study using Cone Beam Computed Tomography. *J Contemp Dent Pract*. 2016;1;17(7):515-521.

De Rossi A, Silva LA, Leonardo MR, Rocha LB, Rossi MA. Effect of rotary or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide 1% chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;99(5):628-636.

De-Jesus-Soares A, Prado MC, Nardello LCL, Pereira AC, Cerqueira-Neto ACCL, Nagata JY, Martinez EF, Frozoni M, Gomes BPFA, Pinheiro ET. Clinical and Molecular Microbiological Evaluation of Regenerative Endodontic Procedures in Immature Permanent Teeth. *J Endod*. 2020 Jul 15;S0099-2399(20)30492-1 (online ahead of print).

Dahlen G, Leonhardt A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21: 6–11.

Dhar D, Mohanty A. Gut microbiota and Covid-19 - possible link and implications. *Virus Res.* 2020;285:198018.

Di Cerbo A, Palmieri B, Aponte M, Morales-Medina JC, Iannitti T. Mechanisms and therapeutic effectiveness of *Lactobacilli*. *J Clin Pathol.* 2016;69(3):187-203.

Dioguardi M, Di Gioia G, Illuzzi G, Laneve E, Cocco A, Troiano G. Endodontic irrigants: Different methods to improve efficacy and related problems. *Eur J Dent* 2018; 12:459-466.

Diogo P, Fernandes C, Caramelo F, Mota M, Miranda IM, Faustino MAF, Neves MGPMS, Uliana MP, de Oliveira KT, Santos JM, Gonçalves T. Antimicrobial Photodynamic Therapy against Endodontic *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* Mono and Mixed Biofilms in the Presence of Photosensitizers: A Comparative Study with Classical Endodontic Irrigants. *Front Microbiol.* 2017;30;8:498.

Divia AR, Nair MG, Varughese JM, Kurien S. A comparative evaluation of *Morinda citrifolia*, green tea polyphenols, and Triphala with 5% sodium hypochlorite as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*: An *in vitro* study. *Dent Res J* 2018; 15:117-122.

Didilescu AC, Cristache CM, Andrei M, Voicu G, Perlea P. The effect of dental pulp-capping materials on hard-tissue barrier formation: A systematic review and meta-analysis. *J Am Dent Assoc.* 2018;149(10):903-917.

Donyavi Z, Ghahari P, Esmailzadeh M, Kharazifard M, Yousefi-Mashouf R. Antibacterial Efficacy of Calcium Hydroxide and Chlorhexidine Mixture for Treatment of Teeth with Primary Endodontic Lesions: A Randomized Clinical Trial. *Iranian Endodontic Journal* 2016;11(4): 255-260.

Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002;13(2):113-117.

Estrela C, Holland R, Estrela CR, Alencar AH, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Characterization of successful root canal treatment. *Braz Dent J.* 2014;25(1):3-11.

El-Sayed H, Aly Y, Elgamily H, Nagy MM. A Promising Probiotic Irrigant: An *In Vitro* Study. *Open Access Maced J Med Sci.* 2019 Jan 28;7(3):407-411.

Faria G, Celes MR, De Rossi A, Silva LA, Silva JS, Rossi MA. Evaluation of chlorhexidine toxicity injected in the paw of mice and added to cultured I929 fibroblasts. *J Endod.* 2007 Jun;33(6):715-722.

Ferreira AM, Carvalho MJ, Sequeira MM, Silva AM, Carvalho LH. Chemical constituents of *Euphorbia hyberna* L. (*Euphorbiaceae*). *Nat Prod Res.* 2013;27(3):282-285.

Galofré M, Palao D, Vicario M, Nart J, Violant D. Clinical and microbiological evaluation of the effect of *Lactobacillus reuteri* in the treatment of mucositis and peri-implantitis: A triple-blind randomized clinical trial. *Journal of periodontal research* 2018; 53(3), 378-390.

Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J.* 2013;24(2):89-102.

- Gordon DM. The potential of bacteriocin-producing probiotics and associated caveats. *Future Microbiol.* 2009 Oct;4(8):941-943.
- Graunaite I, Lodiene G, Maciulskiene V. Pathogenesis of Apical Periodontitis: A Literature Review. *J Oral Maxillofac Res* 2011 ;2(4): e1.
- Gruner D, Paris S, Schwendicke F. Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2016;48: 16-25.
- Gursoy H, Ozcakil-Tomruk C, Tanalp J, Yilmaz S. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Investig.* 2013;17(4):1113-1125.
- Gupta G. Probiotics and periodontal health. *Journal of Medicine and Life* 2011; 4: 387-394.
- Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am.* 2010 Apr;54(2):291-312.
- Hajela N, Chattopadhyay S, Nair GB, Ganguly NK. Intestinal microbiota and vaccine efficacy in children from resource poor settings - potential impact for the usefulness of probiotics? *Benef Microbes.* 2020 Aug 12;11(4):319-328.
- Hartmann RC, Neuvald L, Barth V, de Figueiredo JAP, de Oliveira SD, Scarparo RK, et al. Antimicrobial efficacy of 0.5% peracetic acid and EDTA with passive ultrasonic or manual agitation in an *Enterococcus faecalis* biofilm model. *Aust Endod J.* 2018.
- Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *J Endod.* 1988;14(3):125-127.
- Hasan A, Paray BA, Hussain A, Qadir FA, Attar F, Aziz FM, Sharifi M, Derakhshankhah H, Rasti B, Mehrabi M, Shahpasand K, Saboury AA, Falahati M. A review on the cleavage priming of the spike protein on coronavirus by angiotensin-converting enzyme-2 and furin. *J Biomol Struct Dyn.* 2020;22: 1-9.
- Haukioja A, Yli-KnuuttinH, Loimaranta V, Kari K, Ouwehand AC, Meurman JH, Tenovou J. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2006: 21: 326–332.
- Heithersay GS. Periapical repair following conservative endodontic therapy. *Aust Dent J.* 1970;15(6):511-518.
- Hidalgo LR, da Silva LA, Nelson-Filho P, da Silva RA, de Carvalho FK, Lucisano MP, Novaes AB Jr. Comparison between one-session root canal treatment with aPDT and two-session treatment with calcium hydroxide-based antibacterial dressing, in dog's teeth with apical periodontitis. *Lasers Med Sci.* 2016 Sep;31(7):1481-1491.
- Hidalgo LRDC, Silva LABD, Leoni GB, Mazzi-Chaves JF, Carvalho EEDS, Consolaro A, Sousa-Neto MD. Mechanical Preparation Showed Superior Shaping Ability than Manual Technique in Primary Molars - A Micro-Computed Tomography Study. *Braz Dent J.* 2017;28(4):453-460.
- Holland R, Gomes JE Filho, Cintra LTA, Queiroz ÍOA, Estrela C. Factors affecting the periapical healing process of endodontically treated teeth. *J Appl Oral Sci.* 2017;25(5):465-476.
- Hong L, Hai J, Yan-Yan H, Shenghui Y, Benxiang H. [Colonization of *Porphyromonas endodontalis* in primary and secondary endodontic infections]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2015;33(1):88-92.

Huffaker SK, Safavi K, Spangberg LS, Kaufman B. Influence of a passive sonic irrigation system on the elimination of bacteria from root canal systems: a clinical study. *J Endod.* 2010;36(8):1315-1318.

Ikram S, Hassan N, Raffat MA, Mirza S, Akram Z. Systematic review and meta-analysis of double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trials using probiotics in chronic periodontitis. *J Investig Clin Dent.* 2018;9(3):e12338.

Iqbal A. Antimicrobial irrigants in the endodontic therapy. *Int J Health Sci (Qassim)* 2012; 6:186-192.

Ito IY, Junior FM, Paula-Silva FW, Da Silva LA, Leonardo MR, Nelson-Filho P. Microbial culture and checkerboard DNA-DNA hybridization assessment of bacteria in root canals of primary teeth pre- and post-endodontic therapy with a calcium hydroxide/chlorhexidine paste. *Int J Paediatr Dent.* 2011;21(5):353-360.

Jasrotia A, Bhagat K, Bhagat N, Bhagat RK. Comparison of Five Different Irrigation Techniques on Smear Layer Removal in Apical Thirds of Root Canals of Mandibular First Premolar: A Scanning Electron Microscopic Study. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2019;9(6):630-636.

Jiang Q, Stamatova I, Kainulainen V, Korpela R, Meurman JH. Interactions between *Lactobacillus rhamnosus* GG and oral micro-organisms in an in vitro biofilm model. *BMC Microbiology* 2016; 16:149,1-11.

Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol* 1999; 44:55-66.

Keller MK, Hasslöf P, Dahlén G, Stecksén-Blicks G, Twetman S. Probiotic Supplements (*Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and ATCC PTA 5289) Do Not Affect Regrowth of *Mutans Streptococci* after Full-Mouth Disinfection with Chlorhexidine: A Randomized Controlled Multicenter Trial. *Caries Res* 2012;46: 140–146.

Keller MK, Hasslöf P, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Co-aggregation and growth inhibition of probiotic *lactobacilli* and clinical isolates of *mutans streptococci*: An in vitro study, *Acta Odontologica Scandinavica* 2011; 69:5, 263-268.

Kermeoglu F, Aksoy U, Kalender A, Oztan MD, Oguz EI, Kıyan M. Determination of the Minimum Inhibitory Concentrations of Alexidine and Chlorhexidine Against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: An In Vitro Study. *Cureus* 2018;10(2):2221, 1-8.

Khoroushi M, Kachuie M. Prevention and treatment of white spot lesions in orthodontic patients. *Contemp Clin Dent* 2017; 8:11-9.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010;8(6): e1000412.

Kumar VN, Krishnamurthy M, Poorni S, Patil S, Raj AT. Probiotics in Caries Prevention. *J Contemp Dent Pract.* 2018;1;19(2):123-124.

La Rosa GRM, Gattuso G, Pedullà E, Rapisarda E, Nicolosi D, Salmeri M. Association of oral dysbiosis with oral cancer development. *Oncol Lett.* 2020;19(4):3045-3058.

Lakhani AA, Sekhar KS, Gupta P, Tejolatha B, Gupta A, Kashyap S, Desai V, Farista S. Efficacy of Triple Antibiotic Paste, Moxifloxacin, Calcium Hydroxide And 2% Chlorhexidine Gel In Elimination of *E. Faecalis*: An In vitro Study. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(1):ZC06-ZC09.

- Lee J, Lorenzo D, Rawlins T, Cardo VTA. Sodium Hypochlorite Extrusion: An Atypical Case of Massive Soft Tissue Necrosis. *J Oral Maxillofac Surg* 2011; 67: 1776-1781.
- Lee YL, Hong CY, Kok SH, Hou KL, Lin YT, Chen MH, Wang CC, Lin SK. An extract of green tea, epigallocatechin-3-gallate, reduces periapical lesions by inhibiting cysteine-rich 61 expression in osteoblasts. *J Endod*. 2009;35(2):206-211.
- Leonardo MR, da Silva LA, Tanomaru Filho M, Bonifácio KC, Ito IY. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *J Endod*. 2000;26(7):391-394.
- Leonardo MR, Flores DS, de Paula E Silva FW, de Toledo Leonardo R, da Silva LA. A comparison study of periapical repair in dogs' teeth using RoekoSeal and AH plus root canal sealers: a histopathological evaluation. *J Endod*. 2008;34(7):822-825.
- Leonardo MR, Hernandez ME, Silva LA, Tanomaru-Filho M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102(5):680-685.
- Leonardo MR, Salgado AA, da Silva LA, Tanomaru Filho M. Apical and periapical repair of dogs' teeth with periapical lesions after endodontic treatment with different root canal sealers. *Pesqui Odontol Bras*. 2003 Jan-Mar;17(1):69-74.
- Li N, Gao S, Tong J, Yu Y, Zhang Q, Xu C. Probiotics as a functional food ingredient in allergic diseases: regulation of CD4+ T helper cell differentiation. *Crit Rev Microbiol*. 2020 Jul 28:1-12.
- Lima CC, Conde Júnior AM, Rizzo MS, Moura RD, Moura MS, Lima MD, Moura LF. Biocompatibility of root filling pastes used in primary teeth. *Int Endod J*. 2015;48(5):405-16.
- Lin TH, Lin CH, Pan TM. The implication of probiotics in the prevention on dental caries. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102(2):577-586.
- Liu T, Huang Z, Ju Y, Tang X. Bactericidal efficacy of three parameters of Nd: YAP laser irradiation against *Enterococcus faecalis* compared with NaOCl irrigation. *Lasers Med Sci*. 2018.
- Maekawa T and Hajishengallis G. Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *J Periodontal Res*. 2014 December; 49(6): 785–791.
- 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;51(10):1118-29.
- Mahasneh SA and Mahasneh AD. Probiotics: A Promising Role in Dental Health. *Dent. J*. 2017; 5: 26,1-10.
- Markowiak P, Ślizewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*. 2017 Sep 15;9(9):1021.
- Marsh PD. Microbiology of Dental Plaque Biofilms and Their Role in Oral Health and Caries. *Dent Clin N Am* 2010; 54:441–454.
- Martin-Cabezas R, Davideau JL, Tenenbaum H, Huck O. Clinical efficacy of probiotics as an adjunctive therapy to non-surgical periodontal treatment chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2016;43(6):520-530.

- Matsubara VH, Bandara HM, Ishikawa KH, Mayer MP, Samaranayake LP. The role of probiotic bacteria in managing periodontal disease: a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2016;14(7):643-655.
- McCabe LR, Parameswaran N. Advances in Probiotic Regulation of Bone and Mineral Metabolism. *Calcif Tissue Int.* 2018;102(4):480-488.
- Messora MR, Oliveira LF, Foureaux RC, Taba M Jr, Zangerônimo MG, Furlaneto FA, Pereira LJ. Probiotic therapy reduces periodontal tissue destruction and improves the intestinal morphology in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontol.* 2013 Dec;84(12):1818-1826.
- Messora MR, Pereira LJ, Foureaux R, Oliveira LFF, Sordia CG, Alvesa AJN, Napimoga MH, Nagatad MJH, Ervolino E, Furlaneto FAC. Favourable effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on experimental periodontitis in rats. *Archives of Oral Biology* 2016; 66: 108–119.
- Metzger Z, Solomonov M, Kfir A. The role of mechanical instrumentation in the cleaning of root canals. *Endodontic Topics* 2013; 29: 87–109.
- Meurman JH, Stamatova I. Probiotics: contributions to oral health. *Oral Diseases.* 2007; 13: 443–451.
- Miranda RG, Santos EB, Souto RM, Gusman H, Colombo APV. Ex vivo antimicrobial efficacy of the EndoVac® system plus photodynamic therapy associated with calcium hydroxide against intracanal *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal* 2013; 46: 499–505.
- Mohammadi Z, Jafarzadeh H, Shalavi S, Kinoshita JI. Unusual Root Canal Irrigation Solutions. *J Contemp Dent Pract* 2017;18(5):415-420.
- Morais AHA, Passos TS, Maciel BLL, da Silva-Maia JK. Can Probiotics and Diet Promote Beneficial Immune Modulation and Purine Control in Coronavirus Infection? *Nutrients.* 2020;10;12(6):1737.
- Morales A, Gandolfo A, Bravo J, Carvajal P, Silva N, Godoy C, Garcia-Sesnich J, Hoare A, Diaz P, Gamonal J. Microbiological and clinical effects of probiotics and antibiotics on nonsurgical treatment of chronic periodontitis: a randomized placebocontrolled trial with 9-month follow-up. *J Appl Oral Sci* 2018; 26: 1-9.
- Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan AU, Yan A, Cheung GSP. Biofilms in Endodontics-Current Status and Future Directions. *Int J Mol Sci.* 2017;11;18(8):1748.
- Nelson Filho P, Silva LA, Leonardo MR, Utrilla LS, Figueiredo F. Connective tissue responses to calcium hydroxide-based root canal medicaments. *Int Endod J.* 1999;32(4):303-311.
- 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):694-696.
- Nole KLB, Yim E, Keri JE. Probiotics and prebiotics in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 2014;71(4):814-821.
- Nowicka A, Wilk G, Lipski M, KołECKI J, Buczkowska-Radlińska J. Tomographic Evaluation of Reparative Dentin Formation after Direct Pulp Capping with Ca(OH)₂, MTA, Biodentine, and Dentin Bonding System in Human Teeth. *J Endod.* 2015;41(8):1234-1240.

- Oelschlaeger TA. Mechanisms of probiotic actions - A review. *Int J Med Microbiol.* 2010 Jan;300(1):57-62.
- Oliveira LD, Leão MV, Carvalho CA, Camargo CH, Valera MC, Jorge AO, Unterkircher CS. In vitro effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. *J Dent.* 2005;33(2):107-114.
- Oliveira LF, Salvador SL, Silva PHF, Furlaneto FAC, Figueiredo L, Casarin R, Ervolino E, Palioto DB, Souza SLS, Taba MJ, Novaes ABNJ, Messora MR. Benefits of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* Probiotic in experimental periodontitis. *J Periodontol* 2017; 88: 197-208.
- Oliveira CP, da Silva JA, de Siqueira-Júnior JP. Nature of the antimicrobial activity of *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium animalis* against foodborne pathogenic and spoilage microorganisms. *Nat Prod Res.* 2015;29(22):2133-6.
- Pai S, Vivekananda Pai AR, Thomas MS, Bhat V. Effect of calcium hydroxide and triple antibiotic paste as intracanal medicaments on the incidence of inter-appointment flare-up in diabetic patients: An in vivo study. *J Conserv Dent.* 2014;17(3):208-211.
- Paiva SS, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC, Rachid CT, Rosado AS. Molecular microbiological evaluation of passive ultrasonic activation as a supplementary disinfecting step: a clinical study. *J Endod.* 2013;39(2):190-194.
- Park OJ, Jeong MH, Lee EH, Cho MR, Hwang J, Cho S, Yun CH, Han SH, Kim SY. A Pilot Study of Chronological Microbiota Changes in a Rat Apical Periodontitis Model. *Microorganisms* 2020 ;8(8):1174.
- Pawar R, Alqaied A, Safavi K, Boyko J, Kaufman B. Influence of an apical negative pressure irrigation system on bacterial elimination during endodontic therapy: a prospective randomized clinical study. *J Endod.* 2012;38(9):1177-1181.
- Pazzini CA, Pereira LJ, Silva TA, Montalvany-Antonucci CC, Macar S, Marques LS, Paiva SM. Probiotic consumption decreases the number of osteoclasts during orthodontic movement in mice. *Archives of oral biology* 2017; 79: 30-34.
- Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *J Physiol.* 2020 Jul 14.
- Pereira MS, Faria G, Bezerra da Silva LA, Tanomaru-Filho M, Kuga MC, Rossi MA. Response of mice connective tissue to intracanal dressings containing chlorhexidine. *Microsc Res Tech* 2012 ;75(12):1653-1658.
- Peters OA. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. *J Endod.* 2004;30(8):559-567.
- Plotino G, Cortese T, Grande NM, Leonardi DP, Di Giorgio G, Testarelli L, Gambarini G. New Technologies to Improve Root Canal Disinfection. *Braz Dent J.* 2016;27(1):3-8.
- Plotino G, Grande NM, Mercade M. Photodynamic therapy in endodontics. *Int Endod J.* 2019;52(6):760-774.

- Pucinelli CM, Silva LABD, Cohenca N, Romualdo PC, Silva RABD, Consolaro A, Queiroz AM, Nelson P Filho. Apical Negative Pressure irrigation presents tissue compatibility in immature teeth. *J Appl Oral Sci.* 2017 Nov-Dec;25(6):612-619.
- Pudgar P, Povšič K, Čuk K, Seme K, Petelin M, Gašperšič R. Probiotic strains of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum* as adjunct to non-surgical periodontal therapy: 3-month results of a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Investig.* 2020 Jul 14 (Online ahead of print).
- Ramezanalil F, Samimi S, Kharazifard M, Afkhami F. The in Vitro Antibacterial Efficacy of Persian Green Tea Extract as an Intracanal Irrigant on *Enterococcus faecalis* Biofilm. *Iran Endod J.* 2016;11(4):304-308.
- Ramamoorthi S, Nivedhitha MS, Divyanand MJ. Comparative evaluation of postoperative pain after using endodontic needle and EndoActivator during root canal irrigation: A randomised controlled trial. *Aust Endod J.* 2015;41(2):78-87.
- Reid G. Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2016 Feb;30(1):17-25.
- Ricoldi MST, Furlaneto FAC, Oliveira LFF, Teixeira GC, Pischiotini JP, Moreira ALG, Ervolino E, Oliveira MN, Bogsan CSB, Salvador SL, Messoria MR. Effects of the probiotic *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* on the non-surgical treatment of periodontitis. A histomorphometric, microtomographic and immunohistochemical study in rats. *PLoS ONE* 2017; 12(6): 1-15.
- Rius L, Arias A, Aranguren JM, Romero M, de Gregorio C. Analysis of the smear layer generated by different activation systems: an in vitro study. *Clin Oral Investig.* 2020 Jun 9 (online ahead of print).
- Rödig T, Zimmermann F, Konietschke F, Sydow HG, Wiegand A. Comparison of the antibacterial efficacy of sonic- and two ultrasonic-activated irrigation techniques in reducing intracanal *Enterococcus faecalis* populations. *Quintessence Int.* 2018:1-9.
- Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J Endod.* 1994;20(3):127-129.
- Samaranayake L, Matsubara VH. Normal Oral Flora and the Oral Ecosystem. *Dent Clin N Am* 2017; 61:199–215.
- Sermeño RF, Silva LAB, Herrera H, Herrera H, Silva RAB, Leonardo MR. Tissue damage after sodium hypochlorite extrusion during root canal treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108:46-49.
- Sasaki H, Balto K, Kawashima N, et al. Gamma interferon (IFN-gamma) and IFNgamma-inducing cytokines interleukin-12 (IL-12) and IL-18 do not augment infection-stimulated bone resorption in vivo. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11:106 –110.
- Sánchez-Sanhueza G, Bello-Toledo H, González-Rocha G, Gonçalves AT, Valenzuela V, Gallardo-Escárate C. Metagenomic study of bacterial microbiota in persistent endodontic infections using Next-generation sequencing. *Int Endod J.* 2018 Dec;51(12):1336-1348.
- Sangalli J, Júnior EGJ, Bueno CRE, Jacinto RC, Sivieri-Araújo G, Filho JEG, Cintra LTÂ, Junior ED. Antimicrobial activity of *Psidium cattleianum* associated with calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: an in vitro study. *Clin Oral Investig.* 2018;22(6):2273-9.

Silva LA, Leonardo MR, Assed S, Tanomaru Filho M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. *Braz Dent J.* 2004;15(2):109-114.

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):94-98.

Silva LABD, Linhares ML, Silva RABD, Nelson-Filho P, Lucisano MP, Pucinelli CM, Carvalho FK, Cohenca N. Negative Pressure Irrigation Presents Mineralizing Potential in Dogs' Immature Teeth with Periapical Lesion. *Braz Dent J.* 2020 Jan-Feb;31(1):37-43.

da Silva LA, Nelson-Filho P, da Silva RA, Flores DS, Heilborn C, Johnson JD, Cohenca N. Revascularization and periapical repair after endodontic treatment using apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing in dogs' teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 May;109(5):779-787.

da Silva RA, Ferreira PD, De Rossi A, Nelson-Filho P, Silva LA. Toll-like receptor 2 knockout mice showed increased periapical lesion size and osteoclast number. *J Endod.* 2012 Jun;38(6):803-813.
Silva LA, Romualdo PC, Silva RA, et al. Antibacterial Effect of Calcium Hydroxide With or Without Chlorhexidine as Intracanal Dressing in Primary Teeth With Apical Periodontitis. *Pediatr Dent.* 2017;39(1):28-33.

Siqueira JF Jr., Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2 – Redefining the endodontic microbiota. *J Endod* 2005; 31:488-498.

Siqueira JF, Roças I. Present status and future directions in endodontic microbiology. *Endodontic Topics* 2014; 30: 3–22.

Siqueira Junior JF, Rôças IDN, Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Ricucci D. Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. *Braz Oral Res* 2018;18 (32): e65.

Shetty SR, Al-Bayati SAAF, Narayanan A, Hamed MS, Abdemagyd HAE, Shetty P. Sodium hypochlorite accidents in dentistry. A systematic review of published case reports. *Stomatologija.* 2020;21(1):17-22.

Siddharth M, Singh P, Gupta R, Sinha A, Shree S, Sharma K. A Comparative Evaluation of Subgingivally Delivered 2% Curcumin and 0.2% Chlorhexidine Gel Adjunctive to Scaling and Root Planing in Chronic Periodontitis. *J Contemp Dent Pract.* 2020;21(5):494-499.

Schmitter T, Fiebich BL, Fischer JT, Gajfulin M, Larsson N, Rose T, Goetz MR. Ex vivo anti-inflammatory effects of probiotics for periodontal health. *Journal of oral microbiology* 2018; 10(1), 1502027.

Schröder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J Dent Res.* 1985;64 Spec No:541-548.

Slaughter RJ, Watts M, Vale JA, Grieve JR, Schep LJ. The clinical toxicology of sodium hypochlorite. *Clin Toxicol (Phila).* 2019 May;57(5):303-311.

Slutzky-Goldberg I, Hanut A, Matalon S, Baev V, Slutzky H. The effect of dentin on the pulp tissue dissolution capacity of sodium hypochlorite and calcium hydroxide. *J Endod.* 2013;39(8):980-983.

de Sousa Reis M, Scarparo RK, Steier L, de Figueiredo JAP. Periradicular inflammatory response, bone resorption, and cementum repair after sealing of furcation perforation with mineral trioxide aggregate (MTA Angelus™) or Biodentine™. *Clinical oral investigations* 2019, 1-9.

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):177-181.

Stanisic D, Jovanovic M, George AK, Homme RP, Tyagi N, Tyagi SC, Singh M. Gut microbiota and the periodontal disease: role of hyperhomocysteinemia. *Can J Physiol Pharmacol.* 2020 Jul 24 (Online ahead of print).

Sunmola AA, Ogbole OO, Faleye TOC, Adetoye A, Adeniji JA, Ayeni FA. Antiviral potentials of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus amylovorus*, and *Enterococcus hirae* against selected Enterovirus. *Folia Microbiol (Praha).* 2019;64(2):257-264.

Susila A, Minu J. Activated Irrigation vs. Conventional non-activated Irrigation in Endodontics - A Systematic Review. *Eur Endod J.* 2019;4(3):96-110.

Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J.* 2003 Nov;36(11):733-739.

Tanomaru-Filho M, Silveira BR, Martelo RB, Guerreiro-Tanomaru JM. Influence of Concentration and Agitation of Sodium Hypochlorite and Peracetic Acid Solutions on Tissue Dissolution. *J Contemp Dent Pract.* 2015 Nov 1;16(11):876-879.

Teixeira CS, Felipe MCS, Felipe WT. The effect of application time of EDTA and NaOCl on intracanal smear layer removal: an SEM analysis. *International Endodontic Journal* 2005; 38: 285–290.

Tenore G, Palaia G, Ciolfi C, Mohsen M, Battisti A, Romeo U. Subcutaneous emphysema during root canal therapy: endodontic accident by sodium hypochlorite. *Ann Stomatol (Roma).* 2017;8(3):117-122.

Tong X, Qi X, Mao R, et al. Construction of functional curdlan hydrogels with bio-inspired polydopamine for synergistic periodontal antibacterial therapeutics. *Carbohydr Polym.* 2020; 245:116585.

Trindade AC, De Figueiredo JA, Steier L, Weber JB. Photodynamic therapy in endodontics: a literature review. *Photomed Laser Surg.* 2015;33(3):175-182.

Trindade AC, de Figueiredo JAP, de Oliveira SD, Barth Junior VC, Gallo SW, Follmann C, Wolle CFB, Steier L, Morgental RD, Weber JBB. Histopathological, Microbiological, and Radiographic Analysis of Antimicrobial Photodynamic Therapy for the Treatment of Teeth with Apical Periodontitis: A Study in Rats' Molars. *Photomed Laser Surg.* 2017;35(7):364-371.

Türkün M, Cengiz T. The effects of sodium hypochlorite and calcium hydroxide on tissue dissolution and root canal cleanliness. *Int Endod J.* 1997;30(5):335-342.

Twetman L, Larsen U, Fiehn NE, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Coaggregation between probiotic bacteria and caries-associated strains: An *in vitro* study, *Acta Odontologica Scandinavica* 2009; 67: 284-288.

Uzunoglu-Özyürek E, Dik Güzel C, Dogan Buzoglu H. Effect of different irrigation methods in the presence of a separated instrument: an *in vitro* study. *Acta Odontol Scand.* 2020;27:1-8.

- Vera J, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B, Cruz AG. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod.* 2012;38(8):1040-1052.
- Vestman NR, Chen T, Holgerson PL, Öhman C, Ingegerd Johansson I. Oral Microbiota Shift after 12-Week Supplementation with *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and PTA 5289; A Randomized Control Trial. *PLoS ONE* 2015; 10(5): 1-18.
- Villavicencio J, Villegas LM, Arango MC, Arias S, Triana F. Effects of a food enriched with probiotics on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. Salivar counts in preschool children: a cluster randomized trial. *J Appl Oral Sci.* 2018;14;26:e20170318.
- Vives-Soler A, Chimenos-Küstner E. Effect of probiotics as a complement to non-surgical periodontal therapy in chronic periodontitis: a systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2020;1;25(2):e161-7.
- Wang Z, Xue K, Bai M, Deng Z, Gan J, Zhou G, Qian H, Bao N, Zhao J. Probiotics protect mice from CoCrMo particles-induced osteolysis. *Int J Nanomedicine* 2017; 27(12): 5387-5397.
- Walker WA. Mechanisms of action of probiotics. *Clin Infect Dis* 2008 ;46: 87-91.
- Widjiastuti I, Rudyanto D, Yuanita T, Bramantoro T, Aries Widodo W. Cleaning Efficacy of Root Canal Irrigation with Positive and Negative Pressure System. *Iran Endod J.* 2018;13(3):398-402.
- Xu K, Cai H, Shen Y, Ni Q, Chen Y, Hu S, Li J, Wang H, Yu L, Huang H, Qiu Y, Wei G, Fang Q, Zhou J, Sheng J, Liang T, Li L. Management of corona virus disease-19 (COVID-19): the Zhejiang experience. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2020;21;49(1):0.
- Yamamoto-Silva FP, Silva LR, de Lima KL, Silva MA, Estrela C, de Freitas Silva BS. Low-level laser therapy as adjunctive treatment for a sodium hypochlorite accident: a case report. *Gen Dent.* 2019;67(4):63-66.
- Zaura E, Twetman S. Critical Appraisal of Oral Pre- and Probiotics for Caries Prevention and Care. *Caries Res.* 2019;53(5):514-526.
- Zarei M, Javidi M, Gharechahi M, Kateb M, Zare R, Kelagari ZS. Tissue Reaction to Different Types of Calcium Hydroxide Paste in Rat. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2016;57(2):57-64.
- Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006 May;32(5):389-398.
- Zehnder M, Lehnert B, Schönenberger K, Waltimo T. Spüllösungen und medikamentöse Einlagen in der Endodontie [Irrigants and intracanal medicaments in endodontics]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2003;113(7):756-763.

Anexo

ANEXO A**APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

58



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado “**Análise Microscópica e Efeito na Microbiota Bucal e Radicular de Ratos após o Uso Sistêmico e Local de Probiótico**”, Protocolo nº 2018.1.782.58.0, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 12/12/2018.

Vigência do Projeto	01/02/2019 a 01/02/2022
Espécie/Linhagem	Rato isogênico / Wistar Sprague-Dawley
Nº de animais	140
Peso/Idade	170-250g / 6-8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – PUSP-RP

Ribeirão Preto, 12 de dezembro de 2018.

Prof. Dr. Michel Reis Messoria

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais