



ARIANE CASSIA SALUSTIANO MARINHO

**“EFEITO DO PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO NOS NÍVEIS DE
ENDOTOXINAS EM INFECÇÕES ENDODÔNTICAS PRIMÁRIAS E AVALIAÇÃO
DO POTENCIAL INFLAMATÓRIO DO CONTEÚDO INFECCIOSO QUANTO À
PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS”**

PIRACICABA
2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

ARIANE CASSIA SALUSTIANO MARINHO

**“EFEITO DO PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO NOS NÍVEIS DE
ENDOTOXINAS EM INFECÇÕES ENDODÔNTICAS PRIMÁRIAS E AVALIAÇÃO
DO POTENCIAL INFLAMATÓRIO DO CONTEÚDO INFECCIOSO QUANTO À
PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS”**

Orientadora: Prof^a Dr^a Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Odontologia de Piracicaba,
da UNICAMP para obtenção do Título de
Mestra em Clínica Odontológica, Área de
Endodontia.

Este exemplar corresponde à versão final
da Dissertação defendida pela aluna Ariane
Cassia Salustiano Marinho e orientada pela
Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de
Almeida Gomes

PIRACICABA

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

M338e

Marinho, Ariane Cassia Salustiano, 1985-

Efeito do preparo químico-mecânico nos níveis de endotoxinas em infecções endodônticas primárias e avaliação do potencial inflamatório do conteúdo infeccioso quanto à produção de citocinas pró-inflamatórias / Ariane Cassia Salustiano Marinho. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo De Almeida Gomes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Bactérias. 2. Citocinas. 3. Endotoxinas. 4. Hipoclorito de sódio. 5. Clorexidina. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida, 1961- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Effect of chemo-mechanical preparation in the levels of endotoxin in primary endodontic infections and evaluation of the inflammatory potential of the infectious content regarding the production of pro-inflammatory cytokines

Palavras-chave em Inglês:

Bacteria

Cytokine

Endotoxin

Sodium hypochlorite

Chlorhexidine

Área de concentração: Endodontia

Titulação: Mestra em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Brenda Paula Figueiredo De Almeida Gomes [Orientador]

Daniel Pinto De Oliveira

Caio Cezar Randi Ferraz

Data da defesa: 25-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 25 de Fevereiro de 2013, considerou a candidata ARIANE CASSIA SALUSTIANO MARINHO aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "BPA", written above a horizontal line.

Profa. Dra. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "DPO", written above a horizontal line.

Prof. Dr. DANIEL PINTO DE OLIVEIRA

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "CCRF", written above a horizontal line.

Prof. Dr. CAIO CÉZAR RANDI FERRAZ

DEDICATÓRIA

*A ti, Senhor, dedico este trabalho e ofereço meu louvor em
gratidão por tudo que fizestes por mim.*

À minha mãe **Eliete Salustiano**, pelo seu amor incondicional e suporte em todos os momentos da minha vida. Obrigada por estar sempre ao meu lado, até nos momentos mais difíceis. Suas palavras de incentivo e motivação foram essenciais à concretização desse sonho.
Sem você, eu nada seria.

Ao meu irmão **Arthur Tardelli**, um verdadeiro presente de Deus, por sustentar-me incessantemente com suas orações. Sou a irmã mais feliz do mundo por ter você em minha vida!

Obrigada por ouvir minhas lamentações nos momentos de cansaço, enxugar minhas lágrimas nos momentos de tristeza, por me estender a mão, por dividir uma palavra de esperança e um sorriso nos momentos de alegria.

Se hoje eu cheguei até aqui foi porque, antes de qualquer outra pessoa, vocês acreditaram em mim!
Amo vocês!

*À minha orientadora, profa. Dra. **Brenda P. F. A. Gomes**, por ter acreditado em mim. Tem sido maravilhoso conviver com você. Agradeço por sua enorme contribuição na minha formação profissional e pessoal. Você tem me ensinado o que é ser um verdadeiro mestre. Acima de tudo quero agradecer por sua amizade, carinho, conselhos e bom ânimo. Obrigada por me fazer uma pessoa melhor.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À família **Salustiano** pelos ensinamentos de vida e por celebrar todas as minhas conquistas.

Aos professores **Dr. Caio César Randi Ferraz, Dra. Danna Mota Moreira, Dr. Daniel Pinto de Oliveira, Dr. Frederico Canato Martinho e Dr. José Flávio Affonso de Almeida**, que aceitaram prontamente o convite para enriquecer os manuscritos da minha Dissertação de Mestrado.

Ao meu professor e amigo **Dr. Daniel Pinto de Oliveira**. Você foi minha inspiração para vir à Piracicaba em busca da concretização do sonho de me tornar professora. A você, minha estima e admiração.

Aos meus grandes amigos da área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba **Fernanda Graziela Corrêa Signoretti, Francisco Montagner, Frederico Canato Martinho, Giselle Priscilla Cruz Abi Rached, Marcos Sérgio Endo e Maria Rachel Figueiredo Penalva Monteiro** por dividirem comigo as alegrias, risadas e angústias. Obrigada pela amizade, carinho, conselhos. Vocês são maravilhosos. Amigos pra uma vida inteira.

Ao amigo **Frederico Canato Martinho**, pelo incentivo e injeção de ânimo à minha formação, sobretudo pelo apoio incondicional à realização desta pesquisa. Você foi essencial. Sem você tudo teria sido mais difícil. Obrigada por se fazer sempre presente oferecendo seu bom-humor e palavra amiga. Meu muito obrigada. Foi maravilhoso poder conviver com você e desfrutar da sua amizade. Para sempre!

*Ao meu grande amigo **Marcos Sérgio Endo**, que se fez expressar o verdadeiro sentido da amizade. Obrigada por estar sempre presente. Vai ser difícil olhar ao redor e ver que você não vai estar comigo diariamente. Mas, aonde quer que eu vá, levarei você no coração, como algo muito precioso que encontrei.*

*À amiga **Camila Lima de Andrade** por ser uma dádiva de Deus em minha vida. Uma amiga-irmã, parceira. Obrigada por ter sempre uma palavra de carinho e conforto em todos os momentos em que precisei e pelas inúmeras risadas que compartilhamos. Amo você.*

*À amiga **Ana Regina Polay** pela acessoria técnica e pela amizade que surgiu dentre tantos testes de quantificação de endotoxina. Conte comigo sempre.*

*Aos meus amigos **Emily Santos, Julyanna Nepomuceno, Karine Damasceno Alécio, Kerly Assis, Marianne Araújo, Pedro Fortes, Rosa Vieira** que apesar da distância, nossos laços de amizade não se desfizeram, pelo contrário, se fortaleceram ainda mais. Obrigada por serem um motivo a me impulsionar. Tenho um carinho imensurável por todos!*

*A **todos os pacientes** que participaram desta pesquisa! Sem a presença deles este trabalho não seria realizado! Meus sinceros agradecimentos!*

AGRADECIMENTOS

À Direção da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do seu diretor **Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de mestrado, processo nº 2010/13743-3.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão de auxílio à pesquisa, processo nº 2010/19136-1.

À **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, coordenadora do Programa de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP e ao **Prof. Dr. Márcio de Moraes**, coordenador do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**, responsável pela área de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas.

Aos professores da área de Endodontia **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Prof. Dr. Caio César Randi Ferraz, Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho e Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida**.

Aos funcionários **Ana Godoy, Daiane Scutton, Denize Lumena de Pinho, Wanderly Almeida Pavinatto, Geovânia Caldas Almeida, Eliane Melo Franco de Souza, Eliene Narvaes e Maria Elisa dos Santos, Jéssica Paiva**.

À **Érica A. Pinho Sinhoreti, Priscilla Zuzi Boldrin, Raquel Q. Marcondes Cesar, Roberta Clares Morales dos Santos, Débora Barbeiro e Ana Paula Carone**,

profissionais da secretaria da pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas.

*A todos os **funcionários** da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas.*

A todos que participaram de forma direta e indireta, contribuindo para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

*Aos professores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, **Altair Antoninha Del Bel Cury, Célia Marisa Rizzatti Barbosa, Cinthia Machado Tabchoury, Débora Alves Nunes Leite Lima, Eduardo Dias de Andrade, Flávio Henrique Baggio Aguiar, Francisco Carlos Groppo, Glaucia Maria Ambrosano, José Ricardo de Albergaria Barbosa, José Roberto Lovadino, Livia Tenuta, Luciana Asprino, Luís Alexandre Paulillo, Luís Roberto Marcondes, Márcio Casati, Márcio de Moraes, Maria Cristina Volpato, Pedro Luiz Rosalen, Renata Cunha Matheus, Wander José da Silva**, pela admiração e convívio agradável durante minha vida acadêmica em Piracicaba.*

*À todos os colegas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba que participaram da minha vida acadêmica: **Adriana de Jesus Soares, Ana Carolina Machado Rocha Lima Caiado, Camila Lima, Carlos Vieira Júnior, Danna Mota Moreira, Douglas Cecchin, Ezilmara Leonor Rolim de Sousa, Ezymar Cayana, Flaviana Bombarda de Andrade, Francisco Montagner, Frederico Canato Martinho, Helena Rosa Campos Rabang, Joelson Brum, Juliana Melo, Juliana Nunes Botelho, Karine Schell Nicastro, Livia Forster, Maraísa Greggio Delboni, Marcos Frozoni, Maria Eunice Davidian, Patrick Baltieri, Paulo Hemerson de Moraes, Ricardo Ferreira, Rogério de Castilho Jacinto, Shaiana Tashi Kawagoe, Thaís Accorsi Mendonça, Thaís Bellato, Vanessa Berber, e Wanderson Miguel Maia Chiesa**, pelo aprendizado e convívio agradável compartilhado nesses anos.*

*À todos os **amigos** que passaram pelo Curso de Especialização em Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, do ano de 2009 a 2011, pelos momentos de aprendizado e comemorações.*

Aos colegas de mestrado Ana Carolina Pimentel, Aniele Lacerda, Cimara Barroso Braga Brum, Claudia Suzuki, Érika Clavijo, Thais Duque, Thiago Farias e Tiago Rosa.

Aos colegas de doutorado Ana Carolina Mascarenhas, Carlos Pantoja, Carolina Carvalho de Oliveira, Daniel Rodrigo Herrera, Daniela Miyagaki, Emmanuel da Silva, Fernanda Graziela Corrêa Signoretti, Gabriel Rocha Campos, Giselle Priscilla Cruz Abi Rached, Jefferson Marion, Juliana Nagata, Letícia Nóbrega, Máira Prado, Maria Rachel Figueiredo Penalva Monteiro, Marcos Sérgio Endo e Nilton Vivacqua Gomes.

*Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou o teu **Deus**;
eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com minha destra fiel.*

Isaías 41.10

RESUMO

Lipopolisacarídeos (LPS) – endotoxinas são capazes de estimular células a produzirem citocinas pró-inflamatórias envolvidas na destruição tecidual periapical. Os objetivos do presente estudo foram: 1) Verificar e quantificar endotoxinas em canais radiculares infectados de dentes com periodontite apical crônica e sua relação com sinais e sintomas clínicos de origem endodôntica; 2) Avaliar a efetividade do preparo químico-mecânico (PQM) com hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5%; clorexidina gel (CLX) 2% e soro fisiológico (SS-controle) na eliminação de endotoxinas; 3) Avaliar o potencial inflamatório do conteúdo endodôntico, antes (C1) e após a instrumentação do canal radicular (C2) com NaOCl 2,5%, CLX 2% ou soro fisiológico e após uso de EDTA 17% (C3) em cultura de células de macrófagos quanto à produção de citocinas pró-inflamatórias - IL-1 β , TNF- α . Amostras foram coletadas de 30 canais radiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical em C1, C2 e C3 utilizando cones de papel estéreis/apirogênicos. Endotoxina foi detectada em 100% dos canais radiculares estudados, representada pela mediana de 18,70 EU/mL. Dentes com presença de dor à percussão e exsudação intracanal foram relacionados com níveis elevados de endotoxina ($p < 0,05$). Após o PQM, significativa redução de endotoxina foi obtida nos canais radiculares: NaOCl 2,5% + EDTA 17% (99,75%), CLX gel 2% + EDTA 17% (98,27%), SS+ EDTA 17% (98,71%) ($p < 0,05$). IL1- β e TNF- α foram produzidos por macrófagos estimulados pelo conteúdo endodôntico (C1>C2>C3). Foi possível concluir que 1) Endotoxinas estavam presentes em todos os casos investigados, apresentando níveis mais elevados nos dentes com dor à percussão e exsudato intracanal. 2) O preparo químico-mecânico foi eficaz na redução do conteúdo de endotoxinas, independente da substância química auxiliar testada; 3) O potencial inflamatório do conteúdo endodôntico foi demonstrado pela produção de IL1- β e TNF- α , exercendo maior atividade inflamatória contra macrófagos nas amostras iniciais, quando comparado com as obtidas após o preparo químico-mecânico.

Palavras-Chave: Bactérias, Citocinas, Endotoxinas, Hipoclorito de sódio, Clorexidina.

ABSTRACT

Lipopolysaccharide (LPS)-endotoxin are able to stimulate cells to produce proinflammatory cytokines involved in the periapical tissue destruction. The aims of this study were: 1) To verify and quantify endotoxin in infected root canals of teeth with apical periodontitis and correlate the levels with clinical signs and symptoms of the primary endodontic infections; 2) To assess the effectiveness of chemo-mechanical preparation (CMP) with 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl), 2% chlorhexidine (CHX) and saline solution (SS), as negative control, for the elimination of endotoxins; 3) To evaluate the inflammatory potential of endodontic content before (C1) and after the CMP (C2) with 2.5% NaOCl, 2% CHX or SS and after final rinse with 17% EDTA (C3) in macrophage cell culture regarding the production of proinflammatory cytokines – IL-1 β and TNF- α - via the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Samples were collected from 30 canals with pulpal necrosis and apical periodontitis in C1, C2 and C3 using sterile non-pyrogenic/paper points. Endotoxin was detected in 100% of root canals studied, represented by the median of 18.70 EU/mL. Teeth with tenderness to percussion and intracanal exudate were related to high levels of endotoxin ($p < 0.05$). After CMP, significant reduction of endotoxin was obtained in root canals instrumented with 2.5% NaOCl + 17% EDTA (99.75%), CHX 2% + 17% EDTA (98.27%) and SS + EDTA 17% (98,71%) ($p < 0.05$). IL1- β and TNF- α were produced by the macrophages in response to the endodontic content (C1>C2>C3). It was possible to conclude that 1) Endotoxin were present in all cases investigated, showing higher levels in the teeth with tenderness to percussion and intracanal exudate; 2) CMP was effective in reducing the endotoxic content, regardless of the auxiliary chemical substance; 3) The inflammatory potential of endodontic content was demonstrated by the production of IL1- β and TNF- α in all cases. The infectious content present in the root canal in the initial samples exerted greater inflammatory activity against macrophages compared to the residual content after CMP.

Key Words: Bacteria, Cytokines, Endotoxin, Sodium Hypochlorite, Chlorhexidine.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Endotoxinas.....	5
2.1.1. Descrição estrutural da endotoxina	6
2.1.2 Potencial inflamatório da endotoxina.....	8
2.1.2.1 Fator de Necrose Tumoral (TNF)	11
2.1.2.2 Interleucina -1 (IL-1)	12
2.1.3 Endotoxinas em canais radiculares.....	14
2.2 Substâncias químicas auxiliares	29
2.2.1 Hipoclorito de sódio.....	29
2.2.2 Clorexidina	30
3. PROPOSIÇÃO	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Seleção da amostra	41
4.2 Análise clínica e radiográfica.....	41
4.3 Procedimentos clínicos.....	42
4.3.1 Descontaminação do campo operatório	42
4.3.2. Abertura coronária.....	43
4.3.3 Coletas endodônticas	43
4.5. Processamento Laboratorial das amostras	50
4.5.1. Investigação e quantificação de endotoxinas- Teste cinético turbidimétrico (Pyrogen [®] -5000, Lonza, Walkersville, MD, EUA)	50
4.5.2 Avaliação do potencial inflamatório do conteúdo endodôntico– Estimulação celular e dosagem de citocinas inflamatórias	56
4.6. Análise Estatística	64
5. RESULTADOS	65
5.1. Aspectos clínicos e radiográficos dos elementos dentais com necessidade de tratamento endodôntico devido à periodontite apical crônica.....	65
5.2. Quantificação de endotoxinas nos canais radiculares infectados antes (C1). 67	
5.2.1. Efeito do preparo químico-mecânico com NaOCl 2,5% e CLX gel 2% na redução de endotoxinas dos canais radiculares infectados	68
5.3. Avaliação do potencial inflamatório do conteúdo endodôntico inicial presente nos canais radiculares através dos níveis de (IL1- β)	69
5.3.1 Avaliação do potencial inflamatório do conteúdo endodôntico após a instrumentação e após uso de EDTA 17% através dos níveis de IL1- β	70
5.4 Avaliação do potencial inflamatório do conteúdo endodôntico inicial presente nos canais radiculares através dos níveis de TNF- α	72
5.4.1 Avaliação do potencial inflamatório do conteúdo endodôntico após a instrumentação e após uso de EDTA 17% através dos níveis de TNF- α	73
5.5 Teste de correlação.....	73
6. DISCUSSÃO	75
6.1. Quantificação de endotoxinas nos canais radiculares.....	75

6.2.1. Efeito do preparo químico-mecânico na redução de endotoxinas dos canais radiculares infectados	77
6.3 Avaliação do potencial inflamatório do conteúdo endodôntico -Estimulação celular e dosagem de citocinas inflamatórias	81
7. CONCLUSÃO.....	85
REFERÊNCIAS.....	87
Apêndice 1. Dados gerais dos 30 pacientes selecionados para realização do tratamento endodôntico.....	105
Apêndice 2. Dados gerais e características clínicas dos casos selecionados para a pesquisa.....	105
Apêndice 3. Distribuição da concentração de endotoxinas de acordo com a presença de sintomatologia dolorosa provocada e presença de exsudato intracanal.....	108
Apêndice 4 – Características iniciais da amostra nos diferentes grupos avaliados quanto à redução de endotoxina de canais radiculares com periodontite apical crônica.....	109
Apêndice 5 – Níveis de LPS (EU/mL), IL1- β (pg/mL) e TNF α (pg/mL) dos 30 casos com periodontite apical crônica nas diferentes etapas da terapia endodôntica (C1, C2 e C3).....	110
ANEXO – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Humana.	111

1. INTRODUÇÃO

Bactérias e seus subprodutos desempenham um papel etiológico primário no desenvolvimento e perpetuação das lesões pulpares e perirradiculares (Takehashi *et al.*, 1965). A destruição tecidual observada em lesões periapicais pode resultar tanto direta quanto indiretamente (via sistema imune) da antigenicidade dos produtos ou componentes bacterianos presentes no canal radicular sobre os tecidos periapicais (Mattison *et al.*, 1987).

Embora apresente diversidade microbiana, sabe-se que a infecção endodôntica primária é composta predominantemente por bactérias Gram-negativas anaeróbias estritas (Gomes *et al.*, 1994; Siqueira *et al.*, 2001; Jacinto *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2006; Martinho *et al.*, 2010). Essas bactérias apresentam como principal constituinte de parede celular, os lipopolissacarídeos (LPS), também denominados de endotoxinas (Rietschel *et al.*, 1992).

Endotoxinas apresentam uma peculiaridade estrutural de amplo espectro de atividade biológica, os quais atribuíram a esta molécula especial interesse por diversas áreas de pesquisa nos últimos 100 anos. Uma vez liberadas da parede celular durante a multiplicação ou morte bacteriana (Rietschel *et al.*, 1992), são consideradas, mesmo em baixas concentrações, potentes estimuladores da resposta inata do sistema de defesa do hospedeiro (Beutler, 2000; Hong *et al.*, 2004; Martinho *et al.*, 2010), induzindo assim, uma série de eventos biológicos que levam a uma reação inflamatória (Khabbaz *et al.*, 2000) e reabsorção dos tecidos mineralizados (Mattison *et al.*, 1987; Stashenko, 1993).

Estudos clínicos demonstraram a presença de LPS bacteriano em 100% dos canais radiculares de dentes com infecção endodôntica primária e presença de lesão periapical (Jacinto *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2007; Martinho & Gomes, 2008; Martinho *et al.*, 2010; Martinho *et al.*, 2011), sugerindo sua participação na patogênese de lesões periapicais.

Endotoxinas são capazes de estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL1- β , IL-6, TNF- α e PGE₂ por diferentes linhagens celulares (Wilson *et al.*, 1996; Martinho *et al.*, 2010; Martinho *et al.*, 2011; Martinho *et al.*, 2012). A rede de citocinas produzidas revela sua complexa atividade antigênica e o padrão de resposta imune/ inflamatória pulpar e perirradicular gerado será determinado pelo potencial inflamatório do conteúdo infeccioso presente no interior do canal radicular (Homji *et al.*, 2012).

O equilíbrio entre a produção de citocinas pró-inflamatórias e subsequente produção de citocinas anti-inflamatórias representa um mecanismo regulador do organismo durante os processos inflamatórios. Um desequilíbrio neste mecanismo, a favor do gradiente de concentração de citocinas pró-inflamatórias, pode gerar consequências danosas aos tecidos do hospedeiro (Darveau, 2000). Consequentemente, periapicopatias de origem pulpar desenvolvem-se em resposta a irritantes microbianos presentes no sistema de canais radiculares (Gomes *et al.*, 2009).

Considerados primeira linha de defesa do sistema imune, os macrófagos estão presentes em maior população, representando a principal fonte de produção de citocinas pró-inflamatórias (Artese *et al.*, 1991; Matsuo *et al.*, 1992) e quase exclusivamente o produtor de Fator de Necrose Tumoral- α (TNF-alfa) na presença do LPS bacteriano (Beutler & Cerami, 1986). IL1- β e TNF- α têm sido detectadas em tecidos periapicais (Barkordar *et al.*, 1992), em canais radiculares de dentes com exsudação e lesão periapical (Matsuo *et al.*, 1992).

Dada a predominância de bactérias Gram-negativas em canais radiculares com infecções endodônticas primárias e sua conseqüente liberação de endotoxinas com potente ação citotóxica, faz-se necessário o estudo de substâncias químicas utilizadas durante a terapia endodôntica que possam atuar não só a redução da carga microbiana, mas também na eliminação e/ou inativação do conteúdo endotóxico e demais produtos tóxicos e conseqüentemente, reduzir o potencial inflamatório aos tecidos periapicais.

Com o intuito de estabelecer um protocolo clínico efetivo para eliminação e/ou inativação de endotoxinas, limitado número de estudos *in vivo* avaliaram a efetividade da terapia endodôntica utilizando diversas substâncias químicas na sua redução em canais radiculares infectados (Buck *et al.*, 2001; Tanomaru *et al.*, 2003; Vianna *et al.*, 2007; Martinho & Gomes, 2008; Gomes *et al.*, 2009; Martinho *et al.*, 2010; Maekawa *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2012)

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é a substância química auxiliar mais utilizada em endodontia devido a sua baixa tensão superficial, capacidade de dissolver matéria orgânica, e ações desodorizante, alvejante, lubrificante e excelente atividade antimicrobiana (Jeansonne & White, 1994; Menezes *et al.*, 2004; Tanomaru *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2009; Martinho *et al.*, 2010), entretanto, é tóxico para os tecidos periapicais (Önçag *et al.*, 2003).

Por sua vez, a clorexidina (CLX) apresenta baixa toxicidade (Önçag *et al.*, 2003), atividade antimicrobiana imediata (Gomes *et al.*, 2009) e substantividade em tecido dentinário (Dametto *et al.*, 2005), sendo também utilizada como substância química auxiliar na terapia endodôntica. Consiste em uma molécula hidrofóbica e lipofílica carregada positivamente que interage com os fosfolipídeos e os lipopolissacarídeos da membrana celular das bactérias, sendo capaz de penetrar nas células através de um mecanismo de transporte ativo ou passivo. Sua eficácia se dá devido à interação da carga positiva de sua molécula com a carga negativa dos grupos fosfato das paredes da célula microbiana, alterando assim o equilíbrio osmótico das células (Mohammadi e Abbott, 2009). Em sua maior concentração usada clinicamente (2%), a clorexidina é bactericida provocando a precipitação do conteúdo do citoplasma, resultando em morte celular. (Gomes *et al.*, 2009).

Com o intuito de investigar a ação das substâncias químicas auxiliares mais frequentemente utilizadas durante a terapia endodôntica sobre os níveis de endotoxinas, Gomes *et al.* (2009) investigaram a atividade do NaOCl 2,5% e CLX gel 2% em canais radiculares de dentes com infecção endodôntica primária. Neste trabalho, os autores realizaram a instrumentação do canal radicular com limas

manuais a 1 mm do comprimento real do dente. Endotoxina foi detectada em todos os casos investigados e obtida redução do seu conteúdo em apenas 58% (NaOCl) e 47% (CLX), demonstrando a baixa capacidade do preparo químico-mecânico, particularmente no protocolo utilizado, em removê-las do interior do canal radicular. Neste sentido, justifica-se a busca de um protocolo clínico mais efetivo para máxima redução de endotoxinas de canais radiculares infectados.

O presente estudo realizou *in vivo* coleta de amostras do conteúdo endodôntico de dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical para quantificação de endotoxinas e avaliação do potencial antigênico do conteúdo infeccioso endodôntico na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) por macrófagos. A partir do conhecimento deste conteúdo inicial, foi avaliada a efetividade do preparo químico-mecânico utilizando instrumentos rotatórios na completa extensão do canal radicular com diferentes substâncias químicas auxiliares (NaOCl 2,5% e CLX gel 2%) seguido de irrigação final com EDTA 17%, na redução de LPS e nos níveis de citocinas produzidas, visando a instituição de uma conduta terapêutica mais eficaz.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Endotoxinas

Avanços tecnológicos na área de microbiologia têm permitido identificar os microrganismos, estudar as comunidades microbianas, fatores de virulência e sua patogenicidade (Gomes, 1995; Jacinto *et al.*, 2005; Montagner, 2010; Martinho *et al.*, 2011). Dada a diversidade de trabalhos que investigaram microbiologicamente as infecções endodônticas, pode-se afirmar que, em canais radiculares de dentes com necrose pulpar e lesão periapical crônica, embora exista diversidade microbiana, existe um predomínio de bactérias anaeróbias estritas, particularmente as Gram-negativas (Gomes *et al.*, 1994; Gomes *et al.*, 1996; Siqueira *et al.*, 2001; Jacinto *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2006; Martinho *et al.*, 2010).

Qualquer microrganismo que infecte o canal radicular possui o potencial de iniciar uma inflamação nos tecidos periapicais (Darveau *et al.*, 2000). Entretanto, a virulência e patogenicidade de espécies individuais variam consideravelmente e pode ser afetada pela presença de fatores determinantes de virulência (Sundqvist, 1976; Siqueira & Rôças, 2009).

Bactérias Gram-negativas possuem uma membrana celular externa diferenciada com a presença de constituintes hidrofóbicos compostos por polissacarídeos (polímeros de açúcares), lipídeos (complexos contendo ácidos graxos) e proteínas. Essa estrutura é denominada lipopolissacarídeo ou endotoxinas, as quais são secretadas em vesículas durante a fase de crescimento bacteriano ou liberadas durante a morte celular. LPS representa a principal superfície antigênica das bactérias Gram-negativas, apresentando significância microbiológica e imunológica (Westphal, 1975; Rietschel & Brade, 1992).

Aproximadamente 75% da superfície celular bacteriana é composta por esta molécula, sendo esta, essencial para o crescimento celular, diminuição da permeabilidade da membrana, integridade e estabilidade estrutural, assim como

proteção contra agressões externas (Rietschel & Brade, 1992; Caroff & Karibian, 2003).

2.1.1. Descrição estrutural da endotoxina

O LPS mais estudado é de origem enterobacteriana. Apesar de *Escherichia coli* não ser uma bactéria comumente encontrada no interior de canais radiculares com polpa necrosada, sua endotoxina apresenta a estrutura básica do componente lipídico, que representa o centro ativo responsável pela toxicidade do LPS. Dada a sua elevada toxicidade, estudos têm sugerido a sua utilização para avaliar a efetividade de substâncias químicas sobre endotoxinas (Oliveira *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2007). Trabalhos mostram que existe cerca de 10^6 moléculas de LPS para cada unidade formadora de colônia da espécie *Escherichia coli* (Raetz & Whitfield, 2002; Caroff & Karibian, 2003).

Apesar da existência de algumas exceções, muitas espécies possuem forma ou arquitetura química (**Figura 1**) constituída de três componentes específicos:

- **Uma porção medial- Lípide A**

A porção "Lípide A", a qual se liga à membrana bacteriana, é a porção efetivamente tóxica da molécula, causando respostas imunológicas específicas. Consiste em um glicolípídeo composto de dissacarídeos aos quais se encontram ligados ácidos graxos de cadeia curta e grupos fosfatos. Pesquisas revelam que a porção "Lípide A" pode variar de espécie para espécie e entre diferentes cepas da mesma espécie (Reife *et al.*, 2006; Dixon & Darveau, 2005), de acordo com o número de grupo de fosfatos, a quantidade e a posição de ácidos graxos na molécula (Bainbridge *et al.*, 2002; Darveau *et al.*, 2004; Dixon & Darveau, 2005). Desta forma, a ocorrência de uma diversidade de LPS bacteriano com diferentes toxicidades nas infecções pode potencializar ou inibir a atividade antigênica

entre eles sobre os tecidos periapicais (Magnuson *et al.*, 1989; Hong *et al.*, 2004; Dixon & Darveau, 2005). A mudança em menor ou maior proporção da porção “Lípide A” pode produzir efeitos distintos e diversos na modulação da resposta imune (Dixon & Darveau, 2005). Convém ressaltar que mudanças no micro-ambiente bacteriano, tal como a concentração de hemina, pode alterar estruturalmente a porção “Lípide A” (Al-Qutub *et al.*, 2006).

- **Um núcleo- o “core”**

O “core” tem constituição pouco variável, porém também pode induzir a formação de anticorpos específicos. Este é constituído de uma parte de açúcares e uma parte chamada KDO (2-keto-3-deoxioctano). Esta se liga ao lípide A, podendo inclusive, interferir na sua bioatividade (Rietschel *et al.*, 1992).

- **Uma porção distal ou externa- Antígeno O**

O antígeno O é a cadeia mais longa e a porção mais variável do LPS entre as espécies bacterianas. O antígeno O varia entre as espécies de bactérias Gram-negativas tanto em composição como em comprimento. Consiste em uma variedade de resíduos oligossacarídicos, cujas cadeias recobrem a superfície da célula e a protegem da ação das substâncias hidrofóbicas (Luderitz *et al.*, 1981, Rietschel *et al.*, 1992).

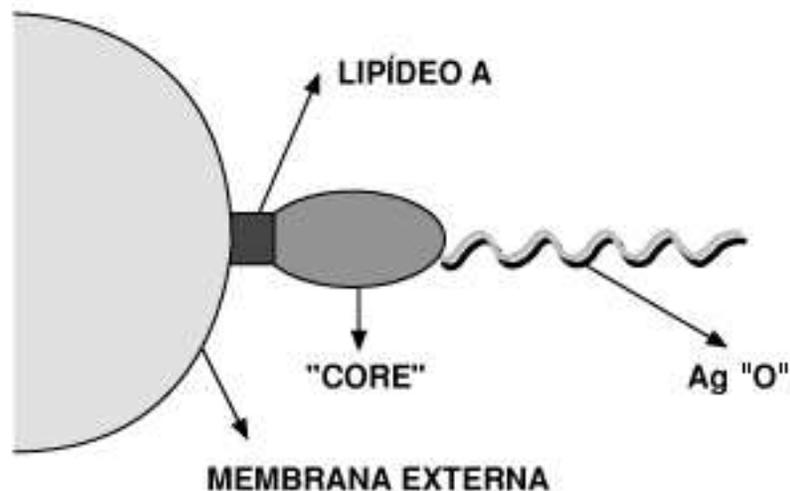


Figura 1- Ilustração dos componentes estruturais da endotoxina bacteriana. (Fonte: Giroir, B.P. Mediators of septic shock: New approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade. Crit. Care Med., v. 21, p. 780-9, 1993.)

A composição química e estrutural do LPS bacteriano tem sido amplamente explorada para melhor entendimento do seu verdadeiro papel no desencadeamento e manutenção de processos inflamatórios em humanos (Petsch & Anspach, 2000).

2.1.2 Potencial inflamatório da endotoxina

O ser humano é extremamente sensível ao LPS, observando-se que quantidades muito pequenas são suficientes para deflagrar o estado de choque. O LPS participa da resposta imune imediata a partir da fagocitose de microrganismos Gram-negativos. Assim, o indivíduo está exposto tanto ao LPS ligado à membrana da bactéria, como à endotoxina livre (fragmentos da parede celular) que normalmente é liberada durante a replicação e crescimento bacteriano (Rietschel *et al.*, 1992). Uma vez no meio circulante, ocorre interação entre a

endotoxina e o sistema imune do hospedeiro. A interação entre o lipídeo A e as células do hospedeiro ocorre através da ligação do LPS com uma proteína normalmente presente no plasma, com peso molecular de 60 Kd, denominada proteína ligadora do LPS ou LBPs- (LPS binding proteins). A presença de um receptor na superfície dos macrófagos/monócitos (molécula CD14) permite que este complexo LPS-proteína ligadora do LPS, ative as células do hospedeiro. A ativação de macrófagos pelo complexo LPS-CD14 inicia o processo de sinalização para receptores chamados TLR- (Toll-like receptor). Receptores TLR reconhecem o LPS bacteriano como estranho ao hospedeiro, de forma única e específica para cada bactéria. Sabe-se que há mais de dez diferentes tipos de receptores e alguns deles estão envolvidos no reconhecimento de compostos bacterianos. O TLR4 é o receptor que responde à presença do LPS, deflagrando no hospedeiro uma resposta imunológica para produção e secreção de compostos protéicos os quais possuem seqüências de aminoácidos distintas (Baron, 1996). Estes compostos são considerados mediadores humorais ou inflamatórios e denominados citocinas.

A Figura 2 mostra o mecanismo de reconhecimento da molécula de endotoxina via receptor celular na produção de citocinas pró-inflamatórias.

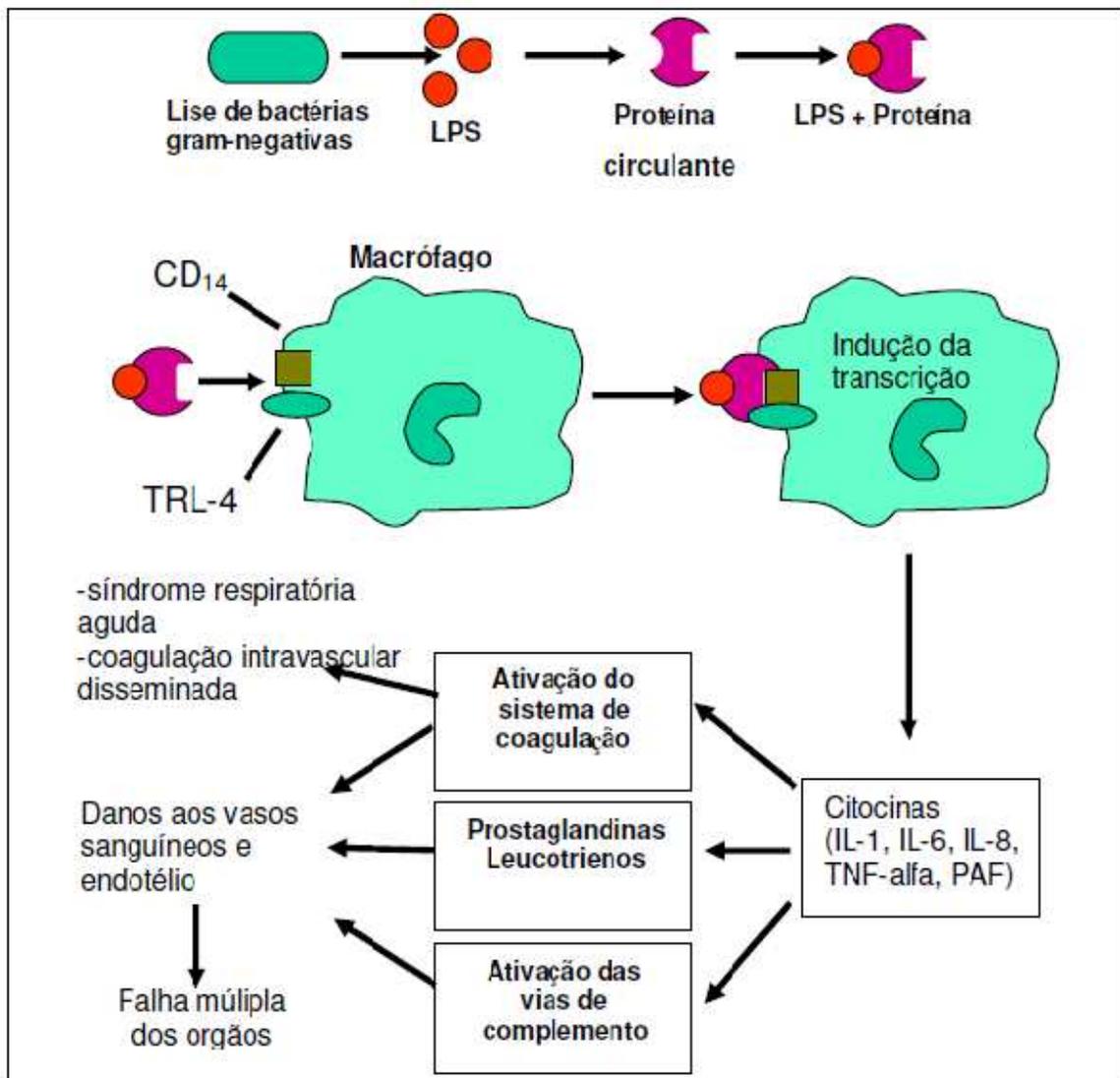


Figura 2. Mecanismo de reconhecimento da molécula de endotoxina via receptor celular para produção de citocinas pró-inflamatórias. Resposta Imune Clássica. (Fonte: Vianna, M.E. Microbiologia e tratamento das infecções endodônticas – Piracicaba, 2006).

As principais citocinas identificadas em quadros inflamatórios são o Fator de Necrose Tumoral (Tumor Necrosis Factor - TNF), as Interleucinas 1, 6 e 8 (IL-1, IL-6 e IL-8) e o Interferon-gama (IFN-g) (Dinarello, 1991; Hageman, 1995). Quando secretadas, as citocinas se ligam aos receptores de citocinas presentes nos linfócitos, macrófagos, fibroblastos, osteoblastos, células endoteliais e

epiteliais, desempenhando papel importante em vários processos biológicos, como a inflamação, a imunidade e a hematopoiese, e atuam tanto local quanto sistemicamente (Dinarello, 1991). Algumas citocinas possuem a capacidade de dar início à inflamação e mantê-la, sendo chamadas citocinas pró-inflamatórias, enquanto que outras suprimem a atividade de citocinas pró-inflamatórias e são denominadas citocinas anti-inflamatórias. As diferentes citocinas podem apresentar ações antagônicas ou sinérgicas, com produção e liberação controladas por mecanismos de "feedback" em cada etapa do processo inflamatório. Seus efeitos, "*in vivo*", dependem do tipo de microrganismo invasor, da magnitude e tempo de liberação, da meia-vida curta, da distribuição no organismo e da presença de inibidores naturais (Van Deuren *et al.*, 1992). No entanto, quando sintetizadas em níveis elevados, as citocinas modificam o padrão de resposta celular, participando substancialmente no desenvolvimento de patologias de caráter inflamatório crônico (Graves, 2003). Desempenhando importante papel em eventos inflamatórios, destacam-se as Interleucinas e o Fator de Necrose Tumoral.

2.1.2.1 Fator de Necrose Tumoral (TNF)

Dentre as linhagens celulares envolvidas no processo inflamatório, os macrófagos estão presentes em maior população, sendo considerados a principal fonte de produção de citocinas pró-inflamatórias (Artese *et al.*, 1991; Matsuo *et al.*, 1992) e quase exclusivamente o produtor de Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) na presença do LPS bacteriano (Beutler & Cerami, 1986).

TNF é estrutural e funcionalmente semelhante à linfotoxina, proteína produzida por linfócitos ativados e que foi originalmente descrita por Williams & Granger em 1984. A linfotoxina possui 30% de homologia com o TNF e também ocasiona necrose tumoral "*in vivo*". Apesar da pouca semelhança na seqüência de aminoácidos, o TNF- α e a linfotoxina podem se ligar ao mesmo receptor na superfície celular e têm várias ações comuns. Desta forma, o produto derivado de

macrófagos foi denominado TNF- α e o derivado de linfócitos de TNF- β (Grunfeld & Palladino, 1990; Girardin *et al.*, 1992). Nos processos infecciosos bacterianos, o TNF- α é o mais estudado.

TNF- α é considerado o principal mediador inflamatório, por ser a primeira citocina liberada pelas células do hospedeiro, após contato com a bactéria ou seus produtos. Além disso, desempenha papel-chave no desencadeamento e regulação de outras citocinas pró-inflamatórias (Pezelj-Ribaric *et al.*, 2007). Conforme foi demonstrado em estudos com animais, a administração de TNF induz à síntese de outros mediadores, como a IL-1 e IL-6, cuja liberação é inibida pela neutralização da atividade do TNF (Fong & Lowry, 1990). Esta citocina é uma molécula bioativa de grande relevância na produção de metaloproteinases-1 (MMP1) pelos macrófagos, bem como na indução de reabsorção óssea perirradicular (Tracey *et al.*, 1986).

2.1.2.2 Interleucina -1 (IL-1)

Interleucina-1 (IL-1) foi inicialmente descrita por Atkins, em 1960, como pirogênio endógeno e em 1972, por Gery *et al.*, como "fator ativador de linfócitos". A propriedade deste produto de macrófagos em atuar como estimulador de linfócitos originou o nome interleucina. Os estudos moleculares confirmaram a existência de pelo menos dois tipos de IL-1. Em 1985, March *et al.*, descreveram a clonagem do DNA de duas moléculas distintas de IL-1, a partir de macrófagos humanos (IL-1 α e IL-1 β). As cadeias de aminoácidos destes dois tipos de IL-1 apresentam somente 26% de homologia entre si, porém reconhecem os mesmos receptores na superfície celular e deflagram respostas biológicas semelhantes, contudo, IL-1 β é predominante (Le & Vilcek, 1987).

IL-1 é capaz de induzir à síntese e à liberação de mediadores como a IL-6 e IL-8 e levar ao aparecimento de hipotensão, taquicardia, acidose láctica, neutrofilia. Contudo, seu efeito biológico mais consistente é o aumento da síntese

de prostaglandina E₂ (PGE₂), que possui a capacidade de sensibilizar nociceptores (Van Deuren *et al.*, 1992).

O sinergismo existente entre o IL-1 e TNF é um fenômeno comumente descrito na literatura (Dinarello *et al.*, 1986; Crown *et al.*, 1993; Martinho *et al.*, 2012). Claramente, ambas as citocinas são produzidas em sítos de inflamação e, desta forma, a interação de seus efeitos deve ser considerada quando avaliada a severidade da doença. Foi demonstrado que o TNF e IL-1 são capazes de induzir alterações hemodinâmicas e hematológicas típicas do choque séptico e seus efeitos são mais potentes quando administrados juntos. Tanto o TNF como a IL-1 são capazes de determinar o aparecimento de febre, sendo que a IL-1 é considerada a sua principal indutora (Hong *et al.*, 2004). IL-1 potencializa vários efeitos biológicos do TNF. Essa atuação sinérgica parece ser importante na ativação da cascata de inflamação, provocando aumento da permeabilidade, liberação de óxido nítrico, mediador da morte celular e ainda, hiperalgesia LPS-induzida (Dinarello *et al.*, 1986).

Particularmente, em quadros infecciosos em canais radiculares, altas concentrações de IL1-β e TNF-α são capazes de desenvolver um quadro de pulpíte e iniciar uma cascata da inflamação resultando em destruição tecidual (Tani-Ishii *et al.*, 1995; Hong *et al.*, 2004; Martinho *et al.*, 2011).

Estas citocinas pró-inflamatórias regulam a produção de MMP-1 pelos macrófagos, as quais induzem reabsorções periapicais (Prso *et al.*, 2007; Pezelj-Ribaric *et al.*, 2007). Gazivoda *et al.* (2009) também demonstraram que na patogênese da lesão periapical, os níveis de TNF-α são altos em lesões de tamanhos maiores. Somado a isso, a alta produção de TNF-α em lesões grandes pode estar associada às diferentes composições do infiltrado inflamatório. Resultados semelhantes foram encontrados por Pezelj-Ribaric *et al.*, (2007) com altas concentrações de TNF-α detectadas em lesões periapicais com grandes áreas de radioluscência e baixas concentrações em lesões periapicais com pequenas áreas de radioluscência.

Como demonstrado por Artese *et al.* (1991), a progressão da lesão radiográfica está diretamente relacionada com a reabsorção óssea na região afetada. Estudos sugerem que IL- 1 β , isoladamente, não é responsável pela progressão da lesão. Estudos recentes demonstram que nos sítios de inflamação existe um complexo “*network*” entre as diferentes citocinas produzidas, o que permite a comunicação entre diferentes células envolvidas no processo inflamatório na potencialização de um efeito biológico (Martinho *et al.*, 2012).

A destruição dos tecidos periapicais mediada por IL1- β e TNF- α , parece estar diretamente relacionada com níveis elevados de endotoxinas presente nos canais radiculares.

2.1.3 Endotoxinas em canais radiculares

A partir das observações de que produtos derivados de macrófagos eram liberados na circulação após o contato com endotoxina levando à indução de um efeito biológico, vários estudos foram realizados com o intuito de se investigar a concentração destas em canais radiculares e seu papel na modulação da resposta imune, visando contribuir para o entendimento das manifestações clínicas pulpares e perirradiculares.

Com o propósito de detectar e quantificar endotoxinas em amostras clínicas, o método frequentemente utilizado é o *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) (Martinho *et al.*, 2011). O Método LAL deriva de uma cascata de coagulação enzimática sendo ativado pela presença de endotoxinas de bactérias Gram-negativas. Este método consiste em derivados da hemolinfa do caranguejo-ferradura (*Limulus Polyphemus*) que, quando exposto à molécula de endotoxina tem sua opacidade e viscosidade aumentadas, tornando-se um gel de consistência endurecida. A formação do coágulo ocorre como resultado de uma reação enzimática entre a endotoxina e uma proteína coagulável presente na circulação do amebócito *Limulus* (Levin & Bang, 1968). O Fator C (FC), o primeiro componente da cascata, é um zimogênio que é ativado pela ligação de endotoxina (LAL ativado), este, por

sua vez, ativa uma pró-enzima (coagulase) que transforma coagulogênio em coagulina. Esta via ativa uma enzima pro-cloagulante em uma enzima coagulante.

Baseados nesse princípio existem diversos testes para detecção e quantificação de endotoxinas, apresentando variações de suas propriedades. Os primeiros estudos em Endodontia utilizaram testes qualitativos para detecção de endotoxinas, pela evidência de geleificação (Gel clot LAL assay) da amostra em contato com o LAL (Schein & Schilder, 1975; Oliveira *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2007). Neste método, são colocadas amostras dos canais radiculares juntamente com o reagente do LAL em tubos apirogênicos. Esses tubos são levemente agitados, permanecendo em banho-maria a 37° C durante 1 hora. Após esse período é verificada a formação ou não do gel inclinando-se os tubos por meio de análise qualitativa.

Com o intuito de aprimorar a mensuração e acurácia de detecção de endotoxinas em canais radiculares, testes quantitativos vêm sendo empregados: teste cromogênico endpoint (QCL-test) (Martinho & Gomes, 2008; Jacinto *et al.*, 2005; Khabbaz *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2009); cinético cromogênico (KQCL-test) (Rocha *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2007; Cardoso *et al.*, 2008) – ambos os testes colorimétricos determinam os níveis de endotoxina pela intensidade de cor amarela; e por fim, o teste cinético turbidimétrico (Martinho *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2009), o qual resulta em aumento na turbidez do substrato. As densidades da cor amarela e da turbidez estão correlacionadas com a concentração de endotoxina (Chen, 2006; Martinho *et al.*, 2011).

Enquanto o teste cromogênico endpoint (QCL-test) possui um limiar de sensibilidade baixo (limite de detecção: 0,1-1 unidades de endotoxina/mL {EU/mL}) para determinação da concentração de endotoxinas em uma amostra, os testes cinético cromogênico (KQCL-test) (limite de detecção: 0,005-50 EU/mL) e cinético turbidimétrico (0,01-100 EU/mL) apresentam maior sensibilidade de detecção. Quanto menor a concentração de endotoxina detectável, mais sensível é o teste (Chen, 2006). Em contrapartida, os testes cinéticos necessitam de um tempo

maior de duração do experimento (60 min x 16 min para o teste cromogênico endpoint).

De acordo com a literatura endodôntica, todos estes testes são sensíveis para detecção de endotoxinas em infecções endodônticas primárias, uma vez que endotoxinas foram detectadas em 100% dos casos (Khabbaz *et al.*, 2001; Jacinto *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2007; Martinho & Gomes *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2009; Martinho *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2012). Entretanto, Martinho *et al.* (2011) compararam a precisão e reprodutibilidade de diferentes testes de detecção de endotoxina de infecções endodônticas primárias. Amostras do canal radicular de 21 dentes com necrose pulpar e periodontite apical foram coletadas com cones de papel antes do preparo químico-mecânico. A mesma amostra foi analisada por três diferentes testes de detecção: cromogênico endpoint (QCL), cinético cromogênico (KQCL) e cinético turbidimétrico (Pyrogen[®] 5000). Todos os três testes de LAL foram eficazes na detecção de endotoxina do canal radicular. Independentemente do teste utilizado, endotoxinas foram detectadas em 100% dos canais radiculares (21/21). O teste KQCL obteve uma mediana de concentração de endotoxina de 7,49 EU/mL, porém não significativamente diferente do teste turbidimétrico (9,19 EU/mL) (ambos métodos cinéticos). Em contraste, o método QCL mostrou obteve uma mediana de concentração de 34,20 EU/mL ($p < 0,05$). A comparação dos três métodos revelou que ambos os testes turbidimétrico (Pyrogen[®] 5000) e cinético cromogênico (KQCL) foram mais precisos, apresentando melhor reprodutibilidade. Este estudo revelou que os testes quantitativos de LAL cinético turbidimétrico e cinético cromogênico são mais fidedignos para quantificação de endotoxinas em infecções do canal radicular, sendo ambos mais precisos e mais reprodutíveis quando comparados ao teste cromogênico endpoint (QCL).

Diversos estudos foram conduzidos para investigação da presença de endotoxinas em infecções endodônticas primárias e determinação de sua concentração inicial (**Tabela 1**).

Tabela 1. Estudos prévios de quantificação de endotoxinas em canais radiculares utilizando diferentes testes de quantificação.

Autores	Seleção dos casos	Método LAL / Teste	Concentração de endotoxina
Jacinto <i>et al.</i> , 2005	Necrose pulpar + Lesão periapical (Assintomática)	Cromogênico endpoint (QCL)	12,030 EU/mL
Jacinto <i>et al.</i> , 2005	Necrose pulpar + Lesão periapical (Sintomática)	Cromogênico endpoint (QCL)	18,540 EU/mL
Schein & Schilder, 2006	Polpa vital	Cromogênico endpoint (LAL)	0,007 µg/mL
Schein & Schilder, 2006	Pulpite Irreversível (Sintomática)	Cromogênico endpoint (LAL)	0,075 µg/mL
Schein & Schilder, 2006	Necrose pulpar (Assintomática)	Cromogênico endpoint (LAL)	0,192 µg/mL
Schein & Schilder, 2006	Necrose pulpar (Sintomática)	Cromogênico endpoint (LAL)	1,070 µg/mL
Vianna <i>et al.</i> , 2007	Necrose pulpar + Lesão periapical (Assintomática)	Cromogênico endpoint (QCL)	151, 61 EU/mL
Martinho & Gomes, 2008	Necrose pulpar + Lesão periapical (Assintomática)	Cromogênico endpoint (QCL)	228 EU/mL
Martinho <i>et al.</i> , 2010	Necrose pulpar + Lesão periapical (Assintomática)	Cinético Turbidimétrico (Pyrogent®5000)	9,19 EU/mL
Martinho <i>et al.</i> , 2011	Necrose pulpar + Lesão periapical (Assintomática)	Cinético cromogênico (KQCL)	7,49 EU/mL
Martinho <i>et al.</i> , 2011	Necrose pulpar + Lesão periapical (Assintomática)	Cromogênico endpoint (QCL)	34,20 EU/mL
Oliveira <i>et al.</i> , 2012	Necrose pulpar + Lesão periapical (Assintomática)	Cinético cromogênico (KQCL)	6,95 EU/mL

Quantificar endotoxinas e investigar sua relação com sinais e sintomas de origem endodôntica tem sido alvo de diversos estudos.

Khabbaz *et al.* (2001) investigaram a presença de endotoxina em dentes com dor aguda de origem pulpar. Foram realizadas 24 coletas da superfície da lesão cariosa em dentes com pulpite irreversível e reversível de 9 molares e 15 pré-molares. Os dentes foram divididos em 3 grupos: sintomáticos com presença de lesão cariosa (n=9), assintomáticos com presença de lesão cariosa (n=11) e grupo controle sem cárie (n=4). A quantificação de endotoxina foi realizada pelo método quantitativo cromogênico endpoint (QCL). Os resultados indicaram a presença de endotoxina em níveis mais elevados nos casos sintomáticos, valor médio de 0,15773 ng/mL, quando comparado aos casos assintomáticos, com valor médio de 0,10723 ng/mL; os dentes do grupo controle, estavam livres da presença de endotoxina. Nos dentes sintomáticos (pulpite irreversível), endotoxina foi encontrada na superfície e em camadas mais profundas de cárie, nos respectivos valores 0,15078 e 0,12111 ng mL⁻¹, o qual foi significativamente maior na superfície do que em profundidade. Nos dentes assintomáticos, a concentração de endotoxina presente na superfície e em camadas mais profundas de lesões cariosas foram detectadas nos valores de 0,122091 e 0,07163 ng mL⁻¹ respectivamente. Os resultados também demonstram que a concentração de endotoxina foi maior na superfície de dentes sintomáticos com lesão cariosa quando comparado aos dentes assintomáticos (0,15078 e 0,12091 ng mL⁻¹, respectivamente). Similarmente, maior quantidade de endotoxina estava presente em camadas profundas das lesões cariosas de dentes sintomáticos quando comparada aos dentes assintomáticos (0,12111 e 0,07163 ng mL⁻¹, respectivamente). Os autores concluíram com o estudo, que endotoxina estavam presentes em lesões cariosas de dentes sintomáticos e assintomáticos; a quantidade de endotoxina foi significativa maior na superfície do que em camadas profundas da dentina cariada; e maior concentração de endotoxina estava presente nos casos sintomáticos quando comparado aos assintomáticos.

Nelson-Filho *et al.* (2002) investigaram *in vivo* a região apical e periapical de dentes de cães inoculados com LPS de *Escherichia coli*. Após a remoção da polpa de 60 pré-molares, os dentes foram divididos nos seguintes grupos experimentais: G1 (n=20) inoculados com endotoxina, G2 (n=20) preenchidos com endotoxina e hidróxido de cálcio, G3 preenchido com solução salina, e G4 canal vazio. Dez dentes foram utilizados para cada grupo controle. Após 30 dias, foram observadas lesões periapicais similares nos grupos 1 e 4; e lâmina dura intacta nos grupos 2 e 3. Os autores concluíram que a endotoxina bacteriana foi capaz de causar lesão periapical visível radiograficamente, e que o hidróxido de cálcio foi capaz de neutralizar o LPS bacteriano.

Silva *et al.* (2002) avaliaram histopatologicamente os tecidos apicais e periapicais em 30 dentes de cães, inoculados com endotoxina de *Escherichia coli* associada ao hidróxido de cálcio. O grupo 1 (n=10) foi inoculado com 0,1 mL de endotoxina e o grupo 2 (n=10) foi inoculado com 0,1 mL endotoxina associada ao hidróxido de cálcio. Para o controle negativo (n=5) foi utilizado soro fisiológico estéril e para o controle positivo (n=5), as raízes ficaram expostas à cavidade oral durante cinco dias consecutivos. A intensidade e tipo do infiltrado inflamatório, espessamento do ligamento periodontal e a presença de reabsorção dos tecidos mineralizados foram analisados. O grupo 1 apresentou intenso infiltrado inflamatório nas duas regiões; reabsorção cementária e um predomínio de neutrófilos próximo ao ápice e em uma região mais periapical, a presença de neutrófilos e macrófagos. Para o grupo 2, 18 das 20 raízes apresentaram a região apical e periapical com características de normalidade. Áreas de reabsorção óssea foram observadas em apenas dois casos. Para o controle negativo, o osso alveolar, cimento e ligamento periodontal estavam normais. Para o controle positivo, o cimento radicular apresentou irregularidades e um concentrado celular inflamatório próximo à abertura apical. Os resultados demonstraram que o LPS bacteriano é capaz de induzir e desenvolver lesão periapical, em dentes de cães; sugerindo ainda, que o hidróxido de cálcio é capaz de inibir a ação tóxica da endotoxina, *in vivo*, mesmo em altas concentrações.

Jacinto *et al.* (2005) quantificaram endotoxinas em canais radiculares com infecção endodôntica primária e investigaram a relação entre sua concentração e sinais/sintomas clínicos de origem endodôntica. Amostras foram coletadas de 50 dentes. Técnicas anaeróbias foram utilizadas para determinação do número de colônias formadas. Para quantificação de endotoxina, foi utilizado o teste quantitativo cromogênico endpoint (QCL). Em todos os casos foram detectados micro-organismos e endotoxina. Os casos sintomáticos apresentaram um número maior de unidades formadoras de colônias ($1,43 \times 10^6$) e uma concentração maior de endotoxina (18540,0 EU/mL) do que os casos assintomáticos ($9,1 \times 10^4$ e 12030,0 EU/mL). Estes achados embasam a correlação entre a concentração de endotoxina e a presença de sinais e sintomas clínicos.

Schein & Schilder (2006) quantificaram endotoxinas através do teste quantitativo cromogênico endpoint (QCL) de amostras coletadas em canais radiculares de 40 dentes. Os dentes foram divididos em grupos: dentes vitais e assintomáticos (n=10), dentes vitais e sintomáticos (n=10), dentes despulpados e assintomáticos (n=10) e dentes despulpados e sintomáticos (n=10); e radiograficamente: dentes com presença de lesão periapical (n=23) e ausência de lesão periapical (n=17). Os dentes vitais/ assintomáticos apresentaram menor média quando comparado aos dentes vitais/sintomáticos (0,007 e 0,075 $\mu\text{g Et/mL}$, respectivamente). Os dentes despulpados/ assintomáticos por sua vez, apresentaram maior concentração de endotoxina (0,192 $\mu\text{g Et/mL}$) quando comparados com os dentes vitais. Entre os dentes despulpados, os sintomáticos apresentaram maior concentração de endotoxina do que os assintomáticos (0,192 e 1,070 $\mu\text{g Et/mL}$, respectivamente). Em resumo, os dentes com sintomatologia clínica e presença de lesão periapical apresentaram maior concentração de endotoxina.

Recentemente, Gomes *et al.* (2012) avaliaram comparativamente os níveis de bactérias anaeróbias Gram-negativas e endotoxinas encontrados em infecções endodônticas primária e secundária com periodontite apical, correlacionando os níveis de LPS com achados clínicos/radiográficos. Foram coletadas amostras de

15 canais radiculares com infecções primárias e 15 com infecções secundárias, utilizando cones de papel estéril/apirogênico. O teste cinético turbidimétrico de LAL foi usado para quantificar endotoxinas e PCR Simples (16S rDNA) foi usado para investigação bacteriana. Endotoxinas foram detectadas em 100% das amostras endodônticas coletadas em infecções primárias (15/15) e infecções secundárias (15/15) com mediana de 7,49 EU/mL e 3,96 EU/mL, respectivamente ($p < 0,05$). Os níveis de endotoxinas encontrados na presença de sintomas clínicos foram significativamente maiores do que em dentes assintomáticos com infecções primárias ($p < 0,05$). Correlação positiva foi encontrada entre os níveis de endotoxinas e tamanho da área radiolúcida periapical (> 3 mm) ($p < 0,05$). *Prevotella nigrescens* (10/15, 4/15), *Fusobacterium nucleatum* (5/15, 1/15), *Treponema denticola* (3/15, 1/15) e *Treponema socranskii* (5/15, 1/15) foram detectados em dentes com infecções primária e secundária, respectivamente. *P. endodontalis* estava presente apenas em dentes com infecções primárias (5/15). Pode-se concluir que, dentes com infecções endodônticas primárias apresentaram níveis mais elevados de endotoxinas e uma comunidade bacteriana gram-negativa mais complexa do que dentes com infecções secundárias. Além disso, os níveis de endotoxinas foram relacionados com a severidade da destruição óssea nos tecidos periapicais, bem como o desenvolvimento das características clínicas em dentes com infecções primárias.

Foi demonstrado que a rede de citocinas produzidas em resposta ao estímulo nocivo revela a complexa atividade antigênica do conteúdo presente em canais radiculares infectados (Martinho *et al.*, 2012). Devido à alta citotoxicidade do LPS contra tecidos periapicais, via ativação do sistema imune, na produção de citocinas pro-inflamatórias, surgiu a hipótese de existir uma maior produção de citocinas pro-inflamatórias quanto mais elevada a concentração de endotoxinas.

O padrão de resposta inflamatória determinado pela expressão e produção de citocinas vem sendo investigado por inúmeros trabalhos na literatura visando um melhor entendimento da imunopatologia das infecções endodônticas (Jiang *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2004; Prso *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009; Bodet &

Grenier, 2010; Maekawa *et al.*, 2011; Martinho *et al.*, 2011; Martinho *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2012).

Ataoglu *et al.* (2002) dosaram os níveis de IL-1 β e TNF- α em exsudatos periapicais e sua relação com achados clínicos e radiográficos de 35 canais radiculares. Foram coletados exsudatos periapicais com pontas de papel absorvente. Níveis de TNF- α e IL-1 β foram determinados pelo ensaio imunoenzimático ELISA. As amostras foram divididas em dois grupos, conforme a presença ou ausência de sinais clínicos, incluindo edema e/ou fístula, dor à palpação ou percussão e presença de pus intracanal. Amostras do exsudato periapical foram divididas em dois grupos de acordo com o tamanho da área de radioluscência periapical. A concentração média de IL-1beta (72,79 ng mL⁻¹) em exsudatos foi aproximadamente 12 vezes superior aos níveis de TNF- α (6,17 ng mL⁻¹). Não houve correlação significativa entre estas citocinas ($P > 0,05$). Níveis de IL-1 β em canais com maiores áreas de radioluscência foram significativamente maiores do que aqueles com pequenas áreas ($P < 0,05$). Houve uma tendência de níveis mais elevados de IL-1 β em grupos com sinais clínicos, embora sem diferenças significativas ($P > 0,05$). Os autores concluíram que níveis de exsudato periapical de ambas citocinas não refletem o estado de doença periapical.

Hong *et al.* (2004) investigaram a ação do LPS bacteriano nos tecidos periapicais com relação à indução de reabsorção óssea. Polimixina B foi avaliada no tratamento das lesões periapicais. O LPS foi isolado de dois endodonto-patógenos, *F. nucleatum* e *P. endodontalis*. O LPS foi inserido em macrófagos de ratos (J744) para indução da produção de interleucina 1- α (IL-1 α) e fator de necrose tumoral (TNF- α). Os resultados mostraram correlação dos níveis de LPS com os níveis de citocinas. A polimixina B inibiu significativamente estes efeitos. O LPS também estimulou a expressão gênica da metaloproteinase 1 (MM-1) no J774. Os anticorpos anti IL-1 α e TNF- α apresentaram diminuição de seus efeitos. A administração de polimixina B reduziu as extensões de reabsorções ósseas e simultaneamente o número de fatores produtores de macrófagos MMP-1. Os autores concluíram que a liberação de LPS dos canais radiculares infectados

estimula a síntese de IL-1 α e TNF- α pelos macrófagos. Estas citocinas pró-inflamatórias regulam a produção de MMP-1 pelos macrófagos, as quais induzem reabsorções periapicais.

Pezelj-Ribaric *et al.* (2007) avaliaram os níveis de TNF- α em exsudatos de tecidos periapicais de dentes com periodontite apical e correlacionaram seus níveis com achados radiográficos. Exsudato intracanal foi coletado de canais radiculares de 60 dentes unirradiculares com auxílio de cones de papel absorvente e os pacientes divididos em 3 grupos, de acordo com seus aspectos clínicos e radiográficos: G1- 20 pacientes com dentes com periodontite apical crônica, com dor intensa ou ausência de dor, e tamanho da lesão periapical < 1cm; G2- 20 pacientes com dentes com periodontite apical crônica, com dor intensa ou ausência de dor, e tamanho da lesão periapical > 1cm; G3- (controle) – 20 pacientes com sintomas de periodontite aguda acompanhada de dor intensa, necrose pulpar e espessamento do ligamento periodontal observado radiograficamente. Dosagem de TNF- α das amostras coletadas dos canais radiculares foi realizada por meio do teste imunoenzimático ELISA. Os resultados demonstraram um aumento significativo nos níveis de TNF- α de dentes com patologia periapical nas lesões >1cm, o que estabelece um relacionamento entre níveis de TNF- α e tamanho da lesão radiográfica.

Prso *et al.* (2007) avaliaram a presença de TNF- α e Interleucina-6 em lesões periapicais humanas. Amostras clínicas de dentes sintomáticos, presença de lesões assintomáticas e dentes com tecidos periapicais sem inflamação (controle) foram coletadas. No grupo dos dentes sintomáticos estavam incluídos aqueles que apresentassem aspectos clínicos e radiográficos de existência de patologia perirradicular, com presença de reabsorção óssea e dor à percussão e/ou à palpação. No grupo das lesões assintomáticas estavam incluídos os dentes que apresentasse lesões periapicais sem, no entanto, apresentar qualquer sintomatologia à percussão e/ou à palpação. Os pacientes participantes deste estudo foram submetidos à apicetomia para coleta dos tecidos periapicais. Após a excisão, cada espécime foi dividido em duas partes; sendo uma destas utilizada

para análise histopatológica e a outra utilizada para análise da presença de citocinas. Os resultados mostraram que os níveis de TNF- α foram significativamente maiores em lesões sintomáticas quando comparadas ao grupo controle. O grupo das lesões assintomáticas também diferiu estatisticamente do grupo controle, mas nenhuma diferença foi encontrada nos níveis de TNF- α entre os grupos das lesões sintomáticas e assintomáticas. O mesmo ocorreu com as concentrações de IL-6. Assim, os autores concluem que as lesões sintomáticas representam o estágio ativo da doença, e as lesões assintomáticas representam o processo da doença em evolução, além de afirmarem que o TNF- α e a IL-6 possuem um papel importante na patogênese da reabsorção óssea.

Silva *et al.* (2009) estudaram a presença, localização, distribuição e concentração de citocinas inflamatórias em polpas saudáveis e inflamadas, através de imunohistoquímica e teste ELISA. Vinte polpas, obtidas a partir de terceiros molares saudáveis (n = 10) e de pulpectomias (n = 10) foram utilizadas para o estudo. Em cultura de células de fibroblastos obtidos de polpas dentárias saudáveis LPS de *Escherichia coli* foi inoculado para estimular a produção de IL-1 β e IL-8. Os resultados foram avaliados através do teste de ELISA. De acordo com os resultados, os autores afirmam que, imunohistoquimicamente, as polpas inflamadas apresentaram-se fortemente marcadas para citocinas inflamatórias, enquanto as polpas saudáveis não apresentaram nenhuma marcação. O teste ELISA detectou altos níveis de ambas as citocinas, cujos fibroblastos estimulados por LPS produziram maior quantidade de citocinas do que as células saudáveis do grupo controle. Assim, conclui-se que polpas inflamadas apresentam valores mais altos de IL-1 β e IL-8, quando comparadas à polpas saudáveis.

Bodet & Grenier (2010) investigaram a resposta inflamatória provocada pelas espécies bacterianas *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis* e seus lipopolissacarídeos (LPS), individualmente e em combinação no sangue de pacientes com periodontite crônica. Amostras de sangue foram coletadas de 7 pacientes com periodontite e então estimuladas por LPS para produção de interleucina IL-1beta, IL-6, IL-8, e fator de necrose tumoral

alfa (TNF- α). A dosagem destas citocinas foi realizada pelo ensaio imunoenzimático- ELISA. Foram detectados elevados níveis de IL-1beta, IL-6, IL-8 e TNF-alfa produzidos pela população mista de leucócitos de pacientes com periodontite. Além disso, LPS da espécie *P. gingivalis*, LPS de *T. denticola* e LPS de *T. forsythia* atuaram em sinergia para induzir altos níveis de IL-1beta e TNF-alfa. Este estudo sugere que estas bactérias podem contribuir para a resposta imunodestrutiva do hospedeiro, característica de periodontite, através de efeitos sinérgicos de seus LPS na resposta inflamatória induzida por uma população mista de leucócitos.

Skovbjerg *et al.* (2010) demonstraram que bactérias Gram-positivas induzem a produção de níveis mais elevados de interleucina-12 (IL-12), interferon-gama (IFN- γ) e tumor fator de necrose (TNF) em células mononucleares no sangue periférico (PBMC) do que bactérias Gram-negativas. PBMC de doadores de sangue foram incubados com bactéria inativada UV representando 37 espécies de cinco filos. IL-12, TNF, IL-1beta, IL-6, IL-8 e IL-10 foram dosados nos sobrenadantes após 24h e IFN-gama após 5 dias. Bactérias Gram-positivas induziram a produção de IL-12 (nove vezes mais em média) e IFN- γ (sete vezes), TNF mais (três vezes) e IL-1beta (1,5 vezes) do que fez as Gram-negativas. Por sua vez, estas induziram IL-6 (1,5 vezes), IL-8 (1,9 vezes) e IL-10 (3,3 vezes) do que fizeram Gram-positivos. Os resultados confirmam a diferença fundamental na resposta imune inata às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, o que aponta provavelmente nas diferenças na estrutura da parede celular dessas bactérias.

Martinho *et al.* (2010b) investigaram o perfil microbiano e níveis de endotoxina em infecções endodônticas primária associadas à periodontite apical. A antigenicidade do conteúdo infeccioso foi avaliada contra macrófagos na produção de IL-1 β e TNF- α , correlacionando seus níveis aos achados clínicos e radiográficos. Foram coletadas amostras de 21 canais radiculares com infecção endodôntica primária e periodontite apical. PCR (16S rDNA) foi usado para a detecção de bactérias-alvo. O método cinético turbidimétrico de LAL foi utilizado para determinar a concentração de endotoxinas. A concentração de IL-1 β / TNF- α

em sobrenadantes de macrófagos foram dosados através do DuoSet-kit (ELISA). Os resultados demonstraram que *Prevotella nigrescens* (13/21), *Porphyromonas endodontalis* (6/21) e *Treponema socranskii* (6/21) foram as espécies Gram-negativas mais frequentemente detectadas. A presença de fístula (2/21) foi associada à presença de *Filifactor alocis* ($p < 0,05$). Foi encontrada uma correlação entre o número de bactérias Gram-negativas e os níveis de IL-1 β /TNF- α ($p < 0,05$). Elevados níveis de endotoxinas foram correlacionados à concentração de TNF- α ($p < 0,05$). Níveis mais elevados de IL-1 β e níveis de endotoxinas foram relacionados ao tamanho da lesão periapical ($p < 0,05$). Os autores concluíram que a antigenicidade do conteúdo endodôntico não está relacionado apenas com a quantidade de endotoxinas encontradas no canal radicular, mas também ao número de espécies diferentes de bactérias Gram-negativas envolvidas na infecção. Além disso, um tamanho maior (>2 mm) da lesão periapical foi relacionada a IL-1 β e à concentração de endotoxinas.

Martinho *et al.* (2011) investigaram a presença de diferentes espécies bacterianas Gram-negativas e níveis de endotoxinas em dentes com infecção endodôntica primária associada à periodontite apical, determinando sua antigenicidade contra macrófagos através da produção de prostaglandina E_2 (PGE $_2$). Foram coletadas amostras de 21 canais radiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical. Reação em cadeia da polimerase (PCR 16S rDNA) foi usada para detecção bacteriana e o método de LAL para quantificação de endotoxinas. Os níveis de PGE $_2$ em sobrenadantes de macrófagos foram dosados através do DuoSet-kit (ELISA). As espécies mais frequentemente detectadas foram *Prevotella nigrescens* (13/21), *Fusobacterium nucleatum* (6/21), e *Porphyromonas endodontalis* (6/21). Uma associação positiva foi encontrada entre *F. nucleatum* e *P. endodontalis* ($p < 0,05$). Foi encontrada associação significativa entre o número de espécies bacterianas Gram-negativas e níveis de endotoxinas, assim como níveis de PGE $_2$ ($p < 0,05$). Níveis elevados de endotoxina foram detectados em dentes com exsudação. Maior concentração de PGE $_2$ foi encontrada em dentes com dor à percussão e à palpação. Os autores concluíram

que a presença de sintomatologia clínica dolorosa em infecções endodônticas primárias está relacionada a altos níveis de endotoxinas e PGE₂.

Martinho *et al.* (2012) investigaram o perfil bacteriano e possíveis correlações entre achados clínicos e radiográficos de infecções endodônticas primárias associada a periodontite apical (PEIAP) com níveis de Interleucina IL-1- β , Fator de Necrose tumoral- alfa, IL-6, IL-10, prostaglandina E₂ (PGE₂) e suas associações produzidas por macrófagos. Amostras de 21 canais radiculares com PEIAP foram coletadas usando cones de papel estéril/apirogênico. Dados quanto à presença de exsudato (EX), dor à palpação (POP), dor à percussão (TTP), e tamanho da lesão radiográfica (SRL) foram registrados. A investigação microbiológica foi realizada através de PCR Simples 16S rDNA e a quantificação de endotoxinas determinadas pelo método de LAL. Linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi estimulada com conteúdo endodôntico durante 24hs. Níveis de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10 e PGE₂ foram dosados pelo método de ELISA. Os dados foram avaliados por correlação de regressões múltiplas. Bactérias e endotoxinas foram detectadas em 100% das amostras. IL-6 e TNF- α foram positivamente correlacionados com SRL e EX, respectivamente ($p < 0,05$). Associação positiva foi encontrada entre EX e PGE₂, IL-1 β , e TNF- α ($p < 0,05$), IL-6 e PGE₂ foram positivamente correlacionados à POP, entretanto não foi encontrada associação à SRL ($p < 0,05$). Os autores sugeriram diferentes funções para cada citocina no desenvolvimento da periodontite apical, cujos efeitos de suas interações repercutem na presença de sinais/sintomas e achados radiográficos manifestados em infecções endodônticas.

De Brito *et al.* (2012) avaliaram a expressão de mRNA de genes CD4(+), CD28(+), e CD8(+)-T e a expressão de Interferon- γ , TNF- α , interleucina (IL)-1 β , IL-17A, IL-10, CCL2/MCP-1, CCL4, CCL5, CXCR4, CCR5 e receptor ativador para o fator nuclear ligante de kappa B (RANKL) em amostras coletadas da região periapical de infecções endodônticas. As amostras foram coletadas imediatamente após o preparo do canal radicular e 7 dias depois para caracterizar as expressões dos genes investigados. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real*

time-PCR) demonstraram níveis significativamente mais altos de marcadores CD4(+)CD28(+) e CD8(+) T, e de IL-10 e CXCR4 imediatamente após o preparo, seguido por um decréscimo dos níveis de RANKL, interferon- γ , IL-1 β e CCL5 após 7 dias. Análise da expressão dos linfócitos T e citocinas na área periapical foram capaz de mostrar que condições distintas do canal radicular podem desempenhar um papel regulador no controle de processos imune/inflamatórios locais.

Devido ao potencial inflamatório de LPS em estimular a produção de diferentes citocinas inflamatórias, sua remoção e/ou eliminação dos canais radiculares durante a terapia endodôntica deve ser considerada para contribuir com o processo de reparo dos tecidos periapicais.

O melhor e mais seguro método utilizado para descontaminar o canal radicular é a criteriosa limpeza do conteúdo necrótico-séptico através da combinação dos atos operatórios de instrumentação do canal radicular, irrigação e sua devida aspiração. O preparo do canal radicular é dividido, de maneira didática, em *meios químicos*, por intermédio das substâncias químicas auxiliares; *meios físicos*, que é o ato simultâneo de irrigar, aspirar e inundar o canal radicular com a solução irrigadora indicada e *meios mecânicos*, que é ato operatório de instrumentação dos canais radiculares (Schilder, 1974).

A instrumentação mecânica possui a capacidade de reduzir em até 90% o número de células bacterianas do interior do canal radicular (Siqueira *et al.*, 1999a; Dametto *et al.*, 2002; Berber *et al.*, 2005). Contudo, mesmo que a eficácia de descontaminação pela ação mecânica dos instrumentos endodônticos tenha sido comprovada, esta por si só é incapaz de promover completa desinfecção de regiões do espaço endodôntico devido às complexidades anatômicas do sistema de canais radiculares (Biffi & Rodrigues, 1981; Byström & Sundqvist, 1983). É importante ressaltar a necessidade da utilização de substâncias químicas auxiliares durante o preparo químico-mecânico com o intuito de promover uma significativa redução dos depósitos bacterianos e de endotoxinas nos canais radiculares, além de lubrificação do canal durante a ação de corte dos

instrumentos, controle da exsudação, dissolução do tecido pulpar necrosado e remoção da “*smear layer*” (Spangberg, 1982; Byström & Sundqvist, 1983; Martinho & Gomes, 2008).

2.2 Substâncias químicas auxiliares

2.2.1 Hipoclorito de sódio

A partir da introdução do hipoclorito de sódio (NaOCl) como solução irrigadora em Endodontia (Walker, 1936), esta substância química vem sendo amplamente utilizada em diferentes concentrações durante o preparo dos canais radiculares.

A ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio ocorre devido ao seu equilíbrio dinâmico, demonstrado na seguinte reação química: $\text{NaOCl} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NaOH} + \text{HOCl}$ $\rightleftharpoons \text{Na}^+ + \text{OH}^- + \text{H}^+ + \text{OCl}^-$. O NaOCl (hipoclorito de sódio, sal) reage com molécula de água (H₂O) formando NaOH (hidróxido de sódio, base forte) e HOCl (ácido hipocloroso, ácido fraco). O hidróxido de sódio atua como solvente orgânico e de gordura, formando sabão (reação de saponificação). O ácido hipocloroso possui efeito antimicrobiano por liberar cloro nascente, que se liga ao grupamento NH₂ dos aminoácidos, formando as cloraminas, interferindo no metabolismo celular. Além disso, inibe a função enzimática bacteriana por oxidação irreversível dos grupos SH (sulfidríla) de enzimas bacterianas essenciais (Vianna, 2002).

O NaOCl é conhecido por sua excelente atividade antimicrobiana frente aos microrganismos encontrados no interior do sistema de canais radiculares (Byström & Sundqvist, 1983; Hauman & Love, 2003; Berber *et al.*, 2006). Estudos demonstram sua efetiva ação antimicrobiana (Gomes *et al.*, 2001; Ferraz *et al.*, 2001, Vianna *et al.*, 2004) e sua capacidade de dissolução de tecido orgânico (Bealtz *et al.*, 2003; Naenni *et al.*, 2004); dentre outras propriedades, tais como desodorizante, ação clareadora, lubrificante, baixa tensão superficial, e sua

capacidade de promover saponificação de lipídios (Grossman *et al.*, 1941; Bloomfield & Miles, 1979).

Entretanto, as substâncias químicas auxiliares não apresentam seletividade para atuar apenas sobre microrganismos, podendo também, gerar efeitos tóxicos para as células vivas do hospedeiro. A toxicidade do NaOCl está diretamente relacionada à sua concentração (Hülsman & Hahn, 2000; Ferraz *et al.*, 2001; Tanomaru-Filho *et al.*, 2002). Embora apresente pronunciada citotoxicidade (Pashley, 1985), este efeito é minimizado desde que a solução seja mantida no interior do canal radicular, sem que extravase para os tecidos periapicais (Sabala & Powell, 1989). Quanto à capacidade de remoção da *smear layer*, esta, tem se mostrado deficiente, uma vez que o NaOCl age apenas na sua porção orgânica superficial, que representa a menor porção constituinte da lama dentinária formada após a instrumentação (Berg *et al.*, 1986; Baumgartner & Mader, 1987). Entretanto, quando associado ao uso de um agente quelante, como o ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) (White *et al.*, 1984; Baumgartner & Mader 1987), a remoção da *smear layer* é potencializada.

2.2.2 Clorexidina

Tendo em vista algumas desvantagens do hipoclorito de sódio, a clorexidina inicialmente utilizada na Periodontia, passou a ser utilizada em Endodontia como substância irrigadora, como alternativa ao NaOCl, devido a sua biocompatibilidade e por apresentar ação antimicrobiana similar ao NaOCl contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Jeansonne & White, 1994).

Quimicamente, a clorexidina é uma molécula catiônica simétrica, composta por dois anéis simétricos 4-clorofenil e dois grupos bisguanida conectados por um anel central de hexametileno. A forma mais estável de preparação é na forma de sal de digluconato por ser altamente solúvel em água, e

quando em pH fisiológico dissocia-se facilmente, liberando componentes bioativos carregados positivamente (Rölla & Melsen, 1975).

Hennessey (1973) relata que a interação da clorexidina com as células bacterianas ocorre devido a: a) aderência à parede celular; b) alteração da permeabilidade da membrana celular; c) precipitação e coagulação do conteúdo citoplasmático. Esta ação ocorre devido à aderência das moléculas catiônicas de clorexidina às paredes celulares dos microrganismos, que são carregadas negativamente, alterando a permeabilidade da membrana celular, o que resulta na perda dos componentes intracelulares e no desequilíbrio osmótico da célula.

Em baixa concentração a clorexidina promove a saída das substâncias de baixo peso molecular, como o potássio e o fósforo, exercendo assim o efeito bacteriostático. Em alta concentração promove o efeito bactericida, pela precipitação ou coagulação do conteúdo citoplasmático, resultando na morte celular (Fardal & Turnbull, 1986). O efeito bacteriostático da clorexidina é considerado o mais importante porque a ligação da molécula de clorexidina é liberada lentamente em baixas quantidades (Fardal & Turnbull, 1986).

Diferentes propriedades são atribuídas à clorexidina, tais como: amplo espectro antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, anaeróbias, facultativas e aeróbias, leveduras e fungos (Hennessey, 1973; Greenstein *et al.*, 1986; Fardal & Turnbull, 1986; Ferraz *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2004; Dametto *et al.*, 2005); especificamente frente à *Candida albicans* (Waltimo *et al.*, 1999); relativa ausência de toxicidade (Greenstein *et al.*, 1986); capacidade de adsorção pela dentina e lenta liberação da substância ativa, o que prolonga sua substantividade residual, de 48 a 72 horas (Jeansonne & White, 1994; White *et al.*, 1997) e de 7 (Dametto *et al.*, 2005) a 12 dias após a instrumentação do canal radicular (Rosenthal *et al.*, 2004). No entanto, a clorexidina não possui capacidade de dissolução tecidual (Abou-Rass & Piccinino, 1982; Jeansonne & White, 1994). Estudos mostraram que ambas as formas de apresentação desta substância, solução aquosa ou gel, não são capazes de dissolver o tecido pulpar (Ferraz *et al.*, 2001; Marley *et al.*, 2001; Okino *et al.*, 2004).

Por outro lado, Ferraz *et al.* (2001) demonstraram por meio de análise por microscopia eletrônica de varredura que a instrumentação do canal radicular utilizando clorexidina gel 2% como substância química auxiliar produziu superfície dentinária mais limpa quando comparado a outros irrigantes, comumente utilizados, tais como hipoclorito de sódio e gluconato de clorexidina na forma líquida e apresentou capacidade antimicrobiana comparável às outras substâncias testadas. As propriedades mecânicas do gel parecem ser o principal fator para essa diferença, uma vez que, devido à sua viscosidade, previniu a formação de *smear layer*. É importante ressaltar que a preparação em gel pode compensar a sua inabilidade em dissolver os tecidos orgânicos por sua ação reológica.

Embora bem consolidado o uso dessas substâncias químicas auxiliares na terapia endodôntica, por sua ação antimicrobiana de amplo espectro, é imperioso também investigar sua ação sobre endotoxinas em canais radiculares infectados.

Ao longo dos anos, estudos têm sido realizados em busca de substâncias químicas auxiliares que sejam capazes de atuar sobre as moléculas de LPS presente nos canais radiculares e assim estabelecer um protocolo clínico efetivo para sua eliminação ou inativação química (Niwa *et al.*, 1969; Buttler & Crawford, 1982; Porro *et al.*, 1998; Buck *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2007; Vianna *et al.*, 2007; Martinho & Gomes, 2008; Martinho *et al.*, 2010; Maekawa *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2012). Cabe destaque ao hipoclorito de sódio e à clorexidina.

Buck *et al.* (2001) analisaram soluções aquosas de LPS misturadas a irrigantes endodônticos por 30 minutos e ao hidróxido de cálcio por 5 dias, através da técnica de espectrofotometria de massa e gás cromatográfico. A inativação do LPS foi medida através da quantificação de ácidos graxos liberados. A água, EDTA, etanol, clorexidina 0,12% na forma líquida + hipoclorito de sódio 2,62% e o hipoclorito de sódio 2,62% demonstraram pequena ação sob o LPS. A aplicação de hidróxido de cálcio por 5 dias, assim como a exposição à mistura alcalina da clorexidina, etanol e hipoclorito de sódio por 30 minutos, foram capazes de inativar moléculas de LPS, através da hidrólise de ligações de ésteres nas ligações de ácidos graxos do “Lipíde A”.

Tanomaru *et al.* (2003) avaliaram o efeito do preparo biomecânico com diferentes soluções irrigadoras e medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio, em 140 pré-molares de 7 cães inoculados com LPS de *Escherichia coli* por 10 dias. Os dentes foram divididos em 7 grupos, de acordo com a solução irrigadora utilizada: NaOCl 1% (G1), NaOCl 2,5% (G2), NaOCl 5% (G3), clorexidina 2% (G4), solução salina (G5), apenas o LPS (G6 – controle positivo) e preenchimento com pasta Calen, após irrigação com soro fisiológico (G7 – controle negativo). Após 60 dias, os animais foram mortos e os seguintes parâmetros foram avaliados: presença de infiltrado inflamatório, espessura do ligamento periodontal e desenvolvimento de reabsorção cementária e óssea. A avaliação histopatológica demonstrou que dos grupos 1 ao 4 houve maior infiltrado inflamatório, maior espessamento do ligamento periodontal e maiores áreas de reabsorção cementária e óssea quando comparados ao grupo 7. Os autores concluíram que o preparo biomecânico associado às soluções irrigadoras testadas não inativou os efeitos da endotoxina; mas, o uso da medicação intracanal com Ca(OH)_2 parece inativar os efeitos da endotoxina *in vivo*.

Silva *et al.* (2004) avaliaram histologicamente a efetividade do preparo mecânico em 120 canais radiculares de 6 cães, inoculados com LPS bacteriano após pulpectomia e, posteriormente selados com óxido de zinco e eugenol. Os dentes foram divididos em grupos de acordo com o irrigante utilizado: solução salina, hipoclorito de sódio 1%, 2,5%, 5% e clorexidina 2% e grupo controle sem irrigante. Os animais foram sacrificados em 60 dias, os dentes foram fixados e desmineralizados. Subseqüentemente, foram realizados cortes seriados e corados pela técnica de Brown-Brenn para visualização de contaminação bacteriana. Os resultados demonstraram que o infiltrado inflamatório foi menos intenso nos grupos que continham hipoclorito de sódio 5% e clorexidina 2%. Entretanto, nenhum dos irrigantes foi capaz de inativar por completo o efeito nocivo do LPS bacteriano. O preparo químico-mecânico associado a diferentes irrigantes não foi capaz de inativar o LPS bacteriano.

Oliveira *et al.* (2007) avaliaram os efeitos dos irrigantes utilizados em

Endodontia sobre endotoxinas presentes em canais radiculares. Oitenta e quatro dentes unirradiculares foram inoculados com endotoxina de *Escherichia coli*. As amostras foram instrumentadas e divididas em 7 grupos de acordo com a solução irrigadora utilizada: hipoclorito de sódio em duas concentrações diferentes (2,5 e 5,25%), digluconato de clorexidina a 2%, solução de hidróxido de cálcio a 0,14%, polimixina B e solução salina apirogênica associada à endotoxina (controle positivo) e solução salina apirogênica (controle negativo). Duas amostras foram coletadas de cada dente: logo após a instrumentação e 7 dias após a instrumentação. A ação de inativação da endotoxina foi avaliada pelo teste de Lisado de amebócito *Limulus* (LAL) e pela produção de anticorpos em cultura de linfócitos B. Os resultados demonstraram que o hidróxido de cálcio e a Polimixina B inativaram a endotoxina e alteraram suas propriedades em estimular a produção de anticorpos por linfócitos B. O NaOCl e a clorexidina não foram capazes de inativar o LPS.

Vianna *et al.* (2007) avaliaram o efeito do preparo químico-mecânico na redução de endotoxinas e patógenos endodônticos em infecções endodônticas primárias. Níveis de endotoxina e a carga bacteriana foi determinada antes e após o preparo químico-mecânico com clorexidina gel 2% (CLX) e após 7 dias de medicação intracanal. Foram utilizados neste estudo 24 dentes unirradiculares, sendo 34 preparados com clorexidina gel 2% e 3 diferentes medicações intracanal: Ca(OH)₂ pasta; CLX gel 2%; e Ca(OH)₂ + CLX gel 2%. O teste de LAL foi usado para mensurar os níveis de endotoxina. Técnicas aeróbias e anaeróbicas de isolamento e identificação bacterianas foram utilizadas para determinar a redução bacteriana pelas unidades formadoras de colônia (UFC). Os resultados mostraram presença de endotoxina e bactérias em 100% das amostras iniciais, com concentração de endotoxina variando de 62,93 a 214,56 EU/mL e UFC entre 4×10^5 e $2,6 \times 10^6$. Após o preparo, a média de endotoxina reduziu em apenas 44,4%. Oito canais radiculares tiveram uma redução de 99,96% de bactérias (UFC). Após 7 dias de medicação intracanal, a concentração de endotoxina diminuiu apenas 1,4% quando comparado às amostras coletadas após o preparo

químico-mecânico, e bactérias residuais foram encontradas em 13 casos. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as medicações utilizadas. Os autores concluem que relativamente altos valores de endotoxina ainda permanecem no canal radicular após o preparo, apesar da maioria das bactérias serem eliminadas. Nenhuma melhora significativa foi encontrada após 7 dias de medicação.

Cardoso *et al.* (2008) avaliaram a eficiência da água ozonizada em eliminar *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e endotoxina de canais radiculares em 48 dentes unirradiculares humanos. Destes, 24 foram inoculados com *C. albicans* e *E. faecalis* e 24 foram inoculados com endotoxina de *Escherichia coli*. Os dentes foram irrigados com água ozonizada e soro fisiológico (controle negativo). A eficiência antimicrobiana foi mensurada por meio de redução microbiana (contagem de formação de colônias) e por dois testes para detecção de endotoxina: método qualitativo linear de LAL e pelo método de cultura de linfócitos B. Os resultados demonstraram que após o período de 7 dias, houve crescimento microbiano conferindo a água ozonizada baixa ação residual. No entanto, os autores ressaltaram que nenhum efeito foi observado sobre a endotoxina testada.

Martinho & Gomes (2008) realizaram um estudo clínico para quantificar endotoxinas e bactérias cultiváveis em dentes com necrose pulpar e periodontite apical antes e após o preparo químico-mecânico com NaOCl 2,5%, correlacionando endotoxinas e bactérias cultiváveis com a presença de sintomatologia clínica. Foram selecionados vinte e quatro canais radiculares e as amostras foram coletadas antes e após o preparo. Técnicas de cultura foram utilizadas para quantificar as unidades formadoras de colônia e, para quantificação de endotoxinas foi utilizado o método de LAL. Lipopolissacarídeos e bactérias foram detectados em 100% das amostras iniciais, com uma média de concentração de 139 Eu/mL e $2,64 \times 10^6$ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL, respectivamente. Altos níveis de LPS foram encontrados em dentes com sintomatologia clínica ($p < 0,05$). Após o preparo químico-mecânico, a média de

redução de endotoxinas foi de 59,99% e a média de redução bacteriana de 99,78%. Tais resultados, segundo os autores, indicam que o preparo químico mecânico com NaOCl 2,5% foi efetivo contra bactérias, porém pouco eficaz na eliminação de endotoxinas em canais radiculares infectados. Além disso, uma associação estatisticamente significativa foi encontrada entre os altos níveis de bactérias e endotoxinas e presença de sintomatologia clínica dolorosa.

Gomes *et al.* (2009) conduziram um estudo clínico comparando a eficácia do preparo químico-mecânico com hipoclorito de sódio 2,5% e clorexidina gel 2% na eliminação de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos em dentes com periodontite apical crônica. As amostras foram obtidas de quarenta e quatro canais radiculares antes e após o preparo. Os dentes foram aleatoriamente divididos em dois grupos: G1- NaOCl 2,5% (n=27) e G2- CLX gel 2% (n=27). O teste do Lisado de amebócito de limulus (LAL) foi usado para quantificar as endotoxinas coletadas nas amostras. Os resultados mostraram presença de endotoxinas em 100% das amostras investigadas, com uma média de 272 EU/mL em G1 e de 152,46 EU/mL em G2. Após o preparo houve uma redução para 86 EU/mL em G1 e 85 EU/mL em G2. Os autores concluem que nenhuma das duas substâncias utilizadas no preparo biomecânico foram efetivas na eliminação de endotoxinas.

Martinho *et al.* (2010a) investigaram a capacidade do preparo químico-mecânico (PQM) com NaOCl a 5,25% + EDTA a 17% em remover endotoxinas de 21 canais radiculares com periodontite apical crônica. Instrumentação rotatória foi realizada no limite apical de instrumentação correspondente ao ponto zero do localizador foraminal. Amostras do conteúdo endodôntico foram coletadas antes e após o preparo químico-mecânico. O teste cinético turbidimétrico de LAL foi utilizado para quantificação de endotoxinas. Os resultados demonstraram a presença de endotoxinas em 100% dos casos (antes e após o PQM) e uma redução de endotoxina (98,06%) estatisticamente significativa após o preparo.

Maekawa *et al.* (2011) analisaram a efetividade de diferentes substâncias químicas auxiliares e de medicações intracanaís na redução bacteriana e de endotoxinas em canais radiculares infectados de dentes contaminados por *E.coli*

por 14 dias. Os dentes foram divididos em três grupos de acordo com a substância química auxiliar utilizada no preparo: G1) Hipoclorito de sódio 2,5%; G2) Clorexidina gel 2%; e G3) Água apirogênica. Em seguida, os grupos foram subdivididos de acordo com a medicação intracanal utilizada: A) pasta de hidróxido de cálcio; B) Polimixina B; C) Hidróxido de cálcio associado à Clorexidina gel 2%. Amostras do conteúdo endodôntico foram coletadas após o preparo o preparo biomecânico, após 7 e 14 dias de uso da medicação intracanal e 7 dias após a remoção da medicação intracanal. Os autores concluíram que tanto o hipoclorito de sódio quanto a clorexidina foram eficazes em eliminar a carga microbiana do canal radicular, entretanto apenas reduziram os níveis de endotoxina. Apenas com o uso de medicação intracanal o conteúdo endotóxico dos canais radiculares foi significativamente reduzido, independente da substância química auxiliar testada.

Oliveira *et al.* (2012) avaliaram a efetividade do tratamento endodôntico utilizando diferentes irrigantes na redução de endotoxinas em canais radiculares de dentes com periodontite apical crônica e seus efeitos citotóxicos em cultura de macrófagos na produção de citocinas inflamatórias. Trinta e seis canais radiculares foram selecionados. Amostras foram coletadas antes (S1) e após a instrumentação (S2). Os canais radiculares foram divididos em 3 grupos (n = 12) de acordo com a solução irrigadora utilizada no preparo: CLX + LW (água de limão 0,14%); clorexidina gel 2% + hidróxido de cálcio CLX + Polimixina B, clorexidina + Polimixina B; CLX (controle), clorexidina + soro fisiológico. A terceira coleta foi realizada após o uso do EDTA 17% e S4 após a medicação intracanal (CLX + hidróxido de cálcio por 14 dias). Endotoxinas foram quantificadas através do método de LAL e efeitos citotóxicos através da produção de citocina (IL-1 β e TNF- α em macrófagos (RAW 264.7) estimulados com o conteúdo do canal radicular. Endotoxinas foram detectadas em todos os canais radiculares em S1. O grupo CLX + LW apresentou a maior redução de endotoxina após instrumentação (99,18%), similarmente ao grupo CLX + PmB (96,42%, $p > 0,05$) e diferente do grupo CLX (90,78%, $p < 0,05$.) A medicação intracanal promoveu significativa

neutralização de endotoxinas com uma redução de 99,2% a 100%. O conteúdo do canal radicular em S1 induziu maior produção de TNF- α e IL-1 β em comparação com as amostras obtidas após o tratamento. Os autores concluíram que a combinação de CLX e água de limão como irrigante endodôntico foi a mais eficaz na redução de endotoxinas em canais radiculares, e o uso da medicação intracanal foi importante para neutralizar efeitos citotóxicos do conteúdo infeccioso intracanal.

Tendo sido observado um baixo desempenho do NaOCl (Buttler & Crawford, 1982; Oliveira *et al.*, 2007; Tanomaru *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004; Martinho *et al.*, 2008) e da CLX (Tanomaru *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2007; Vianna *et al.*, 2007) na eliminação do LPS bacteriano, a redução de endotoxinas presente nos canais radiculares parece não estar relacionada apenas com a substância química auxiliar utilizada, mas principalmente pela ação mecânica dos instrumentos endodônticos, limite apical de instrumentação, conjuntamente com o fluxo e refluxo da solução irrigadora (Gomes *et al.*, 2009).

Ainda, devido ao fato do LPS aderir-se nos tecidos mineralizados da região apical e periapical (osso e cimento) (Schein e Schilder, 1975), agindo como um potente estimulador da reabsorção óssea, a ação mecânica dos instrumentos endodônticos na redução de endotoxinas de canais radiculares contaminados ganhou especial atenção no trabalho de Marinho *et al.* (2012). Estes autores avaliaram a influência do diâmetro de alargamento foraminal com instrumentos rotatórios na redução dos níveis de endotoxina. Trinta canais radiculares de dentes pré-molares inferiores foram inoculados com endotoxina de *Escherichia coli* (055: B55). Grupos foram divididos de acordo com o diâmetro apical final de instrumentação (#25/.06- (G1); #30/.05- (G2); # 35/.04- (G3) e #40/.04- (G4). Coletas do conteúdo endodôntico foram realizadas antes e após o preparo químico-mecânico. Água estéril/apirogênica foi utilizada como irrigante. Endotoxina foi quantificada pelo método cinético turbidimétrico de LAL. Os resultados demonstraram haver relação diretamente proporcional entre os níveis de redução de endotoxina e o aumento do diâmetro apical final de instrumentação.

3. PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo foram:

- 1) Quantificar endotoxinas em canais radiculares infectados de dentes com periodontite apical crônica e verificar sua relação com sinais e sintomas clínicos de origem endodôntica;
- 2) Avaliar a efetividade do preparo químico-mecânico com hipoclorito de sódio 2,5%, clorexidina gel 2% ou soro fisiológico na eliminação de endotoxinas;
- 3) Avaliar o potencial inflamatório do conteúdo endodôntico, antes (C1) e após a instrumentação do canal radicular (C2) com NaOCl 2,5%, CLX 2% ou soro fisiológico e após uso de EDTA 17% (C3) em cultura de células de macrófagos quanto à produção de citocinas pró-inflamatórias - IL-1 β , TNF- α .

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção da amostra

Foram selecionados 30 pacientes que compareceram à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo-Brasil, os quais possuíam dentes unirradiculares indicados para a realização de tratamento endodôntico devido à periodontite apical crônica. Por se tratar de um estudo microbiológico, fatores que poderiam interferir na microbiota do canal radicular foram levados em consideração, e desta forma, foram excluídos do presente estudo: pacientes que fizeram uso de antifúngicos e antibióticos (num período mínimo de 3 meses anterior à consulta), pacientes com comprometimento sistêmico, profundidade de sondagem periodontal do dente analisado maior que 3 mm; dentes com fratura radicular; dor espontânea, câmara pulpar com exposição ao meio bucal, impossibilidade de isolamento absoluto ou de introdução do cone de papel no comprimento de trabalho.

O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Estadual de Campinas, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (protocolo nº 103/2008) (**Anexo 1**). Os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido elaborado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa antes de participar da pesquisa.

4.2 Análise clínica e radiográfica

O diagnóstico de necrose pulpar associado à presença de lesão periapical foi obtido pela realização de exame clínico-radiográfico minucioso. Formulários específicos (fichas de exame clínico) foram devidamente preenchidos durante a anamnese contendo dados quanto à idade, gênero, estado geral do paciente, história dentária pregressa e atual, exame clínico e radiográfico.

Foi verificada a presença de cáries e/ou restaurações, relatos de dor atual ou prévia, natureza da dor (localização, aparecimento, duração, frequência e intensidade). Foram realizados teste de sensibilidade pulpar (teste térmico a frio), testes perirradiculares (palpação e percussão), avaliação da profundidade de sondagem periodontal, inspeção da presença de edema dos tecidos moles e investigação da presença de fístula.

Foram realizadas radiografias periapicais pré-operatórias com auxílio de posicionador radiográfico e posteriormente, realizou-se a determinação radiográfica do tamanho da lesão periapical e avaliação do grau de destruição óssea. Após acesso aos canais radiculares, foi avaliado o aspecto físico dos canais radiculares, como presença de exsudato (seroso, purulento ou hemorrágico), presença de restos de tecido pulpar ou ausência de exsudação intracanal, denotando um canal seco.

4.3 Procedimentos clínicos

4.3.1 Descontaminação do campo operatório

Previamente à intervenção endodôntica foram realizados bochechos com enxaguatório bucal (clorexidina 0,12%) (Drogal, Farmácia de Manipulação, Piracicaba, SP) por 1 minuto. Em seguida, os pacientes foram anestesiados localmente e o dente envolvido recebeu polimento coronário com pedra-pomes e então isolado com lençol de borracha (isolamento absoluto) (**Figura 3-A**). Realizou-se o vedamento da interface coroa/lençol com cianocrilato (Super Bonder; Loclite Brasil Ltda, Itapevi, SP) para evitar infiltração de saliva. A antisepsia do campo operatório (dente, grampo, lençol de borracha, arco e cianocrilato) foi realizada com a utilização de *swabs* estéreis umedecidos primeiramente em H₂O₂ a 30% (v/v), e depois em NaOCl 5,25% (Drogal, Farmácia de Manipulação, Piracicaba, SP, Brasil) por 30 segundos cada, subseqüentemente

neutralizado com solução estéril de tiosulfato de sódio a 5% (Drogal, Farmácia de Manipulação, Piracicaba, SP) (**Figura 3-B**).

4.3.2. Abertura coronária

A fase de abertura coronária foi realizada em duas etapas operatórias. A água proveniente do equipo foi cessada, sendo a irrigação realizada manualmente com solução salina estéril (Drogal, Farmácia de Manipulação, Piracicaba, SP, Brasil) (**Figura 3-C**). Foram utilizadas pontas esféricas diamantadas estéreis para remoção dos contaminantes coronários (tecido cariado, restaurações defeituosas). Posteriormente, na confecção da cavidade de acesso, nova broca estéril/apirogênica (esterilizadas através de calor seco, em estufa por um período de tempo de 4 horas a 200°C) foi utilizada. Após a abertura coronária, o campo operatório e a câmara pulpar foram novamente descontaminados, seguindo o protocolo de descontaminação e em seguida neutralizados como descrito anteriormente. Foram individualizados, para cada dente, jogos de instrumentais estéreis/apirogênicos utilizados, de forma que não houvesse nenhum tipo de contaminação. Todos os procedimentos clínicos foram realizados por um único operador.

4.3.3 Coletas endodônticas

Amostras do conteúdo endodôntico foram coletadas logo após a abertura coronária (C1) (**Figura 3-E**), após o preparo químico-mecânico dos canais radiculares (C2) e após irrigação final com ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 17% (Drogal, Farmácia de Manipulação, Piracicaba, SP).

4.3.3.1 Coleta endodôntica inicial

Coleta de endotoxina/ estimulação celular (CE1)

Após abertura coronária, foi realizada coleta inicial para investigação dos níveis de endotoxina/ produção de citocinas (CE1). Para CE1, um cone de papel estéril #20 (Dentsply, Petrópolis, R.J.), previamente esterilizado a 200^o C, por 4 horas em estufa, foi introduzido no comprimento aparente do dente (determinado pela radiografia periapical pré-operatória), o qual permaneceu em posição por 60 segundos. Em seguida, o cone foi transferido para tubos de vidro apirogênicos contendo 5 esferas de vidro também apirogênicas. As amostras, devidamente identificadas, foram armazenadas a -20 °C para posterior análise dos níveis de LPS.

Forma de conveniência da abertura coronária foi realizada com pontas diamantadas tronco-cônicas de extremidade inativa nº 3082 (KG Sorensen Ind. Com. Ltda, Barueri, SP) dando a conformação apropriada à cavidade, de acordo com a anatomia interna do dente. Para proporcionar um acesso livre e reto aos canais radiculares foi realizado desgaste compensatório, com a utilização de brocas de Largo nº 2 (Maillefer Instruments, Baillagues - Switzerland). Com base nas radiografias pré-operatórias, efetuou-se a exploração dos canais radiculares com lima tipo-K nº 15 (Maillefer Instruments, Baillagues - Switzerland). A odontometria do canal radicular foi realizada com auxílio de localizador apical (Novapex, Forum Technologies, Rishon le-Zion, Israel), correspondendo ao ponto zero do localizador foraminal, com uma lima que melhor se adaptou ao diâmetro do forame apical (**Figura 3-F**). A seguir, os dentes foram divididos aleatoriamente em três grupos de acordo com a substância química auxiliar utilizada no preparo químico-mecânico: GI- NaOCl 2,5%; GII- CLX gel 2% e soro fisiológico 0,9% (grupo controle) (Drogal, Fármacia de Manipulação, Piracicaba, SP) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Divisão dos grupos quanto às substâncias químicas auxiliares utilizadas no preparo químico-mecânico.

Grupo I	NaOCl 2,5% (n=10)
Grupo II	Clorexidina gel 2% (n=10)
Grupo Controle	Soro fisiológico (n=10)

Instrumentação dos canais radiculares

Uma vez determinado o comprimento real do dente, foi realizada a instrumentação do canal radicular em toda sua extensão, correspondente ao ponto zero do localizador apical. Foi utilizado o sistema automatizado de rotação contínua Mtwo[®] (VDW, Munich, Germany), acoplado ao contra-ângulo Sirona - VDW- SILVER (VDW, Munich, Germany) de redução 6:1 com torque e velocidades pré-programadas para cada lima (**Figura 3-G**).

A instrumentação dos canais radiculares foi realizada seguindo a sequência de instrumentos recomendada pelo fabricante: 10/.04; 15/.05; 20/.06; 25/.06; 30/.05; 35/.04 e 40/.04. O instrumento foi inserido com leve pressão permitindo que o mesmo tocasse as paredes do canal de modo circunferencial. No momento em que o instrumento apresentou-se livre no canal radicular foi efetuada a sua troca para o diâmetro subsequente.

Irrigação dos canais radiculares

Durante o preparo químico mecânico, o protocolo de irrigação foi realizado de acordo com cada substância química auxiliar utilizada nos diferentes grupos:

- Grupo I - inundação do canal radicular com NaOCl 2,5%, sendo este renovado com 5 mL da mesma substância a cada troca de lima;
- Grupo II- inundação do canal radicular com clorexidina gel 2%, sendo esta removida com 5 mL de soro fisiológico a cada troca de lima;
- Grupo controle- inundação do canal radicular com soro fisiológico, sendo este renovado com 5 mL da mesma substância a cada troca de lima;

Após o uso do último instrumento rotatório, os canais foram irrigados com 5 mL de soro fisiológico estéril. Em seguida, foi realizada a neutralização do NaOCl 2,5% com 5mL de tiosulfato de sódio (5%) por 1 minuto (Martinho, 2007) e da CLX gel 2% com tween 80 (0,5%) associado a lecitina de soja (0,07%) (Drogal, Farmácia de Manipulação, Piracicaba, SP) por 1 minuto (Vianna *et al.*, 2006b). Estas soluções foram posteriormente removidas com 5mL de soro fisiológico estéril.

O volume de irrigação ao final do preparo químico-mecânico foi de 45 mL para cada canal radicular tratado. Os procedimentos de irrigação foram realizados com o auxílio de seringa de 5mL (Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda, São Paulo, SP) e agulha hipodérmica BD 20 x 5,5 (Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda, São Paulo, SP) pré-curvada, introduzida até o terço médio do canal radicular. A aspiração do conteúdo dos canais radiculares foi realizada por meio de cânula aspiradora (Conjunto de aspiração – Colgran, São Paulo – SP).

4.3.3.3 Coleta de endotoxina/ produção de citocina após instrumentação (CE2)

Após preparo químico-mecânico, foi realizada nova coleta endodôntica para investigação dos níveis de endotoxina/ produção de citocinas (CE2). Para CE2, um novo cone de papel estéril #20 foi introduzido no comprimento real do dente, o qual permaneceu em posição por 60 segundos. Em seguida, foi transferido para

tubos de vidro apirogênicos contendo 5 esferas de vidro também apirogênicas. As amostras, devidamente identificadas, foram armazenadas a -20 °C, como recomendado pelo fabricante.

4.3.3.4 Coleta de endotoxina/ produção de citocina após EDTA 17% (C3)

Para remoção da *smear layer*, foi realizada irrigação com 3 mL de EDTA 17%, o qual permaneceu no interior dos canais radiculares por 3 minutos, com renovação desta solução a cada minuto (Teixeira *et al.*, 2005). Em seguida, os canais foram irrigados com 5 mL de soro fisiológico estéril/apirogênico para remoção do agente quelante. Após, uma nova coleta para investigação dos níveis de endotoxina/ produção de citocinas (CE3) foi realizada como previamente descrito. Ao final dos procedimentos de coleta, os dentes instrumentados com solução salina foram reinstrumentados na mesma sessão utilizando clorexidina gel 2% como substância química auxiliar e posteriormente obturados e restaurados.

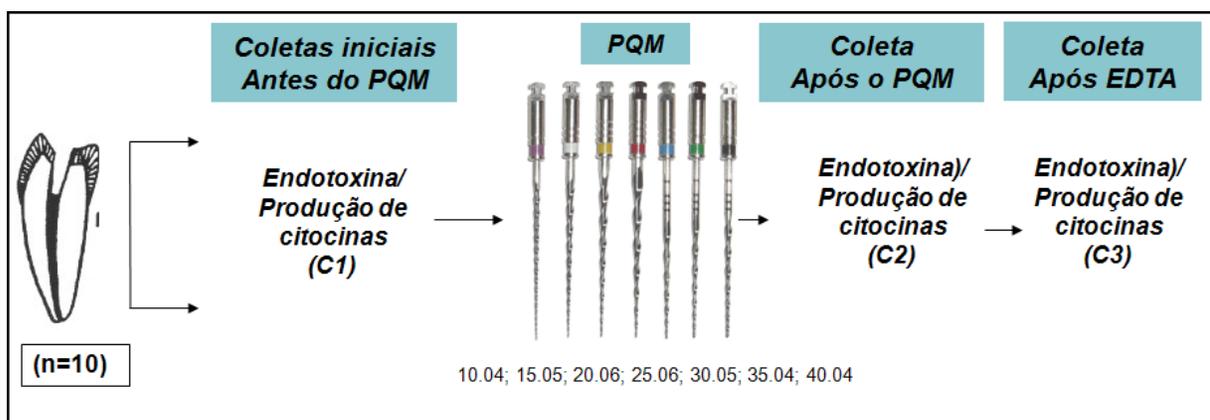


Figura 2- Esquema descritivo das coletas endodônticas antes e após o preparo químico-mecânico e após uso do EDTA 17% nos diferentes grupos avaliados.

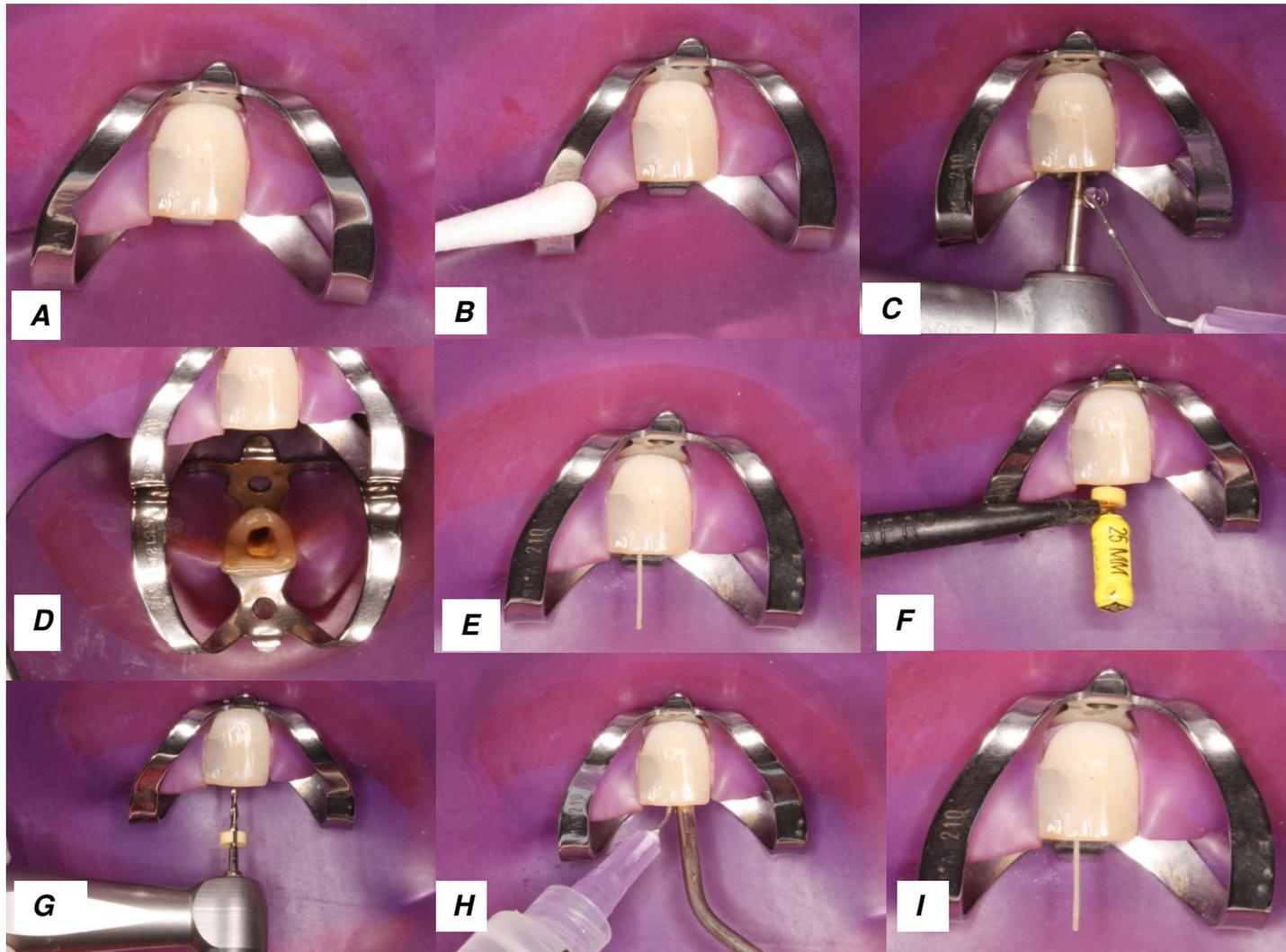


Figura 3- Procedimentos clínicos e coletas endodônticas. A- Isolamento absoluto; B- Descontaminação do campo operatório; C, D- Abertura coronária; E- Coleta Inicial; F- Odontometria eletrônica; G- Instrumentação rotatória Mtwo®; H- Irrigação/Aspiração do canal radicular; I- Coleta após PQM e EDTA 17%.

4.4 Obturação dos canais radiculares e selamento coronário

Após coletas do conteúdo endodôntico, os canais foram irrigados com 5 mL de soro fisiológico, secos com pontas de papel estéreis e obturados. Para os canais com presença de exsudação foi aplicada medicação intracanal (hidróxido de cálcio + soro fisiológico) e quando controlada, os mesmos foram obturados e restaurados.

A obturação do canal radicular foi realizada com cones de guta-percha acessórios Fine Medium extra-longo e Medium (Konne Indústria e Comércio de Materiais Odontológicos Ltda., Belo Horizonte, MG) e cimento endodôntico Endomethasone (Specialités – Septodont, Saint-Maurdes, Fossés Cedex, France), pela técnica do cone modelado apical (Cortez, 2002), complementada com condensação lateral.

O procedimento restaurador de todos os dentes foi realizado através da colocação de 2 mm de Coltosol (Vigodent, Coltene, Rio de Janeiro, RJ) na embocadura dos canais, aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos em toda a cavidade, adesivo 3M Single Bond (3M Dental Products, St. Paul, EUA) e inserção de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St. Paul, USA) pela técnica incremental.

4.5. Processamento Laboratorial das amostras

4.5.1. Investigação e quantificação de endotoxinas- Teste cinético turbidimétrico (Pyrogent[®]-5000, Lonza, Walkersville, MD, EUA)

Para quantificação de endotoxinas presentes em 30 dentes com infecção endodôntica primária e lesão periapical foi utilizado o método turbidimétrico Pyrogent -5000[®] (Lonza, Walkersville, MD, EUA) de LAL. **(Figura 6 A-B)**. Por meio deste, foi realizado um ensaio cinético quantitativo no qual a amostra foi colocada em contato com o reagente LAL reconstituído, em seguida incubada em um leitor de microplacas e monitorada automaticamente através de um software até o surgimento de turvação. O tempo necessário antes da ocorrência da turvação (Tempo de reação) é inversamente proporcional à quantidade de endotoxina presente na amostra.

O kit Pyrogent-5000[®] apresenta: 1) Pyrogent-5000[®] LAL Reagente; 2) Endotoxina padrão de *Escherichia Coli* (055:B5); 3) Tampão de reconstituição Pyrogent-5000. Além dos substratos provenientes do kit, também foram utilizados: 1) Água Reagente LAL (Lonza, Walkersville, MD, EUA); 2) Hidróxido de sódio 0.1 N ou Ácido clorídrico 0.1N, dissolvido em água reagente LAL, para ajuste do pH da amostra, se necessário; 3) Tubo de vidro descartável para diluição, isentos de endotoxina; 4) Ponteira estéreis descartáveis de 10 µL, 200 µL e 1000 µL; 5) Microplaca estéril descartável (Corning Costar, Cambridge, MA, UK); 6) Multipipetador de 8 canais; 7) Reservatório de reagente (Lonza, Walkersville, MD); 8) Leitor de microplacas (Ultramark, Bio-Rad Laboratories); 9) Software WinKQCL[®] (Lonza, Walkersville, MD); 10) Cronômetro e agitador vortex.

Para realização do teste, todo material utilizado proveniente da LONZA (WALKERSVILLE, MD, USA) estava apirogênico (livre de endotoxinas).

Padronização da Curva Padrão

O estabelecimento da curva padrão com concentrações conhecidas de

endotoxinas é necessário para determinar a concentração de endotoxinas com quantidades desconhecidas. A curva-padrão é necessária para determinar a menor e a maior concentração de endotoxina presente na amostra, assim como os picos obtidos dentro da curva. Como um parâmetro para o cálculo da quantidade de endotoxinas em amostras de canais radiculares, a curva padrão foi obtida a partir da reconstituição do liofilizado de endotoxina oferecida pelo *kit* numa concentração conhecida de 100 EU/mL, onde suas diluições alcançam as concentrações finais de: 0,01, 0,1, 1, 10, 100 EU/mL de acordo com as instruções do fabricante (**Figura 4; 6-F**).

Diluições seriadas para obtenção das concentrações de endotoxina da curva-padrão

1. Foi adicionado 0,1mL de 100 EU/mL endotoxina estoque em 0,9 ml de água para reagente LAL, resultando numa concentração de 10 EU/mL de endotoxina. Essa solução foi vigorosamente agitada em vórtex por pelo menos 1 minuto antes do procedimento;
2. Foi transferido 0,1mL da solução de endotoxina 10 EU/mL em 0,9 mL de água para reagente LAL para um recipiente adequado, resultando numa concentração de 1 EU/mL. A solução foi vigorosamente agitada em vórtex por pelo menos 1 minuto antes do início do procedimento;
3. Foi transferido 0,1mL da solução de endotoxina 1 EU/mL em 0,9mL de água para reagente LAL para um recipiente adequado, resultando numa concentração de 0,10 EU/mL. Essa solução foi vigorosamente agitada em vórtex por pelo menos 1 minuto antes do procedimento.
4. Foi transferido 0,1 mL da solução de endotoxina 0,10 EU/mL em 0,9mL de água para reagente LAL para um recipiente adequado, resultando numa concentração de 0,01 EU/mL. Essa solução foi vigorosamente agitada em vórtex por pelo menos 1 minuto antes do início do procedimento.

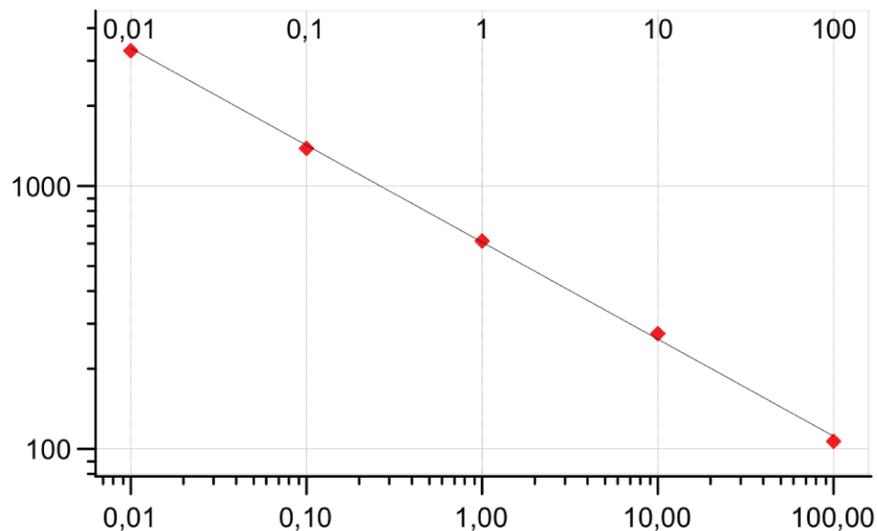


Figura 4. Exemplo de curva padrão para quantificação de endotoxinas em EU/mL.

Padronização das diluições das amostras

Os frascos de vidro contendo as amostras oriundas da instrumentação do canal radicular foram colocados em banho maria (37°C) por 30min (**Figura 6-G**). As amostras de endotoxina coletadas dos canais radiculares foram reconstituídas em 1 mL de água de LAL (**Figura 6-D**) e em seguida extraídas sob agitação mecânica em vortex por 60 segundos.

O teste LAL pode ser influenciado por muitos fatores. Fatores da inibição da detecção de endotoxina devem ser evitados, para isso foi realizada a adição de uma quantidade conhecida de endotoxina (0,1 EU/ml), em cada amostra, este procedimento é denominado “*Spike*”. Em seguida, os testes foram realizados em duplicata, sendo da mesma amostra - 2 poços contendo 100 µL da amostra mãe ou suas diluições; e 2 poços contendo 100 µL amostra + 0,1 EU/mL de endotoxina

(spike). O teste foi realizado como descrito a seguir. Para comprovar que não houve qualquer tipo de interferência (inibição ou desenvolvimento) da amostra com o reagente de LAL, a concentração de endotoxina recuperada dos poços contaminados, calculada pelo software, deve estar entre 50% - 200%, valor este denominado controle positivo do produto (PPC). A amostra mãe e sua diluição 10^{-2} foram as que apresentaram maiores números dentro do padrão do PPC, então a diluição 10^{-2} foi selecionada para a realização dos testes de todas as amostras através do método turbidimétrico.

Plate Layout

Para quantificação da endotoxina presentes nas amostras foram utilizadas placas de culturas de células (96 poços – 12 colunas e 8 fileiras) (Corning Costar, Cambridge, MA) apirogênicas (**Figura 5**). Inicialmente, 100 μ L do “blank” (água de LAL) foram inoculados em duplicata na placa (**Figura 6-D**). Em seguida, 100 μ L de cada ponto da curva padrão nas diferentes concentrações (100 EU/mL, 10 EU/mL, 1 EU/mL, 0,10 EU/mL e 0,01 EU/mL) foi distribuído em duplicata (**Figura 6-F**). Após, 100 μ L das amostras e seus respectivos controles (PPC) - ambos em duplicata foram inoculados com reagente de LAL (**Figura 6-H**). Para cada poço do controle positivo foi adicionado 10 μ L de 0,1 EU/mL de endotoxina de *E. coli* (spike). A placa foi posicionada no leitor de ELISA (Ultramark, Bio-Rad Laboratories) e 100 μ L do reagente de LAL foram adicionados em todos os poços (**Figura 6-I**).

De forma contínua durante todo o ensaio, o leitor de microplacas com Software WinKQCL[®] programado para - 340 nm, 37 ° C e 100 leituras - é monitorado na absorvância de 340nm de cada orifício da microplaca. Usando a leitura de absorvância inicial de cada orifício como seu próprio branco, o leitor determina o tempo necessário para que a absorvância aumente a 0.03 unidades. Este tempo é denominado Tempo de reação. O software WinKQCL executa automaticamente uma correlação linear log/log do Tempo de Reação de cada

padrão com a concentração de endotoxina correspondente, levando aproximadamente 60 min para o término do teste e quantificação de endotoxinas nas amostras (**Figura 6-J**).

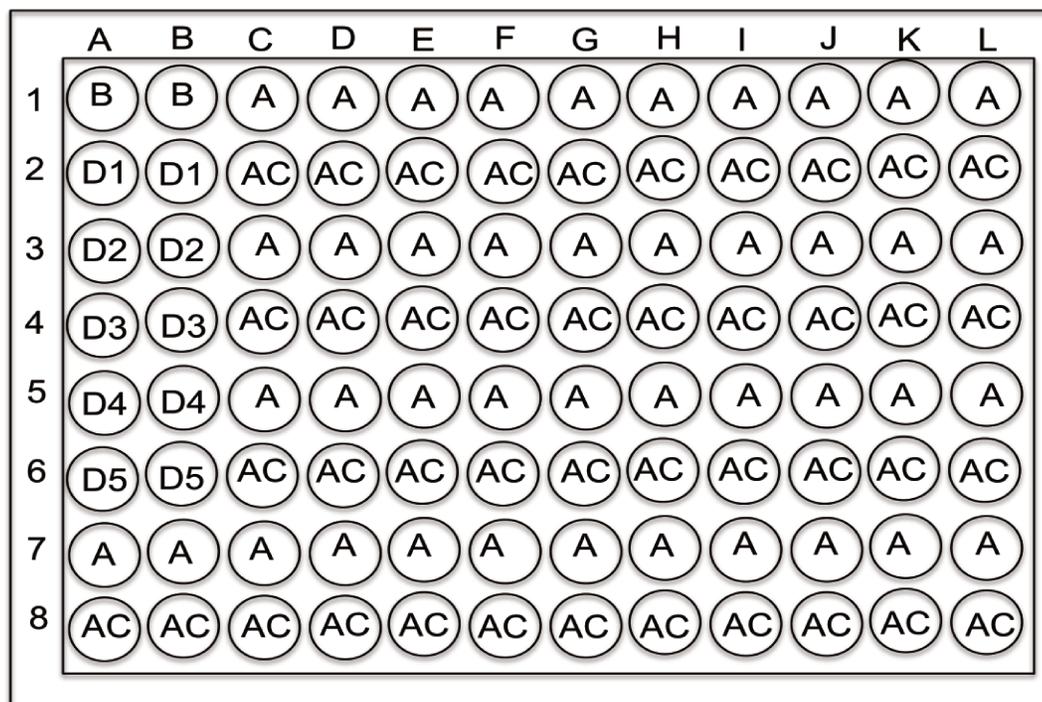


Figura 5. Distribuição das amostras: B= blank; D1= 0,01 EU/mL, D2= 0,10 EU/mL; D3= 1 EU/mL; D4= 10 EU/mL; D5= 100 EU/mL; A= Amostra; AC= Amostra Controle (Amostras contaminadas com concentração conhecida de endotoxina- Spike procedure).



Figura 6. Ensaio cinético quantitativo para detecção de endotoxinas. **A, B** – Kit Pyrogen 5000; **C**– Reconstituição do Substrato de endotoxina; **D**- Água de LAL; **E**- Agitação mecânica em vórtex do substrato de endotoxina; **F**- Diluições seriadas para obtenção da curva padrão, **G**- Amostras em banho-maria; **H**- Preparo da placa; **I**- Inoculação do controle positivo (*Spike procedure*); **J**- Leitor Biotek.

4.5.2 Avaliação do potencial inflamatório do conteúdo endodôntico– Estimulação celular e dosagem de citocinas inflamatórias

Cultura Celular

Para avaliação do potencial inflamatório do conteúdo endodôntico em cultura de células, foi utilizada a linhagem imortalizada de macrófagos murinos (RAW 264.7) do Núcleo de Biologia Celular e Tecidual (NCT-Bio) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas. As células foram mantidas em meio DMEM – Dulbecco's modified Eagle minimal essential medium supplemented (GIBCO) - enriquecido com 10% de soro fetal bovino inativado em calor, 100U/mL de penicilina e 100U/mL de estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em placa de poliestireno de 100 mm (Corning Costar, Cambridge, MA). O meio de cultura foi trocado a cada 4 dias e as células mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, até confluência de 90%. Em seguida, as células foram suspensas em solução de tripsina-EDTA 0,25% (Invitrogen, Carlsbad, CA). A contagem de células viáveis foi realizada através da câmara de Neubauer, utilizando o teste de exclusão de azul de tripan.

Estimulação celular

Um total de 10⁴ macrófagos viáveis foram colocados em cada poço da placa de poliestireno de 6 poços, acrescentando meio para cultura DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 100U/mL de antibiótico até obter o volume final de 1000 µL. As placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 48 horas. Previamente à estimulação com o conteúdo do canal, as células foram desinduzidas por 8h em meio de cultura (DMEM) contendo 0,3% de soro fetal bovino, com finalidade de sincronizar o ciclo celular e reduzir a influência dos componentes do soro fetal nas células.

Em seguida, os macrófagos foram estimulados com 60 μ L da amostra coletada do conteúdo endodôntico (C1, C2 e C3) reconstituída em água de LAL e posteriormente mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO₂. As amostras foram inoculadas em duplicata por um período de 24 horas, período suficiente para desencadear uma resposta imunológica celular ao conteúdo endodôntico, com consequente liberação de mediadores químicos inflamatórios (Martinho *et al.*, 2010).

Nesta fase da pesquisa, foram realizados dois grupos controles (positivo e negativo). No grupo controle positivo, as células foram estimuladas com uma concentração conhecida de endotoxina (10 EU/mL), e no grupo controle negativo, as células foram distribuídas nos poços sem, no entanto, receberem nenhuma estimulação por endotoxina ou alíquota proveniente do conteúdo endodôntico.

Após 24 horas, os sobrenadantes foram coletados utilizando pipeta de 1000 μ L com ponteiros plásticos estéreis e armazenados em tubos plásticos estéreis de 1.5 mL, congelados a -80°C para posterior quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α) (**Figura 7**).



Figura 7 – Crescimento/ estimulação celular - **A.** Células congeladas (macrófagos RAW 264.7); **B.** Inoculação em meio DMEM + penicilina + Streptomicina + Soro fetal bovino; **C.** Incubação em estufa 5% CO₂ a 37° C; **D.** Verificação do crescimento celular até confluência de 90%; **E.** Distribuição celular em placa de 6 poços; **F.** Crescimento celular durante 48 horas (10⁴ macrófagos) em estufa de CO₂ a 37° C. **G.** Contagem celular em câmara de Newbauer; **H.** Agitação em vortex do conteúdo endodôntico; **I.** Estimulação celular com 60 µL conteúdo endodôntico; **J.** Incubação em estufa de CO₂ a 37° C durante 24 horas; **K.** Coleta do sobrenadante; **L.** armazenamento em tubo plástico.

Quantificação de citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α , (Teste imunoenzimático – ELISA)

A produção de IL-1 β e TNF- α após estimulação por conteúdo endodôntico e controle positivo foram avaliadas por ensaios imunoenzimáticos (ELISA- (Enzyme-linked immuno sorbent assay) utilizando os Kits DuoSet[®] ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, USA).

TESTE IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)- TÉCNICA SANDUÍCHE

Nesse método, o anticorpo de um antígeno particular é, inicialmente, adsorvido no poço da placa. Depois, o antígeno é adicionado e se liga ao anticorpo (AC) (**Figura 8**). Em seguida, um segundo e diferente anticorpo ligado à enzima é adicionado (anticorpo biotilado) (**Figura 8**). Na sequência, é adicionado estreptovidina conjugada a peroxidase, onde a estreptovidina irá se ligar na biotina do AC secundário e a porção peroxidase ficará exposta para reagir com o substrato cromogênico (**Figura 8**). É então, adicionado o substrato cromogênico [(solução A (H₂O₂) + Solução B (Tetrametilbenzodina – TMB)], no qual, a H₂O₂ será quebrada pela peroxidase em H₂O + 1/2 O₂. Por sua vez, o O₂ irá agir sobre o TMB, passando de incolor para coloração azul. E finalmente, é adicionado uma solução de parada “stop solution” (2 N H₂SO₄), tornando a reação amarela, e permitindo a mensuração da quantidade de antígeno presente na amostra, de acordo com a intensidade da cor amarela lida em espectrofotômetro, numa densidade óptica (DO) de 450 nm. A presença de produto colorido indica a presença de antígeno. Trata-se de um método eficiente, pois permite detectar quantidades de proteína da ordem de nanogramas (10⁻⁹ g).

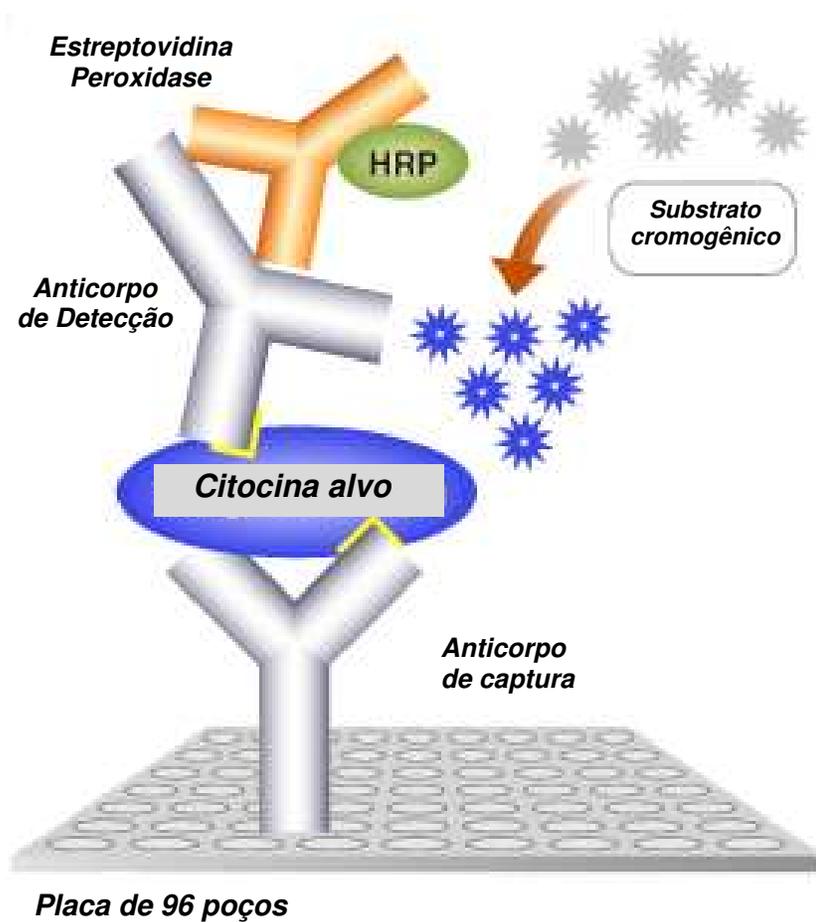


Figura 8. Esquema ilustrativo da técnica ELISA sanduíche.

Kit Duo-set (R&D System, Minneapolis, EUA)

O kit Duo-set apresenta: 1) Anticorpo de captura; 2) Anticorpo detecção biotinizado; 3) Padrão; 4) Streptavidina conjugada com peroxidase (*Streptavidin-Horseradish-peroxidase*).

Padronização da curva padrão

O estabelecimento de uma curva padrão com concentrações de citocinas inflamatórias conhecidas foi necessário para determinar a concentração de citocinas inflamatórias de amostras com quantidades desconhecidas.

Curva padrão para IL1- β

Esta curva foi realizada utilizando a solução concentrada do padrão (recombinante de IL1- β) 1000 pg/mL e suas diluições – 500 pg/mL(pg/mL), 250 pg/mL, 125 pg/mL e 62,5 pg/mL.

Curva padrão para TNF- α :

Esta curva foi realizada utilizando a solução concentrada do padrão (recombinante de TNF- α :) 2000 pg/mL e suas diluições – 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL e 32,2 pg/mL.

Procedimento laboratorial

O teste imunoenzimático ELISA foi realizado no Laboratório de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Placas de microtitulação de 96 poços (*Corning Cell Culture Cluster*, Corning, EUA) foram sensibilizadas com anticorpo de captura anti- IL-1 β , anti- TNF- α de camundongo (100 μ L/ poço) de acordo com a recomendação do fabricante.

As placas foram mantidas *overnight* em temperatura ambiente, em seguida, foram lavadas 3 vezes com solução tampão de lavagem (PBS 0.05% de Tween 20) e bloqueados com 300 μ L de solução tampão de bloqueio (PBS com 1% de soro albumina bovina, BSA) por 1 hora em temperatura ambiente. Após, as placas foram novamente lavadas (3 vezes) com solução tampão de lavagem e incubadas com 100 μ L dos padrões de citocinas inflamatórias com concentrações conhecidas (curva padrão) e 100 μ L dos sobrenadantes da cultura de célula estimulados com conteúdo endodôntico durante 2 horas em temperatura ambiente. Todos realizados em triplicata.

Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com solução tampão de lavagem e incubadas com 100 μ L de anticorpos de detecção anti- IL-1 β , anti- TNF- α marcados com biotina. As placas foram mantidas por 2 horas em temperatura ambiente e novamente lavadas. Após a lavagem, foi acrescentado 100 μ L de streptavidina em cada poço e protegidas contra luz utilizando papel alumínio durante 20 minutos.

Uma nova lavagem foi realizada, e a reação revelada utilizando 100 μ L de solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio em cada poço, e incubado por 20 minutos em temperatura ambiente, sendo a placa envolta em papel alumínio. Em seguida, foi adicionado 50 μ L do reagente de parada “Stop solution” em cada poço – ácido sulfúrico 2N. A densidade óptica (DO) de cada poço foi determinada no leitor de microplacas com comprimento de onda de 450 nm (**Figura 9**).

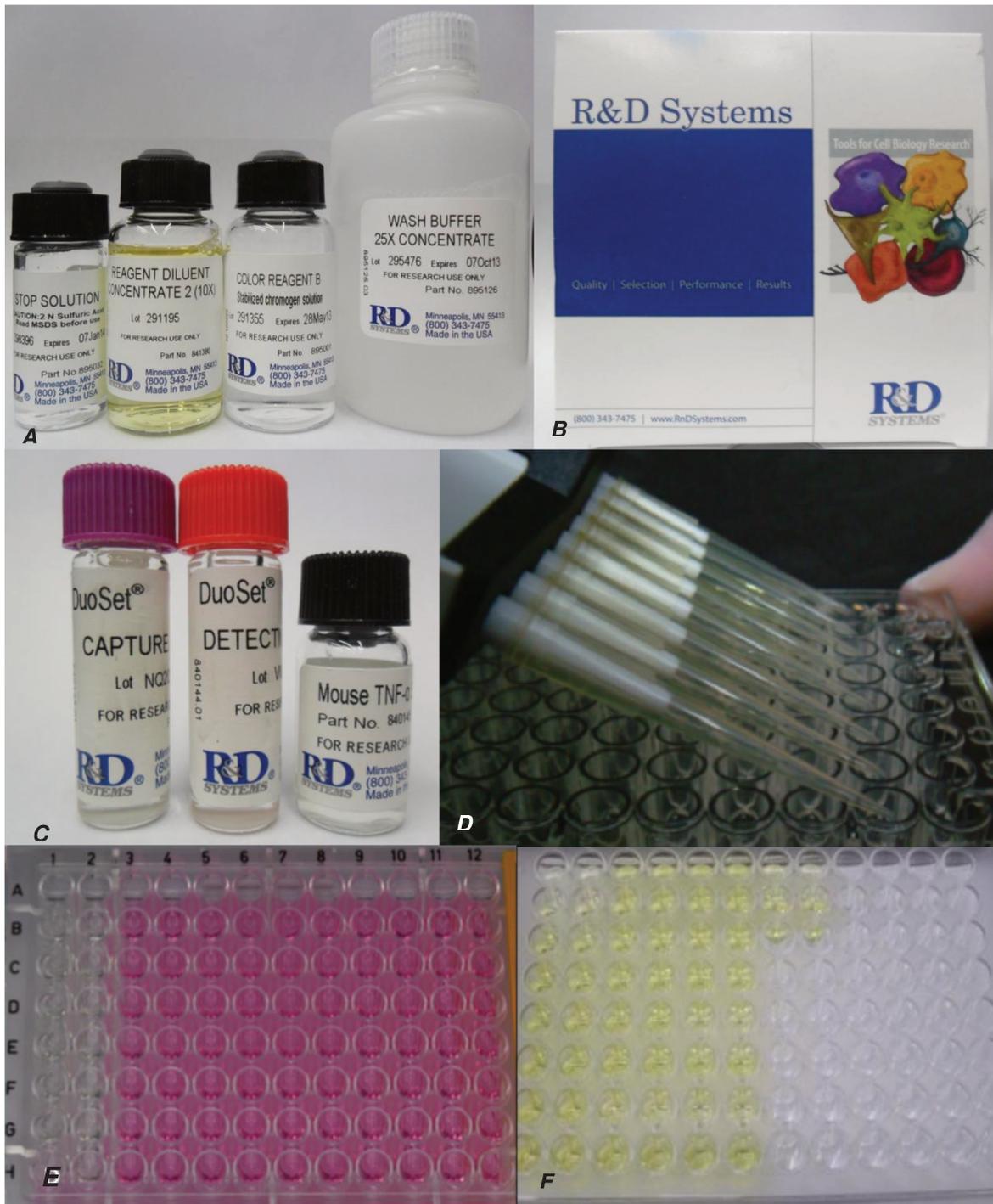


Figura 9. Kit Duo-set ELISA_ **A. B** - Kit DuoSet e reagentes; **C**- Anticorpo de captura, anticorpo de detecção e padrão; **D**- Sensibilização da placa com anticorpo de captura; **E**. Distribuição e incubação da placa com padrões e amostras; **F**- Revelação da reação com substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio.

4.6. Análise Estatística

Os dados foram tabulados em uma planilha de cálculo no programa Microsoft Office Excell 2007 (Microsoft Corporation, EUA) e estatisticamente analisados utilizando-se os programas BioEstat 5.0 (Instituto Sustentável Mamirauá, Belém, PA, Brasil) e SAS Software versão 9.1 (The SAS Institute, Cary, NC, EUA). Para todos os testes estatísticos empregados, o nível de significância foi estabelecido em 5%.

A normalidade dos dados obtidos em variáveis quantitativas foi previamente analisada por meio do teste Shapiro Wilk ($\alpha=0,05$). Dados que apresentaram a característica de normalidade foram analisados por meio do teste Anova seguido pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Nos casos em que a normalidade não foi obtida, a comparação inter grupo foi feita por meio do teste Kruskal Wallis seguido pelo teste de Dunn ($\alpha=0,05$) e a comparação intra grupo foi feita por meio do teste de Friedmann ($\alpha=0,05$).

Teste de correlação de Pearson foi realizado para verificar a associação entre níveis de endotoxinas e citocinas pró-inflamatórias e citocinas entre si.

5. RESULTADOS

5.1. Aspectos clínicos e radiográficos dos elementos dentais com necessidade de tratamento endodôntico devido à periodontite apical crônica

Os dados gerais e aspectos clínicos e radiográficos dos elementos dentais submetidos ao tratamento endodôntico estão apresentados na Tabela 3. Nenhum dos pacientes relatou ser portador de qualquer tipo de doença sistêmica. A faixa etária dos pacientes atendidos variou entre 15 e 55 anos (média de 36 anos), sendo 20 pertencentes ao gênero feminino e 10 ao masculino.

Todos os elementos dentais apresentavam uma única raiz e único canal radicular (30/30), sendo 26 superiores (16 incisivos centrais, 8 incisivos laterais, 2 caninos); e 4 inferiores (1 incisivo lateral, 1 canino e 2 pré-molares). Vinte dentes analisados apresentavam restaurações coronárias definitivas, 6 elementos dentais estavam hígidos e 4 dentes apresentavam-se cariados. Dos dentes que possuíam restaurações definitivas, apenas 4 apresentavam características clínicas satisfatórias.

Nenhum elemento dental possuía tratamento endodôntico prévio. Todos os dentes responderam negativamente ao teste de sensibilidade pulpar, denotando necrose do tecido pulpar (30/30). Nenhum paciente queixava-se de dor espontânea. Dezesete dos 30 casos analisados estavam assintomáticos (17/30) e os demais apresentavam sintomatologia clínica provocada (13/30), dentre eles: dor à palpação (DAP) 11/13, dor à percussão (DP) 12/13, ou a associação de dor à palpação e à percussão (DPP) 10/13, sendo estes classificados como sintomáticos.

Quanto ao aspecto físico dos canais radiculares, exsudato foi encontrado em 16 canais radiculares, sendo 10 do tipo seroso e 6 do tipo purulento, conferindo um aspecto físico de canal molhado. Dezesete dentes apresentaram profundidade de sondagem igual a 1mm, 8 dentes possuíam 2mm e 5 dentes possuíam 3mm, dados compatíveis com as características da normalidade. O tamanho das lesões periapicais variaram entre 1- 4 mm (n=19) e de 5- 9 mm (n=11).

Tabela 3. Características clínicas e radiográficas dos elementos dentais submetidos ao tratamento endodôntico

Grupos dentários	n	%
11,21	16	53,3
12,22	8	26,6
13,23	2	6,6
32	1	3,3
34,35	2	6,6
43	1	3,3
Dente		
Unirradicular	30	100
Superior	26	86,6
Inferior	4	13,3
Hígido	6	20
Cariado	4	13,3
Restaurado	20	66,6
*Restauração definitiva satisfatória	4	20
*Restauração definitiva insatisfatória	16	80
Sintomatologia		
Assintomático	17	56,6
Sintomático	13	43,3
Tipos de sintomatologia		
Dor espontânea	0	0
Dor à percussão	12	92,3
Dor à palpação	11	84,6
Dor à palpação+ percussão	10	76,9
Histórico de dor prévia	6	35,2
Exsudato intracanal		
Ausente (canal seco)	14	46,6
Presente (canal molhado)	16	53,3
Claro	10	62,5
Purulento	6	37,5
Hemorrágico	0	0
Fístula Intra-oral		
Ausente	21	70
Presente	9	30
Sondagem periodontal		
1mm	17	56,6
2mm	8	26,6
3mm	5	16,6
Tamanho da lesão radiográfica		
1-4 mm	19	63,3
5-9 mm	11	36,6

5.2. Quantificação de endotoxinas nos canais radiculares infectados (C1)

Endotoxina foi detectada em 100% dos canais radiculares com periodontite apical crônica, com valores compreendidos entre 0,16 a 171 EU/ml, representados pela mediana de 18,70 EU/mL (**Tabela 4**).

Níveis mais elevados de endotoxina foram detectados nos casos com presença de sintomatologia dolorosa provocada (31,40 EU/mL x 11,85 EU/mL). As concentrações de endotoxinas nos dentes com dor provocada foram estatisticamente maiores quando comparada aos dentes assintomáticos ($p=0,0204$, Teste t de amostras independentes). Associação positiva foi encontrada entre níveis mais elevados de endotoxinas e presença de dor à percussão (31,50 EU/mL, $p=0,0236$) e presença de exsudato intracanal (31,80 EU/mL).

Tabela 4 – Comparação dos valores de endotoxinas (Mediana e intervalo de confiança 95% em EU/mL) de acordo com os parâmetros clínicos avaliados.

Sinais/Sintomas	Ausente Med (IC 95%)	Presente Med (IC 95%)	Valor de p
Dor provocada	11,85 (7,87 – 26,73)	31,40 (21,38 – 55,43)	0,0204**
Dor à percussão	12,00 (9,15 – 27,11)	31,50 (20,35 – 57,64)	0,0236**
Percussão+Palpação	13,40 (12,40 – 35,29)	27,55 (12,66 – 51,96)	0,3946*
Dor à palpação	12,70 (11,31 – 35,54)	31,20 (14,72 – 49,74)	0,3658*
Dor prévia	16,20 (11,72 – 37,00)	22,30 (13,56 – 46,76)	0,5471**
Lesão > 4mm	14,60 (12,95 – 36,36)	26,10 (11,45 – 50,08)	0,5404*
Exsudato intracanal	6,85 (3,01 – 16,90)	31,80 (29,30 – 55,60)	0,0001**
Fístula	14,60 (11,49 – 33,70)	31,60 (17,25 – 58,15)	0,1480*

*Comparação entre os grupos por meio do teste T para dois grupos distintos apresentando variâncias homogêneas ($\alpha=0,05$). **Comparação entre os grupos por meio do teste T para dois grupos distintos apresentando variâncias heterogêneas ($\alpha=0,05$).

5.2.1. Efeito do preparo químico-mecânico com NaOCl 2,5% e CLX gel 2% na redução de endotoxinas dos canais radiculares infectados

Níveis elevados de endotoxinas foram encontrados nos canais radiculares na coleta inicial (**Tabela 5**). O preparo químico-mecânico foi capaz de reduzir endotoxinas em todos os canais radiculares estudados. NaOCl 2,5% apresentou maior efetividade na redução dos níveis de endotoxinas (99,65%) quando comparado à CLX gel 2% (95,07%) ($p < 0,05$). O uso de EDTA 17% como protocolo final do preparo químico-mecânico potencializou a redução de endotoxinas, principalmente nos grupos II (95,07% x 98,27%) e III (96,79 X 98,71%) ($p < 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 5 – Níveis de endotoxinas (Mediana e intervalo de confiança 95% em EU/mL) de canais radiculares com necrose pulpar e lesão periapical nas diferentes etapas do tratamento endodôntico utilizando diferentes substâncias químicas auxiliares

GRUPOS	Etapas do tratamento endodôntico		
	Inicial (C1) Med (IC 95%)	Após PQM (C2) Med (IC 95%)	Após EDTA (C3) Med (IC 95%)
NaOCl (I)	25,80 (13,75 – 51,47) Aa	0,07 (0,03 – 0,15) Ab	0,09 (0,03 – 0,17) Ab
CLX (II)	18,65 (8,40 – 44,35) Aa	0,63 (0,39 – 1,22) Ab	0,26 (0,02 – 0,85) Ab
SS (III)	13,95 (-2,08 – 73,53) Aa	0,18 (-4,85 – 13,33) Ab	0,07 (0,03 – 0,15) Ab

Letras maiúsculas distintas na coluna significam diferença estatística pelo teste Kruskal Wallis seguido pelo teste de Dunn ($\alpha=0,05$). Letras minúsculas distintas na linha significam diferença estatística pelo teste de Friedman ($\alpha=0,05$).

Tabela 6 – Percentual de redução dos níveis de endotoxinas (Mediana e intervalo de confiança 95% em EU/mL) nas diferentes etapas do tratamento endodôntico utilizando diferentes substâncias químicas auxiliares

GRUPOS	Etapas do tratamento endodôntico	
	C1 – C2 (%) Med (IC 95%)	C1 –C3 (%) Med (IC 95%)
NaOCl (I)	99,65 (99,29 – 99,83) Aa	99,75 (98,92 – 100,00) Aa
CLX (II)	95,07 (68,61 – 100,00) Bb	98,27 (96,10 – 99,20) Aa
SS (III)	96,79 (74,92 – 100,00) ABb	98,71 (97,09 – 99,79) Aa

Letras maiúsculas distintas na coluna significam diferença estatística pelo teste Kruskal Wallis seguido pelo teste de Dunn ($\alpha=0,05$). Letras minúsculas distintas na linha significam diferença estatística pelo teste de Friedman ($\alpha=0,05$).

5.3. Avaliação do potencial inflamatório do conteúdo endodôntico inicial presente nos canais radiculares através dos níveis de (IL1- β)

IL1- β foi detectada em 100% dos sobrenadantes de macrófagos estimulados com conteúdo endodôntico inicial, com valores compreendidos entre 18,17 a 89,49 pg/mL (mediana 32,94 pg/mL). Não houve diferença estatística entre os níveis de IL1- β detectados em sobrenadantes de macrófagos estimulados com conteúdo infeccioso de dentes com sintomatologia dolorosa (mediana 31,10 pg/mL) quando comparados ao conteúdo de dentes assintomáticos (mediana 33,18 pg/mL) ($p>0,05$).

No grupo controle positivo, as células foram estimuladas com uma concentração conhecida de endotoxina (10 EU/mL). IL1- β produzida foi detectada numa mediana de 15,53 pg/mL. No grupo controle negativo, as células não receberam estimulação por endotoxina ou alíquota proveniente do conteúdo endodôntico e desta forma, não foi detectada a presença de IL1- β de acordo com o limite de detecção do teste utilizado.

Valores individuais dos níveis de IL1- β (pg/mL) estão distribuídos na tabela 7.

Tabela 7 – Mediana de concentração e intervalo de confiança 95% dos níveis de IL1- β (pg/mL) relacionados aos diferentes parâmetros clínicos e radiográficos avaliados.

Parâmetros – Ausente/Presente	Ausência Med (IC 95%)	Presença Med (IC 95%)	Valor de p
Dor provocada	33,18 (28,76 – 46,33)	31,10 (26,87 – 38,33)	0,3229*
Dor à percussão	32,96 (28,91 – 45,46)	30,93 (26,44 – 39,01)	0,4119*
Percussão+Palpação	32,96 (29,38 – 44,27)	30,93 (25,03 – 40,09)	0,4508*
Dor à palpação	33,18 (29,28 – 44,98)	31,10 (25,71 – 39,14)	0,3950*
Dor prévia	31,10 (26,77 – 37,77)	37,11 (28,87 – 50,14)	0,1740*
Lesão > 4mm	32,74 (28,09 – 38,50)	33,18 (26,29 – 51,80)	0,3723**
Exsudato intracanal	33,16 (28,10 – 41,20)	29,91 (27,10 – 45,03)	0,7918*
Fístula	33,15 (28,41 – 42,68)	32,74 (26,43 – 43,72)	0,9357*

*Comparação entre os grupos por meio do teste T para dois grupos distintos apresentando variâncias homogêneas ($\alpha=0,05$). **Comparação entre os grupos por meio do teste T para dois grupos distintos apresentando variâncias heterogêneas ($\alpha=0,05$).

5.3.1 Avaliação do potencial inflamatório do conteúdo endodôntico após a instrumentação do canal radicular e após uso de EDTA 17% através dos níveis de IL1- β

IL1- β foi detectada em menores níveis após PQM quando comparados aos níveis iniciais (**Figura 10**). Menor potencial inflamatório determinado através dos níveis de IL1- β foi observado nos sobrenadantes de macrófagos estimulados com o conteúdo infeccioso presentes após EDTA (C3) quando comparado à infecção inicial (C1).

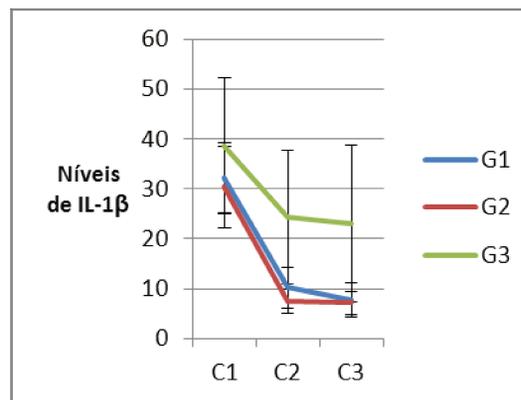
Valores individuais das médias e desvio-padrão encontrados em cada grupo e diferentes etapas operatórias encontram-se distribuídos na tabela 8.

Tabela 8 –Potencial inflamatório do conteúdo infeccioso nas diferentes etapas da terapia endodôntica através dos níveis de IL1- β (pg/mL)

Grupos	Etapas do tratamento endodôntico		
	Inicial (C1) Med (IC 95%)	Após PQM (C2) Med (IC 95%)	Após EDTA (C3) Med (IC 95%)
NaOCl (I)	30,33 (27,10 – 37,27) Aa	8,80 (7,14 – 13,14) Bb	7,23 (5,20 – 10,26) Bb
CLX (II)	30,38 (24,45 – 36,18) Aa	7,53 (5,79 – 9,21) Bb	7,47 (5,50 – 8,81) Bb
SS (controle)	35,91 (28,13 – 49,11) Aa	21,38 (14,03 – 34,69) Ab	20,45 (11,90 – 34,28) Ab

*Letras maiúsculas distintas na coluna significam diferença estatística pelo teste Kruskal Wallis seguido pelo teste de Dunn ($\alpha=0,05$). Letras minúsculas distintas na linha significam diferença estatística pelo teste de Friedman ($\alpha=0,05$).

Figura 10. Níveis de IL1- β antes, após a instrumentação e após uso de EDTA 17%.



5.4 Avaliação do potencial inflamatório do conteúdo endodôntico inicial presente nos canais radiculares através dos níveis de TNF- α

Fator de Necrose Tumoral- α foi quantificado nos sobrenadantes de macrófagos estimulados com o conteúdo infeccioso de canais radiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical.

TNF- α foi detectado em 100% dos sobrenadantes de macrófagos estimulados com conteúdo endodôntico inicial, com valores compreendidos entre 877,21 a 39480,0 pg/ml (mediana 1002,6 pg/mL).

No grupo controle positivo, as células foram estimuladas com uma concentração conhecida de endotoxina (10 EU/mL). Níveis de TNF- α foram detectados numa mediana de 4965,82 pg/mL. No grupo controle negativo, as células não receberam estimulação por endotoxina ou alíquota proveniente do conteúdo endodôntico e desta forma, não foi constatada a presença desta citocina nos sobrenadantes avaliados. Valores individuais dos níveis de TNF- α (pg/mL) de acordo com os parâmetros clínicos analisados estão distribuídos na tabela 9. Não foram encontradas associações positivas entre maiores níveis de TNF- α em resposta à estimulação com conteúdo endodôntico de casos com presença de sinais e sintomas de origem endodôntica.

Tabela 9 – Mediana e intervalo de confiança 95% dos níveis de TNF- α (pg/mL) relacionados aos diferentes parâmetros clínicos e radiográficos avaliados

Parâmetros	Ausência	Presença	Valor de p
	Média (\pm dp)	Média (\pm dp)	
Dor provocada	994,02 (928,35 – 1578,59)	1005,39 (855,18 – 1333,94)	0,4443*
Dor à percussão	993,60 (930,44 – 1544,34)	1016,79 (842,55 – 1370,31)	0,5354*
Percussão+Palpação	1002,60 (941,06 – 1491,02)	994,00 (789,04 – 1460,51)	0,6811*
Dor à palpação	1011,17 (939,84 – 1518,76)	990,01 (811,89 – 1405,52)	0,5763*
Dor prévia	994,00 (940,86 – 1529,89)	1011,66 (800,00 – 1440,40)	0,5803*
Lesão > 4mm	1012,14 (948,32 – 1474,01)	987,63 (747,49 – 1538,84)	0,7532*
Exsudato intracanal	1002,60 (935,08 – 1649,85)	989,24 (839,69 – 1340,22)	0,3208*
Exsudato purulento	973,53 (912,39 – 1006,28)	1016,79 (407,88 – 22,94,50)	0,3133**
Fistula	1016,79 (985,58 – 1548,50)	991,63 (945,84 – 1013,14)	0,0465**

*Comparação entre os grupos por meio do teste T para dois grupos distintos apresentando variâncias homogêneas ($\alpha=0,05$). **Comparação entre os grupos por meio do teste T para dois grupos distintos apresentando variâncias heterogêneas ($\alpha=0,05$).

5.4.1 Avaliação do potencial inflamatório do conteúdo endodôntico após a instrumentação e após uso de EDTA 17% através dos níveis de TNF- α

Níveis mais baixos de TNF- α foram detectados após PQM quando comparados aos níveis iniciais presentes nas infecções endodônticas primárias (**Figura 11**).

Menor potencial inflamatório determinado através dos níveis de TNF- α foi observado nos sobrenadantes de macrófagos estimulados com conteúdo infeccioso dos canais radiculares após EDTA 17% quando comparado à infecção inicial (C1) ($p < 0,05$).

Valores individuais das médias e desvio padrão encontrados em cada grupo nos diferentes momentos de coleta encontram-se distribuídos na Tabela 10.

5.5 Teste de correlação

Para avaliar possível correlação entre os níveis de endotoxina encontrados, IL-1 β e TNF- α , foi realizada análise estatística complementar por meio do Teste de Pearson. A aplicação deste teste visa investigar se variações nos níveis de endotoxina estão correlacionadas com modificações na concentração de citocinas, de forma diretamente proporcional, caracterizando uma correlação positiva, ou de forma inversamente proporcional, caracterizando uma correlação negativa.

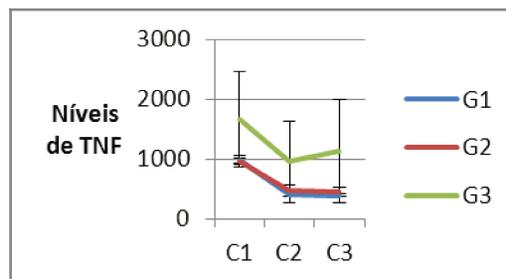
Correlação positiva foi encontrada entre os níveis iniciais de IL-1 β e TNF- α (Correlação de Pearson - $r = 0,6931$; $p = 0,0262$).

Tabela 10 – Potencial inflamatório do conteúdo infeccioso nas diferentes etapas da terapia endodôntica através dos níveis de TNF- α (pg/mL)

Grupos	Etapas do tratamento endodôntico		
	Inicial (C1) Med (IC 95%)	Após PQM (C2) Med (IC 95%)	Após EDTA (C3) Med (IC 95%)
NaOCI (I)	1016,79 (940,07 – 1027,82) Aa	405,02 (378,96 – 431,43) Bab	395,20 (373,41 – 410,69) Bb
CLX (II)	988,51 (927,23 – 1002,90) Aa	476,03 (402,32 – 539,55) ABab	466,52 (402,61 – 511,28) ABb
SS (controle)	1023,14 (1045,00 – 22,78,04) Aa	637,56 (473,87 – 1282,52) Ab	654,06 (506,78 – 1708,96) Ab

Letras maiúsculas distintas na coluna significam diferença estatística pelo teste Kruskal Wallis seguido pelo teste de Dunn ($\alpha=0,05$). Letras minúsculas distintas na linha significam diferença estatística pelo teste de Friedman ($\alpha=0,05$).

Figura 11. Níveis de TNF- α dos três grupos estudados antes, após a terapia endodôntica e após uso do EDTA 17%.



6. DISCUSSÃO

6.1. Quantificação de endotoxinas nos canais radiculares

Diante do predomínio de bactérias Gram-negativas, e considerando lipopolissacarídeo como seu principal constituinte inflamatório, preocupações constantes do papel desta molécula em quadros infecciosos evocaram a “era da quantificação de endotoxinas em canais radiculares” (Schein & Schilder, 1975; Horiba *et al.*, 1991; Khabbaz *et al.*, 2001; Jacinto *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2007; Martinho & Gomes, 2008; Gomes *et al.*, 2009; Valera *et al.*, 2010; Martinho *et al.*, 2010 a,b; 2011; Endo *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2012; Marinho *et al.*, 2012).

Infecções endodônticas associadas à periodontite apical são resultantes da interação entre as defesas do hospedeiro e fatores microbianos, dentre os quais, endotoxina, é indubitavelmente o fator de virulência mais estudado (Tang *et al.*, 2011). Para detecção e quantificação de endotoxinas, o método “Limulus amoebocyte lysate” (LAL) é um dos mais sensíveis, conhecido por detectar endotoxinas, mesmo em baixas concentrações (Novitsky, 1994).

Baseados no princípio de LAL, diversos testes para detecção e quantificação de endotoxinas vêm sendo utilizados. Apesar da capacidade de detectar a presença de endotoxinas, a sensibilidade de detecção dos testes empregados parece influenciar na mensuração da concentração de endotoxinas em uma amostra. Diferenças entre as concentrações de endotoxina podem estar relacionadas à seleção do teste a ser utilizado. Foi demonstrado por Martinho *et al.* (2010) que os testes quantitativos cinéticos de detecção são mais precisos e reprodutíveis para quantificação de endotoxinas em canais radiculares. Essa informação é particularmente importante quando se deseja realizar estudos comparativos dos níveis de detecção de endotoxinas em diferentes etapas operatórias, devendo levar em consideração o teste empregado. Diante disto, o

teste cinético turbidimétrico (Pyrogent -5000[®]) foi o teste de escolha deste estudo para quantificar endotoxinas antes e após a instrumentação do canal radicular e após toailete final com EDTA 17%, estando de acordo com Martinho *et al.*, 2010; Endo *et al.*, 2011; Martinho *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2012 e Marinho *et al.*, 2012.

Endotoxinas foram detectadas em 100% das amostras coletadas de canais radiculares, corroborando com o trabalho de Jacinto *et al.*, 2005, Martinho *et al.* 2010, Martinho *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2012 e Oliveira *et al.*, 2012. Os valores de endotoxina encontrados estão representados pela mediana de 18,7 EU/mL. Esse resultado reafirma achados prévios da investigação da concentração de endotoxinas de canais radiculares com necrose pulpar, quantificada pelo mesmo teste de detecção, nos quais níveis de endotoxinas em infecções endodônticas primárias apresentam uma mediana de concentração baixa.

Acredita-se que deve ser atingido um limiar de concentração de endotoxinas sobre os tecidos pulpares e perirradiculares para o desencadeamento de manifestação clínica dolorosa. Nos dentes com dor provocada, a concentração de endotoxinas foi superior à encontrada nos dentes assintomáticos, concordando com os achados da literatura (Schein & Schilder, 1975; Dhálen & Bergenholtz, 1980; Horiba *et al.*, 1991; Khabbaz *et al.*, 2000; Jacinto *et al.*, 2003, Jacinto *et al.*, 2005; Martinho *et al.*, 2010). Níveis mais elevados de endotoxinas foram estatisticamente maiores nos casos em que havia presença de dor à percussão. Embora o fenômeno de dor de origem perirradicular seja multifatorial, os resultados da presente investigação sugerem que a concentração de endotoxina seja um dos fatores envolvidos, podendo estar relacionada com maior grau de inflamação perirradicular.

Quanto ao aspecto físico do canal radicular, níveis elevados de endotoxinas foram detectados em dentes com exsudação intracanal (\approx 5 vezes superior) concordando com a literatura endodôntica (Schein & Schilder, 1975; Horiba *et al.*, 1989; Jacinto *et al.*, 2005; Martinho *et al.*, 2012). Nenhuma diferença significativa quanto aos níveis de endotoxinas quando da distinção do tipo de exsudato presente, quer seja exsudato purulento ou seroso. Horiba *et al.*, (1990)

quantificaram endotoxinas de amostras de infecções endodônticas primárias e igualmente encontraram elevados níveis de endotoxina em dentes com exsudação intracanal do que naqueles com canais secos, o que suporta os achados do presente estudo.

Considerando que, os produtos da degradação pulpar e a possibilidade de estagnação e degradação de componentes proteicos dos fluidos tissulares servem como nutrientes essenciais à sobrevivência de microrganismos no sistema de canais radiculares, desencadeando reações de defesa do hospedeiro, as infecções endodônticas devem ser tratadas, principalmente, por procedimentos mecânicos auxiliados por substâncias químicas auxiliares, capazes de reduzir ao máximo os irritantes presentes no interior do canal radicular (Takahashi, 1998). Assim, a eliminação completa de microrganismos em canais radiculares infectados é um objetivo claro do tratamento endodôntico (Trope & Bergenholtz, 2002).

Mesmo que as bactérias sejam removidas do canal radicular, endotoxinas podem permanecer e alcançar os tecidos periapicais. Para o hospedeiro, a estrutura do LPS serve como padrão ou sinal molecular que indica a presença de bactérias Gram-negativas, permitindo a identificação pelo hospedeiro como “non-self” (Medzhitov & Janeway, 2000, 2002), desta forma, a perpetuação ou manutenção das periapicopatias após a terapia endodôntica pode estar em detrimento da persistência desse estímulo (Barthel *et al.*, 1997, Vianna *et al.*, 2007). Assim, o tratamento do canal radicular infectado deve visar também a eliminação de endotoxinas dos canais radiculares durante a terapia endodôntica, contribuindo para o processo de reparo dos tecidos periapicais (Martinho *et al.*, 2010).

6.2.1. Efeito do preparo químico-mecânico na redução de endotoxinas dos canais radiculares infectados

Neste estudo, foram comparadas duas substâncias químicas auxiliares mais comumente utilizadas em Endodontia - NaOCl 2,5% e CLX 2% - na remoção

de endotoxinas de canais radiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical associada. Embora bem consolidado o uso dessas substâncias químicas auxiliares na terapia endodôntica, por sua ação antimicrobiana de amplo espectro (Ferraz *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2007; Siqueira *et al.*, 2007; Martinho & Gomes, 2008; Gomes *et al.*, 2009), é imperioso também investigar sua ação sobre endotoxinas em canais radiculares infectados.

No presente trabalho, observou-se que os níveis iniciais de endotoxina foram significativamente reduzidos após a instrumentação, independente da substância química auxiliar utilizada. Trabalhos prévios também demonstraram o efeito do preparo mecânico na redução de endotoxinas de canais radiculares infectados (Vianna *et al.*, 2007; Martinho & Gomes, 2008; Gomes *et al.*, 2009; Martinho *et al.*, 2010; Oliveira *et al.* 2012). A expressiva redução de endotoxina alcançada quando se utilizou um irrigante inerte reafirmou o papel desempenhado pela ação mecânica dos instrumentos endodônticos, particularmente de limas rotatórias na completa extensão do canal radicular, conjuntamente com o fluxo e refluxo da solução irrigadora na redução dos níveis de endotoxinas de canais radiculares infectados. A influência direta que o diâmetro apical final de instrumentação exerce sobre a redução dos níveis de endotoxina de canais radiculares contaminados foi demonstrado por Marinho *et al.*, 2012.

Martinho *et al.* (2010) demonstraram uma redução de 98,06% de endotoxinas ao realizar instrumentação rotatória na completa extensão do canal radicular e finalizando o preparo num diâmetro apical correspondente à lima #30. NaOCL 2,5% foi utilizada como substância química auxiliar. Utilizando o mesmo protocolo de instrumentação, o presente trabalho estendeu o preparo do canal radicular a dois diâmetros superiores ao descrito por Martinho *et al.* em 2010, finalizando a instrumentação do canal radicular num diâmetro apical de 40. Foi obtida uma redução de 99,75% dos níveis de endotoxina. Outro fator a ser considerado para essa significativa redução é a anatomia radicular dos elementos dentais selecionados para este estudo. Os grupos dentários apresentavam raízes

retas e desta forma, este aspecto anatômico pode ter favorecido a efetividade de desinfecção do canal radicular.

Para instrumentação do canal radicular, foi escolhido o sistema rotatório Mtwo por apresentar boa capacidade de corte, atribuída ao design da secção transversal do instrumento, resultando em lâminas de corte agressivo e ângulo de corte positivo (Vahid *et al.*, 2009), além de preservar a geometria do canal radicular com baixo risco de desvios (Sonntag *et al.*, 2007). Também tem excelente capacidade de remoção de debris dentinários (Foschi *et al.*, 2004; Schafer *et al.*, 2006). Foi utilizada a sequência completa de instrumentos Mtwo[®], correspondendo ao tip final do sistema, resultando num diâmetro apical final #40. Esta ampliação anatômica do canal radicular, parece promover ampliação suficiente para chegada da substância química auxiliar no 1/3 apical (Dummer *et al.*, 1998; Usman *et al.*, 2004).

Avaliando o desempenho individual de cada substância química auxiliar após a instrumentação do canal radicular, deve-se ressaltar que, a forma de apresentação líquida dos irrigantes testados pode ter favorecido um melhor desempenho destes quando comparados à forma de apresentação em gel da clorexidina 2%. Um maior percentual de redução de endotoxinas foi demonstrado pelo grupo do NaOCl 2,5% (99,65%) e do soro fisiológico (96,79%), ambos na forma líquida, quando comparados à clorexidina gel 2% (95,07%). Considerando que o mesmo volume de irrigante foi utilizado em todos os grupos (5mL a cada troca de lima), no grupo da CLX gel 2% a irrigação deveria remover raspas de dentina infectada imersas em gel, o que dificulta o turbilhonamento da solução irrigadora, sugerindo a necessidade de um volume maior de soro fisiológico para uma limpeza mais eficaz.

O elevado potencial de dissolução de matéria orgânica, baixa tensão superficial e excelente atividade antimicrobiana consagraram o NaOCl como a substância química mais utilizada mundialmente na terapia endodôntica. No entanto, acredita-se que seu melhor desempenho quando comparado à clorexidina na redução de endotoxinas não esteja associado propriamente à sua

ação química, uma vez que este não diferiu do grupo controle, e sim, à ação física de fluxo-refluxo da solução irrigadora no interior do canal radicular sem a presença de um gel, o que pôde ter contribuído para uma limpeza mais eficaz.

Em contrapartida, várias complicações têm sido relatadas com o uso do NaOCl durante o tratamento endodôntico, tais como dor severa, desenvolvimento de edema, hematoma e necrose tecidual causado pelo efeito oxidativo desta substância quando em contato com os tecidos periapicais (Becking, 1991). Sua elevada citotoxicidade, em detrimento de sua concentração, faz repensar seu uso principalmente a depender do protocolo e técnica de instrumentação do canal radicular, particularmente quando é preconizada ampliação foraminal.

Como alternativa ao NaOCl, a clorexidina vem ganhando aceitação como substância química auxiliar. Baseada em evidências científicas, esta substância apresenta amplo espectro antimicrobiano, capacidade de difusão pelos túbulos dentinários (Gomes *et al.*, 2009) e substantividade (Vianna *et al.*, 2007). Seu efeito residual impede a recolonização bacteriana por 7 dias após a instrumentação (Dametto *et al.*, 2002) até 12 semanas (Rosenthal *et al.*, 2004). Esta substância tem sido utilizada na terapia endodôntica sem apresentar reações adversas, mesmo quando em contato com os tecidos periapicais. Sua baixa citotoxicidade foi demonstrada por Bonacorsi *et al.* em 2004, uma vez que esta substância não apresentou atividade citotóxica expressiva em cultura de células de macrófagos.

É certo que a clorexidina apresenta a desvantagem de não possuir a capacidade de dissolução de tecido orgânico. Porém, quando na forma de apresentação em gel, devido à sua viscosidade, possui a capacidade de promover a suspensão de restos pulpare para sua posterior remoção através do ato físico da irrigação-aspiração do canal radicular com soro fisiológico (Ferraz *et al.*, 2001). Aliado a isso, promove ação lubrificante das paredes do canal, facilitando a ação dos instrumentos endodônticos na limpeza de canais radiculares (Vivacqua-Gomes *et al.*, 2002).

Na prática clínica, o EDTA 17% é usado para remoção da *smear layer* (Torabinejad *et al.*, 2003), independente da substância química auxiliar utilizada. A

camada de smear layer produzida durante o preparo do canal radicular pode promover adesão e colonização de bactérias, dentre elas, as Gram-negativas, à matriz dentinária (Yang & Bae, 2002). Portanto, seu uso é essencial no protocolo de desinfecção do canal radicular (Martinho *et al.*, 2010). Considerando o fato do LPS se aderir a tecidos mineralizados (Schein & Schilder, 2006), julga-se importante a utilização de um agente quelante para potencializar a redução de LPS do interior de canais radiculares após a instrumentação.

Após o toailete final com EDTA 17%, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. Estes achados demonstram a contribuição do EDTA 17% (3mL- 3 minutos, com renovação a cada minuto), no protocolo de redução de endotoxinas de canais radiculares infectados, e esta etapa faz parte do preparo químico-mecânico, sendo seu uso preconizado independente da substância química auxiliar utilizada. O EDTA age em camadas mais profundas ($\approx 130 \mu\text{m}$) da dentina infectada não atingidas pelo preparo químico-mecânico (Berutti *et al.*, 1997). Além disso, é um forte agente quelante (Petsch & Anspach, 200) que pode reagir com o Ca^{++} presente no lipídeo A do LPS (Burton & Carter, 1964), afetando a estrutura dessa molécula.

Vale ressaltar que, independente da substância química auxiliar utilizada, endotoxina ainda foi detectada mesmo após o toailete final do canal radicular com EDTA 17%. Assim, permaneceu uma quantidade residual de endotoxinas (0,44%- NaOCl; 2,35%- CLX, 1,56%- Solução salina) nos canais radiculares. Pouca ou nenhuma informação é disponível na literatura acerca da concentração de endotoxina que o preparo químico-mecânico deve atingir para promover o desequilíbrio do processo inflamatório a favor do hospedeiro e iniciar assim, o reparo da região perirradicular.

6.3 Avaliação do potencial inflamatório do conteúdo endodôntico - Estimulação celular e dosagem de citocinas inflamatórias

No presente trabalho foi investigado o potencial inflamatório do conteúdo endodôntico quanto à produção de IL-1 β e TNF- α , citocinas comumente

relacionadas à progressão da inflamação pulpar e perirradicular (Artese *et al.*, 1991; McNicholas *et al.*, 1991; Hosoya *et al.*, 1997).

Dentre as células de defesa envolvidas no processo inflamatório, estão os macrófagos presentes em maior população, sendo dominantes na produção de citocinas pró-inflamatórias (Artese *et al.*, 1991; Matsuo *et al.*, 1992) e quase exclusivamente o produtor de TNF- α na presença do LPS bacteriano (Beutler & Cerami, 1986). Estudos mostram que o grau de ativação de monócitos depende da virulência do LPS, sendo esta virulência específica para determinadas espécies bacterianas, principalmente as Gram-negativas (Darveau, 2005).

A análise dos efeitos citotóxicos do conteúdo infeccioso dos 30 canais radiculares com infecção endodôntica primária foi realizada numa linhagem de macrófagos murinos imortalizada (RAW 264.7) na produção de IL1- β e TNF- α . Macrófagos têm sido utilizados em testes de imunotoxicidade por permitir a dosagem de citocinas produzidas em cultura de células e pela habilidade em manter suas funções imunológicas na presença de diferentes agentes químicos (Barile *et al.*, 1994).

São atribuídas funções específicas para cada citocina produzida no desenvolvimento da periodontite apical, cujos efeitos de suas interações repercutem na presença de sinais/sintomas e achados radiográficos.

Produção de IL1- β e TNF- α nos sobrenadantes foi detectada em 100% dos casos estimulados com conteúdo endodôntico inicial, corroborando com os achados de Martinho *et al.*, 2010; Martinho *et al.*, 2012 e Oliveira *et al.*, 2012. Foi observada produção de TNF- α em maiores concentrações do que IL1- β ($p < 0,05$), corroborando com os achados de Maekawa *et al.* (2011). Correlação positiva foi encontrada entre os níveis iniciais de IL-1 β e TNF- α . Trabalhos na literatura têm mostrado que essas citocinas estão presentes em níveis significantes em tecidos periapicais de humanos e de modelos experimentais em animais (Wang & Stashenko, 1993; Barthel *et al.*, 1997; Pezelj-Ribaric *et al.*, 2007).

Foi demonstrado por Stashenko *et al.* (1993) que níveis elevados de IL1- β e TNF- α estão presentes em sítios de destruição perirradicular ativa. Estas

citocinas, sinergisticamente, estimulam o desenvolvimento de reabsorção óssea em diferentes condições patológicas (Torabinejad *et al.*, 1994).

Tendo o conhecimento da necessidade de remoção do estímulo causal da produção de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos periradiculares, especial importância é atribuída à terapia endodôntica na redução/eliminação de bactérias e seus fatores de virulência de canais radiculares infectados.

Considerando o objetivo deste estudo, a avaliação do potencial inflamatório do conteúdo endodôntico foi monitorada antes e após a instrumentação do canal radicular e após o uso do EDTA 17%; comparando a efetividade das diferentes substâncias químicas auxiliares.

Quanto aos níveis de IL1- β nas diferentes etapas operatórias, os resultados encontrados neste trabalho demonstraram que o conteúdo infeccioso demonstrou maior potencial inflamatório inicialmente, sendo este reduzido após a instrumentação do canal radicular, tanto para as substâncias químicas auxiliares quanto para o soro fisiológico ($p < 0,05$).

Na comparação entre grupos, as substâncias dotadas de atividade antimicrobiana- NaOCl 2,5% e CLX 2% obtiveram melhores resultados quando comparadas ao grupo controle. Embora a clorexidina gel 2% tenha apresentado maior percentual de redução da produção IL1- β (76,07%) quando comparada ao hipoclorito de sódio (74,06%) estas substâncias não diferiram entre si quanto à redução dos níveis de IL1- β . Estudos prévios já demonstraram que em concentrações comparáveis, o hipoclorito de sódio e a clorexidina possuem ação antimicrobiana similar tanto em trabalhos *in vitro* como *in vivo* (Ferraz *et al.*, 2001; Dametto *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2009; Mohammadi & Abbott, 2009). Ainda que reduzindo os níveis de IL1- β , o grupo controle obteve um menor percentual de redução ao final da terapia endodôntica (43,92%). Este fato reafirma a necessidade do uso de uma substância com propriedades antimicrobianas para uma desinfecção mais efetiva do sistema de canais radiculares.

Quanto aos níveis de TNF- α , a análise do efeito da instrumentação do canal radicular demonstrou uma menor produção desta citocina em todos os

grupos. Apenas após o uso do EDTA 17% foi constatada redução significativa dos níveis de TNF- α em todos os grupos, ressaltando a contribuição deste agente quelante na remoção da *smear layer* e potencialização da desinfecção intrarradicular.

Quanto ao desempenho individual das substâncias químicas auxiliares na redução dos níveis de TNF- α , o hipoclorito de sódio 2,5% apresentou maior percentual de redução (59,89%) seguido da clorexidina gel 2% (52,67%), entretanto, estas substâncias não diferiram entre si. Ainda, o hipoclorito de sódio apresentou-se significativamente mais eficaz do que a solução salina, que reduziu em apenas 45,25% os níveis de TNF- α produzidos. Um melhor desempenho de substâncias dotadas de atividade antimicrobiana sugere que sua atividade química parece interferir no potencial inflamatório do LPS, alterando qualitativamente seu potencial inflamatório.

Como demonstrado no presente estudo, a terapia endodôntica instituída foi capaz de reduzir o potencial inflamatório dos canais radiculares de forma significativa. Contudo, o conteúdo endodôntico mesmo após a terapia endodôntica apresentou potencial antigênico. Devido à complexa interação entre diferentes mediadores químicos da inflamação em resposta ao conteúdo endodôntico infeccioso, a dominância de qualquer um desses na patogênese das lesões periapicais é difícil estabelecer. De qualquer maneira, fica o desafio de saber a real significância da endotoxina presente no canal radicular após o preparo químico-mecânico, assim como a concentração capaz de induzir ou manter uma lesão periapical. As pesquisas devem voltar-se para a busca de uma substância química auxiliar que atue para degradação da molécula de LPS, inativando-a quimicamente durante a terapia endodôntica e conseqüentemente diminuindo o potencial inflamatório do conteúdo intracanal aos tecidos perirradiculares.

7. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos e nas limitações experimentais do presente estudo, pode-se concluir que:

1. Endotoxinas estavam presentes em todos os casos investigados, apresentando níveis mais elevados nos dentes com dor à percussão e com exsudato intracanal.
2. O preparo químico-mecânico foi eficaz na redução do conteúdo de endotoxinas, independente da substância química auxiliar testada.
3. O potencial inflamatório do conteúdo endodôntico foi demonstrado pela produção de IL1- β e TNF- α , exercendo maior atividade inflamatória contra macrófagos nas amostras iniciais quando comparado com as obtidas após o preparo químico-mecânico.

REFERÊNCIAS

Al-Qutub MN, Braham PH, Karimi-Naser LM, Liu X, Genco CA, Darveau RP. Hemin-dependent modulation of the lipid A structure of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 2006;74:4474-85.

Artese L, Piattelli A, Quaranta M, Colasante A, Musani P. Immunoreactivity for interleukin 1-beta and tumor necrosis factor-alpha and ultrastructural features of monocytes/macrophages in periapical granulomas. *J Endod* 1991;17:483-7.

Ataoglu T, Ungör M, Serpek B, Haliloğlu S, Ataoğlu H, Ari H. Interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha levels in periapical exudates. *Int Endod J* 2002;35:181-5.

Atkins, E. Pathogenesis of fever. *Physiol. Rev* 1960; 60: 5804-1960.

Bainbridge BW, Coats SR, Darveau RP. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide displays functionally diverse interactions with the innate host defense system. *Ann Periodontol.* 2002;7:29-37.

Barile FA, Dierickx PJ, Kristen U. In vitro cytotoxicity testing for prediction of acute human toxicity. *Cell Biol Toxicol.* 1994;10:155-62.

Barthel C.R., Levin L.G., Reisner H.M., Trope M. TNF- α release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int. Endod. J.* 1997; 30: 155-9.

Baumgartner J. C., Mader C. L. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. J. Endod. 1987;13: 147-57.

Baumgartner, J.C., Falkler Jr, W.A. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. J. Endod. 1991;17: 380-3.

Bealtz R.E., Torabinejad M., Pouresmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and RDTA on bovine pulp and dentin. J. Endod. 2003;29: 334-7.

Becking A.G. Complications in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 1991; 71: 192-96.

Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. Int Endod J. 2006;39:10-7

Berber, V.B., Verificação da redução do *Enterococcus faecalis* no canal radicular e nos túbulos dentinários utilizando difentes substâncias químicas e técnicas de instrumentação. Piracicaba, 2005.109 p. Tese (Mestrado) – Univercidade Estadual de Campinas.

Berutti E, Marini R, Angeretti A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. J Endod 1997;23:725–7.

Beutler B, Cerami A. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. Nature 1986;320:584-8.

Biffi J. C. G., Rodrigues H.H. Ultrasound in endodontics: a quantitative and histological assessment using human teeth. *Endod. oral Dent. Traumat.* 1981; 5:55-61.

Bloomfield S. F., Miles G. A. The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations. *J. Appl. Bacteriol.* 1979; 46: 65-73

Bodet C, Grenier D. Synergistic effects of lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria on pro-inflammatory cytokine production in an ex vivo whole blood model. *Mol Oral Microbiol.* 2010;102-11.

Buck R.A., Cai J., Eleazer P.D., Staat R.H., Hurst H.E. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. *J. Endod.* 2001; 27: 325- 327.

Burton AJ, Carter HE. Purification and characterization of the lipid A component of the lipopolysaccharides from *Escherichia Coli*. *Biochemistry* 1964;3:411-8.

Buttler T.K., Crawford J.J. The detoxifying effect of varying concentrations of sodium hypochlorite on endotoxins. *J. endod.* 1982;8:59-66.

Byström A., Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1983; 55: 307-12.

Cardoso MG, de Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AO. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105: 85-91.

Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res.* 2003;338:2431-47.

Cortez D.G.N. Estudo in vitro da infiltração, densidade radiográfica e tempo operatório de técnicas de obturação endodônticas. [Dissertação]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2002.

Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99: 768-72.

Dametto, F.R. estudo in vitro da antimicrobiana imediata a mediate da clorexidina gel 2% usada como irrigante endodôntico contra *Enterococcus faecalis*. Piracicaba, 2002. 100 p. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

Darveau RP, Pham TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, Howald WN, Way SS, Hajjar AM. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun.* 2004;72:5041-51.

Darveau, RP. Oral innate host defense responses: interactions with microbial communities and their role in the development of disease, 2000; 169-218. In H. K.

de Brito LC, Teles FR, Teles RP, Totola AH, Vieira LQ, Sobrinho AP.J *Endod.*T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. 2012; 38:481-5.

Dhalén, G., Bergenholtz G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *J. Dent. Res.* 1980; 59: 1033-40.

Dinarello, C. A. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of septic shock syndrome. *J. Infect. Dis.* 1991; 163: 1177-84.

Dixon D.R., Darveau R.P. Lipopolysaccharide Heterogeneity: Innate Host Responses to Bacterial Modification of Lipid A Structure. *J Dent Res.* 2005; 84:584-95.

Dummer PM, al-Omari MA, Bryant S. Comparison of the performance of four files with rounded tips during shaping of simulated root canals. *J Endod* 1998; 24:364-71.

Endo MS. Identificação de microrganismos e quantificação de endotoxinas em canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical. [Dissertação] UNICAMP/FOP, 2011.

Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc.* 1986; 112: 863-9.

Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod* 2001; 7: 452-5.

Ferraz CCR, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* sensitizes capsaicin-sensitive nociceptors. *J Endod* 2011; 37: 45-48.

Gazivoda D, Dzopalic T, Bozic B, Tatomirovic Z, Brkic z, Colic M. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *J Oral Pathol Med.* 2009; 38:605-11.

Girardin, EP.; Roux-Lombard, P.; Grau, G.E.; Suter, P.; Gallati, H.; The j5 study group; Dayer, J.M. Imbalance between tumor necrosis factor-alpha and soluble TNF receptor concentrations in severe meningococcaemia. *Immunol.* 1992; 76, 20-3.

Giroir, B.P. Mediators of septic shock: New approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade. *Crit. Care Med.* 1993; 21:780-9.

Gery I.; Gershon, R K.; Waksman, BH. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1972; 136: 12831.

Gomes B.P., Pinheiro E.T., Gade-Neto C.R., Sousa E.L., Ferraz C.C ., Zaia A.A., Teixeira F.B., Sousa-filho F.J. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol. Immunol.* 2004; 19: 71-76.

Gomes B.P.F.A. An investigation into the root canal microflora. PhD thesis. University of Manchester, UK 1995.

Gomes B.P.F.A., Drucker D.B., Lilley J.D. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int. Endod. J.* 1996a; 27: 291-298.

Gomes B.P.F.A., Ferraz C.C.R., Vianna M.E., Berber, V.B., Teixeira F.B., Souza Filho F.J. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hydrochlorite and chloxexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int. Endod. J.* 2001; 34: 424-428.

Gomes B.PF.A., Lilley J.D., Drucker D.B. Variations in the susceptibilities of the root canal microflora to biomechanical procedures. *Int. Endod. J.* 1996b; 29: 235-41.

Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod.* 2012;38:1082-6.

Gomes BPFA, Drucker DB Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int. Endod. J.* 1994; 27: 291-98.

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

Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol.* 1986; 57: 370-7.

Grossman LI, Melman B. Solution of pulp tissue by chemical agents. *J. Am Dent Assoc.* 1941; 28: 223.

Hageman, J. R; Caplan, M. S. An introduction to the structure and function of inflammatory mediators for clinicians. *Clin. Perinatol.*, 1995; 22: 25161.

Hennessey TS. Some antibacterial properties of chlorhexidine. *J Periodontol Res Suppl.* 1973; 12: 61-7.

Homji NF, Mao X, Langsdorf EF, Chang SL. Endotoxin-induced cytokine and chemokine expression in the HIV-1 transgenic rat. *J Neuroinflammation.* 2012; 9:3.

Hong C.Y., Lin S.K., Kok S.H., Cheng S.L., Lee M.S., Wang T.M., Chen C.S., Lin L.D., Wang J.S. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J. Oral Pathol. Med.* 2004; 33:162-169.

Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med. Oral. Pathol.* 1991;71:492-5.

Hosoya S, Matsushima K. Stimulation of interleukin-1 beta production of human dental pulp cells by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *J Endod* 1997; 23: 39-42.

Hülsmann M., Hahn W. Complications during root canal irrigation: literature review and case reports. *Int. Endod. J.* 2000; 33: 186-93.

Jacinto R.C., Gomes B.P., Ferraz C.C., Zaia A.A., Filho F.J. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol. Immun.* 2003; 18: 285-292.

Jacinto R.C., Gomes B.P., Shah H.N., Ferraz C.C., Zaia A.A.,Souza-Filho F.J. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J. Med. Microbiol.* 2005; 54: 777-783.

Jeansonne M.J. & White R.R.A. Comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5,25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J. Endod.* 1994; 20: 276-278.

Jiang J. Zuo J., Hurst I.R., Holliday S. The synergistic effect of peptidoglycan and lipolysaccharide on osteoclast formation. *Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2003a; 96: 738-43.

Takehashi S., Stanley H.R., Fitzgerald R.J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg.* 1965; 20: 340-349.

Khabbaz M.G., Anastasiadis P.L., Sykaras S.N. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2001; 91: 587-593.

Le, J.; Vilcek, J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab. Invest.* 1987;56:234-48.

Levin J, Bang FB. Clottable protein in *Limulus*; its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb Diath Haemorrh* 1968; 19: 186-97.

Luderitz O., Galanos C., Rietschel E.T. Endotoxin of Gram-negative bacteria. *Pharmacol. Ther.* 1981; 15: 383-402.

Maekawa LE, Carvalho AS, Cardoso PE, Xavier ACC, Oliveira LD, Koga-Ito CY. Atividade antimicrobiana de um EDTA gel associado a peróxido de hidrogênio sobre cepas clínicas de *Candida albicans*. *Cien Odontol Bras* 2011; 12:57-60.

March, C. J.; Mosley, B.; Larsen, A.; Cerretti, D. P.; Braedt, G.; Price, V.; Gillis, S.; Henney, C. S.; Kronhein, S. R.; Grabstein, K.; Conlon, P. J.; Hopp, T. P.; Cosman, D. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary dnas. *Nature*, 1985; 315: 6415.

Marinho ACS; Martinho FC; Zaia AA; Ferraz CCR; Gomes BPF. Influence of the apical enlargement size on the endotoxin level reduction of dental root canals. *J Appl Oral Sci.* 2012;20:661-6.

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

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

Martinho FC; Chiesa WMM, Leite FRM, Cirelli JA, Gomes BPF. Antigenic Activity of Bacterial Endodontic Contents from Primary Root Canal Infection with Periapical Lesions against Macrophage in the Release of Interleukin-1b and Tumor Necrosis Factor alpha. J Endod. 2010; 36:1467–1474.

Matsuo T, Ebisu S, Shimabukuro Y, Ohtake T, Okada H. Quantitative analysis of immunocompetent cells in human periapical lesions: correlations with clinical findings of the involved teeth. J Endod 1992;18:497-500.

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

McNicholas S, Torabinejad M, Blankenship J, Bakland L. The concentration of prostaglandin E2 in human periradicular lesions. J Endod.1991;17:97-100.

Medzhitov R., Janeway C.A.Jr. How does the immune system distinguish self fromnonself? Seminars Immun. 2000; 12: 185-188.

Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, Gomes BP. Treponema species detected in infected root canals and acute apical abscess exudates. J Endod. 2010;36:1796-9.

Naenni N., Thomaz K., Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. J. Endod. 2004;3: 785-787.

Nelson-Filho P., Leonardo M.L., Silva L.A.B., Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. J. Endod. 2002; 28: 694-696.

Niwa M., Milner K.C., Ribi E., Rudbach J.A. Alteration of Physical Chemical and Biological Properties of Endotoxin by Treatment with Mild Alkali. J. Bac. 1969; 97: 1069.

Novistiky T.J. Limulus amoebocyte lysate (LAL) detection of endotoxin in human blood. J. Endotox. Res. 1994; 1: 253-63.

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

Oliveira L.D., Leao M.V.P., Carvalho C.A.T., Camargo C.H.R., Valera M.C., Jorge A.O.C. *In vitro* effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. Journal of Dentistry 2005; 33: 107-114.

Oliveira LD, Jorge AOC, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, Valera MC. *In vitro* effects of endodontics irrigants on endotoxins in root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007;104:135-42.

Önçanğ Ö, Hosgor M, Hilmioğlu S, Zekiöğü O, Eronat C, Burhanoğlu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canals irrigants. Int End J 2003;36:423-432.

Pashley E.L. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *Journal of Endodontics* 1985;11: 525-8.

Petsch D, Anspach FB. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotech* 2000; 76:97-119.

Pezelj-Ribaric S, Magasic K, Prpic J, Miletic I, Karlovic Z. Tumor necrosis factor-alpha in periapical tissue exudates of teeth with apical periodontitis. *Mediators of inflammation* 2007;1-4.

Prso IB, Kocjan W, Simic H, Brumini G, Pezelj-Ribaric S, Borcic J, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 in human periapical lesions. *Mediators of Inflammation* 2007; 1-4.

Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:635-700.

Rietschel E.T., Brade H. Bacterial endotoxins – An integral part of many bacteria, these molecules are at once brutal and beneficial to humans. Efforts are under way to block the bad effects and harness the good. *Scient. Am.* 1992;26-33.

Rietschel E.T., Brader H. Bacterial- Endotoxins. *Scientific. Americam.* 1992; 267: 54-61.

Rietschel E.T., Brader H., Lindner B., Zharinger U. Molecular biochemistry of lipopolysaccharides. In: *Bacterial endotoxic lipopolysaccharides.* Morrison D.C., Ryan J.L., editors. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1992;3-42.

Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98:488-492.

Rölla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res.* 1975; 54: 57-62.

Sabala C.L., Powell S.E. Sodium hypochlorite injection into periapical tissues. *J. Endod.* 1989; 15: 490-2.

Safavi, K.E., Spangberg L.S.W., Langerland K. Root canal dentinal tubule disinfection. *J. Endod.* 1990; 16: 207-210.

Schäfer E, Erler M, Dammaschke T. Comparative study on the shaping ability and cleaning efficiency of rotary Mtwo instruments. Part 1. Shaping ability in simulated curved canals. *Int Endod J* 2006;39:196-202.

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

Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. *D. Clin. N. Amer.* 1974; 18: 269-296.

Seltzer S., Farber P.A. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 1994; 78: 634-645.

Silva ACO, Faria MR, Fontes A, Campos MS, Cavalcanti BN. Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17:527-32.

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

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

Siqueira J.F. Jr., Lima K.C., Magalhaes F.A., Lopes H.P., de Uzeda M. Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *J. Endod.* 1999; 25: 332-5.

Siqueira Jr J. F., Lopes, H.P. Microbiologia endodontica. In: Siqueira Jr. J.F., Lopes H.P. *Endodontia. Biologia e técnica*. Rio de Janeiro: Medsi, 1999b.650p.

Siqueira Jr., Roças I.N., Favieri A., Oliveira J.C.M., Santos K.R.N. Polymerase chain reaction detection of *Treponema denticola* in endodontic infections within root canals. *Int. Endod. J.* 2001; 34: 280-284.

Skovbjerg S, Martner A, Hynsjö L, Hessle C, Olsen I, Dewhirst FE, Tham W, Wold AE. Gram-positive and gram-negative bacteria induce different patterns of cytokine production in human mononuclear cells irrespective of taxonomic relatedness. *J Interferon Cytokine Res.* 2010;30:23-32.

Sonntag D, Ott M, Kook K, Stachniss V. Root canal preparation with the NiTi systems K3, Mtwo and ProTaper. *Aust Endod J* 2007; 33:73-81.

Spangberg L.S.M. Endodontic Medicaments. In Smith DC & Williams DF, eds. *Biocompatibility of Dental Materials* 1 st edn. Boca Raton. USA: CRC Press 1982; 223-257.

Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol.* 1991;62:504-9.

Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol. Immunol.* 1992; 7:257-262.

Sundqvist G. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps. *Odontological Dissertation n^o 7.* University of Umea, Sweden 1976.

Sundqvist G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 1994;78: 522-530.

Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int. Endod. J.* 1998; 31: 311-325.

Tang L, Sun TQ, Gao XJ, Zhou XD, Huang DM. Tooth anatomy risk factors influencing root canal working length accessibility. *Int J Oral Sci.* 2011;3:135-40.

Tanomaru Filho M., Leonardo M.R., Silva L.A.B., Anibal E.F., Faccioli L.H. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions *Int. Endod. J.* 2002;35: 735-739.

Tanomaru J.M.G., Leonardo M.R., Tanomaru-Filho M., Bonetti-Filho L., Silva L.A.B. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LpS. *Int. Endod J.* 2003;36: 733-739.

Tanomaru-Filho M, Poliseli-Neto A, Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru JMG, Ito IY. Methods of experimental induction of periapical inflammation. Microbiological and radiographic evaluation. *Int Endod J.* 2005; 38: 477-82.

Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, et al. A new solution for the removal of the smear layer. J Endod. 2003;29:170-5.

Usman N, Baumgartner JC, Marshall JG. Influence of instrument size on root canal debridement. J Endod 2004; 30: 110-2.

Vahid A, Roohi N, Zayeri F. A comparative study of four rotary NiTi instruments in preserving canal curvature, preparation time and change of working length. Aust Endod J 2009;35:93-97.

Van Deuren, M.; Dofferhoff, A.S.M.; Van Der Meer, J. W. Cytokines and the response to infection. J. Pathol., 1992;168:349-56.

Vianna M.E., Gomes B.P., Berber V.B., Zaia A.A., Ferraz C.C., de Souza-Filho F.J. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 2004; 97: 79-84.

Vianna M.E., Gomes B.P., Sena N.T., Zaia A.A., Ferraz C.C., Souza Filho F.J. *In vitro* evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. Braz. Dent. J. 2005; 16: 175-180.

Vianna M.E., Horz H-P, Gomes B.P.F.A., Conrads G. *In vitro* evaluation of Microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. Int. endod. J. 2006; 39: 484-492.

Vianna, M.E. Microbiologia e tratamento das infecções endodônticas. [Tese] Piracicaba: FOP/UNICAMP– 2006.

Vianna, M.E.; Gomes, B.P.F.A.; Ferraz, C.C.R.; Berber, V.B.; Souza-Filho, F.J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine. *Journal of Dental Research*. 2002, 81: B151.

Vivacqua-Gomes N, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. *Int Endod J*. 2002; 35:791-5.

Walker A.A Definitive and dependable therapy for pulpless teeth. *J. Am. Assoc.* 1936;23: 1418-24.

Waltimo T.M., Orstavik D., Siren E.K., Haapasalo M.P. *In vitro* susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int. Endod. J*. 1999; 32: 421-429.

Wang CY, Stashenko P. The role of interleukin-1 alpha in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. *Oral Microbiol Immunol*. 1993;8:50-6.

Westphal O. Bacterial endotoxins. The second Carl Prausnitz Memorial Lecture. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1975;49:1-43

White R.R., Goldman M., Lin P.S. The influence of the smeared layer upon dentinal tubule penetration by plastic filling materials. *J. Endod*. 1984;10: 558-62.

Williams, T. W.; Granger, G. A. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: lymphotoxins of several mammalian species. *Nature*, 1968; 219: 1076-8.

Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodontal Res* 1996; 31:393-407.

Woodmansey KF. Intracanal heating of sodium hypochlorite solution: an improved endodontic irrigation technique. Dent Today 2005; 24:114-116.

Yang SE, Bae KS. Scanning electron microscopy study of the adhesion of *Prevotella nigrescens* to the dentin of prepared root canals. J Endod 2002;28:433

APÊNDICE 1. Dados gerais dos 30 pacientes selecionados para realização do tratamento endodôntico

Paciente	Dente	Idade	Sexo	Sintomatologia	Dor percussão	Perc+ Palp	Dor palpação	Dor Prévia
P1	22	51	F	0	0	0	0	1
P2	22	18	F	1	1	1	1	0
P3	23	30	F	1	0	0	1	0
P4	21	15	F	0	0	0	0	1
P5	32	42	M	0	0	0	0	0
P6	11	29	M	1	1	1	1	0
P7	11	27	F	1	1	1	1	0
P8	21	29	M	1	1	0	0	1
P9	21	27	F	1	1	1	1	0
P10	12	35	M	0	0	0	0	1
P11	11	44	F	1	1	1	1	0
P12	12	44	F	1	1	1	1	0
P13	21	49	F	1	1	1	1	0
P14	11	25	M	0	0	0	0	1
P15	21	25	M	0	0	0	0	1
P16	21	30	F	0	0	0	0	1
P17	34	55	F	0	0	0	0	0
P18	35	52	F	0	0	0	0	1
P19	24	31	F	0	0	0	0	0
P20	12	39	M	0	0	0	0	1
P21	43	50	F	1	1	1	1	0
P22	12	44	M	0	0	0	0	1
P23	11	20	M	0	0	0	0	0
P24	13	40	F	1	1	1	1	1
P25	11	31	M	0	0	0	0	0
P26	22	36	F	0	0	0	0	0
P27	21	36	F	0	0	0	0	0
P28	11	47	F	1	1	0	0	1
P29	21	47	F	1	1	1	1	0
P30	21	36	F	0	0	0	0	1

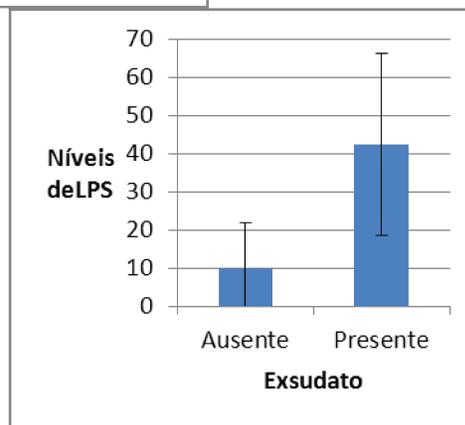
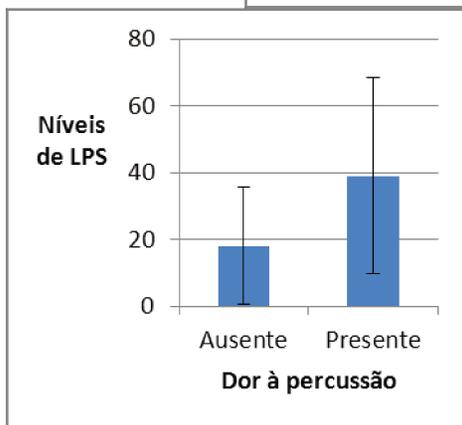
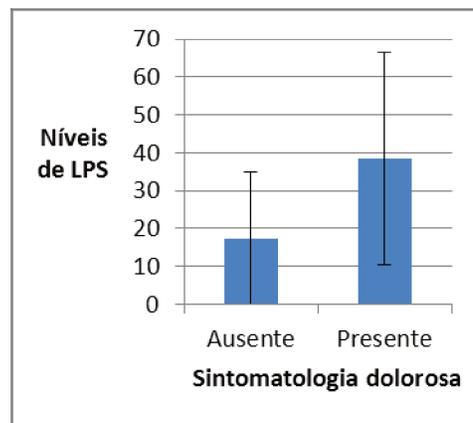
0=ausente
1=presente

Apêndice 2. Dados gerais e características clínicas dos casos selecionados para a pesquisa.

CASO	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
P1	51 anos, gênero feminino, dente 12, unirradicular, assintomático, dor prévia, restauração insatisfatória, mobilidade, lesão periapical 5-9 mm, canal molhado, exsudato claro.
P2	18 anos, gênero feminino, dente 22, unirradicular, dor provocada, dor à percussão e à palpação, cariado, lesão periapical 5-9 mm, canal molhado, exsudato purulento, odor fétido.
P3	30 anos, gênero feminino, dente 23, unirradicular, dor provocada, dor a palpação, dente hígido, lesão periapical 1-4 mm, canal molhado, exsudato claro, odor fétido, fístula intra-oral.
P4	15 anos, gênero feminino, dente 21, unirradicular, assintomático, dor prévia, restauração deficiente, microinfiltração, lesão periapical 1-4 mm, canal seco.
P5	42 anos, gênero masculino, dente 32, unirradicular, assintomático, restauração deficiente, microinfiltração, lesão periapical 1-4 mm, canal molhado, exsudato claro.
P6	29 anos, gênero masculino, dente 11, unirradicular, dor provocada, dor à palpação e à percussão, restauração insatisfatória, lesão periapical 1-4mm, canal molhado, exsudato purulento.
P7	27 anos, gênero feminino, dente 11, unirradicular, dor provocada, dor à palpação e à percussão, restauração insatisfatória, lesão periapical 5-9 mm, canal molhado, exsudato claro.
P8	29 anos, gênero masculino, dente 21, unirradicular, dor provocada, dor à percussão, restauração insatisfatória, lesão periapical 1-4 mm, canal molhado, exsudato claro.
P9	27 anos, gênero feminino, dente 21, unirradicular, dor provocada, dor a palpação e à percussão, restauração insatisfatória, lesão periapical 1-4 mm, canal molhado, exsudato claro.
P10	35 anos, gênero masculino, dente 12, unirradicular, assintomático, dor prévia, restauração insatisfatória, lesão periapical 5-9 mm, canal seco.
P11	44 anos, gênero feminino, dente 11, unirradicular, dor provocada, dor à palpação e à percussão, restauração insatisfatória, lesão periapical 1-4mm, canal molhado, exsudato claro.
P12	44 anos, gênero feminino, dente 12, unirradicular, dor provocada, dor a palpação e à percussão, dente hígido, lesão periapical 1-4mm, canal molhado, exsudato claro, fístula intra-oral.
P13	49 anos, gênero feminino, dente 21, unirradicular, dor provocada, dor à palpação e à percussão, cariado, lesão periapical 1-4 mm, canal seco.
P14	25 anos, gênero masculino, dente 11, unirradicular, assintomático, dor prévia, restauração deficiente, microinfiltração, lesão periapical 1-4 mm, canal seco.
P15	25 anos, gênero masculino, dente 21, unirradicular, assintomático, dor prévia, restauração deficiente, microinfiltração, lesão periapical 1-4 mm, canal seco, fístula intra-oral.
P16	21 anos, gênero feminino, dente 21, unirradicular, assintomático, dente hígido, lesão periapical 1-4 mm, canal seco, fístula intra-oral.
P17	55 anos, gênero feminino, dente 34, unirradicular, assintomático, cariado, lesão periapical 1-4 mm, canal seco.
P18	52 anos, gênero feminino, dente 35, unirradicular, assintomático, dor prévia, cariado, lesão periapical 1-4 mm, canal seco.
P19	31 anos, gênero feminino, dente 21, unirradicular, assintomático, dente hígido, lesão periapical 1-4 mm, canal seco.

P20	39 anos, gênero masculino, dente 12, unirradicular, assintomático, restauração deficiente, microinfiltração, lesão periapical 5-9 mm, canal molhado.
P21	50 anos, gênero feminino, dente 43, unirradicular, dor provocada, dor a palpação e à percussão, restauração satisfatória, lesão periapical 1-4 mm, canal seco.
P22	44 anos, gênero masculino, dente 12, unirradicular, dor provocada, dor a palpação e à percussão, restauração deficiente, lesão periapical 5-9mm, canal molhado, exsudato purulento, odor fétido.
P23	20 anos, gênero masculino, dente 11, unirradicular, assintomático, dente hígido, lesão periapical 1-4 mm, canal seco.
P24	40 anos, gênero feminino, dente 13, unirradicular, dor provocada, dor à percussão, restauração insatisfatória, lesão periapical 5-9 mm, canal molhado, exsudato purulento.
P25	31 anos, gênero masculino, dente 11, unirradicular, assintomático, dente hígido, lesão periapical 1-4 mm, canal seco.
P26	36 anos, gênero feminino, dente 22, unirradicular, assintomático, restauração deficiente, microinfiltração, lesão periapical 5-9 mm, canal seco.
P27	36 anos, gênero feminino, dente 22, unirradicular, assintomático, restauração deficiente, microinfiltração, lesão periapical 1-4 mm, canal seco
P28	47 anos, gênero feminino, dente 11, unirradicular, assintomático, restauração deficiente, microinfiltração, lesão periapical 1-4 mm, canal molhado, exsudato purulento.
P29	47 anos, gênero feminino, dente 21, unirradicular, dor provocada, dor à palpação e à percussão, restauração deficiente, microinfiltração, lesão periapical 5-9 mm, canal molhado exsudato claro.
P30	36 anos, gênero feminino, dente 21, unirradicular, assintomático, restauração deficiente, microinfiltração, lesão periapical 5-9 mm, canal molhado, exsudato purulento.

Apêndice 3. Distribuição da concentração de endotoxinas de acordo com a presença de sintomatologia dolorosa provocada e presença de exsudato intracanal.



Apêndice 4 – Características iniciais da amostra nos diferentes grupos avaliados quanto à redução de endotoxina de canais radiculares com periodontite apical crônica.

Parâmetro	Grupo			valor de p
	NaOCl 2,5% (GI)	Clorexidina gel 2% (GII)	Solução Salina (Controle)	
Unirradicular	10/0	10/0	10/0	1,00
Arco sup/inf	1/9	2/8	1/9	1,00
Gênero M/F	4/6	3/7	3/7	1,00
Dor provocada A/P	4/6	7/3	6/4	0,5307
Dor percussao A/P	5/5	7/3	6/4	0,8929
Percussão+Palpação A/P	6/4	7/3	7/3	1,00
Dor à palpação A/P	5/5	7/3	7/3	0,7094
Dor prévia A/P	6/4	5/5	6/4	1,00
Restauração definiitvaA/P	0/9	0/3	1/7	0,5500
Restauração deficiente	0/9	0/3	1/6	0,5263
Micro infiltração A/P	1/8	0/3	1/6	1,00
Lesão >4mm A/P	4/6	1/9	6/4	0,0891

*A- ausente; P- presente. Valores de p obtidos por meio do teste exato de Fisher. * Letras maiúsculas distintas na linha significam diferença estatística pelo teste Anova 1-way seguido pelo teste de Tukey.

Apêndice 5 – Níveis de LPS (EU/mL), IL1- β (pg/mL) e TNF α (pg/mL) dos 30 casos com necrose pulpar e presença de lesão periapical nas diferentes etapas da terapia endodôntica (C1, C2 e C3).

CASO	LPS (C1)	LPS (C2)	LPS (C3)	IL1 β (C1)	IL1 β (C2)	IL1 β (C3)	TNF α (C1)	TNF α (C3)	TNF α (C3)
P1	20,4	0,19	0,03	37,110	7,934	6,437	877,213	483,518	432,179
P2	82,1	0,04	0,17	39,231	6,542	6,437	1016,786	387,910	381,023
P3	31,4	0,01	0,09	31,098	8,234	8,023	964,028	416,317	402,184
P4	12	0,1	0,3	42,379	9,375	9,237	1021,580	411,015	400,377
P5	16,2	0,17	0,19	40,323	8,115	3,093	1035,971	399,026	387,194
P6	14,6	0,05	0,01	23,117	12,348	5,216	1016,786	373,480	362,019
P7	44	0,01	0,01	28,719	11,311	10,998	1040,760	345,403	342,031
P8	72,2	0,24	0,1	27,314	4,193	3,735	1024,580	390,103	390,017
P9	31,2	0,11	0,1	23,015	15,023	14,794	882,494	428,191	411,378
P10	2,0	0,01	0,01	29,573	18,329	9,321	959,232	417,003	412,073
P11	23,9	0,61	0,53	22,093	8,039	7,912	983,027	342,036	339,023
P12	73,7	0,89	0,51	27,310	10,023	10,137	921,124	479,027	470,017
P13	0,81	0,56	0,01	33,147	6,319	6,222	994,001	423,113	418,213
P14	1,24	0,55	0,06	37,436	6,137	7,039	1028,789	473,036	463,019
P15	9,82	0,66	0,04	43,291	11,017	10,093	1012,139	683,741	593,147
P16	24,2	0,02	0,01	32,741	7,029	7,003	1011,173	483,187	481,018
P17	44,7	1,84	1,88	38,917	9,036	8,147	994,024	532,036	530,470
P18	11,7	0,67	0,47	22,031	5,410	4,079	907,231	511,017	499,063
P19	13,4	1,8	0,77	18,177	3,023	2,927	921,05	403,142	402,371
P20	60,3	0,44	0,06	28,021	8,980	8,002	878,117	379,001	373,149
P21	2,3	0,28	0,05	35,912	0,000	0,000	2282,0	1687,0	1809,0
P22	43,7	0,16	0,01	89,498	41,351	14,547	2710,0	1622,0	2287,0
P23	3,31	0,12	0,03	29,780	27,106	23,576	2651,0	2345,0	22,0
P24	31,8	0,11	0,09	56,986	38,652	34,289	39480,0	1593,0	1764,0
P25	9,2	0,44	0,16	64,726	43,472	59,475	2338,0	203,0	2497,0
P26	0,16	0,1	0,01	33,179	18,015	15,023	993,174	587,036	593,048
P27	4,5	0,04	0,11	23,782	16,132	16,003	981,093	623,115	611,123
P28	72,6	0,21	0,06	39,817	21,379	20,911	1023,143	739,036	697,001
P29	18,7	0,52	0,31	36,071	31,710	27,093	986,024	602,598	601,759
P30	171	40,4	0,08	27,329	20,093	19,998	989,237	512,737	500,048

Azul= NaOCl 2,5%/ Rosa= CLX 2%/ Verde= Soro fisiológico



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Análise microbiológica e estudo de endotoxinas de canais radiculares infectados**", protocolo nº 103/2008, dos pesquisadores Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Ariane Cássia Salustiano Marinho, Frederico Canato Martinho, Letícia Maria Menezes Nóbrega, Thais Mageste Duque e Wanderson Miguel Maia Chiesa, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 16/12/2010.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Microbiological analysis and investigation of endotoxin in infected root canals**", register number 103/2008, of Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Ariane Cássia Salustiano Marinho, Frederico Canato Martinho, Letícia Maria Menezes Nóbrega, Thais Mageste Duque and Wanderson Miguel Maia Chiesa, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 12/16/2010.

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.