



THAIS MAGESTE DUQUE

**“AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO EM
PACIENTES COM DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA ATRAVÉS DA ANÁLISE
MICROBIOLÓGICA POR PCR E QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINAS E
CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS “**

PIRACICABA

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

THAIS MAGESTE DUQUE

**“AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO EM
PACIENTES COM DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA ATRAVÉS DA ANÁLISE
MICROBIOLÓGICA POR PCR E QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINAS E
CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS”**

Orientadora: Prof Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE
DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA, DA
UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRA EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA NA
ÁREA DE ENDODONTIA.

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação defendida pela aluna, Thais
Mageste Duque e orientada pela Profa. Dra.
Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Assinatura da orientadora

PIRACICABA
2013

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

D929a Duque, Thais Mageste, 1984-
Avaliação da influência do tratamento endodôntico em
pacientes com doença periodontal crônica através da análise
microbiológica por PCR e quantificação de endotoxinas e
citocinas pró-inflamatórias / Thais Mageste Duque. -- Piracicaba,
SP : [s.n.], 2013.

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

1. Bactéria. 2. Toxinas. 3. Inflamação. 4. Periodontite. 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: Evaluation of the influence of influence of endodontic
treatment in patients with periodontal chronic disease through microbiological
analysis by PCR quantification of endotoxin and proinflammatory cytokines

Palavras-chave em Inglês:

Bacteria

Toxin

Inflammation

Periodontitis

Área de concentração: Endodontia

Titulação: Mestra em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes [Orientador]

Celso Neiva Campos

Alexandre Augusto Zaia

Data da defesa: 22-02-2013

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 22 de Fevereiro de 2013, considerou a candidata THAIS MAGESTE DUQUE aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "B. Paula Figueiredo de Almeida Gomes".

Prof. Dra. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Celso Neiva Campos".

Prof. Dr. CELSO NEIVA CAMPOS

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Alexandre Augusto Zaia".

Prof. Dr. ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

... aos meus pais lêda e Joaquim, pela compreensão, companheirismo, carinho, amor incondicional e incentivo, Mesmo longe, vocês foram essenciais para a concretização desse sonho!

... aos meus irmãos queridos Guilherme e Raphael. Obrigada pela amizade e carinho, sempre presentes, mesmo distantes.

... aos meus tios, tias, primos e primas por me proporcionarem momentos tão felizes! Todos vocês são muito importantes na minha vida! E foram essenciais para a concretização desse sonho. Fazer parte de uma família como essa e ter o carinho de todos vocês, me fortalece a cada dia! Obrigada!

... em especial ao meu tão querido tio Jorginho e meu querido vovô Norval! Essa vitória eu também devo a vocês! Eternas saudades!

... a um grande exemplo de mulher, minha querida vovó Maria Lúcia, que tenho como um exemplo de garra, coragem, força, dedicação e amor!

Minha família é meu porto seguro! Sem vocês eu não conseguiria!!

Agradeço...

Á Deus, por tudo!! E por sempre iluminar meus passos.

À minha orientadora, Profa. Dra Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, pela orientação, respeito, dedicação, confiança e por ser um exemplo de mulher, de garra e determinação. Obrigada pelos ensinamentos pessoais e profissionais! Obrigada pelo estímulo à pesquisa que se iniciou no estagio e acabou me proporcionando a oportunidade de realizar esse trabalho, de realizar um grande sonho!

Ao Professor e amigo Celso Neiva Campos, pelo exemplo de competência, humildade e sabedoria! E por ser um dos grandes incentivadores e responsáveis pela idealização e realização desse sonho! Suas palavras de conforto e incentivo sempre me deram força! Sou eternamente grata por todo carinho e atenção!

Ao Professor e amigo Josemar Parreira Guimarães, pela oportunidade de conhecer e desvendar o meio científico. E por confiar em mim!

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba FOP-UNICAMP, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Jacks Jorge Jr., à Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia, coordenadora dos Programas 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 Cezar Randi Ferraz, Prof. Dr. Francisco José de Souza-Filho e Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida, assim como à Profa. Dra. Adriana de Jesus Soares, pela atenção e ensinamentos dedicados.

Ao Prof Dr. Caio Cezar Randi Ferraz, Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida e Prof Karina Gonzales Silvério Ruiz, membros da banca examinadora do Exame de Qualificação, pela contribuição a este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo para o mestrado (Processo nº2010/13984-0) e recursos para a realização da pesquisa.

Às funcionárias Ana Cristina Godoy, Daiane Scutton, Geovânia Caldas Almeida e Wanderly Almeida pela amizade e auxílio.

A todos os colegas da área de Endodontia e da Faculdade de Odontologia de Piracicaba: Ana Carolina Caiado, Ana Carolina Mascarenhas, Ana Pimentel, Ariane Marinho, Aniele Lacerda, Carlos Pantoja, Cláudia Suzuki, Cimara Barroso, Daniel Herrera, Danna Moreira, Daniela Myagaghi, Douglas Cecchin, Emmanuel Silva, Ericka Pinheiro, Ezilmara de Sousa, Fernanda Signoretti, Fernanda Lins, Francisco Montagner, Frederico Manhães, Frederico Martinho, Giselle Abi Rached, Helena Rabang, Joelson Brum, Juliana Melo, Karine Nicastro, Letícia Nóbrega, Maira do Prado, Marcos Endo, Marcos Frozoni, Maria Monteiro, Nilton Gomes, Rogério Jacinto, Shaiana Kawagoe, Tiago Rosa, Thaís Accorsi, Thaís Bellato, Thiago Farias, Vanessa Berber e Wanderson Chiesa, pelo convívio compartilhado nesses anos.

Aos alunos e professores da disciplina de Periodontia da FOP-UNICAMP, pelos ensinamentos e pelas várias ajudas durante a realização da pesquisa.

Aos pacientes que colaboraram e possibilitaram a realização da pesquisa.

Ao primo Sérgio pela amizade, convivência, paciência e companhia durante parte desta etapa.

Ao querido Tio Batista por tudo que fez e faz por mim para a minha permanência em Piracicaba. Sou eternamente grata! Sem sua ajuda e carinho nada disso teria acontecido!

A minha grande e eterna amiga Érica, por ser tão querida e especial na minha vida. Obrigada pela amizade e pelas tantas palavras de conforto!

Ao meu grande amigo Jefferson Marion! Você é um presente que Deus me deu! A pós graduação não seria a mesma sem seu companheirismo, respeito e carinho! Tenho uma admiração muito grande por você e agradeço muito por ter sua amizade! Agradeço também pelos momentos agradáveis, sinceros e verdadeiros! Você é uma pessoa ímpar, iluminada e muito querida!

Ao querido Daniel Herrera! Um irmão para mim em Piracicaba! Agradeço todos os momentos agradáveis e amizade verdadeira! Não canso de repetir: você vai fazer muita falta quando voltar para o Peru! Mas tenho certeza que esse amigo estará sempre por perto!

À grande e querida amiga Fernanda Lins! Minha primeira companheira de Piracicaba! Não tenho como deixar de agradecer as broncas! Hoje consigo enxergar e entender a importância que eles tiveram nessa minha caminhada. Infelizmente só uma coisa não

mudou: ainda continuo frágil! Mas agradeço sua amizade. Ela foi o começo de tudo e foi muito especial! Você foi e é uma irmã para mim! Obrigada por tudo!

A querida amiga Maíra! Também fico sem palavras para agradecer a sua amizade e, a oportunidade de mostrar quem eu sou! Obrigada pelo voto de confiança e pela oportunidade de ser madrinha de casamento de uma das minhas amigas de pós graduação! Obrigada pelos conselhos e pelo carinho!

Aos queridos amigos do mestrado Tiago Rosa, Thiago Farias e Aniele Lacerda, pessoas especiais e queridas! Obrigada pelos inesquecíveis momentos juntos, viagens, risadas e amizade. Tenho um carinho imensurável por vocês! Essas amizades também são eternas!

Ao meu amigo Claudio Nóia pela companhia e amizade!

As queridas amigas Juliana Nagata, Nubia Pini e Tereza Pedrosa por todos os momentos sinceros e alegres! Obrigada por tudo sempre!

Ao meus eternos e queridos amigos Rafael Córrea, Glaucia Brito, Andrea Cortes, Tatiana Rodrigues, Talissa Costa e Cristiane Gonçalves pela amizade! Mesmo estando longes, vocês estiveram sempre presentes, me dando apoio e proteção! Obrigada por tudo! O carinho, amizade e admiração que tenho por vocês não tem palavras! Sinto muita falta de todos vocês! Mas aguardem porque a “cuequinha” esta voltando!!!

“No meio da dificuldade, encontra-se a oportunidade”

Albert Einstein

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- LPS - Lipopolissacarídeos
PQM – Preparo químico-mecânico
CMP – Chemical mechanic preparation
Ca(OH)₂ - Hidróxido de Cálcio
CHX - Clorexidina
SS – Solução Salina
MIC – Medicação Intracanal
ICM – Intracanal medication
LAL - Lisado de Amebócito Limulus
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
BPPN – Bacilos produtores de pigmento negro
PCR – Reação em Cadeia de Polimerase
EDTA – ácido diaminotetracético
IL 1 α – Interleucina 1 alfa
IL 1 β – Interleucina 1 beta
TNF α – Fator de necrose tumoral alfa
LTA – Ácido Lipoteicóico
GCF – Fluido Crevicular Gengival

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Radiografias iniciais de pacientes selecionados nesse estudo.....	90
Figura 2	Procedimentos de coleta periodontal. A – Polimento com pedra pomes; B – Coleta inicial da bolsa periodontal de maior profundidade.....	93
Figura 3	Procedimentos de coleta endodôntica. A – Isolamento absoluto após avaliar uma fina camada de dentina; B – Desinfecção do campo operatório: dente e grampo; C – Desinfecção do campo operatório: arco e lençol de borracha.....	95
Figura 4	Procedimentos de coleta após exposição pulpar – A – Exposição pulpar; B – Remoção de todo o teto da câmara pulpar; C – Coleta inicial do canal radicular associado a bolsa periodontal de maior profundidade.....	96
Figura 5	Procedimento após PQM. A – Aspecto dos canais radiculares após instrumentação; B – Aspecto final da coroa do dente após instrumentação, que foi selado com resina composta.....	100
Figura 6	Processamento das amostras pelo método de PCR. A- Estação de trabalho para reações de PCR; B- Termociclador; C-Gel de agarose na cuba; D-Sistema de eletroforese; E-Sistema de imagens para leitura	103

dos géis; F- Imagem dos géis após a corrente para análise; G – Imagem do Gel referente à *Treponema denticola*; H – Imagem do Gel referente à *Parvimonas micra*.....

Figura 7	Processamento de endotoxinas pelo ensaio LAL. A - Kit de endotoxinas composto por água apirogênica, Tampão de reconstituição Pyrogent-5000 LAL, Reagente Pyrogent-5000 LAL e Endotoxina <i>E. coli</i> 055:B5; B - Leitor Biotek (ELX 808, Winooski, VT, EUA); C - Software WinKQCL (Lonza, Walkersville, MD, EUA); D – Resultado da concentração de endotoxinas da bolsa periodontal inicial do paciente 2.....	105
Figura 8	Gráfico da curva-padrão.....	107
Figura 9	Processamento de citocinas. A - Kit para monitoramento de citocinas TNF α ; B – Reagentes do kit; C Biofilmecontendo o anticorpo para a leitura; D - Leitor de Elisa associado ao computador; E - Resultado da curva padrão e do monitoramento de citocinas nas amostras.....	110
Figura 10	Flowchart dos dentes selecionados.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Proporções dos reagentes no Master Mix	101
Tabela 2	Primers específicos a serem analisados	102
Tabela 3	Valores de endotoxinas conhecidos para estabelecimento da curva padrão	106
Tabela 4	Apresentação geral das características dos 15 pacientes que compuseram o estudo.....	114
Tabela 5	Apresentação geral das características iniciais dos 15 pacientes e comparação entre os grupos no baseline.....	115
Tabela 6	Comparação entre os grupos antes e após o tratamento em relação à profundidade de sondagem. Considerados para análise apenas os dentes que não foram extraídos (n=10).....	116
Tabela 7	Apresentação da frequência de presença de bactérias na bolsa periodontal.....	117
Tabela 8	Associação da presença de espécies distintas no interior da bolsa no momento pré tratamento.(n=15).....	118
Tabela 9	Associação da presença de espécies distintas no interior da bolsa no momento após o tratamento endodôntico. (n=15).....	118

Tabela 10	Apresentação da frequência da presença de bactérias no interior do canal.....	119
Tabela 11	Associação da presença de espécies distintas no interior do canal no momento pré tratamento. (n=15).....	120
Tabela 12	Associação da presença de espécies distintas no interior do canal após tratamento endodôntico. (n=15).....	120
Tabela 13	Concentração de endotoxinas presentes na bolsa periodontal antes e após a instrumentação (n=15).....	121
Tabela 14	Comparação entre os grupos em relação à quantidade de endotoxinas no interior da bolsa periodontal antes e após a medicação (=10).....	121
Tabela 15	Concentração de endotoxinas na bolsa periodontal na coleta inicial, após o PQM e após medicação (n=10).....	122
Tabela 16	Concentração de endotoxinas presentes no canal radicular na coleta inicial e após o PQM (n=15).....	123
Tabela 17	Comparação entre os grupos antes e após o tratamento em relação à quantidade de endotoxinas no interior do canal. (n=10).....	123
Tabela 18	Concentração de endotoxinas no canal radicular na coleta inicial, após o PQM e após medicação	124
Tabela 19	Média da concentração de citocinas (pg / ml) nas bolsas iniciais e canais radiculares, assim como a significância estatística.....	125
Tabela 20	Valores da concentração de citocinas (pg / ml) nas bolsas periodontais iniciais dos pacientes do grupo1 (Ca (OH) ₂ +	126

CHX).....

Tabela 21	Valores da concentração de citocinas (pg / ml) nos canais radiculares iniciais dos pacientes do grupo1 (Ca (OH) ₂ + CHX).	126
Tabela 22	Valores da concentração de citocinas (pg / ml) nas bolsas periodontais iniciais dos pacientes do grupos 3.(Ca(OH) ₂ + SS).....	127
Tabela 23	Valores da concentração de citocinas (pg / ml) nos canais radiculares dos pacientes do grupos 3.(Ca(OH) ₂ + SS).....	128

RESUMO

A doença periodontal crônica atinge as estruturas de suporte dos dentes e é uma das causas mais importantes da perda dos dentes em adultos. Essa doença de longa duração que não regride com a terapia, já pode ter causado uma alteração irreversível na polpa, mesmo quando clinicamente, responde de forma positiva aos testes de sensibilidade pulpar. Os lipopolissacarídeos (LPS) presente nas paredes das bactérias Gram negativas e citocinas pró inflamatórias funcionam como fatores estimulantes para a resposta imune, causando destruição óssea e exacerbando o processo inflamatório. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do tratamento endodôntico em pacientes com doença periodontal crônica, através da análise microbiológica por pcr, quantificação de endotoxinas e monitoramento de citocinas pró inflamatórias em bolsas periodontais e canais radiculares. Foram selecionados 15 dentes com envolvimento periodontal crônico e sensibilidade pulpar positiva. Após o preparo químico mecânico (PQM), os dentes foram divididos em três grupos: G1- sessão única (n=5); GII - Ca(OH)₂ associado à clorexidina gel 2% (CHX-gel) (n=5); GIII - Ca(OH)₂ + Solução salina (SS). Amostras foram coletadas em três diferentes momentos da terapia endodôntica: inicial, após PQM e após medicação intracanal (MIC) por 30 dias, através de cones de papéis apirogênicos/estéreis. Os microrganismos foram identificados através da técnica molecular do PCR simples (16S rDNA) com o uso de *primers* específicos para *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermédia*, complexo vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*), *Gemella morbillorum* e *Parvimonas micra*. Para quantificação de endotoxina foi realizado o teste Lisado de Amebócito Limulus (LAL) e, para a quantificação de citocinas IL1 α , IL1 β , TNF α e PGE₂, foi utilizado o ensaio imunoenzimático ELISA. Os resultados mostraram que após 1 ano, dos 15 dentes tratados, 5 foram extraídos. Os outros 10 dentes apresentaram melhora no quadro clínico relacionada à profundidade de sondagem e mobilidade. Nas bolsas periodontais iniciais, pelo menos um dos microrganismos do complexo vermelho estiveram presentes em 12/15 amostras e os 3 juntos estiveram presentes em 6/15. Amostras do canal inicial mostraram a presença de *Parvimonas micra* e *Fusobacterium nucleatum* detectadas em 80% dos casos. Não houve associação entre as bactérias encontradas inicialmente nas bolsas e nos canais

radiculares. Após o PQM e uso de MIC por 30 dias, houve redução do conteúdo microbiano em ambos os sítios. A concentração de endotoxinas nas bolsas periodontais iniciais foram altas (192,81 EU/mL), mas após o PQM, uma redução (19,65 EU/mL) significativamente estatística foi observada. Os canais radiculares apresentaram concentrações de endotoxinas quase nulas (0,1 EU/mL), sendo compatível com o estado pulpar e assim se manteve durante as outras coletas. Avaliando as medicações testadas, a redução de LPS nas bolsas apresentou melhores resultados com o uso do Ca(OH)_2 associado a solução salina ($p < 0,05$). Houve redução de todas as citocinas pró inflamatórias, quando comparadas às coletas iniciais e após o uso da medicação das bolsas e dos canais, sendo esta estatisticamente significativa em relação a $\text{IL1}\beta$ e $\text{TNF}\alpha$. Não houve correlação positiva entre citocinas e endotoxinas nas bolsas periodontais. Conclui-se que o complexo vermelho está presente na doença periodontal e que a presença de uma medicação intracanal diminui a concentração do LPS e de citocinas inflamatórias nos canais radiculares e bolsas periodontais.

Palavras-chave: Perda de inserção, sensibilidade pulpar, PCR, endotoxinas.

ABSTRACT

The chronic periodontal disease affects the supporting structures of the teeth and is a major cause of tooth loss in adults. This long-term illness that does not regress with therapy, may have already caused an irreversible change in the pulp, even when clinically responds to pulp sensitivity tests. The lipopolysaccharide (LPS) present in the walls of gram negative bacteria and inflammatory cytokines act as factors for stimulating the immune response, causing bone destruction and increasing inflammation. The objective of this study was to evaluate the influence of endodontic treatment in patients with chronic periodontitis using microbiological analysis by pcr, endotoxin quantification and monitoring of inflammatory cytokines in periodontal pockets and root canals. Samples were taken from 15 teeth with chronic periodontal involvement and positive pulp sensitivity were selected. After chemical mechanical preparation (MCP), the teeth were divided into three groups: G1- one visit (n = 5), GII - Ca(OH)₂ associated with chlorhexidine gel 2% (CHX-gel) (n = 5) ; GIII - Ca(OH)₂ + saline solution (SS). Samples were collected at three different times in endodontic therapy: initial, after MCP and after intracanal medication (ICM) for 30 days, through paper cones apirogênicos / sterile. The microorganisms were identified by PCR simple molecular technique (16S rDNA) by using specific primers for *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, red complex (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*), and *Parvimonas micras*. For quantification of endotoxin was performed the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test and for the quantification of cytokines IL-1 α, IL-1 β, TNF α and PGE2 was used ELISA immunoenzymatic assay. The results showed that after 1 year, 15 of the treated teeth, 5 were extracted. The other 10 teeth showed improvement related to probing depth and mobility. In the initial periodontal pockets, at least one of the microorganisms of the red complex were present in 12/15 samples and 3 together were present in 6/15. Canals samples showed the presence of *Parvimonas micra* and *Fusobacterium nucleatum* detected in 80% of cases. There was no association between the bacteria found in the pockets and root canals. After the CMP and use of ICM for 30 days, there was reduction of microbial content in both places. The initial endotoxin concentration in periodontal pockets were high (192.81 EU / ml), but after the CMP the reduction (19.65 EU / ml) was statistically significantly observed. Root canals showed

low concentrations of endotoxin (0.1 EU / mL), being compatible with state of the pulp and maintained for other samples. According to the tested medications, reduction of LPS in the pockets showed better results with the use of Ca(OH)_2 associated to saline solution ($p < 0.05$). There was a reduction of all inflammatory cytokines when compared to the initial samples and after use of the dressing in pockets and canals, being statistically significant in relation to $\text{IL1}\beta$ and $\text{TNF}\alpha$. There was no positive correlation between endotoxin and cytokines in periodontal pockets. In conclusion the red complex is present in the periodontal disease and that the presence of dressing decreases the concentration of inflammatory cytokines and LPS in root canals and periodontal pockets.

Key words: Insertion loss, pulp sensibility, PCR, endotoxins.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	7
	2.1. Relações anatômicas entre a polpa e o periodonto.....	7
	2.1.1. Canais laterais, secundários e acessórios.....	8
	2.1.2. Túbulos dentinário.....	13
	2.1.2.1. Permeabilidade dentinária.....	15
	2.1.3. Forame apical.....	16
	2.2. Outras vias de comunicação entre polpa e periodonto.....	16
	2.3. Microcirculação pulpar.....	17
	2.4. Relações biológicas entre a polpa e o periodonto.....	19
	2.4.1. Efeito da doença Pulpar no Periodonto.....	19
	2.4.1.1. Pulpite.....	20
	2.4.1.2. Necrose.....	22
	2.4.2. Efeito da doença Periodontal na Polpa.....	24
	2.4.2.1. Efeito do Tratamento Periodontal sobre a Polpa.....	31
	2.5. Classificação das lesões endodônticas-periodontais.....	34
	2.5.1. Características clínicas para classificar as lesões endodônticas-periodontais.....	40
	2.6. Microbiologia Oral.....	43
	2.6.1. Microbiologia da Polpa vital.....	45
	2.6.2. Microbiologia Endodôntica.....	46
	2.6.3. Microbiologia Periodontal.....	49
	2.6.4. Microbiologia Endodôntica-periodontal.....	55

2.7. Endotoxinas.....	58
2.8. Citocinas pró-inflamatórias.....	65
2.9. Preparo químico-mecânico e uso de medicação Intracanal na redução de microrganismos.....	69
3. PROPOSIÇÃO.....	87
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	89
4.1. Seleção dos pacientes.....	89
4.2. Aspectos clínicos e radiográficos.....	90
4.3. Procedimentos Clínicos e Coleta das Amostras.....	91
4.3.1. Procedimento clínicos para coleta das bolsas periodontais (CP1).....	92
4.3.2. Procedimento clínicos para coleta dos canais radiculares (CE1).....	93
4.3.3. Preparo dos canais radiculares e coletas após o preparo químico-mecânico (CE2 e CP2).....	97
4.3.4. Coleta após medicação intracanal (CP3 e CE3).....	98
4.4. Análise por PCR.....	101
4.5. Quantificação de Endotoxinas.....	104
4.6. Monitoramento de citocinas pró inflamatórias IL1 α , IL1 β , TNF α e PGE2.....	109
ANÁLISE ESTADÍSTICA.....	112
5. RESULTADOS.....	113
5.1. Características Clínicas.....	113
5.2. PCR.....	116
5.3. Quantificação de Endotoxinas.....	120
5.4. Monitoramento de Citocinas.....	124
6. DISCUSSÃO.....	129
7. CONCLUSÃO.....	147
REFERÊNCIAS.....	149

ANEXO 1.....	169
ANEXO 2.....	170
APÊNDICE 1.....	177
APÊNDICE 2.....	180
APÊNDICE 3.....	182
APÊNDICE 4.....	183
APÊNDICE 5.....	187
APÊNDICE 6.....	188
APÊNDICE 7.....	193
APÊNDICE 8.....	197
APÊNDICE 9.....	201

1. INTRODUÇÃO

A polpa e o periodonto são duas estruturas anatomicamente distintas, porém inter-relacionadas funcionalmente (Chilton, 1972). Essa possível inter-relação tem início na odontogênese, quando há a formação do germe dentário. O tecido pulpar e o tecido periodontal periapical e o marginal são embriologicamente semelhantes e apresentam formação concomitante (Chacker, 1974; Christie & Holthuis, 1990).

Anatomicamente existem 3 vias de comunicação entre o espaço pulpar e o periodonto: forame apical, canais laterais e os túbulos dentinários (Gomes *et al.*, 1996b; Simon & Werksman, 1997; Walton & Torabinejad, 1997; Lindhe, 1999). Isso explica a influência que um tecido tem sobre o outro.

Dentre elas, o forame apical é a maior e a mais importante via de comunicação com o periodonto, com passagem de vasos e nervos do meio externo para o interior do dente, permitindo a manutenção do tecido pulpar e a neo-formação dentinária. Permite também uma via de acesso direto entre sítio infectado e não infectado (Lindhe, 1999)

Segundo Langeland *et al.* (1974) e Borba *et. al.* (2002), a polpa só é atingida pela doença periodontal quando esta alcança o forame apical principal, e compromete o periodonto de inserção (Cardon *et al.*, 2007), sendo a vitalidade pulpar alterada com a cronicidade da doença.

O canal lateral é uma das mais aceitas vias de comunicação. Segundo Kipioti *et al.* (1984), não necessitamos de tanta imaginação para entender como é fácil um processo infeccioso se espalhar de fora para dentro, disseminando bactérias e envolvendo a polpa rapidamente, principalmente em dentes que apresentam canais laterais. Eles relatam que a doença periodontal pode causar danos na polpa, dependendo da severidade da doença periodontal, presença de canais laterais e histórico de terapia periodontal.

Canais laterais adjacentes a lesões periodontais podem transportar substâncias tóxicas para dentro da polpa, sendo suficientes para induzir alterações patológicas como calcificações e inflamações pulpares. (Kirkham, 1975)

Os túbulos dentinários podem favorecer a comunicação entre um tecido e outro, em casos de defeitos de desenvolvimento do cimento, reabsorções radiculares, desorganização do cimento radicular na presença de bolsas periodontais e após procedimentos de raspagem (Gutmann, 1978; Belk & Gutmann, 1990; Bergenholtz & Hasselgren, 1999; De Deus, 1992).

Os túbulos dentinários podem estar diretamente expostos à cavidade oral quando na presença da doença periodontal, havendo uma desorganização do cimento radicular na presença de bolsas periodontais, ou ainda nos procedimentos mecânicos do tratamento periodontal (raspagem, alisamento e polimento), no qual camadas de cimento, que funcionam como camadas impermeáveis protetora sobre a dentina, são removidas constantemente e com isso, fluidos orais podem penetrar no interior dos túbulos e até mesmo atingir a polpa dental causando inflamação (Walton & Torabinejad 1997).

Alterações inflamatórias presentes no tecido pulpar podem afetar o tecido periodontal e vice versa, pois essas vias facilitam o trânsito de bactérias entre um tecido e outro. (Kobayashi *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1997).

A literatura é unânime em confirmar a capacidade da doença pulpar iniciar e perpetuar uma doença periodontal. No entanto, a contaminação dos tecidos periodontais, em uma situação de inflamação, podendo levar a alterações pulpares, interferindo na resposta e sensibilidade do órgão pulpar é um assunto bastante questionado na literatura. O tratamento periodontal pode trazer sintomas clínicos de origem pulpar devido à exposição dos túbulos dentinários, causando inflamação, pulpite e necrose pulpar. (Solomon *et al.*, 1995; Walton & Torabinejad, 1997; Bergenholtz & Hasselgren, 1999; Petka, 2000; Wang & Glickman, 2002; Cardon, 2007).

Embora mais de 600 espécies bacterianas diferentes já tenham sido detectadas na cavidade oral, o número de espécies presentes em um canal radicular infectado é

muito restrito, limitando-se a, em média, quatro a sete espécies e levando a afirmações de que a microbiota endodôntica seria menos complexa do que a periodontal (Meng 1999). A maioria das infecções endodônticas é mista e polimicrobiana, com predomínio de microrganismos anaeróbios estritos. Até o momento não foi possível definir o papel de um microrganismo específico na patogênese das alterações pulpo-perirradiculares, e, principalmente, de seus fatores de virulência. Os microrganismos mais freqüentemente isolados de canais radiculares infectados são os anaeróbios estritos, sendo os principais: bactérias dos gêneros *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Veillonella* e *Capnocytophaga* e os facultativos *Streptococcus* e as espécies relacionadas tais como as dos gêneros *Enterococcus* e *Gemella*. (Gomes *et al.*, 1994; Siqueira Jr *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2009)

A periodontite crônica atinge as estruturas de suporte dos dentes e é uma das causas mais significativas de perda dos dentes em adultos. É uma doença comum, presente na cavidade oral e caracterizada pelo dano periodontal generalizado e presença de infiltrado inflamatório crônico (Armitage, 2010).

A doença periodontal está relacionada principalmente ao acúmulo constante do biofilme, sendo a sua progressão relacionada aos patógenos que colonizam o sítio subgingival, pelas respostas inflamatórias e imunológicas do hospedeiro (Armitage, 2010), susceptibilidade do hospedeiro (Deas & Mealey, 2010) e tempo (Aguilar 1999). Há evidência de que esse acúmulo de biofilme bacteriano teria o potencial de provocar mudanças patológicas na polpa (Langeland *et al.*, 1974) .

Mais de 300 espécies bacterianas podem ser cultivadas a partir das bolsas periodontais de diferentes indivíduos e, 30 a 100 espécies podem ser isoladas a partir de um sítio único. No entanto, muitas dessas espécies são difíceis ou impossíveis de serem cultivadas e identificadas. As infecções em bolsas periodontais são infecções mistas e, é difícil avaliar o papel do sinergismo entre as espécies nessa patologia. Dentre os patógenos mais frequentemente identificados na doença periodontal, destacamos *Actinobacillus actinomycetemcomitans* que é uma bactéria Gram-negativa, muito frequente na periodontite agressiva localizada, sendo uma das mais fortes

bactérias associadas ao caráter destrutivo da doença periodontal. Elas apresentam como fatores de virulência, a leucotoxina que é um metabólito tóxico e, apresentam a capacidade de invadir células epiteliais humanas gengivais *in vitro*. *Porphyromonas gingivalis* é o segundo patógeno periodontal mais estudado. São bactérias anaeróbias Gram negativas que fazem parte do grupo dos BPPN (bacilos produtores de pigmentos negros), sendo fundamentais em infecções experimentais mistas, principalmente por produzirem um grande número de fatores de virulência. Essa espécie não é comum na saúde periodontal ou na gengivite, mas é frequentemente detectada em formas destrutivas de doença periodontal. *Prevotella intermedia* é o segundo BPPN mais investigado. Ela se apresenta em níveis elevados em formas agudas de gengivite ulcerativa necrosante e periodontite e, parece apresentar um maior número de fatores de virulência, quando na presença de *Porphyromonas gingivallis*. *Fusobacterium nucleatum* é uma bactéria anaeróbica Gram-negativa, sendo a espécie mais comum presente em placas subgengivais e sítios periodontais ativos ou inativos. *Parvimonas micra* é uma bactéria anaeróbica Gram-positiva associada a infecções anaeróbias mistas na cavidade bucal e, recentemente relacionada a doenças periodontais destrutivas. Tem sido detectada com maior frequência e em maior número, nos locais de destruição periodontal, quando comparados com sítios de gengivite ou sítios saudáveis. *Treponema denticola*, uma bactéria Gram negativa muito comum em sítios periodontalmente comprometidos quando comparados a sítios saudáveis. (Haffajee & Socransky, 1994)

Ainda, estudos histológicos suportam os indícios de que lesões periodontais produzem um efeito degenerativo na polpa dental dos dentes envolvidos. (Seltzer *et al.*, 1963) Os efeitos mais comuns das lesões periodontais na polpa são atrofia, infiltrado inflamatório crônico e reabsorção radicular.

Endotoxinas, constituinte da parede celular das bactérias Gram-negativas, apresentam um importante papel na destruição periodontal (Petsch & Anspach 2000; Kobayashi 1990) e na reabsorção óssea (Miller, 1894). Elas são capazes de estimular diferentes linhagens celulares, incluindo macrófagos e células envolvidas na reabsorção óssea (Martinho *et al.*, 2010).

As citocinas IL1- β , TNF- α estão relacionadas com a resposta imune do hospedeiro frente às doenças periodontais e na destruição óssea. Dentre suas atividades, elas caracterizam a severidade da doença periodontal, medem a atividade desta doença e promovem a quimiotaxia de neutrófilos e sua ativação, cronificando cada vez mais a patologia presente (Goutoudi *et al*, 2004).

Segundo Solomon *et al.* (1995), após a instrumentação completa do canal radicular, o hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂] deve ser usado como medicação intracanal (MIC) por ser bactericida, anti-inflamatório e proteolítico. Ele também inibe a reabsorção e favorece a reparação e neutralização de endotoxinas. É especialmente eficaz nos casos de relações endodônticas e periodontais porque inibe a contaminação através das possíveis vias de comunicação.

Estudos *in vitro* demonstram atividade antimicrobiana de medicações intracanaís na superfície externa de dentes que apresentam ou não cimento. Sendo assim, essa possível difusão da medicação de Ca(OH)₂ com clorexidina (CHX) gel 2% pelos túbulos dentinários ocorre pela dissociação dos íons OH⁻ e Ca⁺ e pode favorecer o tratamento periodontal (Gomes *et al.*, 2009).

Os problemas de natureza endodôntica ou periodontal têm sido tratados em especialidades separadas, mesmo ocorrendo concomitantemente lesões de origem endodôntica ou periodontal no mesmo dente, o que orienta a necessidade de endodontistas e periodontistas conduzirem procedimentos terapêuticos que permitam a resolução dos dois problemas e a manutenção do dente afetado em equilíbrio no arco dental (Toledo *et al.*, 2001)

Não há estudos *in vivo*, na literatura, que avaliaram o efeito da terapia endodôntica em dentes diagnosticados com periodontite crônica e polpas vitais, bem como estudos que relacionem a microbiota de canais radiculares e bolsas periodontais de dentes com destruição periodontal severa.

Dessa forma, o presente estudo tem por objetivo detectar a presença de microrganismos específicos, quantificar endotoxinas e citocinas pró-inflamatórias IL1- α , IL1- β , TNF- α e PGE2 em canais radiculares e bolsas periodontais de dentes com perda

óssea avançada e polpas vitais, avaliando os fatores clínicos, microbiológicos e imuno-inflamatórios. Além disso, visa avaliar o impacto do tratamento endodôntico como tratamento complementar a terapia periodontal em dentes diagnosticados com periodontite crônica e vitalidade pulpar e avaliar a influência da presença da bolsa periodontal sobre as alterações pulpares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RELAÇÕES ANATÔMICAS ENTRE A POLPA E O PERIODONTO

A intimidade entre os tecidos pulpar e periodontal é hoje um fato consolidado, se inserindo em um contexto mais amplo de estreita relação entre o dente e seus tecidos de suporte (Seltzer & Bender, 1963; Seltzer & Bender, 1967; Anele *et al.*, 2010).

É a partir da odontogênese, na formação do germe dentário, que começamos a entender a relação entre a polpa e o periodonto. O tecido pulpar e o tecido periodontal (periapical e marginal) são embriologicamente semelhantes e apresentam desenvolvimento simultâneo, o que explica a influência que um tecido pode ter sobre o outro (Chacker, 1974; Christie & Holthuis, 1990).

Durante o desenvolvimento dentário, a área de tecido mesenquimal é dividida por elementos epiteliais em: folículo dentário, que formará as estruturas periodontais de suporte (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar); e papila dentária que formará o complexo dentina-polpa. (Fachin *et al.*, 2001)

A ampla comunicação entre estas duas estruturas, observada já no início da odontogênese, diminui à medida que a raiz e os tecidos de suporte se formam, configurando, desta forma, na formação do ápice radicular (Cunha *et al.*, 2005)

Diversos possíveis caminhos entre a polpa e o periodonto têm sido sugeridos. Esses incluem caminhos neurais, canais laterais (acessórios), túbulos dentinários, ramificações dos canais principais, forame apical e caminhos comuns de drenagem vasculolinfática (Harrington, 1979, Carranza, 1986)

Na presença de alterações inflamatórias no tecido pulpar ou periodontal, um pode afetar o outro, pois o trânsito de bactérias é facilitado por essas vias (Kobayashi *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1997, Leonardo & Leal, 1998).

Essas possíveis vias de comunicação podem funcionar como caminhos potenciais para a reciprocidade inflamatória e infecciosa entre essas duas estruturas.

As comunicações mais bem conhecidas e sugeridas são os canais laterais, túbulos dentinários e forame apical (Harrington, 1979, Gomes *et al* 1996a).

As possíveis sequelas e as relações entre as interações pulpares e periodontais não são assuntos novos na literatura, embora interesses nessa área têm aparecido nas últimas décadas (Kirkham, 1975).

2.1.1 Canais Laterais, Secundários e Acessórios

Anatomicamente, os canais laterais e secundários saem do canal radicular principal para a superfície externa da raiz. No entanto, eles são encontrados nos terços coronário e apical, respectivamente. Os canais acessórios saem dos canais secundários em direção a superfície externa da raiz. Eles se diferem apenas na localização da superfície dentária. (Siqueira & Lopes, 1999)

Os canais laterais podem aparecer durante a formação radicular dos dentes e podem ter duas origens. Uma delas é a partir da fragmentação da bainha epitelial de Hertwig antes da formação dentinária; a outra forma é através da proliferação e projeção apical da bainha epitelial de Hertwig que pode ser interrompida por grandes vasos sanguíneos ou nervos que passam através dos tecidos mesodérmicos, e ficam aprisionados na estrutura radicular. (Seltzer & Bender 1967; Seltzer & Bender, 1984, Anele 2010, Ruccuci 2010).

Essa teoria também é aceita por Weinmann (1996) que afirma que "o desenvolvimento dos canais laterais ocorre pelo defeito presente na bainha epitelial de Hertwig, devido à presença de vasos sanguíneos e nervos". A interrupção da continuidade da bainha antes da diferenciação odontoblastica e formação dentinária, forma esse defeito na parede dentinária.

Esse tipo de comunicação também pode ser encontrado no assoalho da câmara pulpar de dentes multirradiculares, sendo conhecido por canal cavo interradicular. É um

canal que também pode levar inflamação ou infecção em ambas as direções (Bender & Seltzer, 1972; Weine, 1984)

Os canais laterais promovem uma comunicação direta do ligamento periodontal com a polpa. Eles contêm células pulpares, substância fundamental amorfa, fibras capilares, tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos que conectam o sistema circulatório da polpa com o do ligamento periodontal. Dessa forma, promovem um caminho pelo qual as bactérias e suas toxinas possam se deslocar e causar degradação tecidual (Seltzer & Bender 1963; Santiago & Fonseca, 1983, Anele 2010). Porém, canais laterais são demonstrados com menos frequência do que realmente existem (Weine, 1989).

De Deus (1975) realizou um estudo com 1.140 dentes humanos extraídos pela técnica de diafanização com infiltração de tinta nanquim. O objetivo foi de verificar localização e direção dos canais acessórios, secundários e laterais em diferentes níveis da raiz. Os resultados demonstraram que 27,4% dos dentes apresentaram algum tipo de ramificação, sendo localizado em maior frequência na região apical (17%) e na região de bifurcação e trifurcação de pré-molares e molares. O terço apical apresenta uma frequência de 8,8% de canais laterais e, o terço coronário 1,6%. O autor afirma que ramificações podem ser observadas em qualquer lugar ao longo do comprimento da raiz, mas ocorrem mais frequentemente na porção apical e em dentes posteriores.

Dados semelhantes foram encontrados por Hess (1925), que avaliou a presença de canais laterais em 2790 dentes e concluíram que todos os grupos de dentes apresentam esse tipo de estrutura. Harrington & Steiner (2002) mostraram que 30% a 40% dos dentes apresentam canais laterais e acessórios, sendo a maior parte também encontrada no terço apical.

Perlich & Foreman (1981) analisaram a região de assoalho de 62 molares, dos quais 64% apresentaram canais acessórios na região de furca, com diâmetro de de 7 a 34 μm . Apesar do diâmetro reduzido, podem permitir a troca de produtos tóxicos entre os tecidos quando o dente estiver envolvido por uma patologia.

Gorstein (1983) mostrou que mais de 46% dos molares apresentam canais na região de furca que podem permitir a passagem de microrganismos, toxinas e outros produtos irritantes, causando complicações em ambas estruturas.

Vertucci (1984) realizou diafanização de 2400 dentes para estudar a anatomia interna do sistema de canais radiculares. Foi encontrada uma frequência 23% de canais acessórios na região de furca nos primeiros molares e 11% nos segundos molares. Segundo o autor, os canais acessórios são importante na etiologia de lesões endoperiodontais, permitindo a troca de produtos tóxicos entre periodonto e polpa e vice-versa.

Por meio da microscopia eletrônica de varredura, Dammaschke *et al.* (2004) realizaram um estudo avaliando prevalência, localização e tamanho de canais acessórios em 100 molares permanentes. Como resultado foi encontrado que 79% dos dentes possuíam canal acessório. Os diâmetros variaram de 10 a 200 μm e 63% dos canais acessórios foram encontrados em região de furca.

Muitas considerações existem a respeito do principal papel dos canais laterais e acessórios em desempenhar a propagação de inflamação da bolsa periodontal para a polpa ou da polpa em direção ao ligamento periodontal (Harrington, 1979).

Como a doença periodontal se inicia no nível da crista óssea alveolar, progredindo apicalmente, é importante o conhecimento dessa incidência de canais laterais em todos os terços do dente. Excluindo as áreas de furca dos dentes multirradiculares, estudos indicam que canais laterais no terço coronário são extremamente raro, ocorrendo mais no terço médio e com uma maior frequência no terço apical. Dessa forma, quanto maior a extensão e destruição periodontal, mais canais poderão ser envolvidos pelos processos inflamatórios e, conseqüentemente, maiores danos ao tecido pulpar (Harrington, 1979).

Seltzer & Bender (1963) enfatizaram a intercomunicação entre o tecido pulpar e o periodontal. Eles avaliaram as mudanças em ambos os tecidos, após induzir pulpíte em cães mestiços e macacos Rhesus. Dessa forma, analisaram, por meio de microscopia ótica, o estado pulpar de 85 dentes extraídos por doença periodontal. Eles

demonstraram que a necrose pulpar causava alterações na furca de molares e que a doença periodontal na furca levava a alterações pulpares quando um canal acessório estivesse presente nessa região. Eles concluíram que lesões periodontais podem produzir efeitos degenerativos no tecido pulpar, mas não o suficiente para causar necrose pulpar.

Sallum *et al.* (1963) estudaram 73 mandíbulas de ratos fêmeas, que tiveram uma indução à periodontite experimental durante 29 dias. Após esse período, os animais foram sacrificados, as mandíbulas seccionadas e as lâminas coradas com hematoxilina e eosina para observação da presença de canais acessórios e dos aspectos histomorfológicos do periodonto e polpa. Encontraram que 30,5% das amostras apresentavam canais acessórios e estes, quando comunicados com uma área de bifurcação acometida pela periodontite, apresentavam-se com diversos graus de comprometimento pulpar, desde leve até intenso infiltrado inflamatório, o qual freqüentemente invadia a polpa por extensões variadas.

Embora Mazur & Massler (1964) e Czarnecki & Schilder (1979) não tenham encontrado relação entre a doença pulpar e o estado periodontal, estudos mostram que nos locais onde a bolsa periodontal fica exposta a canais acessórios na parte coronária da raiz ou na região de furca, zonas de inflamação pulpar ou necrose podem ocorrer (Seltzer & Bender, 1963; Rubach & Mitchell, 1965; Langeland *et al.*, 1974, Cunha *et al.*, 2005).

Esses achados corroboram com Rubach & Mitchell (1965). Eles estudaram histologicamente 74 dentes humanos com vários graus de doença periodontal, dos quais 45% (33 dentes) apresentavam canais laterais. A localização mais frequente foi no terço apical e, em muitos casos, estavam totalmente cobertos por cimento. Eles também mostraram 5 casos nos quais pulpites foram induzidas pela doença periodontal através de canais laterais. Os autores concluíram que a inflamação periodontal envolvendo canal acessório ou forame apical pode provocar pulpite ou necrose pulpar.

Langeland *et al.* (1974) avaliando 60 dentes com doença periodontal, concluíram que canais acessórios em região de furca auxiliam na troca de produtos tóxicos entre o canal radicular e o periodonto, porém a desintegração da polpa, a partir da doença

periodontal, só ocorrerá quando o forame apical estiver totalmente coberto por biofilme bacteriano.

Kirkham (1975) investigou a incidência de canais laterais em bolsas periodontais de pacientes com doença periodontal severa. Foram avaliados 100 dentes humanos permanentes extraídos por doença periodontal. O objetivo foi determinar a porcentagem de canais acessórios localizados dentro dos defeitos periodontais. Após a extração, a polpa foi removida e os canais preenchidos com solução radiopaca para posterior análise radiográfica. Dos 100 dentes avaliados, 23 (23%) apresentaram um ou dois canais laterais. Em 2 dos 100 dentes, o canal acessório foi localizado dentro do defeito periodontal. Desses 2 dentes, um era um 1° pré molar superior vital com o canal localizado no terço coronário da raiz e perda óssea vertical generalizada. O outro era um 2° molar inferior com o canal localizado no terço médio da raiz distal e perda óssea vertical na raiz distal. O dente respondeu ao teste de vitalidade, mas a resposta foi atribuída a algumas fibras nervosas viáveis presentes na raiz mesial.

Assim, canais laterais e ramificações apicais compreendem possíveis caminhos através dos quais as bactérias e/ou seus produtos podem transitar do canal radicular para bolsas periodontais e vice versa. Eles são, indiscutivelmente, de difícil acesso, limpeza e desinfecção durante o tratamento. Seu possível significado clínico há muito tempo chamou a atenção de clínicos e pesquisadores a respeito de como essas ramificações devem ser tratadas e qual o destino do tecido presente nele após o tratamento.

Ruccuci (2010) analisou o estado histopatológico e histobacteriológico dos tecidos presentes em canais laterais e ramificações apicais em diversas condições clínicas, bem como na resposta ao tratamento endodôntico. Seus resultados mostram que em dentes não tratados, as condições do tecido dentro dos canais laterais e ramificações apicais refletem as condições da polpa do canal principal. Em relação aos dentes tratados, observaram que o tecido dentro das ramificações permanece relativamente pouco afetado por instrumentos e irrigantes após o preparo químico-mecânico (PQM), independentemente das condições pulpares iniciais. Materiais obturadores que foram forçados em canais laterais, em casos de polpa vital, apresentaram danos aos tecidos e inflamação. Mesmo que, radiograficamente, o

material obturador apareça nos canais laterais e ramificações apicais, isso não indica que a ramificação foi selada ou desinfetada. Concluíram que, como bactérias localizadas em grandes ramificações podem causar ou manter uma doença, outras estratégias devem ser avaliadas com o objetivo de desinfetar essas regiões e melhorar o resultado do tratamento.

2.1.2 Túbulos Dentinários

Os túbulos dentinários também têm sido sugeridos como um caminho entre o periodonto e o tecido pulpar, pois atravessam toda a espessura da dentina. Eles são constituídos por prolongamentos odontoblásticos, fluido tecidual e fibras nervosas que se estendem da interface polpa-dentina à junção esmalte-dentina ou junção dentina-cimento. Essa comunicação é favorecida especialmente, quando na ausência de esmalte ou cimento (Walton & Torabinejad, 1997).

O cimento pode ser permeável em inúmeras condições: em dentes jovens; defeitos cementários; mineralização do cimento; ou reabsorções. Além disso, os túbulos dentinários podem estar expostos em anomalias de desenvolvimento tais como sulcos linguais e projeções de esmalte (Carranza, 1984; Linde *et al.*, 1999; Belk & Gutmann, 1990; Anele *et al.*, 2010).

O diâmetro dos túbulos dentinários é inteiramente compatível com o da maior parte das bactérias encontradas na cavidade oral (Gomes, 2002b). Os microrganismos capazes de colonizar os canais radiculares possuem tamanho aproximado de 1/3 do diâmetro dos túbulos dentinários. Assim, eles podem servir de reservatório bacteriano para a indução de alterações pulpo-periapicais (Adriaens *et al.*, 1988)

No entanto, se este fosse o único fator envolvido na invasão bacteriana, seria apropriado afirmar que quando a dentina é exposta, bactérias teriam livre acesso a polpa e vice versa. Mas, as bactérias só irão se multiplicar em ambientes que ofereçam

condições favoráveis ao seu crescimento como tensão de oxigênio, nutrientes, possíveis interações bacterianas e defesa do hospedeiro (Gomes *et al.*, 1996 a).

Puapichartdumrong *et al.* (2005) relataram que em dentes com polpas vitais, o prolongamento odontoblástico, as fibras colágenas e o fluido dentinário presente nos túbulos dentinários atuam como uma barreira física importante e capaz de dificultar a invasão bacteriana.

Quando a superfície do dente é exposta à doença periodontal, uma comunicação direta dos túbulos dentinários com o processo inflamatório/infeccioso pode ser estabelecido, principalmente na ausência de cimento (Nagaoka *et al.* 1995).

Estudos experimentais demonstram que material solúvel do biofilme bacteriano, quando aplicado à dentina, pode causar inflamação pulpar devido à comunicação entre a polpa e o periodonto, que é favorecida pela presença dos túbulos dentinários. (Bergenholtz *et al.*, 1978).

Tem sido afirmado que existe aproximadamente 15.000 tubulos dentinarios por milímetro quadrado na superfície radicular externa, na junção cimento esmalte. Dessa forma, fica fácil entender que quando esses túbulos se tornam expostos a bactérias e seus subprodutos em uma situação de doença periodontal, uma resposta pulpar pode ocorrer. A natureza da resposta pulpar vai depender da severidade da doença periodontal presente e pode variar desde a destruição de dentina até pulpites e necrose pulpar. A incidência dessas duas ultimas não é conhecida, mas experiências clínicas indicam que elas ocorrem em uma porcentagem relativamente pequena (Harrington, 1979).

Estudos ressaltam que a ocorrência de reabsorção cementária é um achado frequente em dentes acometidos por doença periodontal. Dessa forma, o diâmetro dos túbulos dentinários, seu trajeto e extensão, presença e frequência de canais acessórios, podem favorecer a contaminação da superfície radicular, prejudicando a reparação periodontal (Chen *et al*, 1997).

A literatura mostra que a terapia periodontal pode trazer sintomas clínicos de origem pulpar devido à remoção de cimento presente na dentina radicular e,

consequentemente exposição dos túbulos dentinários, contribuindo para invasão bacteriana. No entanto isso ainda não é bem esclarecido. (Stallard, 1972; Solomon *et al.*, 1995; Bergenholtz & Hasselgren, 1999).

Seltzer & Farber (1994) sugeriram que a presença de uma camada de cimento intacta é importante para a proteção da polpa contra elementos tóxicos produzidos pela microbiota. Logo, a doença e o tratamento periodontal devem ser considerados como causas potenciais de pulpite e necrose pulpar.

2.1.2.1. Permeabilidade Dentinária

A dentina não é uma barreira que previne completamente a invasão de substâncias nocivas externas, como por exemplo, bactérias e seus subprodutos. Isso ocorre devido à sua estrutura tubular, através da qual irritantes podem se difundir e afetar estruturas pulpares e periodontais em várias situações clínicas (Lindhe *et al.*, 1999).

As bactérias penetram na dentina basicamente através de três formas: contaminação de uma área de dentina exposta por saliva; formação de biofilme bacteriano sobre uma superfície dentinária exposta; ou por carie (Lindhe *et al.*, 1999).

A permeabilidade da dentina radicular não é uniforme. Ela apresenta diferenças ao longo do seu comprimento axial. A região cervical e média apresentam permeabilidades superiores à dentina apical. A permeabilidade da câmara pulpar, na região de furca apresenta permeabilidade elevada por causa da presença de canais acessórios (Lindhe *et al.*, 1999).

Sempre que a dentina é exposta por perda de esmalte ou cimento, a polpa é colocada em risco devido a permeabilidade relativamente alta da dentina normal.

Antoniazzi *et al.* (1968) esclareceram que em certas zonas do dente, principalmente a apical, o cimento não se comporta como uma barreira impermeável, permitindo comunicação entre polpa e periodonto.

Do contrário, Seltzer & Bender (1984) descreveram que a dentina produzida pelos odontoblastos na região apical é amorfa e irregular, diferente da dentina dos terços radiculares, cervical e médio. Essa característica reduz sua permeabilidade, dificultando o acesso de microrganismos ou outros irritantes ao interior dos túbulos dentinários.

2.1.3 Forame Apical

À medida que a bainha epitelial se prolifera para a região apical, ela engloba porções da papila dental, até que permaneça somente uma abertura basal (apical). Essa abertura é a principal entrada e saída para vasos e nervos que constituem suprimento para a polpa, sendo assim, a principal via de comunicação entre polpa e ligamento periodontal (Anele *et al.*, 2010).

O forame apical, devido a sua amplitude, é considerado a principal via de comunicação entre a polpa e o periodonto representando o caminho mais significativo para a transição infecciosa entre eles (Chiu, 2008; Anele 2010).

Gadê-Neto (2000) mostrou que a polpa mantém boa capacidade de defesa contra os elementos agressores da biofilme bacteriano e da doença periodontal, desde que o suprimento sanguíneo apical mantenha-se intacto.

2.2 OUTRAS VIAS DE COMUNICAÇÃO ENTRE POLPA E PERIODONTO

É importante destacar que existem outras condições de inter-relação entre polpa e periodonto, denominadas “relações patológicas” ou “não fisiológicas”. Estas incluem, sulcos palato-radiculares ou congênitos, perfurações, trincas e fraturas radiculares (Baumgartner, 2002). Os sulcos favorecem o acúmulo de biofilme bacteriano, destruindo o epitélio sulcular e partes mais profundas do periodonto. Podem, assim, iniciar um intenso envolvimento periodontal de difícil diagnóstico (Gandhi *et al.*, 2011).

Outra situação bastante interessante é a anacorese hematogênica ou seja, a atração que tecidos inflamados ou necrosados exercem sobre as bactérias, presentes na circulação durante uma bacteremia. Essas bactérias passam a colonizar tecidos, estabelecendo um processo infeccioso. Diante a presença das vias de comunicação entre polpa e periodonto, podemos encontrar essas situações de reciprocidade inflamatória e infecciosa nesses dois tecidos (Siqueira & Lopes, 1999).

Essas condições podem favorecer a contaminação do tecido pulpar, a partir da superfície radicular afetada pela doença periodontal, induzindo à formação de dentina reacional, alterações inflamatórias, até a necrose pulpar. E também, levar à alterações no periodonto marginal, a partir de alterações pulpares (Seltzer *et al.*, 1967; Chen *et al.*, 1997).

Esse conjunto de comunicações fisiológicas e não fisiológicas, entre o dente e as estruturas de suporte, não só constitui a base de um relacionamento funcional entre polpa e periodonto, como também influenciam nos processos patológicos de uma estrutura sobre a outra (Berger, 1998, Chen *et al.*, 1997, Souza & Machado, 1995).

2.3 MICROCIRCULAÇÃO PULPAR

A polpa dentária é considerada um sistema de microcirculação, sendo essencial e importante na manutenção da homeostase dos tecidos. Sua principal função é a regulação do ambiente intersticial da polpa, através do transporte de nutrientes, hormônios, gases e remoção de resíduos metabólicos (Siqueira & Lopes, 1999).

O conhecimento deste sistema é essencial para a compreensão do seu funcionamento em polpas saudáveis e inflamadas. Alterações na microcirculação podem determinar e alterar o fluxo sanguíneo, exsudação de plasma e pressão tecidual. Assim, pode influenciar na quantidade e na direção do movimento do fluido dentinário. (Siqueira & Lopes, 1999)

Dados fisiológicos demonstram que a polpa tem um sistema vascular bastante sofisticado para um tecido relativamente primitivo. Como a eficiência do sistema

vascular de um tecido é a chave para sua adequada função, sugere-se que a polpa apresente mecanismos que favoreçam sua capacidade de sobrevivência, mesmo na presença de um problema periodontal inter-relacionado. (Harrington *et al* 2002).

A presença de biofilme bacteriano ou endotoxinas podem causar profundas alterações no fluxo sanguíneo pulpar. Em polpas inflamadas, o fluxo sanguíneo pulpar pode aumentar até 40% e, quando a polpa torna-se parcialmente necrosada, há uma redução desse fluxo. Na inflamação crônica a pressão pulpar é elevada, embora não tão grande como na inflamação aguda. (Siqueira & Lopes, 1999)

Mudanças pulpares resultantes da doença periodontal foram avaliadas por Seltzer *et al.* (1967) que mostraram que as lesões periodontais podem afetar a polpa através da interferência do suprimento nutricional, induzindo mudanças degenerativas e atrofia pulpar. A atrofia seria o resultado da redução do suprimento vascular devido ao aumento da pressão em função da mobilidade do dente (Siqueira & Lopes, 1999). A vascularização de um dente só é comprometida pela doença periodontal quando há muita perda óssea (Ruiz *et al.*, 2001).

Quando a nutrição da polpa é prejudicada pela doença periodontal, ao envolvimento desses canais, pequenas regiões de necrose pulpar podem ser visualizadas, causando colapso pulpar, degeneração gordurosa, e calcificações (Salum *et al.*, 1993).

Processos inflamatórios são sempre levados através da circulação venosa. As veias saem pela polpa através do forame principal ou dos canais laterais. Nesses casos, podemos entender que um processo inflamatório pode ser levado do tecido pulpar para os tecidos periodontais através dessas vias, mas o contrário não.

Nos casos de doença periodontal, quando o biofilme subgingival atinge um canal lateral, a microcirculação correspondente é cortada, mas a inflamação do tecido pulpar adjacente pode ser mínima. Quando atinge o forame apical principal, no entanto, leva a necrose pulpar.

Em dentes multiradiculares, quando apenas uma raiz esta envolvida até o ápice pela doença periodontal, tecido vital pode ser observado na câmara pulpar, visto que a nutrição do forame apical das outras raízes ainda não foram atingidas (Ruccuci & Siqueira, 2010).

Para Carvalho & Zuolo (2000), as alterações pulpares, a partir da doença periodontal, podem estar ligadas a modificações no sistema nutricional da polpa, pela destruição da microcirculação nos canais acessórios. No entanto, a chegada de microrganismos até a polpa, deve ser considerada, principalmente, pelo fato dessas alterações ocorrerem em presença de doenças periodontais mais severas/agressivas.

2.4 RELAÇÕES BIOLÓGICAS ENTRE A POLPA E O PERIODONTO

2.4.1 Efeito da Doença Pulpar no Periodonto

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado e inervado. Processos infecciosos na polpa dental frequentemente envolvem alterações inflamatórias, sendo as causas mais comuns, cáries, procedimentos restauradores e traumas (Siqueira & Lopes, 1999)

A patologia pulpar como causa da doença periodontal tem recebido muita atenção durante a última década (Solomon *et al.*, 1995; Walton & Torabinejad, 1997; Toledo & Rosetti, 2005)

Segundo Lindhe *et al.* (1999), a polpa pode interferir nos tecidos perirradiculares em duas situações:

- Em casos de **polpas vitais**: nessas situações consideramos a pulpíte, que raramente causa lesões ou destruições pronunciadas e significativas nos tecidos periodontais. Dentes com pulpíte, no entanto, pode ocasionalmente demonstrar sinais radiográficos de inflamação no periodonto apical (interrupção da lamina dura, aumento do espaço do ligamento periodontal ou uma radiolusência periapical mínima).

- Em casos de polpas **não vitais**: nessas situações, consideramos a necrose. Em polpas necrosadas, os microrganismos encontram condições que favorecem seu crescimento. As bactérias liberam várias substâncias (enzimas, metabolitos, antígenos) que vão emergir para os tecidos periapicais através de vias que conectam a polpa com

o periodonto. Uma vez no periodonto, os produtos bacterianos vão induzir alterações inflamatórias resultando em destruição de fibras do tecido periodontal e reabsorção do osso alveolar adjacente. Essas lesões inflamatórias normalmente se desenvolvem ao redor do ápice do dente.

Podemos perceber que a condição pulpar é um importante fator na suscetibilidade à invasão microbiana, visto que a polpa vital é muito resistente à invasão de microrganismos. Do ponto de vista diagnóstico, enquanto a polpa mantiver suas funções vitais, mesmo que inflamada ou cicatrizada, é improvável que ela produza irritantes capazes de causarem problemas no periodonto (Lindhe *et al.*, 1999).

Em contrapartida, uma polpa necrosada é rapidamente invadida e colonizada (Rotstein & Simon 2004) podendo desenvolver a infecção em qualquer local onde exista comunicação direta com o periodonto (Lindhe *et al.*, 1999).

2.4.1.1 Pulpite

A resposta pulpar frente a injúrias, envolve tanto reações inflamatórias específicas como não-específicas, através da cicatrização e reparo, bem como dano tecidual irreversível. Estas reações são relacionadas a componentes tóxicos dos microrganismos, aliados aos mecanismos de defesa de hospedeiro. Embora a inflamação seja um mecanismo de proteção, ela pode ter aspectos destrutivos que podem ser responsáveis por danos teciduais. Ao contrário de outros tecidos do corpo, quando ocorrer danos nas células pulpares, estas não são facilmente reparadas, devido ao acesso limitado de células de defesa e as limitações impostas pelo revestimento do tecido duro. A pulpite é um exemplo de uma infecção em que a reação do hospedeiro pode produzir mais danos do que aqueles causados simplesmente pela presença dos microrganismos (Martin, 2000).

As reações agudas, envolvendo leucócitos polimorfonucleares ocorrem quando a polpa está em eminente perigo de invasão por bactérias. Isto contrasta com o modelo de progressão da inflamação, onde a fase aguda geralmente precede a fase de pulpite crônica. Ela pode sucumbir, dependendo da saúde do tecido pulpar e da virulência dos microrganismos. Martin (2000) estudou a histopatologia pulpar em dentes acometidos

por pulpites. Ele mostrou que 43 % das amostras apresentaram histologia normal com apenas com alguns focos de infiltração inflamatória, enquanto que 17% apresentaram mudança inflamatória degenerativa caracterizada por infiltrados de células plasmáticas, incluindo áreas de necrose. Quarenta por cento mostraram mudanças nos tecidos moles e duros na forma de fibrose pulpar, e calcificações, como resultado da exposição da polpa a irritantes e toxinas bacterianas durante um período prolongado. Dessa forma, cria-se um ambiente de hipoxia dentro dos tecidos pulpares, estimulando a proliferação de microrganismos anaeróbios e enfraquecendo a polpa contra uma defesa eficaz ou mecanismos de reparo.

De acordo com Whyman (1988), a inflamação pulpar e a necrose podem ser causadas por uma variedade de irritantes. A infecção bacteriana na polpa como resultado de carie dental é relativamente comum, mas pulpites também podem ser resultado de irritação química, estímulo térmico severo, trauma e procedimentos restauradores. A polpa responde a esses irritantes se tornando hiperêmica e aumentando a quantidade de sangue circulante. Este é um processo reversível no qual há produção de dentina reparadora. Enquanto está inflamada, a polpa mostra dilatação vascular, edema localizado e infiltrado inflamatório. O edema aumenta a pressão intrapulpar que eventualmente causa a morte de células pulpares. Dessa forma, a necrose da polpa resulta na extensão do processo inflamatório para os tecidos periapicais.

Seltzer *et al.* (1967) salientaram a importância da intercomunicação polpa-periodonto, por meio de uma avaliação nas mudanças histológicas dos tecidos periodontais inter-radiculares após uma pulpite induzida em animais experimentais. Cem dentes de cães e macacos foram utilizados e avaliados microscopicamente. Os tecidos pulpares foram expostos por 7 a 90 dias e, após isso, foi feita a avaliação histológica dos tecidos periodontais. Vinte e um dos 100 dentes examinados apresentavam alterações inflamatórias no ligamento periodontal entre as raízes. Após 90 dias, foi observado o reparo das lesões inflamatórias no ligamento periodontal mas, em cinco casos, a inflamação crônica periodontal persistiu com reabsorção contínua da crista óssea. Os autores concluíram que lesões periodontais podem ser

iniciadas e perpetuadas por polpas inflamadas ou necrosadas, aparentemente através de canais acessórios ou laterais situados na região de furca.

É bem sabido que as bactérias são um dos mais importantes agentes causadores de pulpites. Muitas dessas bactérias têm sido isoladas a partir de canais radiculares infectados (Nakane *et al.*, 1995).

Pulpites experimentais mostram que bactérias e seus subprodutos podem difundir através dos túbulos dentinários causando respostas pulpares (Puapichartdumrong *et al.*, 2005).

Quando a polpa dental estiver vital ou mesmo inflamada, como nos casos de pulpites, problemas no periodonto não ocorrem (Bergenholtz & Hasselgren, 1999).

Exame histopatológico de polpas de dentes extraídos por pulpites, devido a presença de carie, mostram reações pulpares que variaram desde inflamação mínima até infiltração inflamatória acentuada no tecido pulpar (Martin, 2000).

2.4.1.2 Necrose

Acredita-se que a degeneração pulpar produza resíduos necróticos, subprodutos bacterianos, toxinas irritantes, além de sustentar o crescimento de patógenos endodônticos que vão progredindo além dos limites do dente, causando destruição óssea periapical (Nicholls, 1984, Walton & Torabinejad, 1997).

Frente a necrose pulpar, o periodonto apical pode desencadear alterações inflamatórias de natureza aguda ou crônica, com presença de um tecido de granulação altamente vascularizado, com neutrófilos, plasmócitos, macrófagos e fibroblastos, bem como um tecido conjuntivo periférico rico em colágeno. Embora a localização dessas lesões seja mais frequente no ápice, elas podem ocorrer em qualquer área que tenha saída para o periodonto (Bergenholtz & Hasselgren, 1999). Eles relataram que a doença pulpar envolvida com reações inflamatórias pode causar degeneração dos tecidos periodontais, caso ocorra um colapso do sistema de defesa do hospedeiro e ou patogenicidade da microbiota num processo infeccioso.

Para uma infecção no canal radicular causar doença periodontal, há necessidade de se ter uma via evidente de comunicação para o periodonto; um canal radicular infectado; e virulência suficiente das bactérias pulpares para causar periodontite marginal (Paul & Hutter, 1997). A extensão da destruição do tecido periodontal depende da virulência da bactéria presente no canal radicular e da resposta do hospedeiro em neutralizar os produtos bacterianos liberados do canal para o periodonto (Lindhe *et al.*, 1999).

Sinai & Soltanoff (1973) investigaram a resposta do tecido periodontal em 16 dentes com danos pulpares. Dez apresentaram mudanças inflamatórias no ligamento periodontal, 1 anquilose na região de furca e 5 não apresentaram nenhuma mudança. Eles concluíram que a necrose pulpar pode produzir mudanças no periodonto.

Miyashiyta *et al* (1998) analisaram 115 pares de dentes contra-laterais, onde os dentes testes eram tratados ou não endodonticamente, mas apresentavam rarefação apical. Os dentes controles não. Tanto os dentes testados quanto os dentes controles, apresentavam parâmetros clínicos semelhantes como biofilmevisível, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e nível de inserção. Eles encontraram uma maior redução do osso alveolar de suporte nos dentes que apresentavam rarefação apical. Essa ligação poderia ser comprovada clinicamente, uma vez que após a terapia endodôntica adequada, o aparelho de suporte do dente se refaz, observando-se regressão das lesões e reparo dos tecidos periapicais (Meng, 1999).

O processo inflamatório presente no canal radicular pode estimular a atividade osteoclástica, causando perda óssea, com potencial de migração em direção à margem gengival e formação de bolsa periodontal (Bender & Seltzer, 1972).

Ehnevid *et al.* (1993) demonstraram que a cicatrização periodontal é influenciada pela infecção do canal radicular. A redução da profundidade de sondagem após procedimentos de raspagem e alisamento radicular foi significativamente reduzida quando lesões periapicais estavam presentes em relação a dentes sem lesões. Os autores concluíram que o canal radicular serve como reservatório bacteriano para a manutenção tanto da inflamação periapical como da inflamação marginal.

Em uma série de estudos longitudinais retrospectivos em humanos, Jansson & Ehnevid (1998) concluíram que a perda de inserção periodontal estava diretamente relacionada à presença de infecção endodôntica. Pacientes com tendência à periodontite marginal e com infecções endodônticas apresentam dentes com bolsas mais profundas, maior perda de inserção e defeitos angulares (verticais), que dentes sem evidência radiográfica de infecção endodôntica. Baseado nesses achados, os autores concluíram que as infecções pulpares servem como um fator de risco em pacientes com tendência a periodontite.

2.4.2 Efeito da Doença Periodontal na Polpa

Apesar de não ser tão claro, a doença periodontal pode causar mudanças patológicas na polpa.

Problemas pulpares e periodontais são responsáveis por mais de 50% da mortalidade dos dentes (Chandrashekar, 2010). O efeito da doença periodontal na polpa dentária foi primeiramente descrita por Turner & Drew (1919).

O termo periodonto descreve todos os tecidos orais envolvidos no suporte e inserção dos dentes. Ele é composto pelos tecidos gengivais, epitélio juncional, uma rede de fibras gengivais que fazem a ancoragem do dente ao osso, e o ligamento periodontal que conecta o cemento radicular ao osso alveolar de suporte. O epitélio juncional promove a inserção na superfície do dente e é um amplo espaço intercelular que permite a troca de materiais entre o ambiente interno e externo (Clarke & Hirsch, 2002).

A doença periodontal é de natureza progressiva e origem complexa, começando no sulco gengival, migrando em direção apical e produzindo inflamação através dos depósitos de biofilme e cálculos. Esse processo leva a perda do osso alveolar circunjacente e dos tecidos moles do periodonto de suporte. Com isso, conduz a uma perda de inserção clínica e formação de um abscesso periodontal durante a fase aguda de destruição (Lindhe *et al.*, 1999). Ela é dependente da ocorrência de um número de

fatores simultâneos para a iniciação e progressão, tais como virulência dos patógenos periodontais, ambiente e suscetibilidade do hospedeiro (Kirkham, 1975).

Fatores de risco endógenos (tais como genética e diabetes mellitus) e fatores de risco exógenos (tais como tabagismo e estresse psicológico) são sempre investigados. Cerca de 50% da perda de inserção clínica numa população pode ser atribuída a hereditariedade.

Estima-se que pelo menos 10-20 genes modificadores estão envolvidos na iniciação e progressão da doença periodontal crônica ou agressiva, ainda que as tentativas para identificar esses genes tenham se mostrados controversos (Flemmig & Beikler 2011).

Se a doença periodontal não for tratada, pode levar à destruição dos tecidos de suporte, perda de inserção periodontal e reabsorção do osso alveolar (Goutoudi *et al*, 2004).

A resposta na doença periodontal frente a presença de bactérias é imunológica ou inflamatória e o periodonto é substituído por tecido granulomatoso com células de defesa. Já na necrose pulpar, a polpa não é acessível às defesas do hospedeiro e contém agentes irritantes muito potentes que causam alterações patológicas no periodonto. Assim, observa-se muito mais facilmente patologias pulpares afetando o periodonto do que o contrário (Armitage, 2010)

Clínicamente, não é incomum observar uma periodontite avançada alcançando o forame apical com necrose pulpar associada. Também pode se disseminar para a polpa através dos canais acessórios, o que ocorre mais frequentemente na furca e próximo ao ápice do dentes. Embora possa acontecer a necrose da polpa, esta também pode permanecer vital por um longo tempo (Nicholls, 1984).

A resposta pulpar frente à doença periodontal parece ser mais reparadora (envolvendo rápida deposição de dentina) do que inflamatória. Dessa forma, há uma maior freqüência de alterações pulpares leves como atrofias ou calcificações, ao invés de alterações mais severas como o comprometimento da vitalidade pulpar. A formação de dentina secundária na polpa também tem sido considerada como resultado das reações patológicas do tecido pulpar frente às periodontites (Bergenholtz & Lindhe, 1978).

Seltzer & Bender (1984) e Petka (2000) também sugerem que a doença periodontal é causa direta de atrofia e necrose pulpar, sendo mais deletéria à polpa do que caries e restaurações.

A polpa de dentes com doença periodontal de longa duração desenvolve fibrose e varias formas de mineralização. Por esse motivo, os canais de dentes com doença periodontal avançada são mais estreitos do que os canais de dentes sem envolvimento periodontal (Chen *et al.*, 1997; Fachin *et al.*, 2001).

Rubach & Mitchel (1965) observaram em dentes com doença periodontal, uma diminuição do suprimento sanguíneo, causando atrofia pulpar, além de pulpíte e necrose.

Quando mudanças patológicas ocorrem na polpa como resultado de uma doença periodontal, a polpa geralmente não degenera enquanto o canal principal não for envolvido. Portanto, parece plausível admitir que a doença periodontal raramente coloca em risco a função vital da polpa. Geralmente, enquanto o suprimento sanguíneo, através do forame apical, permanece intacto, a polpa é usualmente capaz de resistir aos insultos fisiológicos e suportar elementos nocivos induzidos pela doença periodontal (Fachin *et al.*, 2001; Harrington & Steiner, 2002; Abbott & Salgado, 2009).

O mesmo é interpretado por Chapple & Lumley (1999) que demonstraram que a doença periodontal raramente prejudica a vitalidade pulpar, enquanto o suprimento sanguíneo no forame apical permanecer intacto.

Kipioti *et al.* (1984) mostraram uma maior quantidade de células inflamatórias na polpa quando havia uma maior progressão apical da biofilme bacteriano. No entanto, não é certo que a polpa necrosaria na presença de bactéria mesmo quando um ou mais canais laterais ou túbulos dentinários estiverem envolvidos. Os autores concluíram que a doença periodontal tem um efeito cumulativo nos tecidos pulpares mas a desintegração total da polpa só acontece quando todo o forame apical é afetado pela biofilme bacteriano.

Dois estudos interessantes foram realizados por AGUIAR *et al.* (2002). Esses estudos observaram que dentes sem cárie, abrasão, atrição etc. portadores de periodontite agressiva envolvendo o ápice radicular apresentam alterações pulpares. As

alterações mais freqüentes foram fibrose e calcificação distrófica, mais observadas na porção apical da polpa radicular, ficando a porção coronária da polpa com características de normalidade (quando não há rompimento do feixe vásculonervoso). No segundo estudo, verificaram que dentes em situações clínicas semelhantes, entretanto, com periodontites crônicas envolvendo o ápice radicular apresentam alterações pulpares. As alterações mais freqüentes foram fibrose e calcificação distrófica em toda a polpa, encontrando-se significativos casos de necrose pulpar. Esses dois estudos são um contra-ponto interessante ao senso comum de que a doença periodontal não tem potencial de causar danos à saúde pulpar. Pela natureza das duas doenças – uma crônica e outra agressiva – valendo-se da mesma metodologia – pode-se inferir o potencial que o tempo tem de, frente à agressão presente, ser um fator importante, levando, nos casos de periodontite crônica, a que se observe significativos casos de necrose pulpar. O teste de sensibilidade pulpar nem sempre é confiável, pois pode ser falso-positivo, que é uma situação em que dentes com polpa necrótica respondem positivamente ao teste de sensibilidade pulpar ou falso-negativo, que é uma situação em que dentes com polpa vital que não respondem ao teste de sensibilidade pulpar.

Esses achados corroboram com Abbott & Salgado (2009) que afirmaram que as doenças periodontais podem levar a alterações no estado do tecido pulpar de várias maneiras. Pulpite e formação de dentina secundária tem sido relatada como sendo associada a doenças periodontais, bem como reabsorções internas. Estas mudanças ocorrem apenas quando as bolsas periodontais se estendem profundamente e, o suficiente para envolver canais laterais ou túbulos dentinários associados com a dentina radicular exposta ou cáries radiculares.

Quando ocorre a necrose pulpar, a infecção do sistema de canais radiculares é esperada, pois a polpa perde sua capacidade de resistir à invasão bacteriana e, bactérias da bolsa periodontal podem então invadir o tecido pulpar necrótico (Abbott *et al.*, 2011).

Embora muitos estudos tenham concluído que a doença pulpar possa afetar a saúde periodontal (Bergenholtz & Lindhe, 1978; Czarnecki & Schilder, 1979; Harrington, 1979; Simon *et al.*, 1972; Kipiotti *et al.*, 1984; Torabinejad & Trope, 1996; Chen *et al.*,

1997; Walton & Torabinejad, 1997; Harrington & Steiner, 2002; Toledo & Rosetti, 2005), há menos concordância que o inverso seja verdadeiro e possa ocorrer (Bergenholtz & Hasselgren, 1999; Chapple & Lumley, 1999 e Ruiz *et al.*, 2001; Fachin *et al.*, 2001).

Mas alguns trabalhos concordam com a relação causa e efeito entre a doença periodontal e as alterações pulparem inflamatórias. E afirmam que raízes de dentes periodontalmente envolvidos às vezes funcionam como reservatório de bactérias periopatógenicas, as quais podem recolonizar a superfície radicular tratada, bem como atingir a polpa dental (Adriens *et al.*, 1988).

Poucos estudos são encontrados na literatura, procurando determinar a influência da doença periodontal sobre a polpa ou a possibilidade de que as alterações pulparem possam ser produtos da presença da destruição periodontal em seus diferentes graus. No entanto, alguns estudos histológicos suportam os indícios de que lesões periodontais produzem um efeito degenerativo na polpa dental dos dentes envolvidos.

Bombana (2003) afirma que possibilidade de uma alteração periodontal influenciar a polpa, não é tao evidente quanto a influência das alterações pulparem sobre o periodonto. Considera que, se a polpa for provocada por estímulos de baixa intensidade, frequentes e de longa duração, como seria o da presença de uma alteração periodontal, poderia ter uma reação de caráter crônico degenerativo, podendo caminhar lenta e assintomaticamente para a necrose pulpar.

Sinai & Soltanoff (1973) induziram lesões periodontais em ratos e encontraram mudanças reabsortivas e reparativas na polpa, enquanto Hattler & Listgarten (1984) induziram doença periodontal severa em ratos, deixando a lesão se estender para a região apical. Nessa situação, as polpas permaneceram vitais.

Tagger & Smukler (1976) amputaram raízes de molares comprometidos periodontalmente. Eles encontraram que nenhuma das polpas das raízes resectadas apresentaram mudanças inflamatórias. Haskell *et al.* (1980) também removeram raízes de molares com envolvimento periodontal total ou parcial e não encontraram nenhuma célula inflamatória ou muita pouca inflamação na polpa desses dentes. Estão trabalhos vão de acordo com Torabinejad & Trope (1996).

Mazur & Massler (1964) negam que a condição histológica da polpa é afetada pela doença periodontal. Eles avaliaram histologicamente polpas de mais de 100 dentes envolvidos periodontalmente e livres de caries. Como controle, foram usados 22 dentes que apresentavam estruturas periodontais clinicamente e radiograficamente normais. Eles mostraram que dentes com periodonto normal apresentavam as mesmas mudanças pulpares encontradas em dentes envolvidos periodontalmente. Concluíram que mudanças morfológicas na polpa não estão relacionadas a alterações presentes no periodonto.

Czarnecki & Shilder (1979) compararam polpas de dentes hígidos, livres de caries, e periodontalmente dentro dos limites de normalidade, com polpas de dentes semelhantes, mas com doença periodontal. Dos 46 dentes avaliados, 34 apresentavam doença periodontal severa. Destes, apenas 6 dentes apresentavam necrose pulpar, sendo que esses dentes apresentavam grandes extensões de caries e restaurações coronárias. Eles concluíram que a polpa nos dentes hígidos, livres de carie e com periodontite, estava histologicamente dentro dos limites normais, independentemente da severidade da doença periodontal. Os resultados encontrados nos outros grupos, não relacionaram as alterações pulpares à doença periodontal, mas sim a presença de caries profundas e restaurações extensas.

Dados contrários foram observados por Aguiar *et al.* (1999) que analisaram possíveis alterações pulpares em dentes humanos portadores de doença periodontal envolvendo o ápice radicular. Foram avaliados 52 dentes e alterações pulpares mais frequentes foram fibrose e calcificação pulpar. Estas foram observadas com maior freqüência na porção apical da raiz enquanto que a porção coronária apresentava características pulpares de normalidade. Quando a doença envolvia o ápice, alterações pulpares ocorriam em toda a polpa e foram encontrados significativos casos de necrose pulpar, sugerindo que o tempo é um fator importante na etiopatogenia da lesão endo-periodontal.

Langeland *et al.* (1974) estudaram histologicamente a polpa de 60 dentes livres de cárie, mas com vários graus de periodontite, avaliando o efeito cumulativo da doença periodontal na polpa. Eles demonstraram que mudanças histológicas podem ocorrer nos

tecidos pulpaes, sendo os efeitos manifestados por inflamação pulpar, fibroses, calcificações, deposição de tecido calcificado/reacional e reabsorção. Entretanto, a morte pulpar só ocorre com o envolvimento total forame apical.

Resultados parecidos também foram encontrados por Gadê-Neto (2000), onde a doença periodontal foi induzida em 6 cães, pelo uso combinado de colgaduras de liga de aço e algodão. Após 125 dias, coletas microbiológicas das bolsas periodontais e dos canais radiculares foram realizadas. Dos 24 canais avaliados, 16 se apresentavam vitais e 3 necrosados. E, 36,8% da amostra, apresentava atresia dos canais radiculares, provavelmente devido a formação de dentina secundária frente ao estímulo bacteriano.

Em casos de polpa vital onde se avalia destruição óssea extensa pela doença periodontal, podemos questionar se essa quantidade de tecido inflamatório nos canais laterais e túbulos dentinários podem impedir a reinserção periodontal. Como é impossível determinar o estado histológico exato da polpa através de testes clínicos e na maioria dos casos, impossível identificar a presença de canais laterais, a terapia periodontal deve ser realizada com o objetivo de sanar a lesão periodontal. No entanto, a polpa deve responder ao teste térmico dentro dos limites normais e não haver nenhuma outra evidência que indique a não validade desse teste. Segundo Harrington (1979), realizar o tratamento endodôntico em casos onde há uma chance remota de presença de um canal lateral que poderia estar contribuindo para a extensão da lesão periodontal parece loucura. E, se a polpa se apresenta vital, ela ainda apresenta mecanismos que permitem uma significativa capacidade de sobrevivência.

Contrariamente, Nicholls (1984) mostra que o tratamento endodôntico pode se revelar necessário quando bolsas periodontais se estendem para o terço médio da raiz, mesmo que inicialmente a polpa se apresente vital e sadia.

Segundo Zehnder (2001), existe uma ausência de documentação recente procurando esclarecer os diferentes aspectos da relação entre as alterações periodontais e endodôntica.

A falta de correlação encontrada em observações clínicas entre doença periodontal e alterações do tecido pulpar pode depender simplesmente do fato de que

poucos caminhos existem em muitos dentes com envolvimento periodontal. Além disso, uma vez que o complexo dentina/polpa tenha sido exposto a microrganismos, reparo e cura, geralmente serão instituídos, deixando o tecido remanescente relativamente intacto (Lindhe *et al.*, 1999)

As infecções necessitam de mais estudos para identificar características e alterações da resposta do hospedeiro, como produção de citocinas pró inflamatórias e matrix de metaloproteinase nos tecidos periodontais, relacionando-os com a perda óssea e sua possível participação com as lesões pulpares. (Verma *et al.*, 2010)

Para Harrington & Steiner (2002), duas questões básicas ainda estão para ser esclarecidas: se a doença periodontal causa necrose pulpar e se um dente despulpado pode ser causa de uma doença periodontal. Esses autores salientam que a resposta à estas questões básicas é de máxima importância clínica.

2.4.2.1 Efeito do Tratamento Periodontal Sobre a Polpa

A doença periodontal atinge a polpa por conta de tratamentos periodontais anteriores ou bolsas periodontais crônica. O debridamento subgengival e a raspagem e o alisamento radicular são métodos tradicionais de controle da flora microbiana subgengival. Os objetivos do debridamento subgengival são remover não apenas o biofilme bacteriano aderente e disponível, mas também, em menor escala, depósitos de cálculos. O objetivo primário da raspagem e alisamento radicular é a remoção tanto do cálculo quanto do cimento contaminado. A efetividade de ambos os procedimentos diminuem com o aumento da profundidade de sondagem, especialmente quando essas sondagens excedem 5 mm (Cobb, 2002).

A resposta bacteriana após o tratamento de alisamento e raspagem radicular é bastante consistente nas periodontites crônicas. Imediatamente após o tratamento, há uma significativa redução no número de bactérias periodontopatogênicas Gram negativas, com um aumento no número de cocos Gram positivos. Essa nova microbiota

permanece por um período de 4 a 8 semanas e depois volta a carga inicial no período de 12 a 24 semanas, se não houver manutenção (Mealey, 2000).

Estudos mostram que após tratamento periodontal em sítios que apresentam profundidade de sondagem de 4 a 6 mm, devemos esperar uma redução de aproximadamente 1 mm e ganho de inserção clínica de 0,5mm. Em sítios mais profundos com profundidades de sondagem acima de 7mm, a redução deve ser de aproximadamente 2mm e o ganho de inserção clínica de 1mm (Mealey, 2000).

Bergenholtz & Lindhe (1978) observaram a natureza e a frequência das mudanças do tecido pulpar após a destruição induzida experimentalmente do aparato de inserção em macacos Rhesus. Eles constataram que a maioria dos espécimes radiculares examinados (70%) não exibiram mudanças patológicas do tecido pulpar, mas aproximadamente 30-40% da inserção periodontal desses dentes foi perdido. As raízes remanescentes (30%) apresentaram apenas um pequeno infiltrado inflamatório e/ou formação de dentina reparativa em áreas da polpa subjacente às áreas expostas através da destruição do tecido periodontal. Estas mudanças teciduais eram frequentemente associadas a reabsorção da superfície radicular sugerindo que os túbulos dentinários têm que ser descobertos para transmitir a irritação. Eles também sugerem que a presença de uma camada de cemento intacta é importante para a proteção da polpa contra elementos nocivos produzidos pela microbiota do biofilme, e que a inflamação pulpar pode ocorrer se vasos sanguíneos forem cortados durante procedimentos periodontais como raspagens profundas, alisamentos e curetagens.

A reação pulpar é influenciada não somente pelos estágios da doença periodontal, mas também pelo tipo de tratamento, como raspagem, alisamento radicular e administração de medicamentos (Guldener, 1985). O tratamento periodontal é uma casa potencial de pulpíte e necrose (Wang & Glickman, 2002). Um dente que apresenta polpa relativamente normal pode se tornar comprometido se canais laterais forem expostos a progressão apical da doença periodontal ou por causa de tratamento periodontal (Weine, 1984)

Adriens *et al.* (1988) afirmaram que raízes de dentes periodontalmente envolvidos funcionam como reservatório de bactérias periodontopatogênicas, que podem recolonizar a superfície radicular tratada, bem como atingir a polpa dental. Dessa forma, o tratamento periodontal pode ser um risco à saúde pulpar do dente, já que pode remover porções de cemento e camadas superficiais de dentina, expondo a polpa à ação direta do meio bucal e ou periodonto. Assim, a raspagem e alisamento diminuiriam as paredes radiculares e as bactérias atingiriam a polpa.

Jaoui *et al* (1995) avaliaram 195 dentes em 35 pacientes com periodontite avançada que receberam tratamento endodôntico e periodontal. Eles foram avaliados nove anos após o tratamento endodôntico e 8 anos após o tratamento periodontal. 91,4% dos casos estavam em boas condições e 8,6% mostraram uma deterioração da sua condição periodontal. Doze dos 195 dentes com tratamento endodôntico foram perdidos, sendo 8 por razões periodontais, 3 como resultado de fratura e 1 por cáries. Desses 12 dentes perdidos, 10 apresentavam uma condição periodontal ruim. Os resultados indicam que o risco de fracasso endodôntico nestes pacientes com periodontite é muito baixo, e que existe um pequeno risco de perda de dentes por razões periodontais, desde que os pacientes recebam tratamento periodontal de suporte.

Alguns fatores devem ser avaliados durante a terapia periodontal como: quantidade de cemento removido, presença de dentina exposta e capacidade da polpa em responder a estímulos irritantes. (Lindhe *et al.*, 1999)

Hattler & Listgarten (1984) examinaram a resposta pulpar ao alisamento radicular em ratos. Dentina reparadora foi encontrada na parede pulpar abaixo do sitio de alisamento em 32 dos 35 dentes; apenas 6 dos 43 dentes controles apresentaram dentina reparadora. Os autores questionaram a similaridade da resposta pulpar em ratos e humanos frente às bactérias presentes na superfície radicular.

Outros autores mencionam a possibilidade de, durante o tratamento periodontal, os vasos sanguíneos que fornecem suprimento para a polpa via canais acessórios possam sofrer danos. Eles podem ser cortados durante o alisamento ou traumatizados durante a cirurgia. Em alguns dentes, esses vasos parecem ser mais importantes do

que os que estão no forame apical e, se eles sofrem danos, uma necrose parcial parece ser inevitável (Whyman, 1988).

Haffajee & Socransky *et al.* (1997) mostraram que a raspagem e o alisamento radicular foi útil em 68% do tratamento, resultando em nenhuma perda ou um ganho modesto de níveis de inserção. E 32% exibiram pouco benefício da terapia não cirúrgica, com níveis ainda elevados de patógenos e progressiva perda de inserção.

Como doenças periodontais e seu tratamento podem causar alterações pulpares, é essencial reexaminar regularmente dentes periodontalmente envolvidos para avaliar quaisquer alterações no estado da polpa e tecidos periapicais. Isto inclui a repetição de testes de sensibilidade pulpar e comparar os resultados com os obtidos no exame inicial. Todos os dentes que são susceptíveis a mudanças pulpares e aqueles com respostas alteradas de sensibilidade pulpar devem ter mais radiografias periapicais tomadas e comparadas com as anteriores ao tratamento. O estado da polpa é dinâmico e pode mudar ao longo do tempo, uma vez que a polpa é um tecido capaz de responder às estímulos e condições. Repetidos insultos levam à fibrose pulpar e à uma capacidade reduzida em responder normalmente. Portanto, necrose pulpar pode ocorrer a qualquer momento em dentes comprometidos com infecção subsequente do sistema de canais radiculares e perirradiculares (Abbott & Salgado, 2009).

2.5 CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES ENDODÔNTICAS-PERIODONTAIS

Desde 1964, quando Simring & Goldberg descreveram primeiramente a relação entre doença periodontal e endodôntica, o termo endoperio tem se tornado parte do vocabulário dentário.

Os dados clínicos relacionados entre a polpa e o periodonto e, principalmente com as doenças relacionadas entre essas duas estruturas, são frequentemente complexos e questionados. Há a necessidade de investigar a história médica, vitalidade pulpar, sondagem de furca, profundidade da bolsa, mobilidade dentária e exame minucioso das radiografias. Durante o exame clínico, ambos os estados periodontal e pulpar do dente afetado devem ser considerados.

A possibilidade do aparecimento de alterações pulpares ou periodontais primárias e isoladas, que possam originar manifestações secundárias nos tecidos periodontais e pulpares, causando comunicação entre as duas patologias, leva ao aparecimento de diferentes situações clínicas. Todas elas necessitam ser perfeitamente diferenciadas para realização de um correto diagnóstico e plano de tratamento.

Diante dessas diferentes manifestações clínicas, diversas classificações têm sido propostas e sugeridas, através de achados clínicos, radiográficos e bases biológicas. No entanto, a maior parte delas não são inteiramente satisfatórias

A primeira classificação das lesões endoperio, baseada na etiologia, diagnóstico e prognóstico do dente envolvido foi sugerida e proposta por Simon *et al.*, 1972 e, é a mais comumente utilizada. Esta classificação incluiu cinco categorias e se baseia no conceito das doenças primárias e secundárias. Ela foi assim apresentada:

Tipo 1) Lesão Endodôntica Primária

Clínicamente são lesões onde a doença pulpar, através de mudanças inflamatórias, causa reabsorção do osso via forame apical e canais laterais, destruindo o aparato de inserção. Os processos inflamatórios no periodonto ocorrem como resultado da infecção do canal radicular não somente localizado no ápice, mas também ao longo das áreas laterais da raiz e nas áreas de furca dos dentes multirradiculares. Os testes endodônticos revelam uma polpa necrótica ou, em dentes multirradiculares, pelo menos uma resposta anormal, indicando que a polpa está se degenerando. Uma fistula pode formar para estabilizar a drenagem através do ligamento periodontal pelo sulco gengival.

Como se trata de um problema endodôntico que meramente se manifestou através do ligamento periodontal, o tratamento é através da terapia endodôntica não-cirúrgica sem nenhum tratamento periodontal. Nesses casos, a lesão periodontal, quando houver, vai regredir após a terapia endodôntica.

Tipo 2) Lesão Endodôntica Primária com envolvimento Periodontal secundário

Quando a lesão de origem endodôntica primária não é tratada, há uma tendência ao acúmulo de biofilme e formação de gengivite. Essa situação vai progredindo ao redor da raiz com migração apical do epitélio e formação de uma bolsa periodontal verdadeira. A sondagem da bolsa vai revelar presença de cálculo associado. A doença progredirá, levando a destruição do osso alveolar periapical e progressão para dentro da área inter-radicular.

A resolução consiste no tratamento de ambas as partes. O prognóstico depende da severidade do envolvimento periodontal e da eficiência da terapia periodontal.

Tipo 3) Lesão Periodontal Primária

As lesões ósseas de origem periodontal são, geralmente, associadas a mobilidade dentária. Clínicamente, os dentes respondem positivamente ao teste pulpar, o exame periodontal cuidadoso, revela a presença de perda de inserção generalizada e acúmulo de biofilme e cálculo, e as áreas envolvidas usualmente são lateralmente à raiz ou na região de furca. A lesão óssea é geralmente mais disseminada e generalizada do que as lesões de origem endodôntica..

O tratamento depende da extensão da periodontite e da capacidade do paciente em cooperar com o tratamento de longa duração com manutenção da terapia. O prognóstico depende exclusivamente da evolução da terapia periodontal.

Tipo 4) Lesão Periodontal Primária com envolvimento Endodôntico secundário

Nesses casos, os dentes exibem bolsa profunda, com uma extensa história da doença periodontal e, possivelmente, tratamentos prévios. Quando a polpa se torna envolvida, o paciente frequentemente refere dor acentuada e sinais clínicos de doença pulpar. Essa situação existe quando a progressão apical da doença periodontal é suficiente para abrir e expor a polpa ao ambiente da cavidade oral através dos canais laterais, túbulos dentinários ou forame apical. O teste de vitalidade pulpar é necessário

para verificar se ambos os tratamentos serão necessários. Essa lesão é similar a lesão endodôntica primária com envolvimento endodôntico secundário, sua diferença está apenas na sequência dos eventos

O prognóstico depende da continuidade do tratamento periodontal e subsequente terapia endodôntica.

Tipo 5) Lesão combinada verdadeira

A doença pulpar e periodontal podem ocorrer independentemente ou concomitantemente dentro e ao redor do mesmo dente. Quando as lesões progridem, elas eventualmente vão se unir e formar uma lesão única. Uma vez que as lesões endodônticas e periodontais se encontram, elas podem se tornar clinicamente indistiguíveis. O prognóstico depende imensamente da extensão da destruição causada pela doença periodontal.

Como a polpa e o periodonto estão comprometidos, o tratamento consiste em ambas as terapias e acompanhamento periodontal.

O verdadeiro envolvimento endo-pério (lesão associada verdadeira) é de baixa prevalência e raríssimo (De Deus, 1992; Walton & Torabinejad, 1997).

Essa classificação não é universalmente aceita porque é confusa em relação a terminologia utilizada, onde as duas condições primárias são essencialmente doenças de sítio único (isto é, doenças unicamente endodônticas ou periodontais) e, como tal, elas não são doenças endodônticas e periodontais combinadas. Além disso, quando as doenças secundárias estão presentes, não é geralmente possível distinguir elas das lesões verdadeiramente combinadas, uma vez que não é possível determinar qual o tecido foi o primeiro a ser afetado ou infectado (Abbott & Salgado, 2011)

Um dos problemas em se discutir as lesões endoperio é a falta de consenso para definir o termo, que deve ser definido através dos seguintes critérios: o dente envolvido deve se apresentar necrosado; deve haver destruição do aparato de inserção periodontal do sulco gengival até o ápice ou até uma área envolvendo um canal lateral; e ambas as terapias endodotica e periodontal devem ser realizadas para solucionar a lesão (Harrington, 1979).

Weine (1989) propôs uma classificação baseada mais na necessidade de tratamento do que no diagnóstico. Tal classificação não é inaceitável já que a doença deve ser diagnosticada antes de considerar o tratamento necessário, ao invés do contrário. Além disso, as necessidades de tratamento podem variar consideravelmente para diferentes casos com a mesma doença e, portanto, esta classificação pode ser enganosa.

Uma classificação adicional foi proposta por Belk (1990), para as lesões que podem ser vistas clinicamente, mas refletem a presença de duas entidades separadas e distintas. É a “lesão pulpar e periodontal concomitante”. Em essência, ambos os estados da doença existem, mas com diferentes fatores causais e sem evidência clínica de que um estado de doença influenciou o outro.

Outra classificação foi proposta por Guldener, com base na causa da(s) doença(s) e nas necessidades de tratamento. Sua classificação também incluiu outras condições (como perfurações, reabsorção óssea, fraturas de raiz, invaginações, sulcos, etc.) Embora seja reconhecido que esses outros problemas podem envolver tanto a polpa quanto os tecidos periodontais, eles não são estritamente combinados ou simultaneamente doenças endodônticas e periodontais, uma vez que têm razões e/ou causas particulares. A classificação de Guldener também tem a mesma desvantagem de classificação de Weine, onde usam as necessidades de tratamento para classificar as doenças, em vez dos sinais, sintomas e causas da doença.

Depois, Guldener (1985), com definição da origem das manifestações patológicas, propuseram outra classificação:

- Tipo 1) Primariamente Endodônticas
- Tipo 2) Primariamente Periodontais
- Tipo 3) Lesões Endodônticas e Periodontais combinadas

Torabinejad & Trope (1996) classificaram essas lesões de acordo com a origem da bolsa periodontal existente. No entanto, essa classificação apresenta um maior grau de dificuldade relacionado a aplicação clínica.

Tipo 1) Bolsa Periodontal de origem endodôntica

Tipo 2) Bolsa Periodontal de origem periodontal

Tipo 3) Lesão endo-periodontal combinada, subdividida em

3.1) combinada sem comunicação

3.2) combinada com comunicação entre as lesões endodônticas e periodontais

Uma classificação clínica deve ser clara e fácil de entender. No entanto, as duas primeiras são essencialmente síngulas das doenças, não sendo doenças endodôntica e periodontal combinadas, apesar de cada um poder ter algum efeito sobre a outra.

Atualmente, propõe-se que a classificação das doenças periodontais e endodônticas sejam limitadas aos dentes que têm as duas doenças ocorrendo ao mesmo tempo. Por isso, elas devem ser chamadas de 'doenças concomitantes, em vez de' lesões endoperio combinadas, pois o termo sugerido é mais apropriado, e se torna mais preciso, é clinicamente útil e fácil de usar (Abbott & Salgado, 2011). Assim, apenas duas categorias são necessárias:

Tipo 1) Doenças endodônticas e periodontais concomitantes sem comunicação. Desta forma, um dente apresenta o sistema de canais radiculares infectado com periodontite apical e doença periodontal marginal com bolsas. No entanto, as doenças periapicais e periodontais não se comunicam umas com as outras. Clinicamente, quando sondamos a bolsa periodontal, ela não se estende até a lesão periapical; radiograficamente, a bolsa periodontal não se estende até o forame apical e, osso pode ser visto no meio separando a radiolusência periapical da bolsa periodontal.

Tipo 2) Doenças endodônticas e periodontais concomitantes com comunicação. Desta forma, um dente apresenta o sistema de canais radiculares infectados com periodontite apical e doença periodontal marginal com bolsas. No entanto, as doenças periapicais e periodontais se comunicam. Clinicamente quando sondamos a bolsa periodontal, ela se estende até a lesão periapical; radiograficamente, a bolsa

periodontal e a radiolusência periapical aparecem como uma única radiolusência, e não há osso entre a radiolusência periapical e a base da bolsa periodontal.

2.5.1 Características Clínicas que Auxiliam na Classificação das Lesões Endodônticas-periodontais

A parte mais importante em qualquer doença é estabelecer o diagnóstico correto. O diagnóstico deve basear-se numa combinação da história obtida a partir do paciente, exame clínico, observações radiográficas, e a interpretação dos resultados e de todos os testes e investigações. Em particular, os testes de sensibilidade pulpar (idealmente, tanto térmico quanto elétrico), sondagem periodontal, palpação, percussão, testes de mobilidade, transiluminação do dente, e remoção de restaurações existentes são passos valiosos e indispensáveis no diagnóstico, ajudando a diferenciar doenças pulpar/periapical e doenças periodontais (Christie & Holthius, 1990; Abbott & Salgado, 2011).

Segundo Whyman (1988), o diagnóstico diferencial dessas lesões não é sempre óbvio, mas é importante determinar se mudanças ocorrem em ambos os sítios para assim, determinar as terapias. Sobre a identificação dos fatores relevantes durante o diagnóstico, citados anteriormente, ele destaca:

1. História dental: importância dos sinais e sintomas de doenças periodontais ou pulpares recentes/passadas, tratamentos periodontais ou pulpares recentes/passados, ou história de trauma.
2. Duração: se a duração da lesão for conhecida ou puder ser deduzida, pode ser uma informação relacionada com a extensão da destruição do tecido pulpar ou periodontal.
3. Dor: dor severa normalmente não é associada com doença periodontal crônica, mas sim com inflamação pulpar aguda.
4. Vitalidade pulpar: provavelmente é o teste mais importante, indicando se a polpa está ou não envolvida.

5. Sensibilidade a percussão: é um sinal útil de inflamação dentro do ligamento periodontal mas não é um indicador direto de doença pulpar.
6. Supuração: pode ser associado com patologia pulpar e periodontal sendo usado em conjunto com outras informações.
7. Bolsas periodontais: se uma bolsa esta presente e associada a um dente de vitalidade alterada, a possibilidade de uma contribuição pulpar nesse problema deve ser considerado.
8. Mudanças radiográficas: forma, localização e extensão da lesão óssea podem ajudar a completar o diagnóstico. Sinais de perda óssea da crista, envolvimento de furca e patologia periapical devem ser avaliados.

Para se estabelecer o diagnóstico das lesões endoperio, duas principais considerações devem ser estabelecidas: a vitalidade pulpar e a morfologia do defeito periodontal (Chandrashekar, 2010). Os métodos usados para avaliar a vitalidade pulpar são suscetíveis a resultados falso-positivo isto é, uma resposta positiva a partir de uma polpa necrótica; e falso-negativo isto é, uma resposta negativa a partir de uma polpa vital (Peterson *et al.*, 1999).

Porém, a incidência de um resultado falso-positivo pode aumentar a favor de uma periodontite avançada. Estudos relatam resultados falso-positivos tão altos quanto 52% em dentes com periodontite avançada (Hirsch & Clarke *et al.*, 1989)

As limitações dos testes pulpares são questionadas. A presença ou ausência de tecido pulpar pode ser determinada com alguns graus de confiança em dentes unirradiculares. No entanto, em dentes multirradiculares, pode haver tecido pulpar em um ou mais canais enquanto a necrose pulpar pode já ter acontecido em outros canais (Harrington, 1979).

O mesmo é questionado por Reeh & Eldeeb (1990), onde distintos estágios de mortificação pulpar ocorrem simultaneamente nos diferentes condutos, e a degeneração nervosa é o último processo a ocorrer durante a mortificação pulpar.

Ross (1972) acrescenta que nenhum teste de sensibilidade pulpar indicará de maneira fidedigna a condição real de saúde pulpar, indicará somente alteração de respostas frente a estados degenerativos e patológicos da polpa quanto à sensibilidade.

Tal *et al.* (1984) descreveram que a presença de resposta ao teste de sensibilidade pulpar pode indicar que a lesão é periodontal primária sem envolvimento endodôntico, pois em lesão combinada verdadeira, a polpa não promove resposta ao teste. Somando ao exposto, Grant *et al.* (1988) lembram da necessidade de testar dentes adjacentes para o conhecimento de padrões de normalidade.

Becerra *et al.* (1993) avaliando o estado pulpar, pelo teste de vitalidade, de dentes sem cárie e sem obturações, mas com doença periodontal avançada, encontraram uma resposta negativa em 46,15% dos casos, demonstrando a existência de uma relação entre a patologia periodontal avançada e o comprometimento pulpar. Essa relação foi maior em pacientes com periodontite de aparecimento precoce, o que indicaria uma influência da agressividade da doença periodontal no dano pulpar. Segundo Cardon *et al.* (2007), quanto maior for a perda de inserção periodontal, menor é a resposta pulpar ao teste elétrico.

O diagnóstico clínico do estado pulpar pode ser difícil. Infelizmente, não existe um teste único disponível que determine com exatidão e fidedignidade o verdadeiro estado pulpar. Os mais usados testes de sensibilidade pulpar são o térmico e elétrico e só podem indicar a capacidade de fornecimento nervoso da polpa em responder a esse estímulo particular. Estes testes não fornecem qualquer informação sobre a presença ou ausência de suprimento sanguíneo da polpa, o que é mais relevante para determinar se a polpa é saudável ou doente. (Abbott & Salgado, 2009)

A morfologia da lesão periodontal também é outro fator importante para o diagnóstico. Em geral, a periodontite é caracterizada pela perda óssea horizontal generalizada, com formação de biofilme e cálculo evidentes. Em contraste, a presença de uma lesão óssea vertical (bolsa estreita e profunda) favorece a suspeita da origem endodôntica.

2.6 MICROBIOLOGIA ORAL

A cavidade oral é caracterizada por uma microbiota complexa. Mais de 300 espécies de microrganismos já foram detectadas (Gomes *et al.*, 2002b). Devido a dessa grande diversidade bacteriana presente na cavidade oral, o papel de vários microrganismos e, principalmente seus fatores de virulência ainda permanecem desconhecidos (Saito *et al.*, 2009)

A infecção bacteriana é responsável pela maioria das lesões inflamatórias pulpares e periapicais, apesar de muitos fatores também se relacionarem com o desenvolvimento e progressão dessas doenças (Nissan *et al.*, 1995)

As doenças da cavidade oral desenvolvem-se em lugares onde um biofilme está estabelecido. Biofilmes são comunidades de microrganismos embebidos em uma matrix extracelular, que quando em contato com o hospedeiro podem afetar a homeostase do tecido, causando doença. Os biofilmes microbianos causam mais de 75% de todas as infecções microbianas encontradas nos seres humanos

A cavidade oral é repleta de biofilmes que colonizam mucosas, materiais restauradores e dentes. Biofilmes orais estão fortemente associados com a etiologia da doença periodontal, cárie dentária, doenças pulpares, periodontite apical, periimplantites e candidíase (Flemmig & Beikler, 2011)

Muitos fatores também afetam o crescimento e a colonização microbiana em canais radiculares e bolsas periodontais, tais como: concentração de nutrientes disponíveis, baixa tensão de oxigênio, principalmente em canais radiculares necrosados e o tipo e as combinações microbianas presentes no momento (Oliveira *et al.*, 2005, Gomes 2002a)

Canais radiculares e bolsas periodontais infectadas apresentam semelhanças na flora bacteriana, embora existam mais espiroquetas em bolsas periodontais do que em canais infectados. Abbott & Salgado (2001) mostraram que 30-60% da microbiota de bolsas periodontais são espiroquetas enquanto 0-10% estão presentes em canais infectados.

Portanto, as similaridades entre a microbiota endodôntica e periodontal podem sugerir uma infecção cruzada entre o canal radicular e a bolsa periodontal (Zehnder, 2001).

Dentre os microrganismos mais pesquisados, temos os bacilos produtores de pigmentos negros (BPPN). Estes são bastonetes Gram-negativos, anaeróbios estritos e imóveis que, quando cultivados sobre a superfície de ágar sangue, desenvolvem colônias pigmentadas de negro por produzirem pigmentos do tipo protohemina ou protoporfirina. São espécies importantes nas infecções orais e possuem um papel principal na patogênese da doença periodontal e infecções endodônticas. Eles são comumente isolados em combinação com outras bactérias, compondo infecções mistas. Evidências sugerem a existência de sinergismo bacteriano, que seria um fator determinante do potencial patogênico destas espécies (Baumgartner 2002, Nisengard & Newman, 1997).

São muitas as evidências da importância e do envolvimento microbiano, especialmente dessas espécies pigmentadas, tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*, na inflamação periodontal e em lesões periapicais.

As técnicas moleculares, no geral, permitem a identificação potencial de microrganismos específicos.

O “PCR” simples (Polimerase Chain Reaction) é uma técnica molecular bastante sensível que permite a identificação de microrganismos apenas pela presença do DNA. Através da alta replicação de DNA, permite a síntese de um vasto número de cópias para uma quantidade pequena de DNA. Na detecção de patógenos orais, o PCR é um método estabelecido que também permite a detecção de múltiplas amostras (Gomes *et al.*, 2004a; Gomes *et al.*, 2004b; Gomes *et al.*, 2005)

O Real time PCR também é uma técnica molecular caracterizada por uma reação enzimática cíclica na qual dois iniciadores oligonucleótidos sintéticos e uma sonda de DNA hibridizam com as sequências de bases de nucleotídeos específicos do organismo pesquisado. Através da monitorização da liberação de fluorescência em cada ciclo de PCR, o progresso da reação pode ser registada em tempo real e a quantidade de DNA

na amostra quantificada. Dessa forma, determina as quantidades absolutas e relativas de um microrganismo específico em uma amostra mista (Martin, 2000)

Há uma importância em se considerar quais métodos moleculares são utilizados em um estudo. Em alguns casos, não apenas a presença de um microrganismo específico é importante, mas também o número de cepas na amostra, para que se possa associá-lo com os sinais e sintomas clínicos.

2.6.1 Microbiologia da Polpa Vital

O dano pulpar é um processo dinâmico, que depende tanto da presença dos microrganismos quanto das respostas inflamatórias e imunológicas do hospedeiro (Hahn & Liewehr, 2007).

Quando há a presença de fatores microbianos estimulando a polpa, a dor é o primeiro sinal clínico da patologia, por conta do edema causado pela inflamação. Se a inflamação persiste, pode haver a necrose total do tecido. (Hahn & Liewehr, 2007)

As populações microbianas de pulpites e cáries dentárias são altamente complexas e não foram totalmente identificadas. Um extenso grupo de bactérias Gram-positivas está relacionado à iniciação e desenvolvimento da cárie precoce, que incluem *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos*. Em relação as bactérias Gram negativas, as mais relacionadas a cáries são *Veillonella spp*, *Bocteroides (Prevotella e Porphyromono spp)* e *Fusobacterium spp*. (Martin, 2003, Chhour et al., 2004; Hahn & Liewehr, 2007)

A presença de microrganismos nas fases de infecção em tecido pulpar vital permanecem obscuras. Nadkami et al. (2010) identificaram lactobacilos em 7 de 8 polpas em fases limites de infecção. A infecção estabelecida esteve presente em 6 casos, mostrando um perfil mais complexo, com lactobacilos em todas as lesões regiões necróticas de tecido colonizadas por espécies de *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Lachnospiraceae* e *Corinobacteriaceae*. Infecções avançadas foram identificadas em 7

polpas caracterizadas por espécies anaeróbias mistas. Lactobacilos não foram identificados nesta fase. Os grupos microbianos foram isolados de dentro do tecido pulpar. Dessa forma, esse estudo mostrou que lactobacilos poderiam invadir tecido pulpar vital não sendo detectados infiltrados inflamatórios. Os autores concluem que a invasão da polpa pode estar associada com uma variedade pronunciada a populações microbianas que estão presentes em processos cariosos.

2.6.2 Microbiologia Endododônica

Miller (1984) foi o primeiro pesquisador a descrever a presença de bactérias no interior do sistema de canais radiculares, através de esfregaços obtidos de canais radiculares com câmara pulpar aberta e polpas necrosadas. As bactérias passaram então a serem consideradas os principais agentes etiológicos das doenças pulpares e periapicais, papel este confirmado anos mais tarde por Kakehashi *et al.* (1965) e Möller *et al.* (1981).

Embora nenhum microrganismo seja isoladamente responsável pelas patologias pulpares e perirradiculares, algumas espécies têm sido mais consistentemente relatadas no espaço do canal radicular (Sundqvist, 1994).

Em canais radiculares necrosados e presença de lesão periapical crônica, há o predomínio de microrganismos anaeróbios, particularmente os Gram-negativos, que além de possuírem diferentes fatores de virulência e gerarem produtos e subprodutos tóxicos aos tecidos apicais e periapicais, contêm endotoxinas em sua parede celular. A endotoxina é liberada durante a multiplicação ou morte bacteriana, exercendo uma série de efeitos biológicos importantes, que conduzem a uma reação inflamatória e reabsorções ósseas na região periapical (Sundqvist *et al.* 1989, Gomes *et al.* 1994).

A maioria das infecções endodônticas é caracterizada por uma microbiota mista e, os microrganismos mais freqüentemente isolados dos canais radiculares são as bactérias estritas dos gêneros *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Veillonella* e *Capnocytophaga* e os facultativos

Streptococcus e as espécies relacionadas tais como as dos gêneros *Enterococcus* e *Gemella*. Também são isolados com frequência os gêneros *Neisseria*, *Haemophilus*, *Eikenella*, *Staphylococcus*, *Mitsuokella* e *Wolinella* (Siqueira & Lopes, 1999; Sundqvist, 1994; Gomes *et al.* 2006a).

Fusobacterium nucleatum é uma bactéria anaeróbia estrita, Gram-negativa, que é normalmente isolada da cavidade oral. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que esta espécie é uma das mais prevalentes em infecções endodônticas primárias. Além disso, o *Fusobacterium nucleatum* age como uma ponte de coagregação entre microrganismos, sendo desta forma um dos principais microrganismos na formação do biofilme; podendo ser também um agente causador ou contribuir para a reagudização das infecções endodônticas devido a presença de endotoxinas na sua parede celular. Baumgartner *et al.* (1992) mostraram que uma cultura mista de *Fusobacterium nucleatum* é significativamente mais patogênica do que este microrganismo em cultura pura.

Porphyromonas gingivalis é uma bactéria anaeróbia estrita, Gram-negativa, amplamente investigada em infecções da cavidade oral e, possui uma grande variedade de fatores patogênicos, incluindo as fímbrias, proteinases, endotoxinas e proteínas de ligação de hemina. (Holt *et al.*, 1999)

Atualmente, uma maior atenção tem sido dada a espécies de *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* (Siqueira & Lopes, 1999).

Gomes *et al.* (1994) estudaram possíveis associações significantes entre grupos particulares de bactérias isoladas dos canais radiculares com alguns sinais e sintomas de origem endodôntica. Analisando 70 amostras, algumas associações foram confirmadas tais como a dor e a presença de *Prevotella* e *Peptostreptococcus* spp.; edema e *Prevotella* spp. e *Peptostreptococcus micros*; canais molhados e organismos facultativos, *Prevotella* spp., *Propionibacterium* spp. e exsudato purulento e *Fusobacterium necrophorum* e *Prevotella loescheii*.

Peters *et al.* (2002) investigaram as combinações entre bactérias isoladas de 58 canais radiculares infectados de dentes com lesão periapical, mas sem sinais e sintomas clínicos. Relações significantes também foram encontradas entre *Prevotella*

intermédia e *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermédia* e *Prevotella oralis*, *Actinomyces odontolyticus* e *P micra*, *Bifidobacterium* spp. e *Veillonella* spp. Esses resultados sugerem que patógenos endodônticos não ocorrem aleatoriamente, mas são encontrados em combinações específicas.

Gomes *et al.*(1996a) estudaram as variações da microbiota endodôntica antes e após a instrumentação dos canais radiculares. Amostras microbiológicas foram colhidas de 42 canais radiculares, sendo divididos em 2 grupos: grupo 1 que apresentava dentes sem tratamento endodôntico anterior e grupo 2 que já havia sido submetido a tratamento endodôntico prévio. Através dos resultados obtidos, foi identificado uma significativa redução após o PQM em relação a anaeróbios e a espécies Gram positivas, especialmente *Peptostreptococcus* spp. Ainda assim, os autores concluíram que certas espécies são mais resistentes aos procedimentos endodônticos do que outras.

A presença de microrganismos, normalmente, ocorre na presença de necrose pulpar, o que não é comum em polpas vitais.

O significado de bactérias Gram-negativas anaeróbias em dentes que apresentam pulpíte por carie, não é totalmente compreendido. No entanto, espécies de *Prevotella*, *Fusobacterium* e *Porphyromonas* são conhecidas por apresentarem fatores de virulência que se tornam mais potentes na presença de *P micros*. Essa associação aumenta o potencial de degradação, ataca o sistema imunológico e interfere na reparação pulpar (Martin, 2000).

Bactérias Gram positivas podem ser encontradas na cavidade oral e em tecidos periodontais saudáveis. Casos de inflamação tecidual e bacteremias podem favorecer a presença temporária desses microrganismos, sendo de caráter reversível (Reinhardt *et al.*, 1982).

Parvimonas micra e *Porphyromonas endodontalis* têm sido associados ao avanço de processos cariosos, seguido de necrose pulpar. (Martin 2000)

Gomes *et al.* (2005) avaliaram pelo método da cultura e PCR a presença de *P gingivalis*, *P endodontalis*, *P intermédia* e *P nigrescens* em dentes com lesões periapicais em amostras de 100 canais radiculares (50 com infecções primárias e 50 com secundárias). *P gingivalis* foi raramente isolado por cultura (1%), entretanto,

freqüentemente encontrado por PCR (38%). *P. endodontalis* não foi isolado por cultura, mas por PCR foi encontrado em 25% das amostras. *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermédia* e *P. nigrescens* foram os mais freqüentemente identificados em casos de infecções primárias do que secundárias. Entretanto a freqüência de microrganismos produtores de pigmento negro foi elevada utilizando ambos os métodos.

Seol *et al.* (2006) propuseram detectar a presença de *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia*, *Prevotella nigrescens* e *Prevotella tanneriae* em amostras clínicas utilizando o PCR. Dois diferentes protocolos de PCR foram utilizados (um para as duas espécies de *Porphyromonas* e outro para as três espécies de *Prevotella*). Os resultados foram comparados àqueles obtidos pelos métodos tradicionais de cultura microbiológica. Amostras microbianas foram colhidas assepticamente de 40 canais radiculares infectados de pacientes com abscesso. O método de PCR foi processado por meio do DNA extraído de cada amostra. Pelo menos uma das cinco espécies de bactérias pigmentadas foram encontradas em 65% (26 de 40) das amostras utilizando PCR, e em 15% (6 de 40) utilizando o tradicional método de cultura. O PCR foi mais rápido, sensível, específico e efetivo em detectar bactérias pigmentadas do que os procedimentos convencionais de cultura.

As técnicas moleculares para identificação microbiana, como o PCR, têm sido frequentemente utilizadas em pesquisas microbiológicas. Elas apresentam alta sensibilidade e habilidade de detectar microrganismos que são muito difíceis de serem isolados e cultivados por técnicas tradicionais de cultura (Siqueira & Roças, 2003; Gomes *et al.* 2002b, 2005)

2.6.3 Microbiologia Periodontal

A doença periodontal é de etiologia multifatorial, onde estão envolvidos vários complexos bacterianos que interagem com as células do hospedeiro. Essa interação causa uma ampla liberação de mediadores inflamatórios que podem acarretar a destruição das estruturas periodontais (Ebersole *et al.*, 1997).

A etiologia da doença periodontal é multifatorial, mas a presença do biofilme bacteriano é essencial e indispensável na etiopatogênese das infecções periodontais

Algumas bactérias são responsáveis pela formação inicial da biofilme supragengival, como *Streptococcus* spp. e bastonetes Gram positivos. O crescimento secundário e maturação ocorre como consequência do crescimento da biofilme inicial. (Carranza, 1986)

O caráter infeccioso e imunoinflamatório crônico é caracterizado por uma cultura mista, com predomínio de bactérias anaeróbicas Gram negativas. É induzida por biofilmes bacterianos contendo numerosos patógenos periodontais que se associam em complexos periodontopatogênicos. Esses complexos bacterianos são associações de bactérias presentes em biofilmes subgengivais, que interagem com as células do hospedeiro, liberam mediadores inflamatórios e causam a destruição do ligamento periodontal e do osso alveolar adjacente. (Loesche *et al.*, 1990).

Os periodontopatógenos são bactérias específicas encontradas em grande número nas bolsas periodontais, enquanto seus números são baixos em sítios saudáveis (Loesch *et al.*, 1990). Diferentes espécies bacterianas estão associadas a diferentes formas de doenças periodontais. Eles apresentam vários fatores de virulências que aumentam sua colonização, incapacitando a resposta do hospedeiro e causando destruição do tecido diretamente ou pela ativação da resposta inflamatória. Esses fatores permitem que as bactérias colonizem defeitos periodontais profundos desfavorecendo as defesas do hospedeiro (Clarke & Hirsch, 2002)

Socransky e Haffajee (1998) classificaram a microbiota das doenças periodontais em grupos ou complexos, que foi assim apresentada:

- Complexo vermelho: *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*.
- Complexo laranja: *Fusobacterium nucleatum* spp., *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Parvimonas micra*. Dentre as espécies associadas a esse complexo, encontram-se *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Streptococcus constellatus* e *Campylobacter gracilis*.
- Complexo amarelo: *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus intermedius*

- Complexo verde: formado por três espécies de *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* e *A. actinomycetemcomitans* serotipo a.
- Complexo roxo: *Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*.

A. actinomycetemcomitans serotipo b, *Selenomonas noxia* e *Actinomyces naeslundii* são espécies relacionadas com os demais complexos.

De todos esses complexos presentes nas doenças periodontais, o complexo vermelho é o mais investigado, pois está presente em etapas mais tardias da formação do biofilme. As bactérias pertencentes a esse grupo são freqüentemente isoladas dos biofilmes subgingivais em casos onde há grandes profundidades de bolsa e sangramento à sondagem (Socranski & Haffajee, 1998)

Faveri *et al.* (2006) avaliaram a presença do complexo vermelho em 15 indivíduos com periodontite crônica e 15 indivíduos periodontalmente saudáveis. Os parâmetros clínicos de profundidade de sondagem, nível de inserção clínica, presença ou ausência de sangramento a sondagem, biofilme supragengival visível e supuração, foram avaliados em 6 sítios por dente. O checkerboard DNA-DNA foi utilizado para identificar a presença de *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis*. A presença concomitante dessas 3 espécies, foi identificada em 85% dos sítios avaliados dos pacientes com periodontite e 10% dos sítios dos indivíduos saudáveis; 81% dos sítios do grupos saudável não apresentavam esses patógenos, contra 2% dos sítios com periodontite. Os autores concluíram que a colonização simultânea dos 3 patógenos é rara nos indivíduos saudáveis e, uma característica marcante nos indivíduos com periodontite crônica

Dentre as inúmeras espécies bacterianas isoladas do biofilme associado a periodontite, as espécies constituintes do grupo de BPPN, Gram-negativos e anaeróbios, mostram-se fortemente relacionadas com infecções periodontais destrutivas (Socransky & Haffajee, 1998).

Comumente, *Porphyromonas gingivalis* é isolada tanto de canais radiculares quanto nas bolsas periodontais (Holt *et al.*, 1999).

A prevalência de BPPN como *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermédia*, foi determinada em amostras subgingivais de 50 indivíduos com periodontite avançada (17 a 75 anos) e 50 adultos (21 a 36 anos) e 50 crianças com gengivite (2 a 11 anos) por Ashimoto *et al.*, (1996). Foi usado o método do PCR baseado no gene 16S rRNA. A prevalência em indivíduos com periodontite e em adultos e crianças com gengivite, respectivamente, foi de 70%, 10% e 14% para *Porphyromonas gingivalis*, 58%, 12% e 18% para *Prevotella intermédia*.

Algumas espécies do gênero *Prevotella* são encontradas tanto em sítios sadios quanto em sítios periodontalmente comprometidos. *Prevotella intermédia* está mais relacionada com sítios de destruição periodontal do que sítios sadios (Pereira *et al.*, 2011)

Tannerella forsythia, é uma bactéria Gram-negativa anaeróbia frequentemente detectada em indivíduos com diferentes formas de doença periodontal, infecções do canal radicular, e perimplantites (Tanner & Izard, 2006).

Kesavalo *et al.* (2007) demonstraram que *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, associados ou não a *Fusobacterium nucleatum*, não só estão presentes na periodontite crônica, como também exibem virulência na colonização da cavidade oral, indução do aumento da resposta imunes da IgG, e significativa reabsorção óssea alveolar.

Ebersole (1997) mostrou que *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* exibem sinergismo na destruição de tecidos, mas os mecanismos de interação desses microrganismos no sulco subgingival e se eles expressam um potencial patogênico em progredir a periodontite permanece enigmática.

Em seres humanos, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* são mais prevalentes em indivíduos com destruição periodontal do que nos homólogos saudáveis, e ambos têm sido implicados com fatores de risco em periodontite, sugerindo um papel relevante no estabelecimento da doença e progressão (Saito *et al.*, 2009). Em um âmbito clínico, isso contribui para a idéia de que os complexos de bactérias em infecções periodontais podem ser mais relevante do que espécies individuais sozinhas (Gomes *et al.*, 2004). *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella*

forsythia fazem parte de um complexo bacteriano responsável pela severidade da doença periodontal (Yoneda *et al.*, 2005)

Rôças *et al.* (2001) procuraram determinar a existência de associação entre conhecidos patógenos periodontais como *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, conhecidos patógenos periodontais. Por meio da biologia molecular foram estudados 50 canais radiculares de dentes sem vitalidade pulpar e com lesão periapical. O DNA das amostras foi extraído e examinado por PCR. Em 33 casos foi encontrado pelo menos um dos microrganismos estudados. *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Bacteroides forsythus* foram detectados em 44%, 30% e 20% dos casos respectivamente. Os três microrganismos foram identificados em conjunto em 4 casos

Utilizando técnicas de cultivo microbiano, Van Winkelhoff *et al.*, (2002), investigaram a presença de patógenos periodontais suspeitos em 116 pacientes com destruição periodontal (\pm 42,4 anos) e em 94 indivíduos sem doença (\pm 40,4 anos). A prevalência de indivíduos para a presença de *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermédia* foi, respectivamente, 59,5% e 10,6% no grupo sem doença e, 87,9% e 69,1% no grupo com doença periodontal. Segundo os autores, os resultados demonstraram que periodontopatógenos como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermédia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Parvimonas. micra* são fortes marcadores de doença periodontal destrutiva.

Socransky & Haffajeee (2003) investigaram os perfis microbiológicos relacionados com periodontite. Os autores enfatizam a presença do complexo laranja e vermelho em casos de periodontite refratária, nos quais as espécies *Prevotella intermédia*, *Prevotella nigrescens* e *Porphyromonas gingivalis* estão incluídas e mostram-se fortemente relacionadas com parâmetros clínicos periodontais, como perda de inserção e sangramento gengival à sondagem

Verma *et al.* (2010) testou a hipótese de *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* apresentarem fatores de virulência quando em sinergismo. E examinou parâmetros de inflamação periodontal, padrões de resposta imune, indução de reabsorção óssea alveolar e interações de virulência. Em se estudo foram utilizados

modelos de infecções microbianas em ratos que foram infectados individualmente com essas duas bactérias e através da mistura delas por 7 e 12 semanas. Foi realizado o PCR, que detectou mais DNA de *Porphyromonas gingivalis* do que *Treponema denticola*. Ambas as bactérias exibiram grandes quantidades de anticorpos (IgG, IgG2b, IgG1, IgG2), que indicou a estimulação da resposta imune. Avaliações radiográficas indicaram que a reabsorção do osso alveolar em infecções mono ou mistas foram grandes no período de 7 e 12 semanas, quando comparadas com os grupos controles ($p < 0,05$). Histologicamente, houve maior migração do epitélio juncional nas infecções mistas, quando comparadas com as monoinfecções, o que mostra o caráter intenso da resposta inflamatória que é característico da doença periodontal. Os resultados mostraram que *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* não exibiram fatores de virulência quando em sinergismo nas doenças periodontais induzidas em ratos.

Em geral, o tratamento periodontal consiste da raspagem e do alisamento radicular. Uma raspagem subgingival efetiva diminui a população de bactérias Gram negativas enquanto, concomitantemente, permite o aumento de Gram positivos, que esta mais associado a saúde gengival (Cobb, 2002).

Cugini *et al* (2000) mostraram que raspagem e alisamento radicular resulta em significativa diminuição de DNA de espécies subgingivais de *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* e *Treponema denticola*. Concomitantemente com a diminuição dessas bactérias, houve um aumento de *Actinomyces sp.*, *Capnocytophaga sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mitis* e *Veillonella parvula*. Resultados similares mostrando a diminuição nos níveis de *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella denticola* também têm sido mostrado por Lowenguth *et al.* (1995).

Porphyromonas gingivalis e *Treponema denticola*, bactérias pertencentes ao complexo vermelho, têm sido associadas a uma resposta pobre frente ao tratamento de raspagem e alisamento radicular (Haffajee & Socransky 1994; Chave *et al.* 2000)

Chaves *et al.* (2000) demonstraram que lesões periodontais que apresentavam *Porphyromonas gingivalis* em 1, 3 e 6 meses após o tratamento inicial demonstraram perda adicional de tecido ósseo, enquanto que nos casos onde este patógeno estava ausente, após o tratamento houve tendência a recuperação de estrutura óssea. A

ausência de *Porphyromonas gingivalis* no início do tratamento sugere que o sítio não apresentará perda óssea após a terapia periodontal.

O padrão de distribuição de *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermédia/nigrescens* após terapia periodontal foi demonstrado por Mombelli *et al.* (2000), em 17 pacientes com periodontite, através de amostras de biofilme subgengival. As duas espécies de microrganismos apresentaram diferentes padrões de persistência. A *Porphyromonas gingivalis* foi detectada em 59% dos indivíduos, mas em baixa proporção nos sítios (5,4%). A *Prevotella intermédia/nigrescens* mostrou forte relação em sítios com sangramento, não sendo detectada em um único indivíduo, com 40,6% dos sítios positivos para essa espécie. Os autores concluíram que se após o tratamento mecânico padrão, um grande número de sítios continuaram sangrador, pode-se esperar número elevado de sítios positivos para *Prevotella intermédia/nigrescens* e se muitas bolsas profundas persistirem, um maior número de sítios *Porphyromonas gingivalis* positivos.

2.6.4 Microbiologia Endodôntica-Periodontal

Enquanto o efeito das alterações pulpares sobre o periodonto está bem documentado na literatura, o efeito da doença periodontal na polpa tem sido menos avaliado e requer mais investigações, uma vez que a microbiota é similar nas duas lesões, com destaque para as bactérias anaeróbias (Kipioti *et al.*, 1984; Kobayash *et al.*, 1990; Kurihara *et al.*, 1995; Sundqvist, 1992).

Em geral, existem mais espécies de microrganismos em bolsas periodontais do que em sistemas de canais radiculares infectados e, a microbiota de canais radiculares infectados que apresentam doença periodontal concomitante é mais complexa do que em dentes com patologia confinada apenas à região periapical. Assim, a bolsa periodontal pode ser uma fonte de bactérias para o canal radicular ou vice-versa. (Abbott & Salgado, 2009)

Kipioti *et al.* (1984) examinando a microbiota periodontal e endodôntica de 6 dentes necrosados, com coroas clínicas intactas, sem lesões periapicais e com bolsas

periodontais profundas, demonstraram que a microbiota de canais radiculares era similar àquela encontrada nas bolsas periodontais adjacentes. Os organismos mais frequentemente isolados em ambos os locais foram *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia*, *Peptostreptococcus* spp, *Capnocytophaga* spp, *Actinomyces* spp e *Streptococcus* spp. Os autores sugeriram que a bolsa periodontal poderia ser a possível fonte de infecção dos canais radiculares, causando assim, danos ao tecido pulpar. Esse fato também dependia da severidade da doença periodontal, presença de canais laterais e histórico de terapia periodontal no sitio infectado.

Kobaayshi *et al.* (1990) mostraram que dentes com necrose pulpar associada a bolsas periodontais de 6 a 12mm de profundidade que atingiam o forame apical, apresentavam bactérias predominantes como *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Bacteróides* e *Streptococcus*. Esses microrganismos anaeróbios foram comuns a ambos os sítios. Dados semelhantes foram encontrados por Kerekes & Olsen (1990), que analisaram a similaridade entre as microbiotas endodôntica e periodontal de dentes intactos, sem lesão periapical, mas com comprometimento periodontal.

Kurihara *et al.* (1995) estudaram a microbiota de canais radiculares necrosados sem cárie e bolsas periodontais de 5 pacientes com lesões endopéριο. Os autores encontraram mais microrganismos nas bolsas periodontais que nos canais radiculares, sendo que a microbiota das bolsas periodontais consistia principalmente por bacilos e cocos. Espiroquetas foram encontradas apenas nas bolsas periodontais. As espécies bacterianas mais encontradas nos canais radiculares foram *Peptostreptococcus* e *Streptococcus* (cocos Gram-positivos) e *Actinomyces* e *Rothia* (bacilos Gram-positivos). As bactérias mais encontradas nas bolsas periodontais foram bastonetes anaeróbios facultativos e obrigatórios (Gram-negativos e positivos), *Campylobacter* spp, *Fusobacterium* spp, *Peptostreptococcus productus* e *Peptostreptococcus* spp, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans* e spp. O número de bactérias na bolsa periodontal foi maior do que no canal radicular e, as bactérias que eram predominantes na bolsa nem sempre foram as mesmas que prevaleceram no canal . Tal fato é explicado pela diferenças de nichos ecológicos presentes nas duas estruturas.

Bogen & Slots (1999) usaram o método PCR para detectar a presença de *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia* e *Prevotella nigrescens* em 20 lesões periapicais fechadas; com ausência de infiltração coronária na restauração ou cárie dental, bolsa periodontal maior que 4 mm, mobilidade dentária, fístula, fraturas verticais ou comunicação com o seio maxilar; associados a infecções endodônticas persistentes, sintomáticas e assintomáticas. *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella nigrescens* e *Prevotella intermédia* não foram detectadas em nenhuma das lesões periapicais estudadas. *Porphyromonas gingivalis* foi isolada em apenas uma lesão periapical que estava associada à dor moderada. Segundo esses autores, BPPN não parecem ser os principais constituintes da microbiota de lesões periapicais de dentes aparentemente não expostos à contaminação oral, ao contrário do que ocorre em infecções periapicais agudas, o que poderia explicar a natureza relativamente estável e crônica da doença.

Berber (2009) identificou a microbiota dos canais radiculares e bolsas periodontais pelos métodos de cultura e PCR. O DNA bacteriano das amostras foi extraído e “primers” específicos para *Treponema denticola*, *Treponema socranskii*, *Gemella morbillorum*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia*, *Prevotella tanneriae*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Filifactor alocis*, *Parvimonas micra* foram utilizados para detecção destas espécies por PCR. Concluiu-se que, os canais radiculares e as bolsas periodontais de dentes com comprometimento pulpar e bolsa periodontal apresentaram-se infectados com uma combinação de espécies de microrganismos formada principalmente por bactérias anaeróbias estritas e facultativas Gram positivas.

Pereira *et al.* (2011) avaliaram a presença de microrganismos presentes em lesões endoperio, determinando a diversidade genética presente nas bolsas periodontais e nos canais radiculares e avaliando a colonização simultânea nos dois sítios através de clones únicos. Os pacientes selecionados não eram fumantes e apresentavam polpa necrosada, lesão periapical, doença periodontal crônica, ausência de doença sistêmica, presença de inflamação periodontal, bolsas maiores que 5mm e perda óssea. Vinte e sete amostras de ambos os sítios foram realizadas e a presença

dos microrganismos *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia*, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas endodontalis* e *Tannerella forsythia* foi detectada através do PCR. Os resultados mostraram que *Prevotella intermedia* foi a espécie mais prevalente em bolsas periodontais, enquanto *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermédia* foram mais prevalentes em canais radiculares. 18% das amostras mostraram colonização simultânea de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas endodontalis* nos sítios pulpar e periodontal.

2.7 ENDOTOXINAS

Um espaço infectado contém muitos fatores biológicos, incluindo células inflamatórias, tecido necrótico e bactérias. A parede celular de bactérias gram-negativas contém endotoxinas que são lipopolissacarídeos (LPS) com ação citotóxica potencial e que são produzidas durante a multiplicação ou morte bacteriana.

Muito se tem estudado sobre o mecanismo de ação das endotoxinas. Uma vez que, estando livres para agir, as endotoxinas não ocasionam lesões celulares ou teciduais diretamente, mas sim estimulam células competentes a liberarem mediadores químicos (Seltzer & Farber, 1994).

São antígenos não específicos que são fracamente neutralizados pelos anticorpos e frequentemente relacionados à causa e manutenção das lesões periapicais. (Nelson-Filho *et al.*, 2002).

Quimicamente, o LPS é composto por três segmentos covalentemente ligados: o Lipídio A, o Core e o Antígeno O. O antígeno O é constituído por uma cadeia de unidades repetidas de oligossacarídeos, que são específicas e determinam a identidade sorológica de bactérias específicas. No entanto, o lípido A é o principal responsável pela atividade endotóxica e maior fonte de bioatividade do LPS. Sua estrutura primária é bem conservada entre as diferentes espécies de bactérias Gram-negativas. (Oliveira *et al.*, 2005)

O mecanismo de colapso LPS é por meio de hidrólise alcalina das ligações éster no lípido A. A estrutura lipídica consiste de várias ligações ésteres de ácidos graxos e,

cada uma dessas ligações tem o potencial para sofrer hidrólise na presença de condições alcalinas (Buck *et al.*, 2001).

Estudos sugerem que as endotoxinas são o principal fator etiológico envolvido na patogênese da inflamação pulpar e periapical, incluindo a reabsorção óssea (Oliveira *et al.*, 2005; Seltzer & Farber, 1994). Esses possíveis danos causados pelo LPS deixam evidente a necessidade de que sejam avaliadas substâncias utilizadas na prática endodôntica, quanto à capacidade de neutralização do LPS

As endotoxinas não agem diretamente sobre os órgãos, mas através da ativação do sistema imune. Dessa forma, são responsáveis por vários efeitos biológicos importantes, como: quimiotaxia de neutrófilos, ativação do sistema complemento, indução de febre, alterações estruturais, funcionais e metabólicas em diversos órgãos e células; modificações hemodinâmicas; ativação de linfócitos B policlonal; ativação de macrófagos e liberação de vários mediadores inflamatórios tais como fator de ativação de plaquetas, fator de necrose tumoral, interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), leucotrienos, superóxido, leucócitos polimorfonucleares, óxido nítrico e prostaglandina; atração por osteoclastos; aumento de substâncias vasoativas e neurotransmissores nas terminações nervosas nas áreas de lesão potencializando a sensação de dor; complicações mais sérias como sepse, que é uma complicação de pelo menos 50-60% das bacteremias por bactérias Gram-negativas e pode levar a óbito; e reabsorção óssea (Nissan *et al.*, 1995; Nakane *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 2002; Rangel-Frausto, 2005)

O elevado peso molecular da endotoxina pode ser um fator que determina sua passagem mais devagar através da dentina. Além disso, elas podem se ligar à dentina, limitando sua penetração. A permeabilidade da dentina varia largamente de um dente para o outro, devido a depósitos presentes nos túbulos dentinários, comprimento, diâmetro, densidade, direção, e presença ou ausência de esclerose dentinária. A endotoxina pode atravessar a dentina através dos túbulos dentinário, e dessa forma, os produtos bacterianos se tornam potencialmente capazes de atingirem a polpa (Nissan *et al.*, 1995).

Bergenholtz & Lindhe (1978) demonstraram que a aplicação de bactérias e seus subprodutos em uma dentina exposta pode induzir a inflamação na polpa subjacente, o

que indica que são provavelmente produtos bacterianos capazes de se difundir para a polpa. No entanto, não foi determinado se a endotoxina entrou efetivamente na polpa. Warfvinge *et al.* aplicaram endotoxina em cavidades Classe V de macacos e observaram um acúmulo de neutrófilos na polpa. Estes resultados sugerem que a endotoxina difundiu para a polpa e ativou o sistema complemento, produzindo assim C5a que é um fator quimiotático para neutrófilos.

Moore *et al.* (1986) mostraram que 99% dos LPS podem ser removidos por suaves procedimentos, sugerindo que o desbridamento radicular pode ser alcançado por outros métodos que não a instrumentação manual tradicional.

Horiba *et al.* (1990) estudaram a distribuição de endotoxinas nas paredes dentinárias de canais radiculares infectados e sadios. Amostras da parede dentinária da superfície pulpar até o lado cementário de 30 dentes extraídos (5 sadios e 25 com canais infectados) foram preparadas por um método abrasivo. As raízes foram seccionadas vertical e transversalmente de modo a se obter blocos de raiz com aproximadamente 1 mm. Através do método abrasivo, foi obtido pó de dentina de cada espécie, que foi posteriormente medido. Água apirogênica (1 ml) foi adicionada ao pó de dentina e o conteúdo de endotoxina foi extraído das amostras com ácido cítrico e um método colorimétrico foi utilizado para quantificá-las. O conteúdo de endotoxina foi significativamente maior nas amostras da superfície pulpar (30 µm de profundidade) dos dentes com canais radiculares infectados que nas amostras da parede cementária. O conteúdo de endotoxina das amostras de dentes com áreas periapicais radiolúcidas foi significativamente maior que nos dentes com áreas periapicais normais.

Nissan *et al.* (1995) estudaram a capacidade de endotoxina bacteriana em se difundir através da dentina humana. Eles concluíram que a endotoxina foi capaz de passar através de 0,5 mm de dentina em um período que variou de 15 min a 4 h ½, podendo atingir a região periapical mais rápido (23 dias) do que as bactérias (62 dias). Dessa forma, a dentina pode agir como barreira semi-permeável, permitindo assim a passagem de produtos bacterianos para a polpa.

Khabbaz *et al.* (2001) determinaram a presença ou ausência e a quantidade de endotoxinas nas camadas superficiais e profundas de lesões cariosas de dentes

sintomáticos e assintomáticos com tecido pulpar vital. Quantidades iguais (aproximadamente 6 mg) de dentina cariada (superficial e profunda) foram retiradas sob condições assépticas de dentes sintomáticos com pulpíte irreversível (n=9) e dentes assintomáticos com pulpíte reversível (n=11). Os resultados indicaram que endotoxinas estavam presentes nas camadas superficial e profundas das cáries de todos os dentes sintomáticos com pulpíte irreversível, sendo a quantidade de endotoxinas significativamente maior nas camadas superficiais em relação às camadas profundas. Quantidades significativamente maiores de endotoxinas estavam presentes nas camadas superficiais e nas camadas profundas de dentina cariada de dentes sintomáticos em relação aos dentes assintomáticos. Na dentina saudável nenhuma endotoxina foi detectada. Eles demonstraram a presença de endotoxinas na polpa vital de dentes sintomáticos e assintomáticos

Oliveira *et al.* (2005) avaliaram a habilidade da endotoxina em difundir-se pelos túbulos dentinários e o tempo necessário para alcançar a superfície radicular externa. Trinta dentes humanos extraídos tiveram suas coroas e ápices removidos, antes que seus canais fossem preparados. Posteriormente tiveram sua superfície externa impermeabilizada com adesivo epóxi, deixando-se 10 mm da raiz exposta (terço médio). Foram divididos em dois grupos: 1) solução de endotoxina inoculada no canal radicular dos espécimes e 1 ml de água apirogênica; 2) água apirogênica inoculada nos canais e 1 ml de água apirogênica. Após 30 minutos, 2 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h e 7 dias, a água do interior dos tubos foi removida e substituída por outra. A alíquota removida foi testada para detectar a presença de endotoxina através da produção de anticorpos (IgM) em cultura de linfócitos B, pois a endotoxina é um ativador policlonal dessas células. Os resultados mostram que a água removida dos tubos após 24 h, 48 h, 72 h e 7 dias induziu maior produção de anticorpos em relação aos demais grupos, com diferença significativa ($p < 0,05$). Assim, a endotoxina foi capaz de se difundir pelos túbulos dentinários em direção ao cimento, atingindo a região externa da raiz após 24 horas.

O ácido lipoteicoico (LTA) é um componente da parede celular de bactéria Gram positiva e apresenta as mesmas características do LPS, principalmente a de se difundir

pelos túbulos dentinário. Porém, Hahn & Liewehr (2007) afirmaram que a espessura de dentina remanescente e permeabilidade dentinária são os fatores mais importantes que determinam a resposta inflamatória pulpar. A espessura da dentina pode reduzir grandemente a concentração de proteínas bacterianas e a quantidade de LPS que atinge a polpa

Estes dados podem ser de grande importância na prática endodôntica, uma vez que sugerem que os túbulos dentinários podem servir de reservatórios de LPS. Endotoxinas, se não eliminadas durante o tratamento, pode difundir através dos túbulos dentinários, voltar para o canal ou penetrar em materiais de obturação, atingindo tecidos periapicais e induzindo ou mantendo uma lesão periapical. Deste modo, devido à profundidade de difusão de endotoxinas no interior dos túbulos dentinários, o uso concomitante de agentes de irrigação e de medicamentos intracanaís, com capacidade de desintoxicar o LPS pode garantir o sucesso do tratamento endodôntico.

Pitts *et al.* (1982) investigaram o papel da endotoxina na inflamação periapical em cães. Doze dentes foram instrumentados ao nível do delta apical e os quatro dentes restantes foram submetidos ao arrombamento apical. Em metade dos canais radiculares de cada grupo foram injetados 0,1 ml de endotoxina e nos canais do grupo controle, solução salina estéril. Semanalmente, por quatro semanas no primeiro grupo e cinco no segundo grupo, as soluções (endotoxina e salina) foram renovadas no interior dos canais radiculares. As alterações radiográficas periapicais ocorridas foram mais severas nas raízes contendo endotoxinas do que nas raízes contendo SS. A avaliação histológica também demonstrou maior destruição óssea periapical e maior resposta inflamatória nos espécimes contendo endotoxinas. Os autores concluíram que as endotoxinas podem ter um papel de fundamental importância na inflamação periapical e na destruição óssea

Jiang *et al* (2003) investigaram os mecanismos que levam o LPS de bactérias Gram negativas a causar destruição dos tecidos periapicais, analisando o papel dos peptidoglicanos e o sinergismo dos peptidoglicanos e LPS na formação dos osteoclastos. Análise de PCR foi feita para examinar a presença de receptores nos osteoclastos conhecidamente envolvidos na ativação de mediadores celulares em

resposta aos peptidoglicanos e LPS. Na presença de peptidoglicanos houve um estímulo para gerar a formação de células osteoclásticas multinucleadas. Peptidoglicanos e LPS apresentaram um efeito sinérgico na formação de osteoclastos, não só em baixas como em altas concentrações, sendo que nestas houve indução de uma quantidade máxima de formação de osteoclastos. Os resultados evidenciaram a importância de se considerar tanto as bactérias Gram-negativas quanto as Gram-positivas quando se interpreta os achados associados com lesões periapicais primárias e secundárias.

Jacinto *et al.* (2005) quantificaram a presença de endotoxinas e correlacionaram a presença de bactérias específicas e a quantidade de endotoxinas com os sinais e sintomas de origem endodôntica. Amostras microbiológicas foram coletadas de 90 canais radiculares com polpa necrosada e processadas por meio de técnicas microbiológicas. Outras 50 amostras foram obtidas de canais radiculares necrosados, sintomáticos e assintomáticos para realização do teste cromogênico para quantificação das endotoxinas. Um total de 400 isolados clínicos foi encontrado, os quais pertenciam a 69 diferentes espécies e 22 diferentes gêneros, sendo que 80% das bactérias eram anaeróbias estritas e *F. nucleatum* foi a espécie predominante. Canais radiculares de dentes sintomáticos apresentaram uma predominância de anaeróbios estritos e um número maior de espécies por canal radicular em relação aos dentes assintomáticos. Foi observada uma relação entre grupos microbianos específicos, principalmente anaeróbios Gram-negativos e a presença de dor espontânea ou dor prévia, dor à percussão, dor à palpação e edema. Endotoxinas foram encontradas em altas concentrações em canais radiculares de dentes sintomáticos e houve uma correlação positiva entre os sinais e sintomas e a concentração de endotoxinas.

Martinho & Gomes (2008) quantificaram endotoxinas e bactérias cultiváveis em dentes com necrose pulpar e periodontite apical, antes e após o PQM. Vinte e quatro canais radiculares foram selecionados e foram realizadas coletas antes (S1) e após o preparo (S2). Os resultados demonstraram na coleta S2, a média de redução de endotoxina foi 59,99 % e a redução bacteriana foi de 99,78 %. Os autores concluíram que o PQM foi moderadamente efetivo contra bactérias, mas menos efetivo contra endotoxinas presentes na infecção radicular.

Simon *et al.* (1971), avaliando 19 casos sintomáticos, encontrou uma correlação estatisticamente significativa entre a quantidade de endotoxinas em exsudatos gengivais e o grau clínico da inflamação gengival

Poucos estudos avaliam o efeito citotóxico do LPS sobre células pulpares humanas, como linfócitos, ligamento periodontal, fibroblastos e outros, principalmente pela produção de citocinas, que são mediadores de inflamação. Dessa forma, Nakane *et al.* (1995) analisaram células pulpares humanas a partir da exposição delas a várias concentrações de LPS, medindo o conteúdo de DNA, de proteínas e da atividade da fosfatase alcalina das células. Grandes quantidade de fosfatase alcalina são encontradas em odontoblastos na polpa quando as células estão ativas em calcificações ou quando a polpa se apresenta inflamada. Na concentração de 1µg/mL, o LPS não causou mudanças na produção de DNA e proteínas, enquanto que essa quantidade de DNA aumentou nas concentrações de 10µg/mL e 100µg/mL. Nessas mesmas concentrações, houve redução na produção de proteínas. Em relação a atividade da fosfatase alcalina, não houve mudanças em nenhuma das concentrações de LPS testadas. Os autores concluem que não houve nenhum efeito do LPS na diferenciação de células humanas pulpares, mas que ele estimula essas células a produzirem citocinas, como a interleucina-1, interleucina-6 e fator de necrose tumoral, que são mediadores da inflamação.

Pinero *et al.* (1983) relataram que um elevado nível de LPS foi obviamente tóxico para o tecido conjuntivo contendo fibroblastos e matriz extracelular, e iria resultar em necrose do tecido.

O Lisado de Amebócito *Limulus* (LAL) é usado para detecção de endotoxinas bacterianas associadas com bactérias Gram-negativas. O lisado é preparado através do amebócito circulante do caranguejo em forma de ferradura *Limulus polyphemus*. O uso do LAL envolvido na detecção de endotoxinas bacterianas foi observado inicialmente por Bang (1956) através de uma infecção de bactérias Gram-negativas no caranguejo *Limulus polyphemus* que resultou em uma coagulação intravascular fatal. Mais tarde demonstraram que esta coagulação foi o resultado de uma ação entre a endotoxina e uma proteína coagulável presente no amebócito circulante do sangue do *Limulus*. Seguindo o desenvolvimento de um anticoagulante adequado para o sangue do

Limulus, prepararam um lisado do lavado do amebócito que foi um indicador extremamente sensível à presença de endotoxina (Levin & Bang, 1964).

2.8. CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

Citocinas são moléculas protéicas, glicosadas ou não, que enviam sinais estimulatórios, modulatórios, ou mesmo inibitórios para diferentes células do sistema imunológico (Varella & Forte, 2001)

Os mediadores inflamatórios induzidos pelas citocinas pró-inflamatórias sensibilizam as fibras C na polpa dentária, justificando por que algumas cáries profundas causam dor prolongada nos testes de calor (Hahn & Liewehr, 2007).

Microrganismos Gram-negativos não só têm diferentes fatores de virulência como também contêm endotoxina em sua parede celular. A sua ação sobre os macrófagos provoca a liberação de uma série de células inflamatórias, bioativas, de mediadores químicos, ou citocinas, tais como o fator de necrose tumoral (TNF) e as interleucinas 1, 6 e 8 (Silva *et al.* 2002).

Porphyromonas gingivalis, um bacilo Gram-negativo e anaeróbio assacarolítico, é amplamente reconhecido como um importante membro das bactérias periodontopatogênicas. A patogenicidade de *P. gingivalis* é atribuído a um grupo de fatores de virulência potenciais. Entre eles, as fímbrias são consideradas um fator de virulência importante para a iniciação e progressão da doença. Essas fímbrias finas e filamentosas são células de superfície de estruturas que facilitam a adesão das bactérias a superfícies revestidas de saliva de hidroxiapatita, moléculas salivares, várias proteínas da matriz extracelular, e células de mamíferos, tais como células epiteliais bucais e fibroblastos, o que resulta na liberação de citocinas e moléculas de adesão celular, tornando-as estimuladoras potentes da inflamação (Wang *et al.*, 2010).

Sabe-se que o LPS tem um efeito citotóxico em várias células, como linfócitos, ligamento periodontal e outros. E, estimula a produção de citocinas tais como a interleucina-1, IL-6 e fatores de necrose tumoral, que são mediadores de inflamação. Dessa forma, é muito útil investigar a relação entre LPS e da liberação de citocinas em células pulpares humanas (Nakane *et al.*, 1995).

LPS é um dos principais fatores de virulência da *Prevotella intermédia*, microrganismo associado com o início das doenças pulpares e periodontais. Pelt *et al* (2002) realizaram um estudo in vitro para examinar os efeitos do LPS da *P. intermédia* na formação óssea e na liberação de mediadores osteolíticos por osteoblastos de feto de rato em 0, 1, 2, 4 e 11 dias. Após cada um desses períodos, foi calculado a atividade da fosfatase alcalina (efeitos na diferenciação celular), a concentração de cálcio (mineralização), a produção de óxido nítrico (um importante fator osteolítico) e Interleucina-6 (IL-6). Foi também caracterizada a liberação de matrix de metaloproteinases por estes osteoblastos. O LPS causou uma diminuição, proporcionalmente à dose aplicada, da atividade da fosfatase alcalina e da incorporação de cálcio na cultura de células do feto de rato, tendo havido 100% de inibição com 25µg/ml de LPS. O tratamento contínuo dos osteoblastos com o LPS causou também um aumento na liberação de óxido nítrico, IL-6 e aumentou significativamente a atividade da matriz de metaloproteinase durante todos os períodos de estimulação. Os resultados indicaram que o LPS da *Prevotella intermédia* não apenas participa da destruição alveolar e reabsorção óssea, como também inibe a formação óssea.

Respostas imunológicas agudas e crônicas potentes, podem ser mediadas por TNF- α , que tem a capacidade de aumentar a reabsorção óssea (Tavares *et al.*, 2012). Segundo Le & Vilcek (1987), de todas as citocinas estudadas, o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), aparece como um dos mais importantes componentes da defesa do hospedeiro mediada por citocinas contra bactérias.

Ataoglu *et al.* (2002) buscaram determinar os níveis de IL-1 β and TNF- α em exsudatos periapicais e avaliar sua relação com achados clínicos e radiográficos. Foram realizadas coletas de 35 canais de dentes unirradiculares. Os níveis de IL-1 β em canais com maiores áreas radiolúcidas (longo eixo \geq 1 cm) foram significativamente

maiores que as lesões de menor tamanho. Houve uma tendência de níveis mais elevados de IL-1 β nos grupos com sintomatologia clínica, mas sem diferenças significantes ($P > 0.05$). Os autores concluíram que níveis de exsudato, para ambas as citocinas estudadas, não refletiram o estado de doença periapical.

A IL-1 β é uma glicoproteína que está estruturalmente relacionada com a IL-1 α . Ambas possuem propriedades pró-inflamatórias, sendo a IL-1 β mais potente. IL-1 β é produzida predominantemente por monócitos/macrófagos, mas também por fibroblastos e células ósseas. A sua produção pode ser induzida por microrganismos e seus subprodutos, agentes inflamatórios e antígenos. Os seus efeitos biológicos incluem a estimulação de linfócitos T, proliferação de linfócitos B e produção de anticorpos, proliferação de fibroblastos, estimulação de prostaglandina (PGE2) fibroblastos, promove a formação de osteoclastos e reabsorção óssea, e gera quimiotaxia e ativação de neutrófilos. Desempenha um papel importantel em doenças crônicas, e é conhecido por ser o estimulador mais ativos da reabsorção óssea (Henriques *et al.*, 2012).

As quantidades de IL-1 β estão intimamente associadas com a severidade da doença periodontal (Goutoudi *et al.*, 2004). O que corrobora com Masada *et al.*, que mostraram que IL-1 β pode servir como um marcador de destruição do tecido periodontal , se apresentando em altos níveis nos tecido gengivais.

Goutoudi *et al.*, 2004 examinaram a concentração do fluido crevicular gengival GCF e quantidades de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β) e antiinflamatórios (IL-10) em pacientes com doença periodontal . O objetivo era correlacionar IL-1b que tem sido relacionada com a patogênese de diferentes graus de destruição periodontal e inflamação, e níveis de GCF que é fortemente influenciado pelo grau de inflamação do tecido periodontal e destruição óssea. Em pacientes com periodontite, foi encontrado uma quantidade significativamente maior de IL-1 β do que em sitios não doentes, mas esses valores reduziram após a terapia periodontal.

Martinho *et al* (2010) demonstraram o alto potencial inflamatório do LPS contra macrófagos na produção de citocinas pro-inflamatórias (IL1- β e TNF- α).

Em seu estudo, Goutoudi *et al.* (2004) determinaram a relação de mRNA com a expressão de IFN γ , TNF- α , IL-1 β , IL-17A, IL-10 e MCP-1 em lesões refratárias ao tratamento endodôntico. Amostras foram coletadas de dentes com lesões periapicais refratárias (grupo experimental) e dentes saudáveis com vitalidade pulpar (grupo de controle). Diferenças significativas nos níveis de IFN-g, TNF- α , IL-17A, MCP-1 e expressão de mRNA foram observadas, em comparação ao grupo controle. A expressão de mRNA de IL-1 β não foi significativamente diferente entre os grupos. A expressão significativamente aumentada de TNF- α , IFN-g, IL-17A, e MCP-1 mRNA foi observada na resposta imune periapical, em caso de insucesso endodôntico. Estes resultados sugerem que um perfil de citocina pró-inflamatória predomina nestes tipos de lesões dentárias.

PGE2 está relacionada com a maior parte das alterações inflamatórias e destrutivas, tais como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, degradação do colágeno, e reabsorção óssea, e é relatada na polpa dentária humana inflamada (Martinho *et al.* 2011)

Martinho *et al.* (2011) coletaram amostras de 21 canais radiculares com infecção primária e periodontite apical. *Prevotella nigrescens* (13/21), *Fusobacterium nucleatum* (6/21), e *Porphyromonas endodontalis* (6/21) foram as espécies mais freqüentes. Uma associação positiva foi encontrada entre *F. nucleatum* e *P. endodontalis* ($P < 0,05$). Foi encontrada uma relação entre o número de espécies gram-negativas e os níveis de endotoxina, bem como PGE2 ($P < .05$).

O ácido lipoteicoico (LTA) é liberado extracelularmente por bactérias Gram-positivas e podem se difundir para a polpa e causar respostas imunológicas. LPS e LTA ativam o sistema imune do hospedeiro por mecanismos semelhantes. Ambos se ligam a CD14 e induzem citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), interlukin-8 (IL-8), interleucina-12 (IL-12), e das citocinas anti-inflamatórias interleucina-10 (IL-10). Em geral, as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são semelhantes na indução de IL-1, mas Gram-positivas são indutoras mais potentes de IL-12 e TNF- α do que bactérias gram-negativas (Hahn & Liewehr, 2007)

A PGE2 aumenta a resposta de dor causada pela bradicinina, além de favorecer a reabsorção óssea causada pela IL-1 β e TNF- α . Devido à elevada toxicidade de

espécies gram-negativas e seus subprodutos (endotoxina) sobre a estimulação de macrófagos e liberação de citocinas pró-inflamatórias, a remoção dessas citocinas dos canais radiculares infectados durante o tratamento endodôntico parece ser importante para o processo de cicatrização dos tecidos periapicais (Martinho *et al.* 2011).

Tavares *et al.* (2012) avaliaram e compararam a influência de hidróxido de cálcio no líquido intersticial periapical dos canais radiculares humanos. Níveis de interferon gama (IFNg), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina IL-1 β , IL-17A e IL-10, bem como a quimiocina MCP-1 foram testadas em reação em cadeia da polimerase imediatamente após a limpeza do canal radicular e 15 dias depois. O nível de IL-1 β , IFN-g, IL-10 foram aumentados em dentes sem medicação. Com hidróxido de cálcio entre as sessões, não houve nenhuma alteração estatisticamente significativa. No entanto, quando se comparam os dentes que receberam a medicação com aqueles que não receberam, os níveis de expressão de IL-1 β , IFN-g e IL-10 foram estatisticamente inferiores nos dentes que receberam o hidróxido de cálcio. Dessa forma, os autores demonstraram os benefícios do hidróxido de cálcio como medicação intracanal porque impediu o crescimento de todos os mediadores durante o tempo experimental.

2.9. PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO E USO DE MEDICAÇÃO INTRACANAL NA REDUÇÃO DE MICRORGANISMOS

Um importante objetivo do tratamento endodôntico é a eliminação das bactérias do sistema de canais radiculares por meios mecânicos e químicos e uma ampla variedade de agentes antimicrobianos tem sido usada para esse propósito (Safavi & Nichols, 1993). Entretanto, é possível que mesmo que as bactérias sejam removidas do canal radicular, endotoxinas capazes de manter ou induzir periapicopatias possam permanecer, interferindo no sucesso do tratamento endodôntico. Dessa forma, o tratamento do canal radicular infectado não deve se restringir apenas à morte bacteriana, mas também visar a inativação da endotoxina (Silva *et al.*, 2002), o que ocorre através do PQM auxiliado pelo uso de medicação intracanal.

Ingle e Zeldow (1958) observaram que imediatamente após a instrumentação, utilizando solução salina estéril como irrigante, 80% dos canais radiculares infectados apresentaram culturas positivas. Avaliando 48 h, este número aumentou para 95,4%.

Sundqvist & Bystrom (1981) mostraram a importância do preparo químico mecânico na redução microbiana. Em seu trabalho, eles instrumentaram 17 canais radiculares infectados com limas manuais de aço inoxidável, utilizando apenas solução salina, sem o uso de substâncias irrigadoras antimicrobianas ou medicações intracanaís. Eles mostraram que a redução bacteriana foi bastante considerável nesses casos onde não houve uso de substâncias antimicrobianas.

Orstavik & Molven (1991) e Byström & Sundqvist (1981), mostraram que a ação mecânica da instrumentação sem uso de substâncias antimicrobianas foi eficaz na redução bacteriana no interior de canais radiculares. No entanto, a eliminação total de bactérias não foi observado na maioria dos casos.

Gomes *et al.* (1996a) avaliaram as variações na susceptibilidade da microbiota endodôntica aos procedimentos biomecânicos. Quarenta e dois canais radiculares foram investigados, amostras foram coletadas antes e após a instrumentação e os microrganismos comparados. Em 15 casos de infecções primárias não foram observadas mudanças na microbiota. Entretanto, nos 27 casos de infecções secundárias houve uma redução no número de *Peptostreptococcus*. Quando os 42 casos foram avaliados conjuntamente houve um declínio no número de anaeróbios, espécies Gram-positivas, especialmente *Peptostreptococcus* após o procedimento biomecânico. Os autores concluíram que algumas espécies foram mais resistentes ao preparo biomecânico

Dalton *et al.* (1998) compararam a redução bacteriana através da instrumentação com limas de NiTi e limas manuais de aço inoxidável. Foram selecionados 48 dentes com periodontite e amostras microbiológicas foram realizadas antes, durante e após a instrumentação. A redução bacteriana foi similar independentemente da técnica ($p < 0,0001$). Os resultados deste estudo indicaram que ambas as limas não foram significativamente diferentes na sua capacidade em reduzir as bactérias intracanaís.

Siqueira *et al.* (1999) avaliaram “*in vitro*” a redução da população bacteriana pela ação mecânica da instrumentação e irrigação. Os canais radiculares foram inoculados com uma suspensão de *Enterococcus faecalis* e instrumentados com limas manuais Nitiflex, limas Greater Taper (GT) e instrumentos rotatórios Profile 0,06. A irrigação foi realizada com solução salina estéril. Amostras foram coletadas antes e após a instrumentação. Todas as técnicas e instrumentos testados foram capazes de reduzir significativamente o número de células bacterianas no canal radicular. Os resultados deste estudo mostraram que a instrumentação mecânica reduz 90% de bactérias presentes no interior dos canais radiculares.

Vianna *et al.* (2006) avaliaram *in vivo* a redução microbiana após o PQM em canais radiculares de dentes humanos com polpas necrosadas e lesões periapicais. Foram selecionados 32 dentes unirradiculares, os quais foram instrumentados com auxílio da clorexidina gel (2%) ou NaOCl (2,5%). Os resultados mostraram que tanto o grupo da clorexidina como o do hipoclorito de sódio foram capazes de reduzir substancialmente a quantidade de microrganismos no interior dos canais radiculares acima de 96%. Entretanto, o grupo instrumentado com NaOCl apresentou maior número de canais livres de microrganismos do que o grupo da clorexidina. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio apresentou maior capacidade de eliminar microrganismos presentes nos canais radiculares de dentes com infecções primárias.

Martinho & Gomes (2008) mostraram que o PQM com NaOCl 2,5% foi moderadamente eficaz contra bactérias, mas menos eficaz contra endotoxinas em infecção do canal radicular. Vinte e quatro canais radiculares foram selecionados e amostras foram coletadas antes (S1) e depois do preparo químico-mecânico (s2). Técnicas de cultura foram utilizadas para determinar as unidades formadoras de colônia e o teste Limulus Amebocyte Lysate (LAL) foi utilizado para quantificar endotoxinas. LPS e bactérias foram detectados em 100% das amostras iniciais (s1), com uma concentração média de 139 unidades de endotoxina / mL e 105 unidades formadoras de colônias / ml respectivamente. A média na redução de endotoxinas foi de 59,99% e a média na redução da carga bacteriana foi de 99,78%.

No entanto, a instrumentação produz uma camada que cobre os túbulos dentinários e é conhecida por smear layer. É uma camada irregular amorfa, contendo detritos inorgânicos de dentina, orgânicos como tecido pulpar, processos odontoblásticos, restos necróticos, microrganismos e seus subprodutos. A smear layer se adere às paredes do canal radicular e poder ocluir parcialmente ou completamente os túbulos dentinário. Assim, bactérias contidas no interior dos túbulos dentinários podem contribuir para o desenvolvimento ou a persistência de inflamação (Torabinejad et al. 2002; Ballal et al. 2009; Mello et al 2010). Essas partículas também podem se tornar compactadas ao longo de toda a superfície das paredes dos canais, aumentando o risco de "contaminação" bacteriana, e reduzindo a adaptação da guta-percha (Bowman & Baumgartner 2002). Além disso, podem ser compactados apicalmente, criando um tampão apical que impede a completa limpeza e obturação desta região. Assim, a remoção dessa camada se torna indispensável para o sucesso da terapia endodôntica, sendo os agentes quelantes, as substâncias mais eficazes para sua remoção (Iqbal et al. 2003; Shahravan et al. 2007).

O EDTA é o agente quelante mais eficaz na remoção da smear layer, com propriedades lubrificantes proeminentes e amplamente utilizados em endodontia. É usado para ampliar canais radiculares, remover a smear layer, e preparar as paredes dentinárias para melhor aderência de materiais obturadores (Carvalho et al. 2008.)

Çalt & Serper (2002) avaliaram os efeitos do EDTA na remoção de smear layer após 1 e 10 min de aplicação. Seis dentes unirradiculares foram instrumentados até a lima # 60. Os terços apical e coronário de cada raiz foram removidos e depois cortados longitudinalmente em duas partes iguais. Utilizando 10 ml de solução de EDTA 17%, as metades pertencentes à mesma raiz foram irrigadas durante 1 e 10 min, respectivamente. Todas as amostras foram submetidas para irrigação com 10 ml de NaOCl a 5%. Em seguida, todas as amostras foram preparadas para avaliação no MEV. Os resultados mostraram que 1 minuto de irrigação com EDTA é eficaz na remoção da camada de esfregaço. No entanto, um 10 min causou erosão peritubular excessiva. Os autores sugerem que o EDTA não deve ser usado por mais de 1 min.

Foschi *et al.* (2004) compararam, através da microscopia eletrônica de varredura as paredes dos canais radiculares após instrumentação *in vitro*, com dois diferentes instrumentos rotatórios de NiTi. Foram selecionados vinte e quatro dentes humanos unirradiculares e dois tipos de instrumentos de NiTi, Mtwo (Suécia e Martina, Padova, Itália) e ProTaper (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça). A irrigação para ambos os grupos foi realizada após cada troca de instrumento com NaOCl a 5%, H₂O₂ 3% e soluções de EDTA 17% e três áreas diferentes (terços coronário, médio e apical) do canal radicular foram avaliados. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,01$) foi encontrada entre o terço apical e médio e terços coronais para ambos os grupos. Os autores concluíram que ambos os instrumentos produziram limpeza e remoção de debris da dentina dos terços coronários e médios, mas incapazes de produzir uma superfície de dentina livre de smear layer e detritos no terço apical.

Khedmat & Shokouhinejad (2008) compararam a eficácia de 3 agentes quelantes, SmearClear (Sybron Endo, Orange, CA), EDTA 17% e ácido cítrico 10%, na remoção da smear layer. Foram utilizados quarenta e oito dentes unirradiculares divididos em 4 grupos que foram instrumentados com limas rotatórias de níquel-titânio. Depois, cada canal foi irrigado com uma das seguintes soluções: NaOCl a 5,25% (controle), SmearClear, EDTA 17%, e ácido cítrico 10%. Depois disso, todos os espécimes foram submetidos a irrigação com NaOCl a 5,25%. Os dentes foram avaliados através microscopia eletrônica de varredura e a avaliação foi realizada nos terços coronário, médio e apical. Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas na eficácia dos três agentes quelantes. No entanto, a eficácia do ácido cítrico foi significativamente inferior no terço apical em comparação com os terços cervical e médio. Os autores concluíram que os agentes quelantes utilizados não foram eficientes para remover completamente a smear layer do terço apical.

Ballal *et al.* (2009) avaliaram através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), a capacidade do EDTA 17% e ácido maleico 7% na remoção da smear layer do sistema de canais radiculares. Eles utilizaram oitenta dentes unirradiculares que foram submetidos a instrumentação e irrigados com NaOCl 2,5% depois de cada instrumento. Com base na última irrigação solução, as amostras foram divididas aleatoriamente em

três grupos: (1) EDTA 17% + NaOCl 2,5% (n = 30), (2) ácido maleico 7% + NaOCl a 2,5% (n = 30), e (3) grupo controle: solução salina a 0,9% (n = 20). Após a irrigação final, os dentes foram preparados para análise dos terços coronário, médio e apical. Ambas as substâncias foram igualmente eficientes na remoção da smear layer. No terço apical, o ácido maleico se mostrou significativamente melhor. Os autores concluíram que a irrigação final com ácido maleico 7% é mais eficiente do que o EDTA 17% na remoção da smear layer do terço apical.

Mello *et al.* (2010) verificaram o impacto da irrigação final com EDTA 17% na remoção da smear layer. Eles utilizaram dezesseis dentes humanos unirradiculares que foram instrumentados e divididos em dois grupos: grupo 1- irrigação contínua com EDTA 17% durante 3 minutos e, grupo 2 - irrigação com 1 mL de EDTA durante 2 minutos, lavagem por 30 segundos mais 4 mL por 30 segundos. O grupo 1 apresentou mais detritos quando comparado com o Grupo 2 (P <0,01). Os autores concluíram que 5 ml de EDTA durante 3 minutos, remove de forma mais eficiente a smear layer.

Durante a instrumentação, algumas áreas mais complexas dos canais radiculares, como istmos e ramificações, não são alcançadas pela ação mecânica dos instrumentos. Assim, as substâncias químicas utilizadas como soluções irrigadoras durante o PQM se tornam indispensáveis e auxiliam na redução microbiana. Elas devem apresentar propriedades antimicrobianas e capacidade de lubrificação e limpeza das paredes do canal radicular. O PQM reduz significativamente os microrganismos predominantes na microbiota endodôntica, mas algumas espécies persistentes sobrevivem, devido a essas complexidades anatômicas e porque alguns nutrientes são capazes de favorecer o crescimento destes microrganismos (Gomes *et al.*, 1996a; Siqueira & Lopes, 1999).

A clorexidina gel 2% tem sido um irrigante bastante utilizado por causa do seu espectro antimicrobiano, substantividade, biocompatibilidade e capacidade de lubrificação (Dalton *et al.* 1998). Segundo Ferraz *et al.* (2001), a propriedade física do gel de clorexidina tem feito a diferença. Devido à sua viscosidade, o gel compensa a incapacidade da clorexidina de dissolver o tecido, o que facilita a limpeza do canal radicular. Dessa forma, partículas de detritos e restos de tecido de dentina ficam

aderidos na estrutura do gel, além de favorecer a capacidade lubrificante durante a instrumentação.

Ferraz *et al.* (2001) empregaram o uso da CLX gel como substância química auxiliar no tratamento de canais radiculares. Eles observaram atividade antimicrobiana contra a maioria dos microrganismos comumente encontrados nas infecções endodônticas, além de apresentar capacidade lubrificante durante o preparo mecânico.

Apesar da íntima relação entre a polpa e o periodonto (Toledo *et al.*, 2001; Cardon *et al.*, 2007; Walton & Torabinejad, 1997; Petka, 2000; Wang & Glickman, 2002), pouco ou nada se conhece sobre a possível contribuição do tratamento endodôntico na remissão da doença periodontal crônica, visto que o canal radicular pode atuar como reservatório de microrganismos, mesmo na vitalidade pulpar (Harrington *et al.*, 2002).

Embora as medicações intracanaís não possam substituir o PQM, seu emprego como coadjuvante em situações específicas é indicado (Siqueira & Lopes, 1999). A utilização de uma MIC é considerada por Abbott & Salgado 2009, essencial para o tratamento endodôntico.

O canal radicular pode funcionar como um compartimento de liberação lenta para difusão de drogas para o periodonto e as medicações acondicionadas nele, na tentativa de se difundirem em direção à superfície radicular externa. Dessa forma, exercer ação na dentina radicular contaminada por microrganismos alojados no interior dos túbulos, resultando em um efeito antimicrobiano complementar à terapêutica periodontal (Gomes *et al.*, 2008).

Os objetivos das medicações intracanaís são: promover a eliminação de bactérias que sobreviveram ao PQM, atuar como barreira físico-química contra a infecção ou reinfecção por microrganismos da saliva, reduzir a inflamação perirradicular, solubilizar a matéria orgânica, neutralizar produtos tóxicos, controlar a exsudação persistente, controlar reabsorção inflamatória externa e estimular a reparação por tecido mineralizado (Leonardo, 1998).

O Ca(OH)_2 tem tido um papel importantíssimo na terapia endodôntica por mais de 70 anos, tendo seu uso extremamente difundido no tratamento endodôntico, persistindo até os dias atuais como medicamento mais empregado na prática clínica. O

grupo hidroxila é considerado o componente mais importante do Ca(OH)_2 , pois promove a alcalinização do meio, o que encoraja o reparo e a calcificação ativa. O pH alcalino não apenas neutraliza o ácido láctico dos osteoclastos, prevenindo dessa maneira a dissolução dos componentes minerais da dentina, como também pode ativar a fosfatase alcalina, que tem papel importante na formação de tecido duro. Foi provado que o coeficiente de dissociação do Ca(OH)_2 permite uma liberação lenta e controlada de ambos os íons cálcio e hidroxila, que podem se difundir através dos túbulos dentinários (Carrote, 2004).

Suas propriedades derivam da dissociação em íons cálcio e hidroxila, os quais exercem ação sobre bactérias e sobre os tecidos. Seu efeito antibacteriano estaria ligado à inativação de enzimas bacterianas e seu efeito mineralizador, a ativação enzimática tecidual (Estrela & Pesce, 1996; Tanomaru *et al.*, 2003). Na busca por uma medicação que reúna o maior número de vantagens, o Ca(OH)_2 têm sido extensivamente estudado tanto associado a veículos inertes, como a substâncias ativas.

Como o pH do Ca(OH)_2 é cerca de 12, a maioria das espécies bacterianas isoladas de canais radiculares infectados são sensíveis aos seus efeitos, sendo eliminadas em curto período de tempo, quando em contato direto com essa substância. Porém algumas, como o *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, sobrevivem nesse meio alcalino (Siqueira & Lopes, 1999; Gomes *et al.*, 2002). Inclusive há um questionamento a respeito da sua eficácia em reduzir o número de bactérias mesmo após longos períodos entre sessões (Peters *et al.*, 2002).

A baixa solubilidade e difusibilidade do Ca(OH)_2 necessita de um longo tempo de ação para que o medicamento exerça atividade antimicrobiana nos túbulos dentinários infectados. Embora o tempo ideal necessário para ele descontaminar o sistema de canais radiculares seja ainda desconhecido, sua ação antibacteriana pode ser confirmada clinicamente pela presença de microrganismos resistentes ou ausência de exsudatos no canal radicular (Siqueira & Lopes, 1999).

Gomes *et al.* (2002b) investigaram a suscetibilidade de alguns microrganismos freqüentemente isolados de canais radiculares ao Ca(OH)_2 associado a diferentes

veículos pelo método de difusão em ágar. A espécie que apresentou os menores halos de inibição, ou seja, maior resistência aos medicamentos testados foi o *Enterococcus faecalis*.

A CHX gel é eficaz como medicação intracanal devido ao seu amplo espectro antimicrobiano, baixa toxicidade e liberação gradual prolongada, além de reduzir o processo de reabsorção inflamatória (Ferraz *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2006; Lindskog *et al.*, 1998). Entretanto não funciona como barreira física dentro do canal e sua difusão pelos túbulos dentinários resulta num espaço vazio, propício a recontaminação. Quando associada ao Ca(OH)_2 , reduz sua atividade antimicrobiana, mas tal ação ainda é superior ao Ca(OH)_2 não associado. Dessa forma, a associação dessas duas substâncias melhora as propriedades antimicrobianas do Ca(OH)_2 (Gomes *et al.*, 2003).

Nerwich *et al.* (1993) avaliaram mudanças de pH por quatro semanas após colocação de curativo de Ca(OH)_2 em dentes humanos extraídos. Os resultados demonstraram que os íons hidroxila difundem-se em horas pela dentina mais próxima a luz do canal, mas requer de 1 a 7 dias para alcançar a dentina mais externa, próxima ao cimento. Os picos de pH foram atingidos entre 2 e 3 semanas e a difusão foi maior cervicalmente do que apicalmente. A capacidade tampão da dentina é um fator que afeta a difusão de íons hidroxila através dos túbulos dentinários, segundo os autores.

Estrela & Pesce (1996) analisaram a velocidade de difusão dos íons hidroxila de pastas de Ca(OH)_2 preparadas com diferentes veículos: SS, solução anestésica e polietilenoglicol 400, por períodos de 7, 30, 45 e 60 dias. Observaram que as variações no pH da superfície radicular externa ocorreram após 30 dias para os grupos com SS e anestésico, indo de pH 6-7 para pH 7-8; enquanto que a mesma variação para o grupo de polietilenoglicol ocorreu após 45 dias. O pH dentro do canal radicular permaneceu constante em torno de 12 durante o período de 60 dias. Eles demonstraram que o veículo associado ao Ca(OH)_2 influencia a velocidade de sua dissociação iônica e, conseqüentemente, sua ação antimicrobiana e mineralizadora. Não houve diferença nas medidas com a presença ou ausência de cimento.

Wakabayashi *et al.* (1995) avaliaram por microscopia eletrônica de varredura a capacidade do Ca(OH)_2 associado a SS em dissolver a camada odontoblástica e pré-dentina após a remoção do tecido pulpar. No grupo em que a medicação permaneceu por uma semana houve pouca dissolução da camada odontoblástica, sem afetar a pré-dentina ou os processos odontoblásticos. No grupo em que o Ca(OH)_2 permaneceu por 30 dias com trocas semanais houve uma maior efetividade deste medicamento, inclusive com erosão da camada de pré-dentina. Porém, não foi capaz de dissolver fibras de colágeno o que ocorre com o uso do hipoclorito de sódio.

Trope *et al.* (1999) compararam a reparação radiográfica de dentes com periodontite apical tratados em sessão única ou através de medicação a base de Ca(OH)_2 . Os pacientes foram divididos em 3 grupos: grupo 1: tratamento com sessão única; grupo 2: os canais foram deixados vazios por uma semana e depois obturados; e grupo 3: foi utilizado medicação com Ca(OH)_2 por uma semana e, depois, os dentes foram obturados. Todos os dentes foram avaliados por 52 semanas e os resultados mostraram que o grupos de Ca(OH)_2 proporcionou uma reparação mais rápida e mais efetiva em relação aos demais grupos.

Gomes *et al.* (2003a) avaliaram a efetividade do digluconato de CHX 2% gel e Ca(OH)_2 como medicação intracanal, em diferentes períodos de tempo (1, 2, 7, 15 e 30 dias). Canais radiculares de dentes bovinos foram previamente infectados com *Enterococcus faecalis*. As medicações testadas foram: CHX gel 2%; Ca(OH)_2 + polietilenoglicol 400, CHX 2% gel + Ca(OH)_2 . Foi observado que a CHX 2% gel inibiu o crescimento bacteriano proveniente das amostras de dentina infectada em todos os períodos de tempo. A associação de Ca(OH)_2 e polietilenoglicol foram ineficientes na eliminação bacteriana, em todos os períodos de teste. Observaram ausência de contaminação da dentina nos períodos de 1 e 2 dias, nas amostras onde a associação de CHX 2% gel e Ca(OH)_2 foi empregada. Nos períodos subseqüentes, de 7 e 15 dias, houve um decréscimo da atividade antimicrobiana e, em 30 dias, todas as amostras desse grupo apresentaram-se contaminadas. Os autores concluíram que a CHX 2% gel apresentou ampla atividade antimicrobiana sobre o *Enterococcus faecalis*, e que esta decresceu com o passar do tempo.

Gomes *et al.* (2003b) determinaram *in vitro* o tempo necessário para recontaminação de canais radiculares selados coronariamente, preenchidos por Ca(OH)_2 , CHX 2% gel ou pela associação de ambos. Foram utilizados 75 pré-molares inferiores divididos em nove grupos, de acordo com a medicação intracanal utilizada: medicação com CHX e sem selamento; Ca(OH)_2 e sem selamento; Ca(OH)_2 associado a CHX e sem selamento; CHX 2% gel e selamento coronário; Ca(OH)_2 com selamento; associação das medicações com selamento; sem MIC e com selamento coronário; sem MIC e sem selamento coronário. As coroas ficaram imersas em saliva e BHI e apenas os ápices dos dentes em teste estavam em contato com o meio de cultura líquido estéril. Os frascos foram incubados e a turbidez do meio observada diariamente. Os resultados revelaram que os tempos médios necessários para a penetração de microrganismos através dos canais contendo os medicamentos variou de 1,8 a 7,2 dias. Os medicamentos que apresentaram maior barreira física foram aqueles que continham selamento coronário e dentre estes, os melhores em ordem decrescente foram o Ca(OH)_2 (17,2 dias), CHX (13,5 dias) e associação (11,9 dias). Os autores concluíram que o selamento coronário não previne infiltração de microrganismos através dos canais radiculares contendo medicação intracanal.

Evans *et al.* (2003) avaliaram a atividade antimicrobiana da associação da CHX 2% gel e do Ca(OH)_2 , quando comparado ao efeito da associação entre Ca(OH)_2 e água destilada, em discos de dentina bovina previamente contaminada com *Enterococcus faecalis*. Após uma semana no interior dos canais radiculares, nenhuma das associações foi capaz de eliminar completamente as bactérias do interior dos túbulos dentinários. A associação entre CHX 2% gel e Ca(OH)_2 foi a que apresentou o maior efeito bactericida.

Basrani *et al.* (2004) avaliaram algumas propriedades físico-químicas (pH, ângulo de contato, tempo de trabalho, radiopacidade e viscosidade) de medicações intracanal à base de Ca(OH)_2 e CHX na forma gel. As medicações testadas foram CHX 0,2% e 2%, Ca(OH)_2 associado à água na proporção de 40g/100ml, e associação de Ca(OH)_2 e CHX 0,2%. O pH inicial para as associações de Ca(OH)_2 + CHX ou Ca(OH)_2 + água foi igual à 12,4 e não se alterou nas primeiras 24 horas. Dessa forma, a CHX não

alterou o pH do Ca(OH)_2 , mantendo assim a ação antimicrobiana associada à liberação de íons hidroxila. A adição da CHX ao Ca(OH)_2 reduziu o ângulo de contato dessa associação e aumentou sua viscosidade. O uso da CHX em diferentes concentrações e em combinação ao Ca(OH)_2 apresentou propriedades físico-químicas satisfatórias para ser utilizada como medicação intracanal.

De Rossi *et al.* (2005) avaliaram *in vivo* o efeito da instrumentação manual e rotatória e utilização ou não de medicação intracanal com Ca(OH)_2 e CHX 1%, no reparo de lesões periapicais crônicas em cães, avaliadas após 30, 75 e 120 dias. Foram divididos em 4 grupos. Os dois primeiros grupos não receberam medicação, sendo obturados em sessão única, e os outros dois grupos receberam MIC de Ca(OH)_2 e CHX por 15 dias. Os resultados demonstraram, através de análise radiográfica e histológica, que aos 120 dias após a obturação, apenas o grupo que recebeu Ca(OH)_2 com CHX apresentou redução significativa no tamanho das lesões, independente da técnica de instrumentação ter sido manual ou rotatória.

Gomes *et al.* (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana e o pH das seguintes substâncias: gluconato de CHX 2% gel (CHX), Ca(OH)_2 e sua combinação com iodofórmio e óxido de zinco. Para parte microbiológica do experimento foi utilizado o método de difusão em Agar e foram testados os seguintes microrganismos: *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermédia*. Os níveis de pH foram determinados imediatamente após o preparo, após 24 horas e uma semana, sendo que em todos os grupos a medida permaneceu acima de 12, com exceção do grupo da CHX (pH=7.0). Todos os medicamentos testados apresentaram atividade antimicrobiana, porém a mais eficaz contra os microrganismos testados foi CHX, seguida de sua associação ao Ca(OH)_2 e iodofórmio. Os resultados indicaram que a associação do Ca(OH)_2 e da CHX 2% gel, com ou sem iodofórmio ou óxido de zinco, quando utilizada como medicação intracanal promove ação antimicrobiana e é capaz de manter um pH ideal. Tal associação misturada a agentes radiopacificadores como iodofórmio e óxido de zinco permitiria uma melhor visualização do preenchimento do canal radicular, sendo importante na indução da apicificação

Gomes *et al.* (2008) avaliaram CHX 2% gel, CHX 2% gel + Ca(OH)₂ (1:1), CHX 2% gel + Ca(OH)₂ + óxido de zinco (1:1:1) e soro fisiológico + Ca(OH)₂ frente à *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Actinomyces viscosus* e *Porphyromonas gingivalis*. O objetivo desse estudo foi avaliar *in vitro* a ação antimicrobiana de diferentes medicações intracanal na superfície radicular externa, e os resultados mostraram que o maior efeito antimicrobiano foi produzido pela CHX 2% gel, seguido de CHX 2% gel + Ca(OH)₂, CHX 2% gel + Ca(OH)₂ + óxido de zinco e soro fisiológico + Ca(OH)₂. O microrganismo mais suscetível à ação dos medicamentos foi *A. viscosus*, seguido de *E. faecalis*, *C. albicans* e *P. gingivalis*. Os autores concluíram que as medicações intracanal que apresentam CHX em sua composição foram capazes de se difundir através da dentina, atingindo a superfície radicular externa e, que a associação de Ca(OH)₂ e soro fisiológico não mostrou nenhuma atividade antimicrobiana na superfície radicular externa no período de 72 horas e, a CHX 2% gel e suas associações com Ca(OH)₂ e óxido de zinco demonstraram rápida capacidade de difusão na dentina radicular, ocasionando inibição de crescimento bacteriano.

Berber (2009) avaliou o uso de medicação intracanal por 7 (CHX gel 2%) e 14 dias Ca(OH)₂ e associação entre Ca(OH)₂ e CHX gel 2% em reduzir a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) no canal radicular e na bolsa periodontal associada de dentes com polpas necrosadas, lesões periapicais, sangramento gengival e bolsas periodontais. A autora concluiu que quaisquer das medicações intracanaís testadas não foram capazes de alterar ou reduzir a microbiota da bolsa periodontal associada no período de 7 ou 14 dias, não havendo diferenças de eficiência antimicrobiana entre as medicações intracanaís utilizadas tanto no canal radicular como na bolsa periodontal no período estudado.

O Ca(OH)₂ estimula a reparação do tecido duro, devido à sua elevada toxicidade, que causa necrose superficial. Este efeito tóxico do Ca(OH)₂ é indesejável no tecido que já está inflamado, como resultado do processo da doença e, conseqüentemente, a aplicação do Ca(OH)₂ nas fases iniciais do tratamento, pode iniciar ou exacerbar reabsorção radicular externa inflamatória se o cimento está ausente ou foi removido através de alisamento radicular. Longo prazo da utilização de Ca(OH)₂ é também associado com a anquilose significativamente mais reabsorção

radicular externa e de substituição de dentes que tinham danos na superfície externa da raiz, por exemplo, após trauma ou doença periodontal. Assim, o cálcio, hidróxido deve ser usado com cuidado na ausência de cimento (Abbott & Salgado 2009)

Safavi & Nichols (1993) estudaram os efeitos do Ca(OH)_2 sobre o LPS bacteriano. Tubos de vidro contendo suspensão aquosa de LPS na concentração de 30 $\mu\text{g/ml}$; e/ou Ca(OH)_2 (25 mg/ml), ou água apirogênica foram agitados por 20 segundos e incubados a 37°C por uma semana, mantendo então uma agitação diária por 20 segundos. Ácidos graxos livres foram quantificados destas amostras utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massa. O tratamento do LPS com Ca(OH)_2 demonstrou elevada liberação de ácidos graxos, sugerindo que esta substância pode mediar degradação do LPS, podendo representar importância clínica na endodontia.

Em seu trabalho, Buck *et al.* (2001) avaliou se o Ca(OH)_2 favorecia a degradação do LPS bacteriano, principalmente, avaliar se clinicamente, parece benéfico quando se suspeita da presença de endotoxina no canal. Este estudo não abordou a questão de quanto tempo uma condição altamente alcalina pode permanecer *in vivo* no canal, mas o Ca(OH)_2 tem a vantagem de ser utilizado por vários dias, mostrando um maior efeito contra a endotoxina. Os autores concluíram que os produtos químicos altamente alcalinos seriam muito irritantes para os tecidos vitais e os resultados mostraram que a porção biologicamente ativa do LPS que é o lipídeo A, pode ser hidrolisado por produtos químicos altamente alcalinas como o Ca(OH)_2 .

Silva *et al.* (2002) avaliou histologicamente os efeitos de endotoxina pura ou associada ao Ca(OH)_2 sobre os tecidos apicais e periapicais em cães. Eles concluíram que a endotoxina bacteriana causa lesão periapical e que o Ca(OH)_2 inativa os LPS *in vivo*. O mesmo foi verificado por Nelson Filho (2002), que acrescenta que o Ca(OH)_2 deve ser o medicamento de eleição para curativos intracanal em dentes com necrose pulpar e lesão periapical.

Silva *et al.* (2002) avaliaram “*in vivo*” histopatologicamente os tecidos apicais e periapicais em dentes de cães que foram submetidos a endotoxina bacteriana. Os cães tiveram as polpas dos pré-molares removidas e depois foram divididos em quatro grupos, sendo dois deles experimentais (n=20) e dois grupos controle (n=10). Os canais

do grupo 1 foram preenchidos com endotoxina bacteriana, o grupo 2 com endotoxina + Ca(OH)_2 , o grupo 3 com SS e o grupo 4 não recebeu tratamento. Após um período de 30 dias foi realizado o processamento histológico. O infiltrado inflamatório, a espessura do ligamento periodontal, e a presença de áreas de reabsorção foram similares nos grupos 1 e 4. Os grupos 2 e 3 apresentaram resultados semelhantes entre si. Os autores concluíram que após 30 dias, mesmo na ausência de bactérias, as endotoxinas presentes em canais radiculares de cães podem induzir a formação de reações apicais visíveis radiograficamente e, mostrou também, a presença de um intenso infiltrado inflamatório, aumento da espessura do ligamento periodontal e reabsorção de cemento e osso alveolar. Eles também sugerem que o Ca(OH)_2 causa inativação do LPS “in vivo”, mesmo em grandes concentrações. Dessa forma, essa qualidade é adicionada ao Ca(OH)_2 que é sugerido como medicação intracanal de escolha, em casos de necrose pulpar e lesões apicais visíveis radiograficamente

Tanomaru *et al.* (2003) avaliaram o efeito de soluções irrigadoras e do Ca(OH)_2 sobre o LPS. Cento e quarenta raízes de pré-molares de sete cães foram preenchidos com uma suspensão preparada com 100 mg de endotoxina de *Escherichia coli* e 10 ml de SS permanecendo por 10 dias. As soluções irrigadoras utilizadas foram as seguintes: hipoclorito de sódio (1%, 2,5% e 5%), CHX 2% e SS. Em outro grupo o LPS foi mantido durante todo o período experimental e no último grupo o preparo biomecânico foi realizado com SS e os canais foram preenchidos com Ca(OH)_2 . Após 60 dias os animais foram sacrificados e foram avaliados: infiltrado inflamatório, espessura do ligamento periodontal, reabsorção cementária e reabsorção óssea. Pelos resultados obtidos, os autores concluíram que o preparo biomecânico com as soluções testadas não inativaram os efeitos da endotoxina, mas a medicação intracanal com Ca(OH)_2 pareceu inativar os efeitos induzidos pela endotoxina *in vivo*

Vianna *et al.* (2007) quantificaram as endotoxinas presentes e bactérias cultiváveis em canais radiculares humanos com necrose pulpar, antes (S1) e após o PQM com CHX 2% gel como substância química auxiliar (S2), e após 7 dias de MIC (S3), com o objetivo de avaliar os efeitos antimicrobianos e anti-endotóxicos. Foram selecionados 24 dentes, nos quais foi realizado o PQM e as seguintes medicações intracanal: pasta de Ca(OH)_2 ; CHX 2% gel e a associação de ambas. Um teste cromogênico quantitativo

de Lisado de Amebócito de *Limulus* mensurou as endotoxinas presentes. Foi realizada cultura microbiana para determinar a redução bacteriana através da contagem de unidades formadoras de colônia. Valores relativamente altos de endotoxina ainda estavam presentes no canal radicular após o PQM, embora a maioria das bactérias tivesse sido eliminada. Nenhuma melhora foi obtida pela utilização da medicação intracanal por uma semana.

Signoretti (2009) analisou a ação do Ca(OH)_2 , da CHX 2% gel e da associação de ambos quanto as suas propriedades químicas e sua possível ação sobre o LPS bacteriano quando utilizados como medicação intracanal. A liberação do cálcio do Ca(OH)_2 + soro ou associado a CHX foi verificada pela espectrofotometria por absorção atômica e o pH através do emprego de um peagâmetro. As mensurações foram realizadas nos períodos experimentais de 24 horas, 7, 15 e 30 dias. Para a quantificação de endotoxinas foram utilizados dentes humanos, previamente preparados, contaminados, preenchidos com as medicações. Os medicamentos foram inseridos dentro dos canais de 30 dentes (GI Ca(OH)_2 + soro, GII Ca(OH)_2 + CHX, GIII CHX) e foi utilizado um modelo de estudo utilizando tubos de polietileno a fim de padronizar o mesmo volume de medicação inserida em cada amostra. Após permanecerem por 14 dias, foram removidos com irrigação abundante e submetidos à quantificação da endotoxinas. Os grupos do Ca(OH)_2 associado ou não à CHX não diferiram significativamente no período de 24 horas, 7 e 30 dias em relação à liberação de cálcio. Entretanto, no período de 15 dias o Ca(OH)_2 + soro fisiológico liberou menos cálcio do que quando estava associado à CHX 2% gel. Nestes mesmos grupos ocorreu aumento significativo de 24 horas para 7 dias. Entretanto, no período de 15 dias houve uma queda do Ca(OH)_2 + soro. Com relação ao pH, os grupos do Ca(OH)_2 associado ou não à CHX não apresentaram diferença significativa estatisticamente entre si nos intervalos testados, mantendo um pH alcalino ($p > 0.05$). Os maiores valores de pH foram observados após 30 dias para o Ca(OH)_2 + soro. Os valores mais baixos de pH foram apresentados pela CHX 2% gel quando testada sozinha, em todos os períodos. Um aumento significativo no pH foi observado no intervalo de 24 horas e 7 dias, tanto para o Ca(OH)_2 + soro quanto para Ca(OH)_2 + CHX. A maior redução de endotoxinas foi observada no grupo da CHX 2% gel (91,63%), seguida de sua associação com o

Ca(OH)₂ (88,76%) e depois o Ca(OH)₂ + soro fisiológico (82,13%). Não houve diferença estatística entre a CHX 2% gel e sua associação com o Ca(OH)₂, quanto à redução da quantidade de endotoxinas dentro do canal radicular. Concluiu-se que a CHX 2% gel não interferiu no pH e liberação de íons cálcio do Ca(OH)₂ quando em associação com este. Além disso, melhorou a capacidade do Ca(OH)₂ em reduzir o conteúdo de endotoxinas dos canais radiculares *in vitro*.

Reverendo a literatura, podemos observar que existe pouca informação sobre o efeito do tratamento endodôntico de dentes vitais em dentes com periodontite crônica, fato este que nos levou a realizar este trabalho.

3. PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

OBJETIVO GERAL

1. Avaliar a influência da presença da bolsa periodontal sobre as alterações pulpares;
2. Avaliar o impacto do tratamento endodôntico como tratamento complementar à terapia periodontal em dentes diagnosticados com periodontite crônica e vitalidade pulpar, que não apresentaram resultados do tratamento periodontal dentro do período de 1 ano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar a presença de microrganismos específicos em bolsas periodontais e canais radiculares de dentes com envolvimento periodontal crônico e polpa vital, comparando a similaridade dessas microbiotas;
2. Investigar e quantificar níveis de LPS no canal radicular e na bolsa periodontal durante a terapia endodôntica;
3. Investigar e quantificar níveis de citocinas pró inflamatórias IL1 β , IL1 α , TNF α e PGE2 no canal radicular e na bolsa periodontal durante a terapia endodôntica;
4. Avaliar uma possível relação entre o conteúdo endotóxico e a expressão de citocinas pró-inflamatórias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. SELEÇÃO DOS PACIENTES

Foram selecionados 11 pacientes da Clínica de Especialização de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e selecionados 15 dentes. Todos esses pacientes já estavam sob acompanhamento periodontal de no mínimo 1 ano. Esse acompanhamento periodontal era realizado através de visitas periódicas com realização de raspagem supra e subgingivais. A faixa etária dos pacientes foi de 25 a 53 anos, independentemente do gênero. Os voluntários foram confirmados através de exames clínicos e radiográficos.

Os critérios de inclusão foram:

- a) Pacientes que estavam sob tratamento periodontal por no mínimo 1 ano.
- b) Dentes que radiograficamente apresentavam perda óssea extensa em uma das faces proximais, acompanhado ou não de sinais e sintomas clínicos.
- c) Dentes com bolsa periodontal associada com profundidade de sondagem maior ou igual a 6 mm em uma das faces e ausência de sangramento durante as sondagens.
- d) Dentes que clinicamente, através do teste térmico com gelo, apresentaram sensibilidade pulpar positiva característica de pulpite.
- e) Pacientes que não fizeram uso de anti-inflamatórios e antibióticos sistêmicos e/ou locais nos últimos 3 meses.

Foram descartados desse estudo, pacientes que apresentavam dentes, cariados, com câmara pulpar exposta ao meio bucal, com trincas, calcificações, qualquer tipo de reabsorção e os casos que não foi possível acessar todo o comprimento do canal radicular. Pacientes portadores de doenças sistêmicas (como por exemplo, diabetes melitus e AIDS) e com história de antibioticoterapia recente e uso de antifúngicos também não participaram deste trabalho.

A figura 1 mostra radiografias de alguns casos que foram selecionados.

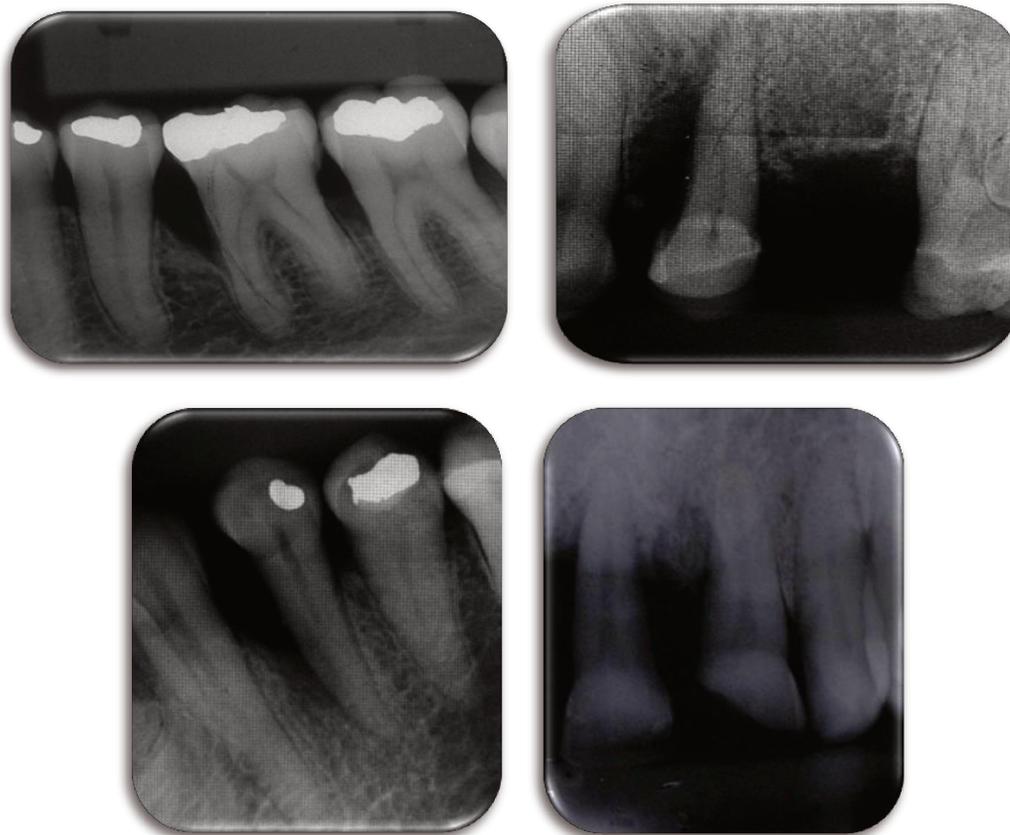


Figura 1 – Radiografias iniciais de pacientes selecionados nesse estudo

Esse projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), da Universidade Estadual de Campinas, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (protocolo nº 131/2010 – ANEXO I). Os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) elaborado conforme as normas deste mesmo comitê (ANEXO II)

4.2. ASPECTOS CLÍNICOS E RADIOGRÁFICOS

Na consulta inicial foi realizado exame clínico periodontal completo, onde eram anotados dados referentes a mobilidade dentária, retração gengival, profundidade de sondagem (bolsa periodontal) e nível de inserção clínica (somatório da retração

gengival e da bolsa periodontal) e, tomada radiográfica periapical para avaliar o comprometimento da doença periodontal (Figura 1)

Foram realizados testes para verificar dor à percussão, à palpação além da realização do teste térmico para confirmação da vitalidade pulpar.

Para cada paciente foram anotados na anamnese: idade, sexo, estado pulpar, profundidade de sondagem da bolsa periodontal, inserção clínica, mobilidade dental, presença de edema dos tecidos periodontais, história de medicação e os achados radiográficos. Os aspectos clínicos do dente envolvido também foram anotados, assim como presença ou ausência de dor, bem como dados da história médica e história dentária.

O grau de mobilidade dentária foi realizado de acordo com Schluger *et al* (1981) em: Grau 0 – Ausência de mobilidade; Grau I – Mobilidade clínica de aproximadamente 1 mm na direção vestibulo-lingual; Grau II - Mobilidade clínica de aproximadamente 2 mm na direção vestibulo-lingual e ausência de mobilidade apical; e Grau III - Mobilidade clínica de aproximadamente 2 mm na direção vestibulo-lingual e mobilidade apical.

A profundidade de sondagem foi realizada em todas as faces do dente (mesial, distal, vestibular e palatina/lingual) com sonda periodontal Hu-Friedy (MGF Co. Inc., Chicago, Estados Unidos)

Todos esses dados e características clínicas dos dentes investigados foram anotados na ficha clínica de cada paciente, como descrito no APÊNDICE I. E todos esses dados estão apresentados no APÊNDICE V.

4.3. PROCEDIMENTOS CLÍNICOS E COLETA DAS AMOSTRAS

As metodologias relacionadas às coletas e análises das amostras já foram descritas previamente (Gomes, 1995; Gomes *et al.*, 1994a,b; 1996, Gomes *et al* 2004; Martinho & Gomes 2007).

Após a consulta inicial, o paciente era marcado para outra consulta, onde seriam então, realizados os procedimentos de coleta e tratamento endodôntico.

4.3.1. Procedimentos clínicos para coleta da bolsa periodontal (CP1)

Inicialmente o paciente realizou bochecho com CHX 0,12%. Depois, o dente envolvido recebeu polimento coronário com pedra-pomes e taça de borracha. Para as bolsas periodontais, foi realizado a coleta dos fluidos periodontais

- Coleta Inicial da Bolsa Periodontal (CP1)

Alguns princípios foram observados na coleta das amostras: utilização de técnicas assépticas e promoção de um fácil acesso para a coleta das amostras como remoção de cálculo supragengival.

Inicialmente foi realizada a remoção de biofilme supragengival da coroa do dente, e em todas as faces, com gaze estéril. Dessa forma, evitamos uma contaminação proveniente do periodonto. Um jato de ar foi aplicado a fim de manter a superfície dental completamente seca.

Antes da coleta inicial, foi realizado o isolamento relativo do dente, com o auxílio de roletes de algodão, para minimizar a contaminação por saliva.

A coleta periodontal foi realizada na bolsa de maior profundidade de sondagem através de cones de papéis absorventes estéreis/apirogênicos (esterilizados através de calor seco, em estufa por um período de tempo de 4 horas a 200°C) calibre FM (Dentsply - Petrópolis,RJ). As coletas foram realizadas para avaliação microbiológica e quantificação de endotoxinas.

Inicialmente, um cone de papel absorvente era introduzido até o fundo da bolsa periodontal permanecendo por 1 minuto. Em seguida, esse cone era transferido para frascos de vidro apirogênicos e armazenados em freezer -20 °C. Essa primeira coleta era destinada para a análise de endotoxinas.

Posteriormente, 3 cones de papel absorvente, um de cada vez, eram introduzidos até o fundo da bolsa periodontal permanecendo por 1 minuto cada um. Esses cones eram transferidas para tubos do tipo *eppendorfs* previamente esterilizados, contendo 1,0 mL do meio de transporte pré-reduzido VMGA III – Viability Medium

Goteberg Agar (Dahlén *et al.*, 1993) e transportados em jarros a vácuo para o Laboratório de Microbiologia da disciplina de Endodontia da FOP-UNICAMP (APÊNDICE VI). Esses *ependorfs* eram congelados em freezer -20°C. Essa segunda coleta era destinada para a análise microbiológica.

Os procedimentos de coleta periodontal estão representados na Figura 2.

Após a realização dessas coletas da bolsa periodontal, o próximo passo realizado foi a coleta do canal radicular.

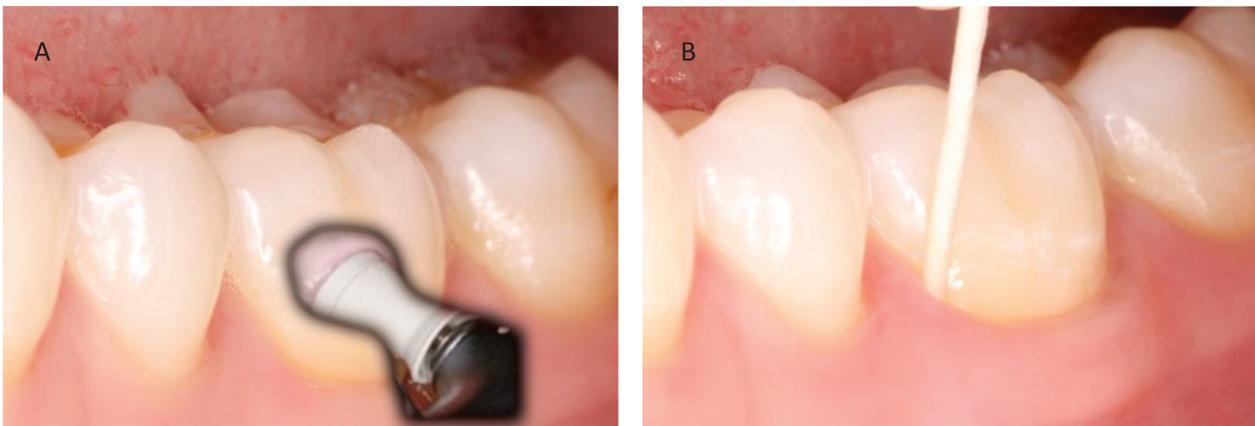


Figura 2 – Procedimentos de coleta periodontal. A – Polimento com pedra pomes; B – Coleta inicial da bolsa periodontal de maior profundidade

4.3.2. Procedimentos clínicos para coleta do canal radicular (CE1)

- Coleta Inicial do Canal Radicular (CE1)

Alguns princípios foram observados na coleta das amostras: utilização de técnicas assépticas, remoção de contaminantes coronários, isolamento absoluto, desinfecção do campo operatório, fácil acesso para a coleta das amostras e evitar contaminação química do espaço pulpar.

Para a fase de acesso coronário, a água proveniente do equipo foi cessada, sendo a irrigação realizada manualmente com SS estéril e apirogênica. Brocas de alta rotação diamantadas estéreis/ apirogênicas (esterilizadas através de calor seco, em estufa por um período de tempo de 4 horas a 200°C) esféricas 1012HL, 1014HL, 1016HL e tronco cônica de ponta inativa 3082 (K.G. Sorensen Ltda, Barueri, SP, Brasil) foram utilizadas para a remoção de esmalte e dentina.

Quando, clinicamente, observava-se uma fina camada de dentina separando o teto da cavidade pulpar, era realizado o isolamento absoluto do dente envolvido. O isolamento foi realizado com lençol de borracha e, o vedamento da interface coroa/lençol com cianocrilato (Super Bonder; Loctite, SP) para evitar uma possível infiltração com saliva.

Prosseguiu-se, então, com a anti-sepsia do campo operatório (superfície externa da coroa, grampo, lençol de borracha, arco e cianocrilato). Este procedimento foi realizado com *swabs* estéreis umedecidos, primeiramente, em H₂O₂ a 30% (v/v) e depois em NaOCl 5,25% por 30 segundos cada, sendo subseqüentemente neutralizados com solução estéril de tiosulfato de sódio 5% (Möller 1981) (Figura 3).

Em uma segunda etapa operatória, na fase de confecção da cavidade de acesso, nova broca estéril/ apirogênica foi utilizada. Nesse momento, era realizada a remoção completa do teto da câmara pulpar, sendo a irrigação novamente realizada manualmente com SS estéril e apirogênica. Após a abertura coronária, o campo operatório era submetido novamente a um processo de desinfecção, como descrito anteriormente.

Nos casos de dentes multirradiculares, a amostra foi coletada do canal radicular associado à bolsa periodontal de maior profundidade, de maneira a confinar o exame microbiológico e endotóxico a um único ambiente ecológico.

Inicialmente, um cone de papel absorvente estéril/apirogênico calibre F Dentsply (Petrópolis,RJ) era introduzido no comprimento total do canal (determinado pela radiografia pré-operatória) permanecendo por 1 minuto. Em seguida, esse cone era transferido para frascos de vidro apirogênicos e congelados em freezer -20 °C. Essa primeira coleta era destinada para a análise de endotoxinas.

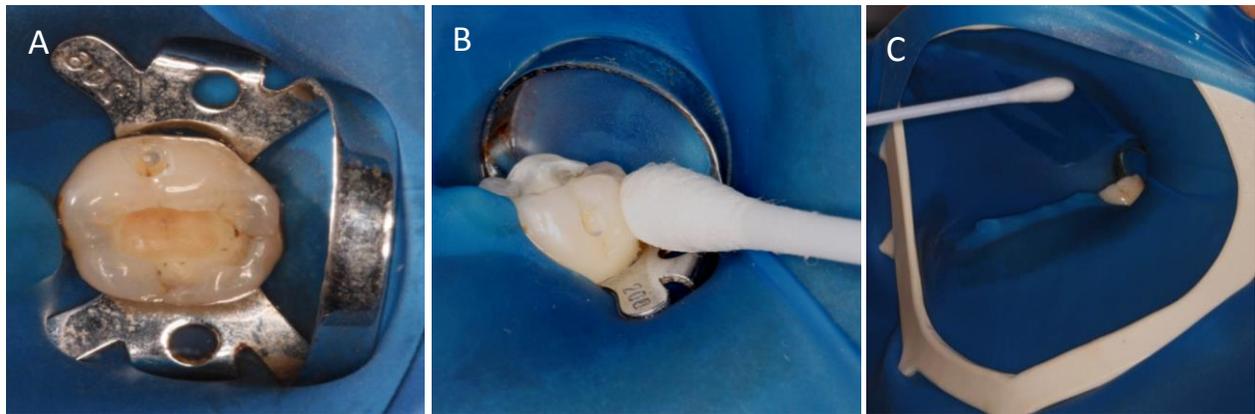


Figura 3 – Procedimentos de coleta endodôntica. A – Isolamento absoluto após avaliar uma fina camada de dentina; B – Desinfecção do campo operatório: dente e grampo; C – Desinfecção do campo operatório: arco e lençol de borracha;

Posteriormente, 3 cones de papel absorvente, um de cada vez, eram introduzidos da mesma forma descrita anteriormente para o canal radicular, permanecendo por 1 minuto cada um. Esses cones eram transferidos para tubos do tipo *ependorfs* previamente esterilizados, contendo 1,0 mL do meio de transporte pré-reduzido VMGA III – Viability Medium Goteberg Agar (Dahlén *et al.*, 1993) e transportados em jarros a vácuo para o Laboratório de Microbiologia da disciplina de Endodontia da FOP-UNICAMP. Esses *ependorfs* eram congelados em freezer -20°C. Essa segunda coleta era destinada para a análise microbiológica

Dentes com comprometimento periodontal podem apresentar uma grande incidência de canais atrésicos, prejudicando a coleta através de cones de papel absorvente. Nos casos onde observava-se essa dificuldade, uma lima tipo Kerr #10 ou #15 estéril/apirogênica de pequeno diâmetro era inserida até o comprimento total do dente. Logo em seguida, as coletas eram realizadas.

As ilustrações desses procedimentos de coleta endodôntica estão representadas na Figura 4.

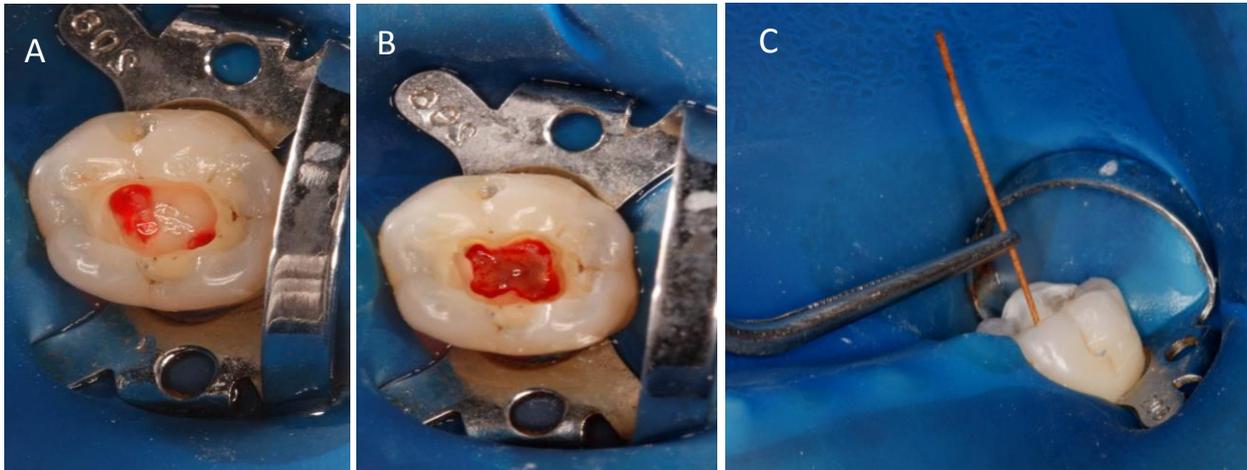


Figura 4 – Procedimentos de coleta após exposição pulpar. A – Exposição pulpar; B – Remoção de todo o teto da câmara pulpar; C – Coleta inicial do canal radicular associado a bolsa periodontal de maior profundidade

4.3.3 Preparo dos canais radiculares e coletas após o PQM (CE2 e CP2)

Após as coletas iniciais (periodontal – CP1 e endodôntica – CE1), a câmara pulpar foi descontaminada com CHX gel 2% (Endogel, Itapetininga, SP). O preparo da entrada dos canais foi complementado com a realização dos desgastes compensatórios, utilizando a ponta diamantada tronco cônica # 3082 e as brocas de largo # 2 e # 3.

O preparo dos 2/3 iniciais do canal radicular foi feito com o rotatório de Níquel-Titânio Hero 20.06 (Micromega, Besançon, França). No mesmo comprimento, o próximo passo foi a inserção das brocas de Gates-Glidden em ordem decrescente #5, #4, #3, #2 em direção “crown-down”. Em seguida, a odontometria foi feita com o auxílio de um localizador apical (Novapex, Forum Technologies, Rishon le-Zion, Israel) e a patência verificada com limas manuais tipo K #10, #15 ou #20 (aquela que se ajustar melhor ao diâmetro do canal). Logo após, todo o comprimento do canal foi instrumentado com limas rotatórias de NiTi – *Mtwo*.

A instrumentação com limas rotatórias de NiTi – *Mtwo* foi realizada seguindo a seqüência recomendada pelo fabricante: *Mtwo* 10/.04; *Mtwo* 15/.05; *Mtwo* 20/.06; *Mtwo*

25/06; *Mtwo* 30/05. O comprimento de trabalho estipulado para todas as limas foi 1 mm além do forame apical com movimentos leves, inserindo e removendo a lima do canal radicular, evitando sempre qualquer força no sentido apical.

Durante o PQM (PQM), os canais foram inundados com CHX gel 2% a cada início do uso de lima e, irrigados com 5 mL de soro fisiológico após cada utilização de lima.

Após a instrumentação, os canais foram irrigados com 4,0 mL de solução de *tween* 80 + lecitina de soja 0,07%, para neutralizar a ação da substância química-auxiliar (Siqueira *et al.*, 1998). Uma nova irrigação com 4,0 mL de solução fisiológica foi feita. Então, 1,0 mL de Ácido Diaminotetracético (EDTA) foi inserido no interior do canal radicular por 3 minutos, sendo feita a troca a cada 1 minuto. A irrigação final foi realizada com 3,0 mL de solução fisiológica estéril.

- Coleta Final do Canal Radicular (CE2)

Após o PQM, nova coleta do canal radicular foi realizada (CE2), da mesma maneira que a CE1. A CE2 foi realizada em dois momentos: imediatamente após o PQM e, após o uso do EDTA 17%.

Logo em seguida, os 15 dentes foram divididos, aleatoriamente (por sorteio) previamente ao início do estudo, em 3 grupos de 5 dentes de acordo com a medicação utilizada e os seguintes procedimentos foram tomados:

- **Grupo I: (n=5)** - Sessão única, sem uso de medicação intracanal.
- **Grupo II: (n=5, MIC por 30 dias)** - os canais deste grupo foram secos com cones de papel e preenchidos com Ca(OH)_2 + CHX-gel 2 % (2:1). Em sequência, procedeu-se a colocação de uma camada de aproximadamente 2 mm de Coltosol, aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos, adesivo Single Bond 3M[®] (3M Dental Products, St Paul, USA) e aproximadamente 3 mm de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St Paul, USA).

- **Grupo III: (n=5, MIC por 30 dias):** os canais deste grupo foram secos com cones de papel e preenchidos com Ca(OH)_2 + SS estéril (1:1). Em sequência, procedeu-se a colocação de uma camada de aproximadamente 2 mm de Coltosol, aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos, adesivo Single Bond 3^M® (3M Dental Products, St Paul, USA) e 3 mm de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St Paul, USA).

Os dentes do grupo I eram imediatamente obturados após o PQM e, nos dentes do Grupo II e III, a medicação era colocada com o uso de lentulos (Figura 5).

Os casos foram sorteados de acordo com cada grupo previamente ao início de todo o trabalho. Foram realizadas radiografias periapicais imediatamente após a colocação das medicações intracanaís contendo Ca(OH)_2 . Elas mostraram que os canais que continham Ca(OH)_2 estavam bem preenchidos.

- Coleta Final da Bolsa Periodontal (CP2)

Com a remoção do isolamento absoluto, uma nova coleta da bolsa foi realizada como descrita na CP1.

4.3.4. Coleta após medicação intracanal (CP3 e CE3)

Após 30 dias de MIC, os pacientes foram novamente atendidos. As características clínicas periodontais foram avaliadas novamente e anotadas na ficha clínica.

Seguindo os princípios das primeiras coletas (CP1 e CP2), novas coletas para endotoxinas e avaliação microbiológica foram realizadas (CP3). Essas coletas foram realizadas para os pacientes dos grupos II (Ca(OH)_2 + CHX-gel 2%) e III (Ca(OH)_2 + SS)

Após a coleta da bolsa peridontal foi realizado o isolamento absoluto, desinfecção do campo operatório, abertura coronária seguida de nova descontaminação como descrito previamente na coleta inicial do canal radicular.

Os canais, então, foram irrigados com 10mL de solução fisiológica no intuito de remover a MIC e possibilitar a coleta do canal. Depois, novas coletas para endotoxinas e avaliação microbiológica foram realizadas (CE3) como descritas anteriormente nas CE1 e CE2.

A seguir, o canal foi reinstrumentado para remoção da medicação e irrigado com 5 mL de solução fisiológica. Novamente os canais foram inundados com CHX gel 2% e foi realizada a prova do cone, confirmada radiograficamente. Então, foi aplicado EDTA 17%, por 3 minutos sob agitação constante com cones de guta percha, com troca a cada 1 minuto.

Os canais foram secos com cones de papel calibrados e, se estavam secos e propícios para a obturação, eram obturados utilizando-se a técnica do cone modelado apical associado à condensação vertical (Termocompactador Easy Endo[®] + Condensador Konne[®]). Logo em seguida, a embocadura do canal foi preenchida com Coltosol[®] e o dente definitivamente restaurado com resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St. Paul, USA). Ao final desse procedimento, foi realizado a radiografia final do tratamento endodôntico. A análise das radiografias foi realizada com auxílio de um negatoscópio primeiramente a olho nu e depois, juntamente com uma lupa estereoscópica (com aumento de 10X).

Todos os pacientes da pesquisa foram aconselhados a retornar ao Periododontista e continuar sob terapia de manutenção e acompanhamento.

Um ano após a realização do tratamento endodôntico, os pacientes foram chamados para avaliação clínica e radiográfica. Dessa forma, eram realizados todos os testes clínicos e características referentes a dor, sangramento, sensibilidade, palpação, percussão eram anotados na ficha clínica. Era também realizada a radiografia do dente avaliado e, esta comparada à radiografia inicial do tratamento.

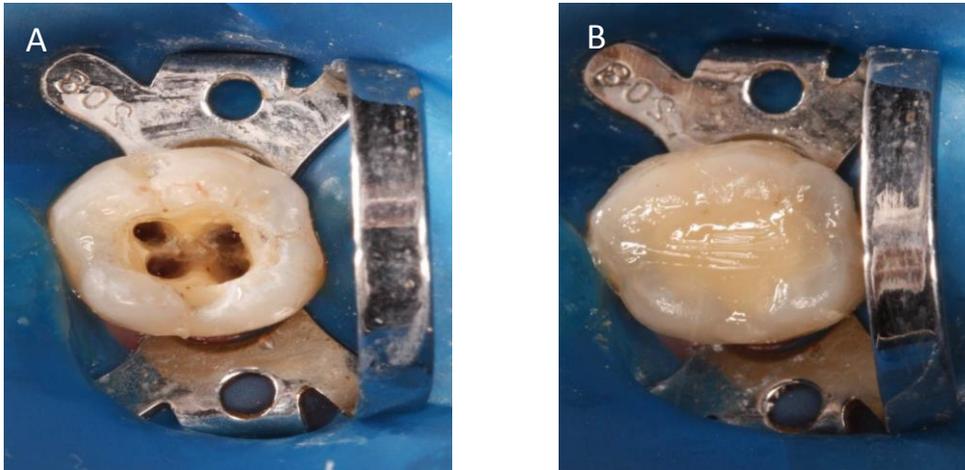


Figura 5 – Procedimento após PQM. A – Aspecto dos canais radiculares após instrumentação; B – Aspecto final da coroa do dente após instrumentação, que foi selado com resina composta

Os métodos clássicos utilizados para analisar as amostras quanto a presença de bactérias alvos, quantificação de LPS e citocinas já foram padronizadas anteriormente, obtendo resultados confiáveis. (Gomes, 1995; Gomes *et al.*, 1994a,b; 1996, Gomes *et al* 2004; Martinho & Gomes 2007).

4.4. ANÁLISE POR PCR

PCR (Técnica da reação em cadeia da Polimerase) foi utilizado para a análise da presença de bactérias alvos como: *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermédia*, complexo vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola*), *Gemella morbillorum* e *Parvimonas micra* nas coletas das bolsas periodontais e dos canais radiculares em todas as etapas do tratamento. Esses microrganismos estão, normalmente, presentes em infecções periodontais e pulpares.

4.4.1. Extração do DNA bacteriano

A extração de DNA foi realizada com o QIA amp DNA kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante (APÊNDICE VII).

4.4.2. Reação de PCR

A reação de PCR foi processada na quantidade de 25 µL de uma mistura de reagentes (Master Mix) contendo as quantidades especificadas no quadro 1 para 2 µL do DNA da amostra. (Tabela 1)

Tabela 1: Proporções dos reagentes no Master Mix

Reagentes	Quantidade (µL)
Tampão (10 x Reaction <i>buffer</i> Invitrogen [®] - Life Technology do Brasil)	2,5 µL
<i>DNTPs</i> (Invitrogen [®] - Life Technology do Brasil):	0,5 µL
<i>MgCl</i> ₂ (Invitrogen [®] - Life Technology do Brasil)	1,25 µL
<i>H</i> ₂ <i>O MiliQ</i>	17,625 µL
<i>Primer Forward</i> 100µM (Invitrogen [®] - Life Technology do Brasil)	0,75 µL
<i>Primer Reverse</i> 100µM (Invitrogen [®] - Life Technology do Brasil)	0,75 µL
<i>Taq Platinum</i> (Invitrogen [®] - Life Technology do Brasil)	0,125 µL

A Taq DNA Polimerase escolhida foi a Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen® - Life Technology do Brasil) que não se degrada com o aumento gradativo da temperatura, podendo ser acrescentada diretamente na mistura (Mix) da reação evitando a necessidade de *hot start*.

Para determinar a temperatura de anelamento ideal, reações de PCR contendo primers espécie-específicos (Tabela 2) foram realizadas em um aparelho termociclador convencional e submetidas a vários gradientes de temperatura (MJ96G, Biocycler,

termocicladores, Curitiba, SC, Brasil) utilizando amostras ATCCs correspondentes e baseadas na literatura de suporte.

Além das amostras, foram utilizados como controles positivos o DNA genômico purificado dos microrganismos, e como controle negativo, água MiliQ esterilizada.

Tabela 2: Primers específicos a serem analisados

Espécie	Seqüência	Ciclos	Fragmento	Referência
<i>Universal</i>	F: TCC TAC GGG AGG CAG CAG T R: GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	Desnaturação inicial 95° por 10min e 40 ciclos: 95° por 10s, 60° por 10s e extensão final 72° por 25s	466bp	Siqueira <i>et al.</i> , 2001.
<i>T. forsythia</i>	F: GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA R: TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	Desnaturação inicial 95° por 1min e 36 ciclos: 95° por 30s, 60° por 1min, 72° por 1min e extensão final 72° por 2min	641 bp	Slots <i>et al.</i> , 1995.
<i>T. denticola</i>	F: TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T R: TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	Desnaturação inicial 95° por 2min e 36 ciclos: 94° por 30s, 60° por 1min, 72° por 2min e extensão final 72° por 10min	316 bp	Willis <i>et al.</i> 1999.
<i>P. micra</i>	F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG R: ATA TCA TGC GAT TCT GTG GTC TC	Desnaturação inicial 95° por 2min e 36 ciclos: 94° por 30s, 60° por 1min, 72° por 2min e extensão final 72° por 10min	207 bp	Conrads <i>et al.</i> , 1997.
<i>F. nucleatum</i>	F: AGT AGC ACA AGG GAG ATG TAT G R: CAA GAA CTA CAA TAG AAC CTG A	Desnaturação inicial 95° por 5min e 30 ciclos: 94° por 30s, 40° por 1min, 72° por 2min e extensão final 72° por 10min	1000 bp	Avilla-Campos <i>et al.</i> 1999.
<i>P. gingivalis</i>	F: AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG R: ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	Desnaturação inicial 95° por 2min e 36 ciclos: 94° por 30s, 60° por 1min, 72° por 2min e extensão final 72° por 2min	404 bp	Siqueira <i>et al.</i> , 2001.
<i>P. intermedia</i>	F: TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG R : TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T	Desnaturação inicial 95° por 2min e 36 ciclos: 94° por 30s, 58° por 1min, 72° por 2min e extensão final 72° por 10min	575 bp	Siqueira <i>et al.</i> , 2001.

4.4.3. Eletroforese

As amostras, após a reação de PCR (produtos da amplificação), foram conservadas a 4°C ou analisadas imediatamente por eletroforese. Utilizou-se o gel de

agarose a 1% (Invitrogen® - Life Technology do Brasil) em tampão de Tris-borato EDTA (pH 8,0) e corado com brometo de etídio (5ug/mL-Invitrogen® - Life Technology do Brasil).



Figura 6 - Processamento das amostras pelo método de PCR. A- Kit de extração de DNA; B - Incubadora; C-Centífuga; D – Reagente para a reação de PCR; E ---- Termociclador; F - Sistema de eletroforese; G - Gel de agarose na cuba; H - Sistema

de imagens para leitura dos géis; I - Imagem do Gel referente à *Treponema denticola*; J – Imagem do Gel referente à *Parvimonas micra*.

Foi incluído em cada gel, um padrão de peso molecular de 100 bp (DNA ladder, Invitrogen® - Life Technology do Brasil). Após o término de cada corrida (60 volts por 1 hora), as bandas foram observadas com auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta. A documentação fotográfica dos géis foi obtida com o sistema Image Master-VDS (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) e a captura das imagens foram realizadas pelo programa LISCAP Image Capture software. As imagens ilustrativas estão na Figura 6.

4.5. QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINAS

Para a quantificação de endotoxinas foi utilizado o método turbidimétrico de detecção: Kit Pyrogen® -5000 (Lonza, Walkersville, MD, EUA) - uma preparação de Lisado de Amebócito *Limulus* (LAL) (APÊNDICE VIII).

O método turbidimétrico quantitativo é baseado no fato de que qualquer aumento na concentração de endotoxinas causa um aumento proporcional na turbidez devido à precipitação de uma proteína coagulável (coagulogênio) no lisado. Procede-se à leitura da densidade óptica de várias diluições da substância a ser analisada contra curva-padrão e são obtidas medidas quantitativas de endotoxinas, em grande faixa de concentrações. Nesta técnica cinética, mede-se o tempo necessário para se atingir uma absorbância pré-determinada da mistura de reação ou a velocidade de desenvolvimento da turbidez.

O teste LAL Pyrogen-5000 é um ensaio cinético quantitativo para detecção de endotoxina de bactérias Gram-negativas. Esse teste utiliza uma preparação de Lisado do Amebócito *Limulus* (LAL), em combinação com um incubador fotométrico e um software apropriado, para detecção fotométrica da endotoxina. Uma amostra é misturada com o reagente LAL reconstituído, colocada em um fotômetro e monitorada automaticamente até o desenvolvimento de uma aparência de turvação (densidade

ótica). O tempo necessário antes da aparição da turvação (tempo de reação) é inversamente proporcional a quantidade de endotoxina presente. A concentração de endotoxina em amostras desconhecidas pode ser calculada a partir de uma curva-padrão (Figura 7).

Para realização do teste LAL Pyrogen-5000, todos os materiais que entrassem em contato com a amostra ou reagentes do teste deveriam estar apirogênicos (livre de endotoxinas). Os materiais tornaram-se apirogênicos quando submetidos ao calor seco (estufa) a 250°C por um período de 30 minutos ou por energia ionizante (EMBRARAD, Cotia, SP). A radiação gama consiste na exposição dos produtos a ação de ondas eletromagnéticas curtas, geradas a partir de fontes seladas de Cobalto 60. Outros materiais já se apresentavam apirogênicos e esterilizados oriundos de fábrica (Lonza, Walkersville, MD, EUA).

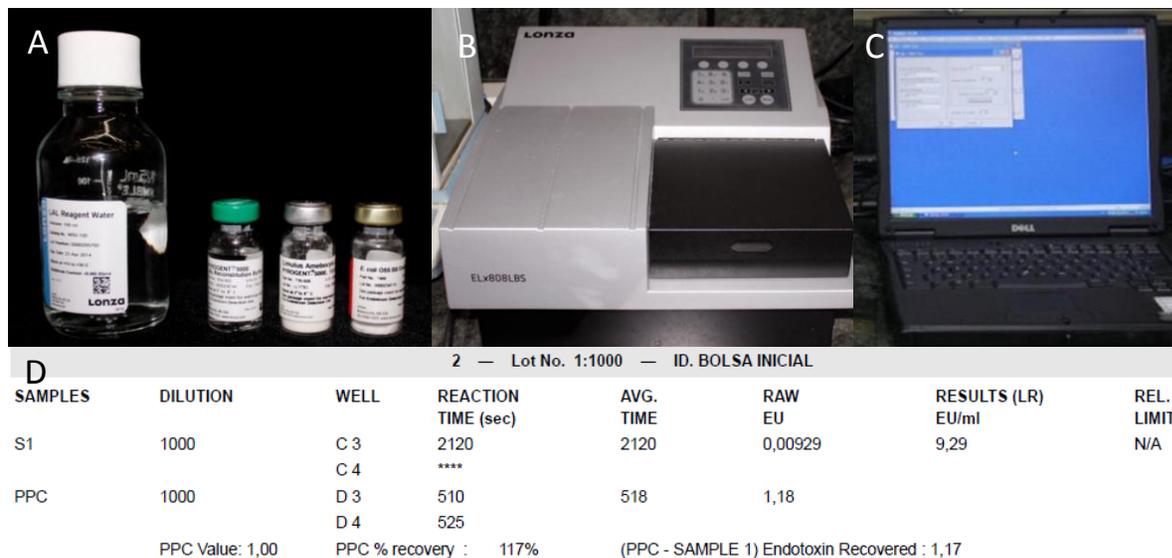


Figura 7- Processamento de endotoxinas pelo ensaio LAL. A - Kit de endotoxinas composto por água apirogênica, Tampão de reconstituição Pyrogen-5000 LAL, Reagente Pyrogen-5000 LAL e Endotoxina *E. coli* 055:B5; B - Leitor Biotek (ELX 808, Winooski, VT, EUA); C - Software WinKQCL (Lonza, Walkersville, MD, EUA); D – Resultado da oncentração de endotoxinas da bolsa periodontal inicial do paciente 2.

O kit Pyrogen-5000 apresenta: 1) Pyrogen-5000 LAL Reagente; 2) Endotoxina de *Escherichia Coli* 055:B5; 3) Tampão de reconstituição Pyrogen-5000.

Para a realização do teste foi utilizado: 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) Microbiofilme(96 poços – 12 colunas e 8 fileiras) estéreis descartáveis e apirogênicas (Corning Costar, Cambridge, MA, UK); 6) Multipipetador de 8 canais; 7) Reservatório de reagente (Lonza, Walkersville, MD); 8) Leitor de microplacas (Biotek, Bio-Rad Laboratories); 9) Software WinKQCL[®] (Lonza, Walkersville, MD); 10) Cronômetro e agitador vortex.

Para o cálculo da concentração de endotoxina em amostras desconhecidas, foi estabelecida uma curva-padrão com quantidades conhecidas de endotoxina (*Escherichia coli*). Esta foi preparada utilizando soluções com concentrações 0,01 EU/mL, 0,10 EU/mL, 1 EU/mL, 10 EU/mL, 100 EU/mL como descrito na tabela 3.

Tabela 3: Valores de endotoxinas conhecidos para estabelecimento da curva-padrão

Tubos apirogênicos	Concentração de endotoxina (EU/mL)	Volume de água reagente LAL	Volume de solução de endotoxina adicionado à água apirogênica
1	10	0,9 mL	0,1 mL de 100 EU/mL solução
2	1	0,9 mL	0,1 mL de 10 EU/mL solução
3	0,10	0,9 mL	0,1 mL de 1 EU/mL solução
4	0,01	0,9 mL	0,1 mL de 0,10 EU/mL solução

Os valores da absorbância das soluções de endotoxina previamente preparadas foram espectrofotometricamente medidos a 340 nm no leitor Biotek (ELX 808, Winooski, VT, EUA). A absorbância a 340 nm foi linear com os intervalos de concentração usados. A linearidade da curva padrão dentro do intervalo de concentração foi usada para determinar os valores de endotoxina. A reprodutibilidade pode ser verificada pela comparação das diferentes curvas (Figura 8).

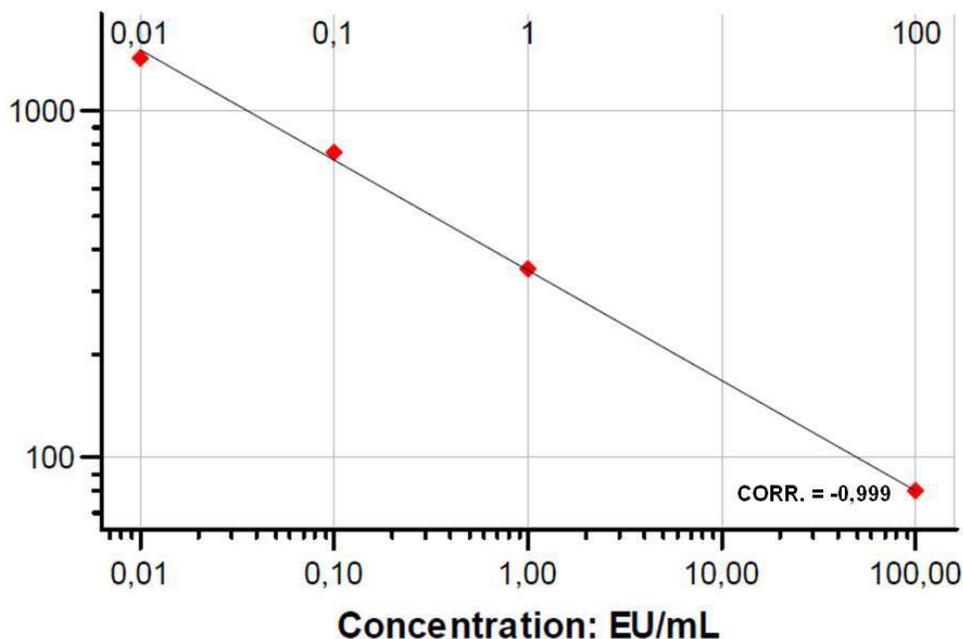


Figura 8: Gráfico da curva-padrão

Curva padrão determinada a partir da diluição da solução de *E. coli* – utilizada como parâmetro para o cálculo das concentrações de endotoxinas das amostras, com base na endotoxina da *E. coli* 055:B5 com concentração conhecida de 100 EU/mL.

4.5.1. Procedimentos para execução do teste

Foi impresso um esboço com o posicionamento da água apirogênica, da curva padrão, das amostras e do controle positivo do produto (PPC) na placa de 96 poços (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, EUA). Em seguida, foi dispensado

cuidadosamente no interior dos poços da microplaca: 100 µl das amostras e 100 µl dos controles positivos das mesmas, ambas em duplicata. Nas amostras controles foram dispensados 10 µl da endotoxina na concentração de 10 EU/mL, evitando a formação de bolha. Após o preenchimento das amostras e dos respectivos controles previamente contaminados com *E. coli*, foi dispensado cuidadosamente no interior dos poços da microplaca: 100 µl de água apirogênica (branco), padrões de endotoxina (100 µl da concentração de 0,01 EU/mL; 0,1 EU/mL; 1 EU/mL; 10 EU/mL e 100 EU/mL). A placa foi pré-incubada por ≥ 10 minutos a $37^{\circ}\text{C} + 1^{\circ}\text{C}$, no leitor Biotek (ELX 808, Winooski, VT, EUA). Próximo ao final do período de pré-incubação, cada frasco de reagente Pyrogent-5000 foi reconstituído com 5,2 mL de tampão de reconstituição Pyrogent-5000, que foi todo misturado levemente. Após isso, foi dispensado rapidamente 100 µL do reagente reconstituído de Pyrogent-5000 dentro de todos os poços da microplaca, iniciando pela primeira coluna (A1-H1) e procedendo em sequência até a última coluna utilizada. Com a tampa da placa removida iniciou-se a leitura.

4.5.2. Cálculo da concentração de endotoxinas

De forma contínua durante todo o ensaio, o leitor de microplacas foi monitorado na absorvância de 340 nm de cada poço 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 (Lonza, Walkersville, MD, EUA) executa automaticamente uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Os parâmetros da curva padrão foram impressos no relatório. Se o valor absoluto do coeficiente de correlação (r) for igual a 0,980, um modelo polinomial pode ser usado para construir uma curva padrão e, assim, predizer as concentrações de endotoxina das amostras de teste.

4.6. DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ INFLAMATÓRIAS IL1 α , IL1 β , TNF α E PGE2

Para quantificação das citocinas pró inflamatórias IL1 α , IL1 β , TNF α E PGE2 das bolsas periodontais e dos canais radiculares, empregou-se ensaio imunoenzimático (ELISA) e kits comerciais (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA ou Biolegend, San Diego, CA, USA). Todas as reações foram desenvolvidas segundo as recomendações dos fabricantes (APÊNDICE X).

Para essa análise, todas as amostras que estavam congeladas em criotubos, foram descongeladas e, suspendidas em 2 mL de água apirogênica / estéril.

Nos ensaios, as concentrações dos anticorpos monoclonal e policlonal, bem como das citocinas recombinantes específicas, utilizadas nas curvas padrão, foram recomendadas pelos fabricantes (R & D Systems e Biolegend).

O kit utiliza a técnica "sanduíche" de ensaio imunoenzimático quantitativo. Um anticorpo anti-humano monoclonal, específico para as respectivas citocinas, foram pré-revestidos em uma placa de 96 poços. Todos os reagentes foram colocados à temperatura ambiente. Foram adicionados 50 μ l do diluente em cada poço. Em seguida, 200 μ L da curva padrão e das amostras foram adicionadas em cada poço e a placa foi incubada à temperatura ambiente durante 2 h. A presença de IL-1 β , IL-1 α , TNF- α e PGE2 vai ligar ao anticorpo imobilizado. Após 2 horas, a placa foi lavada para a remoção de proteínas não ligadas ao anticorpo. Depois, um anticorpo ligado a enzima (peroxidase de rábano) policlonal (200 μ l) específico para cada citocina foi adicionado em cada poço. A placa foi incubada à temperatura ambiente durante mais 2 horas, e os poços lavados novamente. Em seguida, 200 μ l de uma solução de substrato foi adicionada e toda a cor desenvolvida é proporcional à quantidade de citocinas ligadas. Após uma incubação de 20 min a 30 min, uma solução de stop (ácido sulfúrico) foi adicionado a reação. A intensidade da cor (densidade óptica) foi medida utilizando um leitor de microplacas a 450 nm- 540 nm) dentro de 30 min. Uma curva padrão específica para cada citocina foi determinada. Em seguida, a quantidade de citocinas de cada amostra (quantidade total) foi calculada e uma concentração (pg / ml) determinada, dividindo a quantidade de citocinas pelo volume (ml). Os ensaios de

ELISA foram realizados em duplicata, e os valores médios foram utilizados para calcular quantidades e concentrações totais de cada citocina (Figura 9).

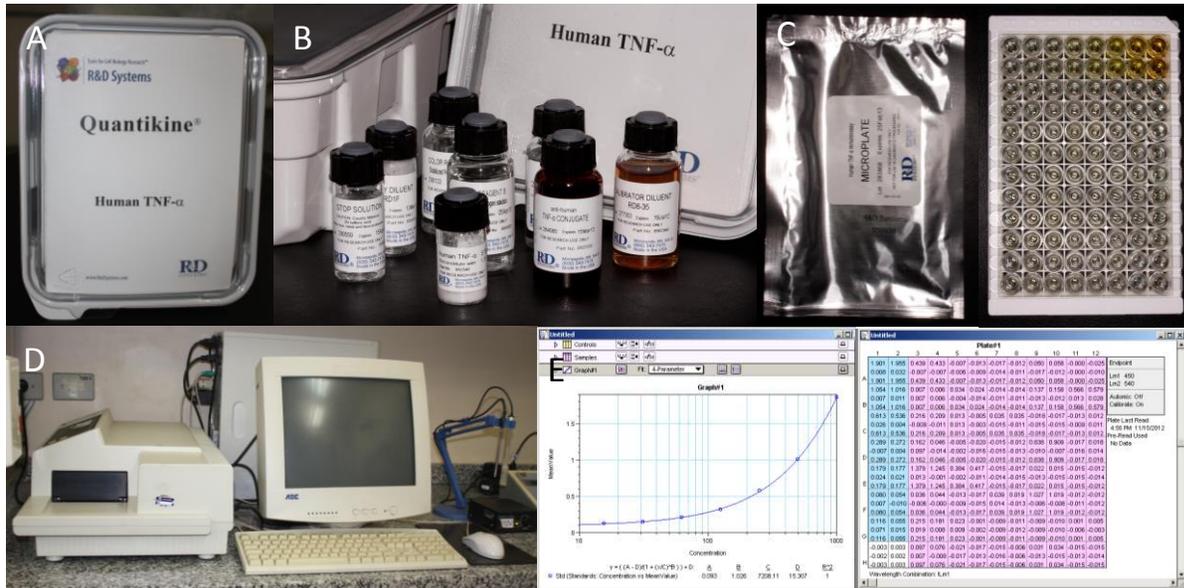


Figura 9- Processamento de citocinas. A - Kit para monitoramento de citocinas TNF α ; B – Reagentes do kit; C Biofilme contendo o anticorpo para a leitura; D - Leitor de Elisa associado ao computador; E - Resultado da curva padrão e do monitoramento de citocinas nas amostras.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados foi considerado o dente como unidade amostral. Para a análise dos dados que trabalharam com presença ou ausência bacteriana foi utilizado o teste Exato de Fisher para comparação intergrupo. Para a análise intra grupo foi utilizado os testes Mc Nemar quando as variáveis eram dicotômicas. Teste anova para medidas repetidas, seguido pelo teste de Tukey, que foi utilizado para a comparação intra e intergrupo quando os dados preencheram os requisitos de normalidade, previamente verificados pelo teste Shapiro Wilk. Quando os dados não apresentaram a característica de normalidade, utilizou-se o teste Kruskal Wallis para a comparação inter grupo e o teste Wilcoxon para a comparação intra grupo.

As análises foram realizadas nos programas Bioestat 5,0 (Instituto Mamirauá, Belém, PA, Brasil) e SAS Software 9,1 (The SAS Institute, Cary, NC, EUA). Para todas as análises considerou-se nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Foram avaliados 79 dentes de pacientes que estavam sob acompanhamento periodontal por mais de 1 ano na Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP. Destes, 16 dentes se apresentavam necrosados.

Os outros 63 dentes apresentavam uma sensibilidade pulpar alterada durante o teste térmico. No entanto, 48 desses dentes foram indicados para a extração após a avaliação da Periodontia e da Prótese. Esses dentes já não apresentavam mais nenhum tipo de suporte ósseo e nenhum tratamento poderia ser realizado.

Foram examinados 11 pacientes que apresentavam 15 dentes com bolsa periodontal associada com profundidade de sondagem maior ou igual a 6 mm em uma das faces, ausência de sangramento, perda óssea extensa em uma das faces visível radiograficamente, acompanhamento periodontal de no mínimo 1 ano sem regressão da doença e, dentes que clinicamente, através do teste térmico, apresentaram sensibilidade pulpar positiva. Essa sensibilidade não era considerada normal, pois mesmo após a remoção do estímulo térmico, o paciente sentia sensibilidade prolongada.

A idade dos pacientes variava entre 25 e 53 anos, sendo que 5 deles pertenciam ao gênero feminino e 6 deles ao gênero masculino.

Os elementos dentais avaliados pertenciam ao grupo dos incisivos superiores (5/15), incisivos inferiores (1/15), pré-molares superiores (2/15), pré-molares inferiores (1/15), molares superiores (1/15) e molares inferiores (5/15).

Clínicamente, 7/15 apresentavam-se com restaurações e 8/15 eram hígidos. Todos apresentavam mobilidade dentária e respostas aos testes de percussão e palpação negativas.

Todos esses dados, dos 11 dentes, estão representados no geral na tabela 4 e, individualmente de acordo com cada grupo, na tabela 5.

Todos os pacientes, durante a anamnese e exame clínico, relataram aumento de sensibilidade e desconforto relacionado ao dente avaliado. Essa sensibilidade era

sempre maior após a terapia de manutenção periodontal e não regredia facilmente, sugerindo uma comunicação entre polpa e periodonto.

Os 15 dentes foram selecionados e divididos, aleatoriamente, em 3 grupos de acordo com o tipo de tratamento endodôntico proposto, como descrito na Figura 10.

A avaliação de preservação foi realizada um ano após a terapia endodôntica. Nesse período, 5 dentes foram extraídos e 10 dentes permaneceram na cavidade oral.

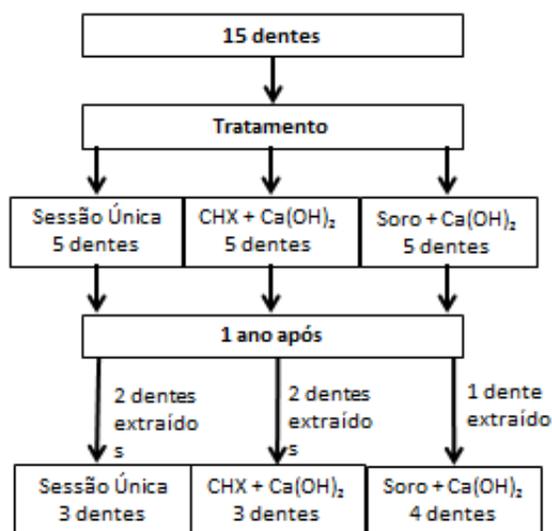


Figura 10 – Flowchart dos dentes selecionados.

Tabela 4 - Apresentação geral das características dos 15 pacientes que compuseram o estudo.

Parâmetro	Dados amostrais
Idade (anos)	38,93 (± 8,99)
Gênero (Masculino/Feminino)	7/8
Estado da coroa Hígido/Restaurado	8/7
Uni/multirradicular	8/7
Profundidade de sondagem (mm)	7,73 (± 2,58)
Nível de Inserção clínico (mm)	10,33 (± 1,71)
Presença de mobilidade – n(%)	15 (100%)

Tabela 5 – Apresentação geral das características iniciais dos 15 pacientes e comparação entre os grupos no baseline.

Parâmetro	Grupos			Valor de “p”
	1- Ca(OH) ₂ + CHX	2 – Sessão única	3 – Ca(OH) ₂ + soro	
Idade (anos)	37 (± 6,04) a	37 (± 9,69) a	42,8 (± 11,14) a	0,5954*
Gênero (M/F)	2/3	2/3	3/2	1,0000**
Estado da coroa H/R	3/2	4/1	1/4	0,7475**
Uni/multirradicular	3/2	4/1	1/4	0,7475**
Profundidade de sondagem (mm)	6,20 (± 2,49) b	6,80 (± 2,17) b	10,20 (± 0,84) a	0,0155*
Nível de Inserção clínico (mm)	10,00 (± 2,00) a	9,80 (± 1,79) a	11,20 (± 1,30) a	0,4082*
Presença de mobilidade – n(%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	1,0000**

*Letras minúsculas distintas na linha significam diferença estatística pelo teste Anova seguido do teste de Tukey. ** Valor de p calculado pelo teste Exato de Fisher.

Nenhum paciente, de nenhum dos grupos, apresentou sensibilidade pós-operatória entre as sessões de atendimento.

De acordo com as características clínicas periodontais, após a terapia endodôntica, alguns dentes (10/15) apresentaram diminuição da profundidade de sondagem (Tabela 6), redução da mobilidade dentária e ausência de sensibilidade, indicando possível saúde gengival. Dos 15 dentes tratados, 5 foram extraídos devido a progressão da doença periodontal. Em relação a esses dentes extraídos, apenas 1/15 era de paciente que não voltou a fazer acompanhamento periodontal e não tinha uma boa higiene. Dos 10 dentes que se mantiveram na cavidade oral, 5 eram dentes que continuaram sob manutenção periodontal e 5 eram de pacientes que por conta própria não voltaram mais para manutenção periodontal.

Tabela 6 – Comparação entre os grupos antes e após o tratamento em relação à profundidade de sondagem. Considerados para análise apenas os dentes que não foram extraídos (n=10). Valores de mediana (mínimo – máximo) em mm.

Grupo	Tempo	
	Antes n=10	Após n=10
1 n=3	7 (4 - 10) Ba	6 (3 - 10) Ba
2 n=4	7 (5 - 10) Ba	5 (3 - 8) Bb
3 n=3	11 (10 -11) Aa	9 (8 - 9) Ab

Letras maiúsculas diferentes na coluna e letras minúsculas diferentes na linha significam diferença estatística pelo teste Anova seguido pelo teste de tukey

Em relação à mobilidade dental, no baseline, todos os dentes apresentavam mobilidade inicial, de no mínimo grau 2. Na preservação de 1 ano, houveram perdas em função da necessidade de exodontia dos dentes envolvidos no estudo. No entanto se observou que dos 10 dentes que continuaram em tratamento, 9 (90%) apresentaram redução da mobilidade para grau 1 e apenas 1 (10%), não apresentou mobilidade na reavaliação.

5.2. PCR

5.2.1 Bolsa Periodontal

Os microrganismos mais frequentemente encontrados na bolsa periodontal, dentre os pesquisados (alvos), pelo método de PCR na coleta inicial foram: *P micra* (86,6%), *T forsythia* (80%) e *P gingivalis* (66,6%) (APÊNDICE II).

Imediatamente após o PQM, *P micra* (86,6%), *T forsythia* (80%) e *P gingivalis* (60%) continuaram entre os mais encontrados.

Para os grupos onde foram utilizados medicação intracanal, após 30 dias, *P micra* e *T forsythia* foram encontrados em 53,3% das amostras e *P gingivalis* (46,6%) e *F nucleatum* em 46,6%, conforme os dados da tabela 7.

Avaliando a presença de *T. forsythia*, *T. denticola* e *P. gingivalis*, que são os microrganismos pertencentes ao complexo vermelho, podemos perceber que: na bolsa periodontal inicial, 7 amostras apresentavam esses 3 microrganismos juntos (P2, P3, P4, P9, P10, P12, P14); 5 amostras apresentavam pelo menos a presença de 2 deles (P5, P7, P11, P13, P15) e, 3 amostras não apresentavam nenhum desses microrganismos do complexo vermelho (P1, P6, P8).

Após o PQM, 6 amostras continuaram apresentando os 3 microrganismos juntos (P2, P3, P4, P9, P10, P14); 6 amostras apresentavam pelo menos 1 microrganismo (P5, P6, P11, P12, P13, P15) e, 3 amostras não apresentava nenhum microrganismo (P1, P7, P8).

Após a medicação de 30 dias, os 10 dentes que faziam parte desses grupos tiveram as bolsas periodontais avaliadas e, avaliando a presença do complexo vermelho, 5 amostras apresentaram os 3 microrganismos juntos (P2, P5, P9, P14, P15); 3 amostras apresentavam pelo menos 2 microrganismos (P11, P12, P13) e, 2 amostras não apresentavam nenhum desses 3 microrganismos (P1, P8)

Tabela 7 – Apresentação da frequência de presença de bactérias na bolsa periodontal.

Espécie bacteriana	Grupo Sessão Única – n=5			Grupo Ca(OH) ₂ e CHX – n=5			Grupo Ca(OH) ₂ e SS – n=5		
	Inicial	Final	1 mês	Inicial	Final	1 mês	Inicial	Final	1 mês
T. forsythia	4	4	-	3	3	3	5	5	5
T. denticola	4	3	-	3	2	3	5	3	3
P. micra	4	3	-	4	5	3	5	5	5
F. nucleatum	3	1	-	1	3	4	4	3	3
P. gingivalis	4	3	-	3	3	3	3	3	4
P. intermédia	2	2	-	2	2	3	2	2	1

*Significa diferença estatística em relação ao tempo baseline por meio do teste McNemar.

Os dentes extraídos pertenciam aos pacientes P1, P2, P7, P11 e P15, dos quais, P2, P11 e P15 apresentavam principalmente microrganismos do complexo vermelho e, P1 e P8 apresentavam, principalmente, *F. nucleatum*, pertencente ao complexo vermelho.

Algumas associações positivas entre microrganismos foram encontradas nas bolsas periodontais iniciais e após o preparo químico mecânico, conforme a tabela 8 e 9. Nessas tabelas, os valores em negrito representam as associações que tiveram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 8 – Associação da presença de espécies distintas no interior da bolsa no momento pré tratamento. N=15

	T. forsythia	T. denticola	P. micra	F. nucleatum	P. gingivalis	P. intermédia
T. forsythia	-	0,0022	0,0286	1	0,0220	0,2286
T. denticola	0,0022	-	0,0286	1	0,0220	0,2286
P. micra	0,0286	0,0286	-	0,4667	0,0952	0,4857
F. nucleatum	1	1	0,4667	-	0,2821	0,3147
P. gingivalis	0,0220	0,0220	0,0952	0,2821	-	0,0440
P. intermédia	0,2286	0,2286	0,4857	0,3147	0,0440	-

Associação avaliada por meio do teste Exato de Fisher. Os dados se referem aos valores de p

Tabela 9 – Associação da presença de espécies distintas no interior da bolsa no momento após o tratamento endodôntico. N=15

	T. forsythia	T. denticola	P. micra	F. nucleatum	P. gingivalis	P. intermédia
T. forsythia	-	0,0769	1	0,0769	0,0440	0,2286
T. denticola	0,0769	-	1	0,6193	0,3147	0,6084
P. micra	1	1	-	0,4667	1	1
F. nucleatum	0,0769	0,6193	0,4667	-	0,0406	0,1189
P. gingivalis	0,0440	0,3147	1	0,0406	-	0,0278
P. intermédia	0,2286	0,6084	1	0,1189	0,0278	-

Associação avaliada por meio do teste Exato de Fisher.

5.2.2 Canal Radicular

Microrganismos foram detectados inicialmente em 11 amostras, sendo que 8 dentes se apresentavam hígidos e 3 restaurados. E, 4 amostras apresentaram ausência de microrganismos na coleta inicial.

Os microrganismos mais frequentemente encontrados nos canais radiculares pelo método de PCR na coleta inicial (antes do preparo químico mecânico) foram: *P micra* (80%) e *F nucleatum* (80%).

Imediatamente após o PQM, *P micra* (80%) foi o microrganismos mais encontrado.

Para os grupos onde foram utilizados MIC, após 30 dias, *P micra* (80%) e *P gingivalis* (80%) foram as mais prevalentes de acordo com a tabela 10.

Tabela 10 – Apresentação da frequência da presença de bactérias no interior do canal.

Espécie bacteriana	Sessão Única – n=5			Grupo Ca(OH) ₂ e CHX – n=5			Grupo Ca(OH) ₂ e SS – n=5		
	Inicial	Final	1 mês	Inicial	Final	1 mês	Inicial	Final	1 mês
T. forsythia	0	0	-	2	0	0	0	2	1
T. denticola	0	0	-	0	0	0	1	0	0
P. micra	2	4	-	2	1	2	0	0	2
F. nucleatum	2	0	-	3	0	0	0	0	0
P. gingivalis	1	0	-	1	1	1	1	0	0
P. intermédia	0	0	-	0	0	0	0	0	0

*Significa diferença estatística em relação ao tempo baseline por meio do teste McNemar.

Nenhuma associação positiva entre microrganismos foi encontrada nos canais radiculares iniciais e após o preparo químico mecânico, conforme a tabela 11 e 12. Nessas tabelas, os valores em negrito representam as associações que tiveram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 11 – Associação da presença de espécies distintas no interior do canal no momento pré tratamento. N=15

	T. forsythia	T. denticola	P. micra	F. nucleatum	P. gingivalis	P. intermédia *
T. forsythia	-	1	0,4762	1	0,3714	-
T. denticola	1	-	1	1	1	-
P. micra	0,4762	1	-	1	1	-
F. nucleatum	1	1	1	-	0,2418	-
P. gingivalis	0,3714	1	1	0,2418	-	-
P. intermédia *	-	-	-	-	-	-

Associação avaliada por meio do teste Exato de Fisher. *não foi detectada no interior do canal.

Tabela 12 – Associação da presença de espécies distintas no interior do canal após tratamento endodôntico. N=15

	T. forsythia	T. denticola	P. micra	F. nucleatum	P. gingivalis	P. intermédia
T. forsythia	-	-	0,5238	-	1	-
T. denticola	-	-	-	-	-	-
P. micra	0,5238	-	-	-	1	-
F. nucleatum	-	-	-	-	-	-
P. gingivalis	1	-	1	-	-	-
P. intermédia	-	-	-	-	-	-

Associação avaliada por meio do teste Exato de Fisher.

5.3. QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINAS

5.3.1. *Bolsa Periodontal*

O teste turbidimétrico LAL indicou que as endotoxinas estiveram presentes em 100% das amostras de bolsas periodontais e, em todas as fases analisadas (inicial, após PQM e após MIC) (APÊNDICE III).

Médias altas de endotoxinas foram encontradas nas coletas das bolsas iniciais (192,81 EU/mL), que apresentou uma redução estatisticamente significativa após a instrumentação do canal radicular. Após o PQM, a média da concentração de endotoxinas presentes em bolsas periodontais foi de 19,65 EU/mL, sendo estatisticamente significativa em relação à coleta inicial. Esses dados estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13 – Concentração de endotoxinas presentes na bolsa periodontal antes e após a instrumentação (n=15). Valores de mediana (mínimo – máximo) em mm.

Parâmetro	Inicial	Final	Valor de "p"
Endotoxinas	221,00 (15,00 – 551,00)	13,70 (0,10 – 93,80)	p = 0,0011*

* Valor de p calculado pelo teste t pareado.

A comparação da concentração de endotoxinas foi realizada entre a coleta inicial da bolsa periodontal e a coleta da bolsa periodontal 30 dias após a medicação intracanal, como mostra a tabela 14.

Tabela 14 – Comparação entre os grupos em relação à quantidade de endotoxinas no interior da bolsa periodontal antes e após a medicação (n=10). Valores de mediana (mínimo – máximo) em mm.

Grupo	Tempo	
	Inicial	Após medicação
Grupo Ca(OH)₂ e CHX	62,50 (15,5 - 225) Aa	14,80 (2,13 - 270) Aa
Grupo Ca(OH)₂ e SS	335 (25,1 - 373) Aa	26,1 (8,97 – 84,80) Aa

Letras maiúsculas distintas na coluna e letras minúsculas distintas na linha significam diferença estatística pelo teste anova.

Após 30 dias, independente da medicação utilizada, não houve diferença estatisticamente significativa quando se comparou com a concentração inicial de endotoxinas e a concentração final de endotoxinas.

Quando comparamos a concentração de endotoxinas nos 3 momentos coletados (coleta inicial da bolsa periodontal, coleta final da bolsa periodontal e coleta da bolsa periodontal 30 dias após a MIC), verificamos diferença estatisticamente significativa apenas no grupo do Ca(OH)_2 e SS, quando avaliamos a redução de endotoxinas após o PQM e após MIC, como mostra a tabela 15.

Tabela 15 – Concentração de endotoxinas na bolsa periodontal na coleta inicial, após o PQM e após medicação (n=10). Valores de mediana (mínimo – máximo) em mm.

Grupos	Tempo		
	Inicial	Após instrumentação	Após medicação
Grupo Ca(OH)_2 e CHX	62,50 (15,5 - 225) Aa	4,32 (0,1 – 93,80) Aa	14,80 (2,13 - 270) Aa
Grupo Ca(OH)_2 e SS	335 (25,1 - 373) Aa	19,80 (1,59 – 29,3) Ab	26,1 (8,97 – 84,80) Aa

Letras maiúsculas distintas na coluna e letras minúsculas distintas na linha significam diferença estatística pelo teste Anova medidas repetidas.

5.3.2. Canal Radicular

Médias muito baixas de endotoxinas foram encontradas nas coletas iniciais dos canais radiculares (0,1 EU/mL), que permaneceu baixa após o PQM. Antes do uso do EDTA foi encontrado uma média de 0,16 EU/mL e após o uso do EDTA de 0,15 pg/mL. Esses valores são compatíveis com o estado de possível vitalidade pulpar dos dentes avaliados. Apesar dos valores serem baixos, não podemos associar eles à presença de LPS bacterianos presentes no tecido pulpar ou periodontal, visto que até mesmo a água aprotogênica utilizada no teste, apresenta níveis baixos de concentração de endotoxinas. Esses dados estão apresentados na tabela 16. Não houve diferença estatisticamente significativa nos períodos avaliados.

Tabela 16 – Concentração de endotoxinas presentes no canal radicular na coleta inicial e após o PQM (n=15). Valores de mediana (mínimo – máximo) em mm.

Parâmetro	Inicial	Antes EDTA	Depois EDTA
Endotoxina	0,1 (0,1 – 0,1)	0,1 (0,03 – 0,92)	0,1 (0,14 – 1,18)

Valores calculados pelo anova medidas repetidas ($p > 0,05$).

A comparação da concentração de endotoxinas foi realizada entre a coleta inicial do canal radicular e a coleta do canal radicular 30 dias após a medicação intracanal, como mostra a tabela 17. Não houve diferença estatisticamente significativa nos períodos avaliados.

Tabela 17 – Comparação entre os grupos antes e após o tratamento em relação à quantidade de endotoxinas no interior do canal (n=10). Valores de mediana (mínimo – máximo) em mm.

Grupo	Tempo	
	Inicial	Após medicação
Grupo Ca(OH)₂ e CHX	0,10 (0,10 – 0,10) Aa	0,10 (0,03 – 0,10) Aa
Grupo Ca(OH)₂ e SS	0,10 (0,10 – 0,10) Aa	0,10 (0,01 – 0,10) Aa

Letras maiúsculas distintas na coluna e letras minúsculas distintas na linha significam diferença estatística pelo teste Anova.

Quando comparamos a concentração de endotoxinas nos 4 momentos coletados (coleta inicial do canal radicular, coleta final antes EDTA, coleta final após EDTA e coleta do canal radicular 30 dias após a MIC), não verificamos diferença estatisticamente significativa, como mostra a tabela 18.

Tabela 18 – Concentração de endotoxinas no canal radicular na coleta inicial, após o PQM e após medicação (n=10). Valores de mediana (mínimo – máximo) em mm.

Grupos	Tempo			
	Inicial	Após instrumentação antes EDTA	Após instrumentação depois EDTA	Após medicação
1 (n=5)	0,10 (0,10 – 0,10) Aa	0,1 (0,09 – 0,16) Aa	0,02 (0,01 – 0,11) Aa	0,10 (0,03 – 0,10) Aa
3 (n=5)	0,10 (0,10 – 0,10) Aa	0,1 (0,1 – 0,92) Aa	0,1 (0,02 -1,18) Aa	0,10 (0,01 – 0,10) Aa

Letras maiúsculas distintas na coluna e letras minúsculas distintas na linha significam diferença estatística pelo teste Anova seguido pelo teste de tukey. ($\alpha=0,05$)

Foi realizado teste estatístico para avaliar a correlação entre endotoxinas presentes nos canais radiculares e endotoxinas presentes nas bolsas periodontais, através da correlação de Pearson (n=15). O valor de correlação de Pearson considerando n inicial =15 é de -0,0074 e $p=0,9792$. Ou seja, não existe nenhuma correlação entre endotoxinas presentes na bolsa e no canal radicular quando avaliamos as coletas iniciais.

5.4. MONITORAMENTO DE CITOCINAS

4.3.1. Monitoramento de citocinas e uso de medicação intracanal

O ensaio imunoenzimático (ELISA) indicou a presença de citocinas pró-inflamatórias IL1 α , IL1 β , TNF α e PGE2 em todas as amostras de bolsas periodontais e canais radiculares pesquisadas. As análises foram realizadas nas coletas iniciais e coletas após uso da MIC por 30 dias (APÊNDICE V).

A IL1 α não apresentou nenhuma relação estatisticamente significativa nas análises.

Os níveis de citocinas, após o uso de MIC por 30 dias, independente da medicação utilizada estão apresentados na Tabela 19. Os níveis de TNF- α , coletados no periápice (canais radiculares iniciais) apresentaram uma redução significamente

estatística após o uso da medicação intracanal. Na bolsa periodontal, os níveis de IL 1 β também apresentaram uma redução significamente estatística, quando os dois grupos de medicação são comparados juntos.

Tabela 19: Média da concentração de citocinas (pg / ml) nas bolsas iniciais e canais radiculares, assim como a significância estatística.

	CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS			
	IL 1 alpha	IL 1 beta	TNF alfa	PGE 2
Bolsa Inicial	147,66 \pm 233,12 A	70,35 \pm 78,71 A	20,49 \pm 12,48 A	74,36 \pm 54,82 A
Bolsa após MIC	61,89 \pm 57,78 A	22,03 \pm 24,56 B	6,86 \pm 5,34 A	78,61 \pm 63,79 A
Canal Inicial	3,96 \pm 3,32 A	8,77 \pm 5,03 A	15,17 \pm 12,52 A	98,44 \pm 60,00 A
Canal após MIC	32,56 \pm 44,78 A	4,53 \pm 13,82 A	3,88 \pm 1,34 B	78,98 \pm 46,65 A

Letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significante pelo teste Wilcoxon. ($\alpha=0,05$)

4.3.2. Monitoramento de citocinas de acordo com cada tipo de medicação utilizada

4.3.2.1. Medicação de Hidróxido de Cálcio e Clorexidina gel 2%

O monitoramento de citocinas foi realizado, nas coletas iniciais e após uso de MIC por 30 dias, dos canais radiculares e das bolsas periodontais. A tabela 17 apresenta esses valores para o grupo de Ca(OH)₂ e CHX gel 2%,

Os níveis de TNF α e IL 1 β das coletas após o uso da MIC, das bolsas periodontais, mostraram uma redução estatisticamente significativa quando comparado com os valores coletados inicialmente. (Tabela 20)

Tabela 20: Valores da concentração de citocinas (pg / ml) nas bolsas periodontais iniciais dos pacientes do grupo1 (Ca (OH)₂ + CHX).

CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS				
	IL 1 alpha	IL 1 beta	TNF alfa	PGE 2
Bolsa Inicial				
Ca (OH)₂ + CHX	91,37 ± 46,57 A	98,40 ± 86,54 A	28,01 ± 11,35 A	75,56 ± 65,61 A
Bolsa após MIC				
Ca (OH)₂ + CHX	63,02 ± 75,20 A	21,98 ± 29,86 B	5,43 ± 4,89 B	48,00 ± 39,28 A

Letras maiúsculas distintas na coluna significam diferença estatística pelo teste Anova seguido pelo teste de Tukey . ($\alpha=0,05$)

Os níveis de PGE2 coletados do periápice (canais radiculares), após o uso da MIC, apresentaram uma redução estatisticamente significativa. (Tabela 21)

Tabela 21: Valores da concentração de citocinas (pg / ml) nos canais radiculares iniciais dos pacientes do grupo1 (Ca (OH)₂ + CHX).

CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS				
	IL 1 alpha	IL 1 beta	TNF alfa	PGE 2
Canal Inicial				
Ca (OH)₂ + CHX	3,44 ± 2,30 A	10,77 ± 6,17 A	16,28 ± 17,16 A	106,31 ± 60,12 A
Canal após MIC				
Ca (OH)₂ + CHX	33,72 ± 61,47 A	8,89 ± 19,56 A	3,65 ± 1,24 A	47,07 ± 27,35 B

Letras maiúsculas distintas na coluna significam diferença estatística pelo teste Anova. ($\alpha=0,05$)

4.3.2.2. *Medicação de Hidróxido de Cálcio e Solução Salina*

As tabelas 22 e 23 apresentam os valores de citocinas para o grupo de Ca(OH)_2 e SS.

Após os 30 dias de MIC nenhuma das citocinas avaliadas mostrou níveis de redução estatisticamente significativa quando comparado com os valores obtidos nas coletas iniciais ($p > 0,05$)

Tabela 22: Valores da concentração de citocinas (pg / ml) nas bolsas periodontais iniciais dos pacientes do grupos 3.(Ca(OH)_2 + SS)

CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS				
	IL 1 alpha	IL 1 beta	TNF alfa	PGE 2
Bolsa Inicial				
Ca (OH)₂ + SS	203,95 ± 334,34 A	42,31 ± 66,38 A	12,97 ± 8,95 A	73,15 ± 43,53 A
Bolsa após MIC				
Ca (OH)₂ + SS	60,77 ± 46,16 A	22,08 ± 21,53 A	8,28 ± 5,93 A	109,22 ± 72,60 A

Letras maiúsculas distintas na coluna significam diferença estatística pelo teste ANOVA. ($\alpha=0,05$)

Os níveis de PGE2 das coletas do periápice (canais radiculares iniciais) aumentaram significativamente quando comparados com os níveis após o uso da MIC. Os níveis de IL1- β coletados do periápice (canais radiculares), após o uso da MIC, apresentaram uma redução estatisticamente significativa.

Tabela 23: Valores da concentração de citocinas (pg / ml) nos canais radiculares dos pacientes do grupos 3.(Ca(OH)₂ + SS)

CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS				
	IL 1 alpha	IL 1 beta	TNF alfa	PGE 2
Canal Inicial				
Ca (OH)₂ + SS	4,47 ± 5,04 A	6,78 ± 3,22 A	14,70 ± 7,41 A	90,57 ± 65,81 A
Canal após MIC				
Ca (OH)₂ + SS	31,64 ± 34,27 A	0,18 ± 0,05 B	4,11 ± 1,53 A	110,88 ± 40,04 B

Letras maiúsculas distintas na coluna significam diferença estatística pelo teste ANOVA. ($\alpha=0,05$)

4.3.3. Monitoramento de Citocinas Pró-inflamatórias e LPS

Para essa análise foi realizado um teste de regressão múltipla linear.

Comparando a concentração de endotoxinas e citocinas pró-inflamatórias, apenas TNF α apresenta uma correlação positiva entre os níveis de LPS e sua expressão no periápice.

Para as bolsas não houve correlação positiva entre endotoxinas e citocinas pró-inflamatórias.

6. DISCUSSÃO

A doença periodontal crônica é de caráter multifatorial e deve ser diagnosticada e tratada de forma multidisciplinar. No entanto, em alguns casos específicos, nos quais a doença periodontal de caráter crônico não responde positivamente, mesmo após longo período de terapia, percebemos que o tratamento periodontal pode ser insuficiente para eliminar processos inflamatórios e infecciosos existentes. Pouco se sabe sobre a influência dessa inflamação periodontal recidivante sobre a condição pulpar e até mesmo, dos possíveis efeitos que esse tratamento periodontal, a longo prazo, está causando nos tecidos pulpares. Dessa forma, não se sabe ao certo, a possível influência da condição pulpar no periodonto, nesses casos de periodontite crônica.

Essa falta de informação clínica, principalmente relacionada aos fatores microbiológicos e inflamatórios, tanto do ambiente pulpar quanto do ambiente periodontal desses casos específicos, motivou a realização desse estudo. Assim, as informações obtidas podem favorecer e auxiliar o tratamento periodontal.

6.1. Características Clínicas e Radiográficas dos pacientes selecionados

A seleção de pacientes para esse estudo foi muito criteriosa. Os pacientes tinham que apresentar acompanhamento periodontal de no mínimo 1 ano, bolsas periodontais profundas (maior ou igual a 6 mm) e sensibilidade pulpar positiva. Dessa forma, um detalhe significativo desse estudo foi a dificuldade de se encontrar pacientes que se encaixassem exatamente no perfil selecionado, principalmente pelo fato deles serem tratados em uma instituição pública. Isso justifica o número restrito da amostra, porque o critério de inclusão foi muito restrito.

Da mesma forma, Mealey (2000) afirma que há uma dificuldade em se localizar pacientes com periodontite crônica, visto que a prevalência é baixa e, assim, não se

consegue comparar adequadamente várias formas de tratamento com números mais expressivos de pacientes.

A evidência de sensibilidade pulpar alterada durante o estímulo térmico, sugeriu uma pulpite, mas existem controvérsias sobre essa questão. Segundo Harrington (1979), a pulpite é uma condição clínica de incidência baixa nos casos de doença periodontal (Harrington, 1979). Porém Seltzer & Farber (1994), Nakane *et al.* (1995) e Martin (2000) admitem que a pulpite é uma possível consequência da doença periodontal e sempre deve ser avaliada clinicamente, pois os dentes tratados endodonticamente perdem a camada de cemento e, favorece a chegada dos estímulos térmicos.

Os prolongamentos odontoblásticos, fibras colágenas e componentes de defesa presentes no fluido dentinário atuam como uma barreira física importante e capaz de dificultar a invasão bacteriana, justificando a capacidade da polpa se defender contra microrganismos (Siquera e Lopes, 1999; Kipiotti *et al.*, 1984; Gadê-Neto, 2000; Lindhe, Harrington *et al.*, 2002) . Em relação a essa possível condição de vitalidade pulpar avaliada em nosso estudo, os túbulos dentinários parecem ter um papel importante, atuando como barreira física e dificultando a invasão microbiana, visto que não foram todos os dentes que apresentaram bactérias nas coletas iniciais do canal.

Porém, já foi demonstrado que quando a superfície do dente é exposta a doença periodontal, os túbulos dentinários favorecem uma comunicação entre periodonto e polpa (Bergenholtz *et al.*, 1978; Nagaoka *et al.*, 1995), contribuindo para a invasão microbiana. (Stallard, 1972; Solomon *et al.*, 1995)

As grandes perdas ósseas verticais são frequentes em doenças periodontais crônicas (Nicholls, 1984). Em nosso estudo, apenas um paciente apresentava um molar inferior com perda óssea vertical generalizada, que envolvia toda a raiz mesial. No entanto, a resposta pulpar era positiva.

Essas características vão ao encontro com os achados de Riccuci (2010) que afirma que, por mais que o forame apical de uma das raízes se apresente envolvido pela doença periodontal, a nutrição do tecido pulpar não é completamente cortada, pois

as outras raízes ainda não estão comprometidas pela doença periodontal, mantendo o dente em questão vital.

Quanto a nutrição pelo forame apical, os trabalhos existentes na literatura mostram que enquanto permanecer intacto, a polpa é usualmente capaz de resistir aos insultos fisiológicos e suportar elementos nocivos induzidos pela doença periodontal (Fachin *et al.*, 2001; Harrington & Steiner, 2002; Abbott & Salgado, 2009). Para Gadê-Neto (2000), quando o suprimento sanguíneo apical não se mantém mais intacto, o tecido pulpar perde a capacidade de defesa contra os elementos agressores da biofilme bacteriano e da doença periodontal.

Existem controvérsias sobre a influência da doença periodontal no tecido pulpar. Sinai & Soltanoff (1973) induziram lesões periodontais em ratos e encontraram mudanças reabsortivas e reparativas na polpa, enquanto Hattler & Listgarten (1984) induziram doença periodontal severa em ratos, deixando a lesão se estender para a região apical e as polpas permaneceram vitais.

Os 15 dentes desse estudo foram obturados após tratamento endodôntico (em sessão única ou após utilização da MIC) e radiografados. Todas as radiografias foram avaliadas no negatoscópio, com auxílio de lupa de 6 vezes de aumento e, nenhum canal lateral foi observado adjacente às áreas comprometidas periodontalmente. Porém, De Deus (1975), Vertucci (1984) e Hess (1925) confirmam que essas ramificações podem ser observadas em todos os tipos de dentes. Contudo, para Weine (1989), eles são demonstrados com menos frequência do que realmente existem.

Rubach & Mitchell (1965) demonstraram que canais laterais e acessórios podem ser localizados em 45% dos defeitos periodontais, independente da severidade da doença. Da mesma forma, Kirkham, (1975) encontrou 23% de canais laterais em dentes comprometidos periodontalmente e, afirmou que essas vias de comunicação podem permitir o acúmulo bacteriano ou, até mesmo, levar contaminação para a polpa, impedindo a cicatrização periodontal pela manutenção da infecção. Em seu estudo, um dente se apresentou vital, com o canal localizado no terço coronário da raiz e perda óssea vertical generalizada, condições semelhantes ao nosso estudo.

Quanto a essa possível reciprocidade inflamatória / infecciosa entre esses dois tecidos, deve-se ressaltar que Mazur & Massler (1964) e Czarnecki & Schilder (1979) não encontraram nenhum tipo de relação. Em ambos os trabalhos, a condição histológica da polpa de dentes comprometidos periodontalmente, foi comparada com as de dentes clinicamente e radiograficamente normais. Os resultados mostram tecidos pulpares histologicamente semelhantes em todas as situações.

Porém, Seltzer & Bender (1963) Langeland *et al.* (1974) afirmaram que as vias de comunicação auxiliam na troca de produtos tóxicos entre esses dois tecidos, mas não o suficiente para causar necrose pulpar.

Durante o preparo químico mecânico, houve uma dificuldade em acessar todo o comprimento do canal radicular. A grande maioria dos canais apresentavam-se atresiadados, principalmente na região apical. Da mesma forma, Aguiar *et al.* (1999) encontraram maior frequência de fibroses e calcificações pulpares na região apical em dentes comprometidos por doença periodontal.

Dessa forma, a resposta pulpar frente ao estímulo periodontal pareceu ser mais reparador do que inflamatório, sendo caracterizado, principalmente, pela produção de dentina. Tal afirmação vai ao encontro com a literatura pesquisada (Bergenholtz & Lindhe, 1978; Chen *et al.*, 1997; Fachin *et al.*, 2001; Lantelme, Gadê-Neto, 2000), sendo lícito dizer que a doença periodontal está indiretamente atuando no tecido pulpar, sem prejudicar sua vitalidade (Chapple & Lumley, 1999; Armitage, 2010; Abbott & Salgado, 2011).

Além da produção de dentina, é comum a presença de focos de inflamação, fibroses e calcificações no tecido pulpar (Langeland *et al.*, 1974; Aguiar, 2002; Abbott & Salgado, 2009). Apesar da presença de tecido pulpar e visualização de sangramento após a abertura, não foi possível realizar a remoção desse tecido para avaliação histológica, pois o mesmo não se apresentava firme e apresentava características de degeneração. Tal fato pode ser provocado pelo efeito cumulativo e estímulo de baixa intensidade, frequente e de longa duração da doença periodontal sobre o tecido pulpar,

caminhando lento e assintomático para a necrose pulpar (Bombana, 2003; Seltzer *et al.*, 1963)

Características clínicas como sondagem e mobilidade, além de características radiográficas como perda óssea vertical, foram essenciais para diagnosticar que os dentes apresentavam doença periodontal. Além disso, características clínicas como estímulo térmico alterado (pois a dor era contínua e de longa duração) e radiográficas, como atresias dos canais radiculares, foram essenciais para diagnosticar que os dentes apresentavam comprometimento do tecido pulpar.

6.2. Proservação e avaliação clínica/radiográfica dos pacientes.

O tempo correspondente desde o início do tratamento endodôntico até a preservação dos dentes foi de um ano. Nesse período, todos os pacientes foram aconselhados a continuar sob manutenção da terapia periodontal. Este tempo é utilizado como protocolo de avaliação por Martin (2005), sendo suficiente para avaliação da condição periodontal.

Durante o exame clínico inicial, todos os pacientes relataram sensibilidade no dente envolvido pela doença periodontal, que aumentava principalmente após sessões de tratamento periodontal. Segundo Abbott & Salgado (2009), o tratamento periodontal pode causar inflamação pulpar, embora normalmente apenas na forma de pulpíte reversível. No entanto, a dor some poucos segundos após o estímulo ter sido removido e desaparece após uma ou duas semanas. Mas, essa inflamação pode persistir e causar uma pulpíte irreversível, que foi a condição clínica diagnosticada nos pacientes desse estudo. Após o tratamento endodôntico, os pacientes não relataram mais sensibilidade, que também foi confirmada na preservação de 1 ano.

Resultados semelhantes de sensibilidade pulpar após terapia periodontal também foram obtidos por Guldener, 1985; Whyman, 1988 e Wang & Glickman, 2002.

Cinco dentes foram extraídos após o tratamento endodôntico, sendo a causa relacionada a problemas periodontais. A hipótese mais provável levantada nesse trabalho, é que esses pacientes perderam os dentes pois não voltaram para fazer a manutenção periodontal e não apresentavam boa higienização. Da mesma forma, Jaoui *et al.* (1995) avaliaram pacientes que receberam terapia endodôntica e periodontal. Dos 195 dentes avaliados, 12 foram extraídos, sendo 10 por motivos periodontais.

Os outros 10 pacientes por nós pesquisados, apresentaram melhoras clínicas, como ausência de mobilidade e, diminuição da profundidade de sondagem de no mínimo 2 mm. Nossos resultados clínicos corroboram com Mealey (2000), que mostram bons resultados avaliados após terapia periodontal em bolsas com profundidade de sondagem acima de 7 mm, devem ser de aproximadamente 2 mm.

6.3. Metodologias Utilizadas

As análises microbiológicas são altamente dependentes da técnica utilizada para coletar as amostras. Em nosso estudo, optou-se por usar cones de papel absorventes estéreis/apirogênicos para as coletas nas bolsas periodontais e nos canais radiculares, sendo essa metodologia já consolidada na literatura pelos estudos de Gomes *et al.*, 1994; Sundvist, 1994; Peters *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 1995).

Usualmente, as amostras dos canais radiculares podem ser coletadas com limas estéreis, enquanto as de bolsa subgingival podem ser coletas com curetas estéreis (Socransky *et al.*, 1998; Socransky & Haffajee, 2002; Hartroth *et al.*, 1999; Pereira 2011).

A escolha do PCR como técnica molecular para identificação bacteriana, nesse estudo, baseou-se em vários trabalhos (Shimoto *et al.*, 1996; Roças *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2004a; Gomes *et al.*, 2004b; Gomes *et al.*, 2005a; Verma *et al.*, 2010) que confirmaram a sua maior sensibilidade, especificidade e efetividade quando comparadas às técnicas convencionais de cultura

No entanto, esse fato limita confirmar a severidade das infecções presentes em nosso estudo. Esse fator não depende apenas da identificação e virulência da espécie que está infectando o ambiente, mas sim da quantidade com que essa espécie invade os tecidos. Dessa forma, técnicas de quantificação molecular podem determinar o número de espécies, favorecendo uma real avaliação do potencial delas com o estado da doença (Haffajee & Socransky, 2006; Saito, 2009)

O Lisado de Amebócito *Limulus* (LAL), por ser um método turbidimétrico quantitativo, têm se mostrado extremamente sensível à presença de endotoxinas, favorecendo uma melhor avaliação das amostras, assim como demonstrado por Martinho *et al.*, 2010 e Martinho *et al.* 2011.

6.4. Microbiologia dos canais radiculares e das bolsas periodontais

As bactérias encontradas com maior frequência nas bolsas periodontais iniciais foram *Parvimonas micra* (86%), *Tannerella forsythia* (80%) e *Porphyromonas gingivalis* (66,6%). As duas últimas são espécies pertencentes ao complexo vermelho, que é considerado o mais destrutivo e prevalente em sítios periodontalmente comprometidos (Socranski *et al.*, 1998; Socransky & Roças, 2001; Yoneda, 2005; Kesavalo, 2007), foi confirmado em nosso estudo.

Segundo Socransky & Haffajee (2003), o complexo vermelho formado por *Tannerella forsythia*, *Porphyromona gingivalis* e *Tannerella denticola* é o mais investigado e importante dentro das patologias periodontais. Fato comprovado em nosso estudo que mostrou a presença de pelo menos 2 dessas bactérias em 12 das 15 amostras iniciais das bolsas periodontais, e pelo menos 1 em 8 das 10 amostras avaliadas após o uso de medicações intracanáis.

Todas as espécies analisadas, com exceção da *Parvimonas micra*, foram bactérias Gram negativas, que são fortemente relacionadas a infecções periodontais destrutivas (Socransky & Haffajee, 1998; Tanner & IZard, 2006 e Kesavalo *et al.*, 2007). Mas, a bactéria Gram positiva *Parvimonas micra* foi a mais prevalente (86%) nas

bolsas periodontais iniciais. Essas espécies Gram positivas, pertencente ao complexo laranja, têm sido pesquisadas e encontradas tanto em sítios periodontais doentes quanto saudáveis, sendo consideradas um marcador de destruição periodontal (Cobb, 2002). *Tannerella forsythia* é frequentemente detectada em pacientes com doença periodontal e foi a bactéria Gram negativa encontrada em maior frequência (80%) nas bolsas periodontais iniciais.

Uma associação positiva entre essas duas espécies foi encontrada em nosso estudo. Esses resultados estão de acordo com os achados de Van Winkelhoff *et al.* (2002) que confirmaram o sinergismo dessas espécies e mostraram que são periodontopatógenos prevalentes e importantes em indivíduos com destruição periodontal.

Ainda sobre a associação entre essas duas espécies, vale ressaltar a importância de bactérias Gram positivas agregadas às bactérias Gram negativas em processos de infecção. Essa combinação específica tem sido frequentemente identificada como um potente fator de virulência, aumentando o potencial de degradação em doenças da cavidade oral. Dados confirmados por Gomes *et al.* (1994), Dahlen & Moller (1992); Socrasnk & Haffajee (1998) e Martin (2000).

Correlações positivas entre todas as bactérias do complexo vermelho foram encontradas. Esse fato demonstra a importância dessas espécies dentro da doença periodontal e do sinergismo entre elas, aumentando a virulência e a severidade da patologia. Esses resultados são também comprovados nos estudos de Ashimoto *et al.* (1996), Socrasnk & Haffajee (1998), Yoneda *et al.* (1995), Cugini *et al.* (2000), Roças *et al.* (2001) e Kesavalo *et al.* (2007)

Em nosso estudo, *Porphyromonas gingivalis* foi um microrganismo frequentemente detectado nas bolsas periodontais. Esse microrganismo tem sido estudado por sua capacidade de invadir os tecidos periodontais subjacentes, representando um reservatório bacteriano, e por estar presente no cemento e dentina radicular de dentes periodontalmente comprometidos, como confirmado por Shiloah & Patters (1994) e Giuliana *et al.* (1997). Além disso, são capazes de manipular a

resposta do hospedeiro através de seus fatores de virulência como fimbrias e LPS. (Wang, 2010)

No presente estudo, a associação entre *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis* foi a mais prevalente, indo de encontro com os achados de Yoneda *et al.* (2005) que afirmaram que essa associação é responsável pela severidade da doença periodontal. Resultados também apresentados por Saito (2009), que confirmou a presença de *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*, mostrando que são periodontopatógenos prevalentes em indivíduos com destruição periodontal.

Porphyromonas gingivalis e *Treponema denticola* também foram associações frequentemente encontradas em nosso estudo, exibindo virulência na colonização da cavidade oral, como demonstrado por Kesavalo *et al.* (1997). Porém esses resultados são contrários aos encontrados por Verma (2010), que mostrou que *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* não exibiram fatores de virulência quando em sinergismo nas doenças periodontais induzidas em ratos.

Apesar da polpa se apresentar aparentemente vital, alguns microrganismos foram encontrados nas coletas iniciais dos canais radiculares, mostrando que o canal pode atuar como reservatório de microrganismos, mesmo na vitalidade pulpar (Harrington *et al.*, 2002). De acordo com Carvalho & Zuolo, (2000), essa chegada de microrganismos até a polpa deve ser considerada, principalmente na presença de doenças periodontais mais severas/agressivas.

Parvimonas micra e *Fusobacterium nucleatum* foram identificadas em 4/15 e 5/15 amostras de canais radiculares, respectivamente. Para Baumgartner (1992), *Fusobacterium nucleatum* age como uma ponte de agregação entre os microrganismos, sendo que suas culturas mistas são mais patogênicas do que culturas puras. *F. nucleatum* é frequentemente encontradas em canais radiculares associados à necrose pulpar (Gomes *et al.*, 2006; Siqueira Jr *et al.*, 2000), sendo de extrema importância em infecções endodônticas primárias e frequentemente pesquisado tanto nos casos sintomáticos (Gomes *et al.*, 1994), quanto nos assintomáticos (Peters *et al.*, 2002). A *P. micra* é usualmente identificada em casos de processos cariosos avançados, seguido de necrose pulpar (Martin, 2000).

Dados semelhantes foram evidenciados por Kolenbrander (2000), nas quais *Parvimonas micra* e *Fusobacterium nucleatum* foram identificados inicialmente em bolsas e canais radiculares, sendo a *Parvimonas micra* detectada em uma menor frequência, sem nenhuma associação positiva com outros microrganismos. Por outro lado, Martin (2000) afirmou que essa associação aumenta o potencial de degradação, ataca o sistema imunológico e interfere na reparação pulpar

Normalmente, esses microrganismos Gram negativos detectados no canal radicular estão associados com dor espontânea e dor à percussão (Sundqvist *et al*, 1989; e Gomes *et al*, 1994a, 1996a, 2002), o que não foi detectado em nosso estudo. Segundo Siqueira Jr. *et al*. (2001a), esses microrganismos também estão presentes em dentes assintomáticos.

Reinhardt *et al*. (1982) mostraram que casos de inflamação tecidual e bacteremias, podem favorecer a presença temporária de bactérias Gram positivas. Martin (2000) afirmou que *Parvimonas micra* associada com outras bactérias Gram negativas, como *Fusobacterium nucleatum*, favorecem a patogenicidade desses microrganismos. Esse fato pode justificar a presença do sinergismo dessas duas espécies, detectadas nos canais radiculares.

As 15 amostras iniciais do canal radicular analisadas por PCR simples, apresentaram resultados positivos para a presença de microrganismos. Resultado diferente foi encontrado por Gade-Neto (2000), que avaliou 16 dentes com vitalidade positiva em dentes comprometidos periodontalmente, sendo que 10 apresentaram cultura microbiológica negativa. No entanto, não foi realizada identificação molecular e os dentes não passaram por nenhum tipo de terapia periodontal.

A *Prevotella intermédia* não foi identificada em nenhuma amostra dos canais radiculares. No entanto, esteve presente em 6/15 amostras de bolsas periodontais. Pereira (2011) explicou que a presença desse microrganismo está diretamente relacionada à patogenicidade e a progressão da doença periodontal. Em seu trabalho, avaliando leões endoperio verdadeiras, esse microrganismo foi identificado em uma maior prevalência nas bolsas periodontais quando comparado com os canais radiculares.

Em contrapartida, Peters *et al.* (2002) mostraram a presença dessa bactéria em canais radiculares infectados e, uma associação positiva dessa bactéria com *Parvimonas micra*. Dados semelhantes foram apresentados por Gomes *et al.* (2005), que mostrou a grande frequência com que esse microrganismo é identificado em infecções primária e secundárias

A baixa prevalência de espécies por canal é aceitável, visto que essas polpas estavam vitais, mas apresentavam consistência e sangramento diferentes de uma polpa vital sadia. Normalmente, em casos de polpa necrosada, há uma prevalência de 4 a 6 espécies por canal, o que caracteriza uma infecção polimicrobiana (Sundqvist, 1976; Gomes *et al.*, 1994a, 1996a; Baumgartner *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2000;).

O tratamento periodontal de longa duração pode ter removido cimento, deixando túbulos dentinários abertos, o que favorece a comunicação de bactérias e subprodutos, como LPS, com o tecido pulpar, assim como é sugerido por Lindhe *et al.* (1999) Além disso, os túbulos dentinários podem ter servido de reservatório bacteriano, que continuaram mantendo a infecção (Adriens *et al.*, 1987 e Loesche *et al.*, 1990).

A literatura pesquisada não evidenciou trabalhos onde há a identificação de bactérias no interior dos canais radiculares, em dentes com envolvimento periodontal crônico e sensibilidade pulpar positiva. Trabalhos clássicos como de Kipioti *et al.* (1984) e Kobayashi *et al.* (1990), além de trabalhos mais atuais como Berber (2009) e Pereira *et al.* (2011) avaliaram a associação de bactérias presentes em bolsas e canais radiculares que apresentavam polpa necrosada.

Com esses resultados, podemos sugerir que bactérias presentes em bolsas periodontais profundas e ativas podem favorecer que bactérias penetrem e contaminem os canais radiculares, através das possíveis vias de comunicação entre essas duas estruturas. Da mesma forma, seria sugestivo que a doença periodontal associada a uma possível bacteremia, principalmente após procedimentos de raspagem, pode favorecer que essas bactérias ocupem o tecido pulpar, mas em quantidade insuficiente para causar necrose tecidual.

6.5. Efeito da medicação intracanal sobre os microrganismos dos canais radiculares e das bolsas periodontais

No que se refere à necessidade ou não do emprego do curativo de demora, é interessante considerar as condições que o canal radicular apresenta. Assim, em casos de sintomatologia e exsudato a utilização de uma medicação como curativo de demora parece assumir um papel coadjuvante, proporcionando uma redução da microbiota abaixo dos níveis já obtidos pelo PQM, principalmente pela penetração em áreas não alcançadas pelos instrumentos e por soluções irrigadoras (Holland *et al.*, 1979; Otoboni Filho, 2000).

Embora as medicações intracanaís não possam substituir o PQM, seu emprego como coadjuvante em situações endodônticas específicas, como exsudato purulento, sintomatologia e controle de infecção é indicado (Siqueira & Lopes, 1999, HOLLAND *et al.*, 1995). A utilização de uma medicação intracanal é considerada por Abbott & Salgado (2009), essencial para o tratamento endodôntico. Associado a isso, o canal radicular pode funcionar como um compartimento de liberação lenta para difusão de medicações para o periodonto, na tentativa de se difundirem em direção à superfície radicular externa. Dessa forma, exercem ação na dentina radicular contaminada por microrganismos alojados no interior dos túbulos dentinários, resultando em um efeito antimicrobiano complementar à terapêutica periodontal (Carrote, 2004 e Gomes *et al.*, 2008).

Nos casos de polpa viva, além da importância de uma obturação hermética e selamento coronário, os objetivos de se empregar medicação intracanal são de prevenir a contaminação do sistema de canais radiculares. Estrela *et al.* (1995) ressaltaram que a medicação intracanal, nos casos de polpa viva, encontra respaldo para sua aplicação baseada nos seguintes aspectos: dificuldade clínica de se estabelecer o real estágio evolutivo do processo inflamatório no nível apical; necessidade de se utilizar medicamentos sem poder de irritação aos tecidos apicais e periapicais e com capacidade de modulação do processo inflamatório sem interferência no processo reparacional; necessidade de manutenção da cadeia asséptica no interior

do canal radicular, levando-se em consideração que em intervenções endodônticas em tecido pulpar vital a contaminação por microrganismos é mínima ou inexistente; e, necessidade de minimizar a sintomatologia dolorosa observada no pós-operatório.

O Ca(OH)_2 , devido suas propriedades dependentes da dissociação dos íons cálcio e hidroxila, foi descrito pela primeira vez por Holland *et al.* (1978) e complementado por Seux *et al.* (1994). Ele continuou sendo amplamente estudado por Estrela & Pesce, 1996; Siqueira & Lopes, 1999; Gomes *et al.*, 2002; Tanomaru *et al.*, 2003; Berber, 2009. No entanto, o tempo e o melhor veículo associado ao Ca(OH)_2 favorecendo sua difusão ainda é bastante estudado na literatura, sendo até mesmo questionado sua eficácia em reduzir bactérias, mesmo após o uso por longos períodos (Peters *et al.*, 2002). Tal fato confirma nossos resultados, que mostraram a presença de microrganismos, principalmente a *Parvimonas micra*, nos canais radiculares após o uso de medicação intracanal.

Tanabe *et al* (2007) demonstraram, *in vitro*, a capacidade de componentes da parede celular de *P. micra* em induzir vias de sinalização intracelular em macrófagos, aumentando a produção de citocinas, quimiocinas e MMP-9.

Segundo Nerwich *et al.* (1993), os íons hidroxila conseguem se difundir alcançando a dentina mais periférica próxima do cimento, em um período de 1 a 7 dias. Contrariamente, Estrela & Pesce (1996) e Wakabayashi *et al.* (1995), observaram que os íons hidroxila alcançam a superfície radicular externa com alteração do pH no período de 30 dias.

Berber (2009) não encontrou nenhuma alteração da microbiota das bolsas periodontais, após o período de 7 a 14 dias. Por essa razão, nosso estudo avaliou o efeito das medicações no período de 30 dias, mas também nenhuma alteração significativa foi encontrada. Esse resultado pode ser justificado pela falta de tratamento periodontal nas bolsas periodontais nesse período em que o canal permaneceu com a medicação. A terapia periodontal era realizada apenas após a obturação do canal radicular.

Chaves *et al.* (2000) e Cobb (2002) afirmaram que a raspagem e o alisamento radicular diminui a população de bactérias Gram negativas, favorecendo as Gram positivas, que estão associadas à saúde periodontal.

A mesma relação foi apresentada por Cugini *et al.* (2000) que mostraram a diminuição de DNA bacteriano de espécies periodontopatogênicas como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, após procedimento periodontais. Contrariamente, Haffajeee & Socransky (1994) e Chaves *et al.* (2000) afirmaram que *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* não respondem de forma tão positiva frente aos tratamentos de raspagem e alisamento radicular.

Gomes *et al.* (2008) avaliando a ação de várias medicações na superfície externa do dente, também mostrou que a *Porphyromonas gingivalis* é o microrganismo mais resistente frente a ação antimicrobiana de algumas medicações. Além disso, mostrou que o Ca(OH)_2 associado a SS não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana na superfície radicular externa no período de 72 horas.

Nossos resultados não mostraram desinfecção completa dos canais radiculares após o uso de Ca(OH)_2 associado a SS ou Ca(OH)_2 associado a CHX gel 2% como medicação intracanal.

Porém, outros estudos, como Evans *et al.* (2003) e Gomes *et al.* 1996, 2006, 2008 afirmaram que há uma maior superioridade da associação do Ca(OH)_2 associado a CHX gel 2%, quando comparado com SS, mostrando um maior efeito bactericida. O que também é confirmado por Basrani *et al.* (2004)

6.6. Quantificação de endotoxinas dos canais radiculares e das bolsas periodontais

Os microrganismos avaliados nesse estudo foram, na maioria, anaeróbios Gram negativos. A escolha por esses microrganismos foi devido à presença dos fatores de virulência, principalmente as endotoxinas, e sua importância dentro das doenças pulpares e periodontais. Trabalhos mostram (Seltzer & Farber, 1994; Nissan *et al.* 1995; Nelson-Filho *et al.*, 2002; Oliveira *et al.* 2005; Pereira, 2011) que esses microrganismos, na maioria das vezes, são responsáveis pelo início e progressão das doenças endodônticas e periodontais, sendo que episódios dessas doenças podem estar relacionados a um desequilíbrio entre fatores de virulência bacteriana e fatores específicos dos hospedeiros.

A concentração inicial de endotoxinas encontradas inicialmente nas bolsas periodontais foi bastante alta, com uma média de 192,81 EU/mL. Essa concentração já era esperada, justamente pela grande presença de bactérias Gram negativas presentes, inicialmente, nesses sítios. Além disso, essa alta concentração confirma o potencial de destruição óssea, favorecendo a destruição periodontal e manutenção das lesões periapicais (Nissan, 1995; Nakane, 1995; Nelson Filho, 2002; Bezera Silva, 2002; Rangel-Frausto, 2005), bem como se relaciona ao grau clínico da inflamação gengival (Simon *et al.*, 1971).

Nossos resultados mostraram uma redução significativa do LPS nas bolsas periodontais, sugerindo que sua fraca aderência à superfície radicular, assim como demonstrado por Moore *et al.* (1986).

Além do LPS presente na parede celular de bactérias Gram negativas, o peptidoglicano presente na parede celular de bactérias Gram positivas e que também estão presentes em sítios periodontais, podem apresentar sinergismo, favorecendo a estimulação de osteoclastos e, conseqüentemente, uma maior destruição periodontal, como demonstrado por Jiang *et al.* (2003)

Nissan *et al.* (1995) mostraram que a endotoxina é capaz de se difundir pelos túbulos dentinário, atingindo a polpa. Por outro lado, Bergeholtz & Crawford (1989) e Warfvinge *et al.* (1985) observaram que a presença de endotoxinas induz processos inflamatórios na polpa, mas eles não determinaram se a endotoxinas entram efetivamente na polpa. Por essa razão, poderíamos esperar altas concentrações de endotoxinas no canal radicular por conta do comprometimento periodontal severo. No entanto, em nosso estudo, a concentração de endotoxinas no canal radicular foi praticamente nula, o que poderia ser justificado pela presença de polpa vital. Porém, Khabbaz *et al.* (2001) demonstraram a presença de endotoxinas em camadas profundas de cáries de dentes sintomáticos e assintomáticos, mas que apresentavam tecido pulpar vital.

Em casos de polpa necrosada, as concentrações de endotoxinas são extremamente altas, o que se justifica pela maior presença de bactérias Gram negativas nessas infecções (Martinho e Gomes, 2008; Jacinto *et al.*, 2005).

É possível que mesmo que as bactérias sejam removidas do canal radicular durante o PQM, endotoxinas capazes de manter ou induzir periapicopatias possam permanecer. Dessa forma, o tratamento do canal radicular infectado não deve se restringir apenas à morte bacteriana, mas também à inativação da endotoxinas, que é favorecido pelo uso de medicação intracanal. A importância do Ca(OH)_2 na inativação do LPS já é bem aceito e discutido na literatura (Safavi & Nichols, 1993; Silva *et al.*, 2002; Nelson Filho *et al.*, 2002; Tanomatu, 2003; Signorreti, 2009).

Em nosso estudo, a concentração de endotoxinas após o uso MIC, nas bolsas periodontais, foi mais baixa quando comparada aos valores iniciais, com diferença estatisticamente significativa para o grupo do Ca(OH)_2 e SS, quando comparado com o grupo do Ca(OH)_2 e CHX. Provavelmente, essa diminuição foi devido ao PQM realizado anteriormente e, pela difusão dos íons OH^- e Ca^+ pelos túbulos dentinários, inibindo a contaminação periodontal, como sugeriu Solomon *et al.*, (1995). Da mesma forma, Gomes *et al.*, (1999) mostraram que o Ca(OH)_2 associado a CHX pode se difundir pelos túbulos dentinários, principalmente na ausência de cimento, o que favorece o aumento do pH na dentina periférica (Tronstad *et al.*, 1981)

6.7. Monitoramento de Citocinas Pró-inflamatórias IL1- α , IL1- β , TNF- α e PGE2 dos canais radiculares e das bolsas periodontais

Citocinas pró inflamatórias podem ser estimuladas pela presença de fatores de virulência, como LPS presentes na parede celular de bactérias Gram negativas (Nakane *et al.*, 1995; Silva *et al.* 2002; Wang *et al.*, 2010). Esse fato pode justificar os altos níveis de citocinas encontrados nas bolsas periodontais, caracterizada principalmente, por bactérias Gram negativas do complexo vermelho que exacerbam essa estimulação (Pelt *et al.*, 2002)

LPS tem sido relatado como estimulador de interleucinas (Pelt *et al.*, 2002; Martinho *et al.*, 2010) e, Martinho *et al.* (2011) mostraram também a estimulação sobre o fator de necrose tumoral, que vai ao encontro dos nossos resultados, onde associação positiva só foi verificada entre níveis de LPS e TNF α .

Nosso estudo confirmou a importância dessas citocinas no processo inflamatório, principalmente relacionado a destruição óssea. Essa resposta osteoclástica já é bem esclarecida na literatura (Le & Vilcek, 1987; Nakane *et al.*, 1995; Goutoudi *et al.*, 2004; Martinho, 2011; Tavares *et al.*, 2012).

Assim como Tavares *et al.* (2012), nosso trabalho mostrou as vantagens do uso de hidróxido de cálcio como medicação intracanal. Possíveis relações entre os níveis de citocinas nas bolsas periodontais e nos canais radiculares, antes e após o uso de medicação intracanal por 30 dias, podem ser percebidos, independente do veículo utilizado com o hidróxido de cálcio. E essa redução, foi mais direcionada também a IL1 β .

Este estudo demonstrou que nos casos de pacientes com periodontite crônica e sensibilidade pulpar positiva, endotoxinas e citocinas estão presentes em altas concentrações nos sítios periodontais. No entanto, após o tratamento endodôntico, uma redução dos sinais clínicos, como profundidade de sondagem e mobilidade, podem ser estabelecidas, favorecendo o tratamento periodontal. Desta forma, através dos

resultados obtidos nesse estudo, mais investigações devem ser realizadas, principalmente com o apoio de periodontistas e do próprio paciente.

7. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. Os canais radiculares e as bolsas periodontais de pacientes com periodontite crônica e sensibilidade pulpar positiva apresentaram-se contaminados, sendo o complexo vermelho detectado frequentemente nas bolsas periodontais e *Parvimonas micra* nos canais radiculares;
2. Associações bacterianas foram visualizadas apenas nas bolsas periodontais com presença constante das bactérias do complexo vermelho;
3. Os níveis de endotoxinas foram bastante altos nos sítios periodontais, mesmo após a terapia endodôntica. No entanto, após o uso de medicação intracanal, houve uma diminuição nessa carga de LPS, sendo os melhores resultados obtidos pela associação de hidróxido de cálcio com solução salina;
4. Níveis de citocinas pró inflamatórias, principalmente a IL1 β , apresentaram reduções estatisticamente significativas, após o uso de medicação com hidróxido de cálcio por 30 dias;
5. O tratamento endodôntico não é fator determinante na complementação da terapia periodontal em dentes diagnosticados com Periodontite Crônica e vitalidade pulpar.

REFERÊNCIAS

1. Abbott PV, Salgado JC. Strategies for the endodontic management of concurrent endodontic and periodontal diseases. *Australian Dental Journal*. 2009; 54 Suppl 1: 70–85.
2. Adriaens PA, Edwards CA, De Boever JA, Loesche WJ. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. *J Periodontol*. 1988; 59: 493-496.
3. Aguiar TRS. Estudo histopatológico da polpa de dentes humanos portadores de doença periodontal envolvendo o ápice radicular [tese]. São Paulo:FO/USP; 1999.
4. Aguiar TRS, Lotufo RF, Jaegger M, Mandarino D. Histopathological study of human pulps in teeth with aggressive periodontitis. *J. Dent Res*. 2002, 81, Suppl 1: 151.
5. Antoniazzi JH, Mjor IA, Nygaard-Ostby B. Assessment of the sealing properties of root filling materials. *Odont T*. 1968; 76: 261-271.
6. Anele JA, Silva BM, Filho FB, Haragushiku G, Leonardi DP. Prevalence of foraminas and accessories canals in the furcation and the floor pulp and influence in the etiology of endo-periodontal lesion. *Odonto*. 2010; 18 (35):106-116.
7. Armitage GC. Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010; 53: 70-88.
8. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11: 266–273.
9. Ballal NV, Kandian S, Mala K, Bhat KS, Acharya S. Comparison of the Efficacy of Maleic Acid and Ethylenediaminetetraacetic Acid in Smear Layer Removal from Instrumented Human Root Canal: A Scanning Electron Microscopic Study. *J Endod*. 2009;35:1573–1576
10. Bang FB. A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1956; 98: 325.

11. Basrani B, Ghanem A, Tjäderhane L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. *J Endod.* 2004; 30(6): 413-417.
12. Baumgartner JC. Endodontic microbiology. In: Walton RE, Torabinejad M, editors. *Principles and practice of endodontics.* 3rd ed. Philadelphia: Saunders Co.; 2002. p. 282-293.
13. Baumgartner JC, Falkler WA Jr, Beckerman T. Experimentally induced infection by oral anaerobic microorganisms in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7: 253-256.
14. Becerra N, Villalobos AM, Fuentes EM. Estudio sobre relation entre periodontitis avanzada y repuesta a test de vitalidade pulpar em piezas dentarias sin caries ni obturaciones. *R. Periodontia.* 1993; 2: 100-106.
15. Belk CE, Gutmann JL. Perspectives, controversies and directives on pulpal-periodontal relationships. *J Can Dent Assoc.* 1990; 56: 1013-1017.
16. Bender IB, Seltzer S. The effect of periodontal disease on the pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1972; 33 (3): 458-474.
17. Berber VB. Identificação da microbiota das lesões endo-periodontais por cultura e PCR e sua suscetibilidade ao PQM e a medicações intracanaais entre sessões de atendimento. 2009. 250p. Tese (Doutorado em clínica odontológica- Piracicaba)- Universidade Estadual de Campinas.
18. Bergenholtz G, Lindhe J. Effect of soluble plaque factors on inflammatory reactions in the dental pulp. *Scand J Dent Res* 1975;83:153– 158.
19. Bergenholtz G, Lindhe J. Effect of experimentally induced marginal periodontitis and periodontal scalling on the dental pulp [abstract]. *J Clin Periodontol.* 1978; 5: 59-73.
20. Bergenholtz G, Hasselgren G. Endodontia e Periodontia. In: Lindhe J. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral.* 3 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 1999. p.207–232
21. Berger CR, 1998, endodontia. São Paulo ed. Pancast, 1998.
22. Bogen G, Slots J. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. *Int Endod J* 1999; 32 (3) : 204-210.

23. Bombana AC, Quais são as atuais abordagens no diagnóstico e tratamento dos envoltimentos endoperiodontais. In. Lotufo RFG, Lascaia NT.Jr. Periodontia e Implantodontia – Desmitificando a Ciência - Artes medicas: São Paulo, 2003; p.307-313.
24. Bonaccorso A, Cantatore G, Condorelli GG, Schafer E, Tripi TR. Shaping Ability of Four Nickel-Titanium Rotary Instruments in Simulated S-Shaped Canals. J Endod. 2009; 35: 883–886.
25. Borba SMC, Gusmão ES, Santos RL, Travassos RMC, Silveira RCJ. Diagnóstico Clínico da Sensibilidade Pulpar em Dentes com Bolsas Periodontais. Rev Bras Cienc Saude 2002; 6: 269-278.
26. Buck RA, Cai J, Eleazer PD, Staat RH, Hurst HE. Detoxification of Endotoxin by Endodontic Irrigants and Calcium Hydroxide. J Endod. 2001; 27 (5): p.325-327.
27. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. Scand J Dent Res. 1981; 89(4): 321-328.
28. Cahn LR. The pathology of pulps found in pyorthetic teeth. D Items Interest 49, 1927: 598-616.
29. Çalt S, Serper A. Time-Dependent Effects of EDTA on Dentin Structures. J Endod. 2002; 28 (1): 17-19
30. Cardon EB, Waick RC, Rosing CK. Analysis of pulp sensitivity in teeth with different degrees of periodontal. Periodontia. 2007; (3): 49-54.
31. Carranza Jr. FA. Periodontia clínica de Glickman. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986: 341-367.
32. Carvalho MC, Zuolo ML. Orifice locating with a microscope. J Endod. 2000; 26(9): 532-534.
33. *Carvalho AS, Camargo CHR, Valera MC, Camargo SEA, Mancini MNG.* Smear Layer Removal by Auxiliary Chemical Substances in Biomechanical Preparation: A Scanning Electron Microscope Study. J Endod. 2008; 34: 1396–1400
34. Carrote P. Endodontics: Part 9 Calcium hydroxide, root resorption, endo-perio lesions. British Dental Journal. 2004; 197: 735-743.

35. Chacker FM. The endodontic-periodontic continuum. *Dent Clin N Amer.* 1974; 18 (2): 383-414.
36. Chandrashekar KT. Hopeless to hopeful: a clinical study on management of periodontal abscess with grade II furcation involvement – endodontic and periodontal interdisciplinary approach: case report. *Rev. Clín. Pesq. Odontol.* 2010; 6 (1): 107-112.
37. Chapple IL, Lumley PJ. The periodontal-endodontic interface. *Dent Update.* 1999; 26(8): 331-341.
38. Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 897-903.
39. Chen S-Y, Wang H-L, Glickman GN. The influence of endodontic treatment upon periodontal wound healing. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 449-456.
40. Chhour KL, Nadkarni MA, Byun R, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Molecular Analysis of Microbial Diversity in Advanced Caries *Journal of clinical microbiology.* 2004, 43 (2): 843-849
41. Chilton NW. Periodontic-endodontic relationships: a synthesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1972; 34 (2): 327-328.
42. Chiu ASM. Considerações clínicas e microbiológicas das lesões endoperiodontais: revisão da literatura [monografia]. *Cruzeiro do Sul;* 2008.
43. Christie WH, Holthuis AF. The Endo-Perio Problem in Dental Practice: Diagnosis and Prognosis. *J Can Dent Assoc.* 1990; 56 (11): 1005-1011.
44. Clarke NG, Hirsch RS. Reviews of infectious diseases. *Infection and Periodontal disease.* 2002; 11 (5): 707-715.
45. Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: na evidence-based perspective of scaling and root planning. *J Clin Periodontol.* 2002; 29 Suppl 2: 6-16.
46. Cunha FS, Machado G, Neuvald I. Análise da presença do canal cavo inter-radicular em molares: estudo in vitro. *Rev Odont Ciên.* 2005; 20 (4): 127-129.

47. Cugini MA, Haffajee AD, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. *J Clin Periodontol.* 2000; 27(1): 30-36.
48. Czarnecki R, Schilder AA. A histological evaluation of the human pulp in teeth with varying degrees of periodontal disease. *J Endod.* 1979; 5: 242-253.
49. Dahlen G, Möller A.R. Microbiology of endodontic infections. In: *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*, 1st edn. St Louis, Missouri, USA: Mosby-Year Book, pp. 444-475. 1992.
50. Dalton BC, Phillips C, Pettiette M, Trope M. Bacterial Reduction with Nickel-Titanium Rotary Instrumentation. *J Endod.* 1998; 24 (11): 763-767
51. Dammaschke T, Witt M, Ott K, Schäfer E. Scanning electron microscopic investigation of incidence, location, and size of accessory foramina in primary and permanent molars. *Quintessence Int.* 2004; 35 (9): 699-705.
52. Deas DE, Mealey BL. Response of chronic and aggressive periodontitis to treatment. *Periodontol 2000.* 2010; 53: 154-166.
53. De Deus QD. Frequency, location and direction of the lateral, secondary and accessory canals. *J Endod.* 1975; 1: 361-366.
54. De Deus QD. *Endodontia*. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSCI; 1992.
55. De Rossi A, Silva LAB, Leonardo MR, Rocha LB, Rossi MA. Effect of rotary or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide/1% chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99: 628-636.
56. Ebersole JL, Feuille F, Kesavalu L, Holt SC. Host modulation of tissue destruction caused by periodontopathogens: effects on a mixed microbial infection composed of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *Microbial Pathogenesis.* 1997; 23 (1): 23–32.
57. Ehnevid H, Jansson LE, Lindskog SF, Blomlof LB. Periodontal Healing in relation to Radiographic attachment and endodontic infection. *J Periodontol.* 1993; 64 (12): 1199-1124.
58. Estrela C. *et al.* Avaliação da dor e de testes de vitalidade para o diagnóstico da inflamação pulpar. *ROBRAC.* 1995, 16:4-8.

59. Estrela C, Pesce HF. Chemical analysis of the formation of calcium hydroxyl ions of calcium hydroxide pastes in the presence of connective tissue of the dog. Part I. Braz Dent J. 1996; 7:41-46.
60. Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul S-U. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. J Endod. 2003; 29: 338-339.
61. Fachin EVF, Luisi SB, Borba MG. Relação Pulpo-periodontal: Considerações Histológicas e Clínicas. Rev Fac Odontol Porto Alegre. 2001; 42: 9-15.
62. Faveri M, Borges MA, Tsuzuki CO, Macarazzo F, Mayer MPA, Feres M. Complexo vermelho em indivíduos brasileiros periodontalmente doentes e saudáveis. R Periodontia. 2006; 16: 41-46.
63. Ferraz CCR. Avaliação in vitro do gel de Clorexidina usado como irrigante Endodonôntico. Piracicaba, 1999. 141p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
64. 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 and endodontic irrigant. J Endod. 2001; 27:452-455.
65. Flemmig TF, Beikler T. Control of oral biofilms. Periodont 2000. 2011; 55(1):9-15.
66. Foschi F, Nucci C, Montebugnoli L, Marchionni S, Breschi L, Malagnino VA, Prati C. SEM evaluation of canal wall dentine following use Sof Mtwo and ProTaper NiTi rotary instruments. Inter Endod J. 2004; 37: 832-839
67. Gadê-Neto CR. Estudo microbiológico da bolsa periodontal e canais radiculares de dentes de cães com doença periodontal induzida [dissertação]. Piracicaba/FOP Unicamp. 2000.
68. Gandhi A, Kathuria A, Gandhi T. Endodontic-periodontal management of two rooted maxillary lateral incisor associated with complex radicular lingual groove by using spiral computed tomography as a diagnostic aid: a case report. Int Endod J. 2011; 1-9.
69. Giuliana G, Ammatuna P, Pizzo G, Capone F, D'Angelo M. Occurrence of invading bacteria in radicular dentin of periodontally diseased teeth: microbiological findings. J Clin Periodontol. 1997 Jul; 24(7):478-485

70. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J.* 1994; 27: 291-298
71. Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dent.* 1996; 29: 47-55 (a).
72. Gomes BPFA, Rodrigues HH, Tancredo N. The use of a modelling technique to investigate the root canal morphology of mandibular incisors. *Int Endod J.* 1996;29: 29-36 (b).
73. Gomes BPFA. Investigação dos microrganismos envolvidos na sintomatologia e no insucesso do tratamento endodôntico. Piracicaba, 2002. Tese (Livre Docência) – Universidade Estadual de Campinas (a)
74. Gomes BPFA. Microrganismos: quais são, onde estão e que danos causam? *In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN, organizadores. Endodontia & Trauma.* 1 ed.; 2002 (b)
75. Gomes BPFA, Carvalho SS, Ferraz CCR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antibacterial activity of chlorhexidine gel and calcium hydroxide separately and combined on infected bovine root dentin . *Int Endod J.* 2003; 36: 267-275. (a)
76. Gomes BPFA, Sato E, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. *Int Endod J.* 2003; 36: 604-609. (b)
77. Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, *et al.* Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19: 71–76 (a)
78. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19:71-76 (b)
79. Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20: 211-215
80. Gomes BPFA, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with

- chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: 544-550.
81. Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, Souza-Filho FJ. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent.* 2009; 37 (1): 76-81.
 82. Gorstein H, Cunnengham WT, Goldman M, Webber Rt. In: *Techniques in clinical endodontics.* 1° ed. Philadelphia:Saunders. 1983. p. 242-244.
 83. Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1beta and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *J Dent.* 2004; 32(7): 511-520.
 84. Grant DA, Stern IB, Listgarten MA. Interrelated endodontics-periodontics. *Periodontics.* 1988; 41: 911–929.
 85. Guldener PHA. The relationship between periodontal and pulpal disease. *Int Endod J.* 1985; 18: 41-54.
 86. Gutmann JL. Prevalence, location, and patency of accessory canals in the furcation region of permanent molars. *J Periodontol.* 1978; 49: 21-26.
 87. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994, 5: 78-111
 88. Haffajee AD, Socransky SS. Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. *Periodontol 2000.* 2006;42: 7-12.
 89. Hahn CL, Liewehr FR. Relationships between Caries Bacteria, Host Responses, and Clinical Signs and Symptoms of Pulpitis. *J Endod.* 2007; 33: 213–219
 90. Harrington GW. The perio-endo question: differential diagnosis. *Dental Clinics of North America.* 1979; 23 (4): 673-690.
 91. Harrington GW, Steiner DR, Ammons Jr WF. The periodontal-endodontic controversy. *Periodontol 2000.* 2002; 30: 123-130.
 92. Haskell EW, Stanley H, Goldman S. A New Approach to Vital Root Resection. *J Periodontol.* 1980; 51: 217-224.
 93. Hattler AB, Listgarten MA. Pulpal response to root planing in a rat model. *J Endod.* 1984; 10(10): 471-476.

94. Hess W. The anatomy of the root canals of the teeth of the permanent dentition. New York, William, Wood & Co., 1925, p-8.
95. Hirsch RS, Clarke NG. Infection and periodontal diseases. Rev Infect Dis. 1989; 11 (5): 707-715.
96. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, *et al.* Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. Periodontol 2000; 1999 (20): 168–138.
97. Ingle JI, Zeldow BJ. An evaluation of mechanical instrumentation and the negative culture in endodontic therapy. J Am Dent Assoc. 1958; 57(4):471- 76.
98. Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. J Med Microbiol. 2005; 54: 777-83.
99. Jansson LE, Ehnevid H. The influence of endodontic infection of periodontal status in mandibular molars. J Periodontol. 1998; 69: 1392-1396.
100. Jaoui L, Machtou P, Ouhayoun JP. Long-term evaluation of endodontic and periodontal treatment. Int Endod J. 1995; 28(5): 249-254.
101. Jiang J, Zuo J, Hurst IR, Holliday LS. The synergistic effect of peptidoglycan and lipopolysaccharide on osteoclast formation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003; 96: 738-743.
102. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod 1965; 20: 340-349.
103. Kerekes K, Olsen I. Similarities in the microfloras of root canals and deep periodontal pockets. Endod Dent Traumatol. 1990;6:1-5. Review.
104. Kesavalu L, Sathishkumar S, Bakthavatchalu V, *et al.* Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease, Infection and Immunity. 2007; 75 (4): 1704–1712.
105. Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001; 91(5): 587-593.

106. Kipiotti A, Nakou M, Legakis N, Mitsis F. Microbiological findings of infected root canals and adjacent periodontal pockets in teeth with advanced periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1984; 58: 213-220.
107. Kirkham DB. The location and incidence of accessory pulp canals in periodontal pockets. *JADA.* 1975; 91: 353-356.
108. Kobayashi T, Hayashi A, Yoshikawa R, Okuda K, Hara K. The microbial flora from root canals and periodontal pockets of non-vital teeth associated with advanced periodontitis. *Int Endod J.* 1990; 23: 100–106.
109. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: Biofilms, interactions, and genetic systems. *Ann Rev Microbiol* 2000; 54: 413-437
110. Kurihara H, Kobayashi Y, Francisco AI, Isoshima O, Nagai A, Murayama Y. A microbiological and immunological study of endodontic-periodontic lesions. *J Endod.* 1995; 21: 617-621.
111. Langeland K, Rodrigues H, Dowden W. Periodontal disease, bacteria and pulpal histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Path.* 1974; 37: 257-270.
112. Le J, Vilcek J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Laboratory Investigation.* 1987; 56 (3): 234-248.
113. Leonardo MR, Leal JM. *Endodontia: tratamento de canais radiculares.* São Paulo: Panamericana; 1998.
114. Levin J, Bang FB. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1964; 115: 265.
115. Lindhe J, Karring T, Lang NP, editores. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral.* 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.
116. Lindskog S, Pierce AM, Blomlöf L. Chlorhexidine as a root canal medicament for treating inflammatory lesions in the periodontal space. *Endod Dent Traumatol.* 1998 Aug;14(4):186-190.
117. Loesche WJ, Bretz WA, Lopatin D, Stoll J, Rau CF, Hillenburg KL, Killoy WJ, Drisko CL, Williams R, Weber HP, *et al.* Multi-center clinical evaluation of a chairside method for detecting certain periodontopathic bacteria in periodontal disease. *J Periodontol.* 1990; 61(3):189-196.

118. Lowenguth RA, Greenstein G. Clinical and microbiological response to nonsurgical mechanical periodontal therapy. *Periodontol* 2000. 1995;9: 14-22.
119. Martin FE. Carious Pulpitis: Microbiological And Histopathological Considerations. *Australian Endod J*. 2003; 29 (3): 134-137.
120. Martinho FC, Gomes BPFA. Quantification of endotoxin and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2,5% sodium hypochlorite. *J Endod*. 2008; 34 (3): 268-271.
121. Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1a and 1b in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Periodontal Research* 1990;25: 156—163.
122. Mazur B, Massler M. Influence of periodontal disease on the dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Path*. 1964; 17: 592-603
123. Mealey BL. Diabetes and periodontal disease: two sides of a coin. *Compend Contin Educ Dent*. 2000; 21(11): 943-950.
124. Mello I, Kammerer BA, Yoshimoto D, Macedo MCS, Antoniazzi JH. Influence of Final Rinse Technique on Ability of Ethylenediaminetetraacetic Acid of Removing Smear Layer. *J Endod*. 2010; 36: 512–514
125. Meng HX. Periodontic-endodontic lesions. [Review] *Ann Periodontol*. 1999; 4: 84-90.
126. Miller WD. An introduction to the study of the bacteriopathology of the dental pulp. *Dent Cosmos* 1894; 36: 505-528.
127. Miyashita H, Bergenholtz G, Gröndahl K, Wennström JL. Impact of endodontic conditions on marginal bone loss. *J Periodontol*. 1998; 69(2): 158-164.
128. Möller AJR, Fabricius L, Dahlen G, Öhman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res*. 1981; 89: 475-484.
129. Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *J Periodontol*. 2000;71:14-21.

130. Moore J, Wilson M, Kieser JB. The distribution of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in relation to periodontally involved root surfaces. *J Clin Periodontol* 1986; 13(8): 748-751.
131. Nadkarni MA, Simonian MR, Harty DWS, Jacques HZNA, Hunter N. Lactobacilli Are Prominent in the Initial Stages of Polymicrobial. *Journal of clinical microbiology*. 2010; 48 (5): 1732 -1740
132. Nagaoka S, Miyasaki FJ, Liu HJ, Iwamoto Y, Kitano M, Kawagoe M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. *J Endod*. 1995; 21: 70-73.
133. Nakane A, Yoshida T, Nakata K, Horiba N, Nakamura H. Effects of Lipopolysaccharides on Human Dental Pulp Cells. *J Endod*. 1995; 21 (3): p.128-130.
134. Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LAB, Assed S. Radiographic Evaluation of the Effect of Endotoxin (LPS) Plus Calcium Hydroxide on Apical and Periapical Tissues of Dogs. *J Endod*. 2002; 28 (10): p 694-696.
135. Nerwich A, Figdor D, Meser HH. pH changes in root dentine over a 4 week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod*. 1993; 19: 302-306.
136. Nicholls E. Treatment of special cases. In: *Endodontics*. 3^o ed. Bristol, Wright; 1984. p. 284-320.
137. Nissan R, Segal H, Pashley D, Stevens R, Trowbridge H. Ability of Bacterial Endotoxin to Diffuse through Human Dentin. *J Endod*. 1995; 21 (2): p. 62-64.
138. Oliveira LD, Carvalho CAT, Valera MC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules. *Braz Oral Res*. 2005;19 (1): 5-10.
139. Olsen MH, Difiore PM, Dixit SN, Veis A. The effects of calcium hydroxide inhibition on LPS induced release of IL-1_β from human monocytes in whole blood. *J Endod*. 1999; 25: 289.
140. Orstavik D, Kerekes K, Molven O. Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial infection during treatment of apical periodontitis: a pilot study. *Int Endod J* 1991 ;24:1-7.

141. Otoboni filho JA. Processo de reparo de dentes de cães com lesão periapical após tratamento endodôntico em uma ou duas sessões: influência do tempo de curativo de demora e do tipo de material obturador. 2000. 341f. Tese (Livre Docência em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araçatuba.
142. Paul BF, Hutter JW. The Endodontic-Periodontal Continuum Revisited: New Insights Into Etiology, Diagnosis and Treatment. J Am Dent Assoc. 1997; 128: 1541-1548.
143. Pelt P, Zimmermann B, Ulbrich N, Bernimoulin JP. Effects of lipopolysaccharide extracted from *Prevotella intermedia* on bone formation and on the release of osteolytic mediators by fetal mouse osteoblasts in vitro. Arch Oral Biol 2002; 47: 859-866.
144. Pereira CV, Stipp RN, Fonseca DC, Pereira LJ, Höfling JF. Detection and Clonal Analysis of Anaerobic Bacteria Associated to Endodontic-Periodontal Lesions. J Periodontol. 2011; 1767-1775.
145. Perlich MA, Foreman ALR. A scanning electron microscopic investigation of accessory foramina on the pulpar floor of human molars. J Endod. 1981; 7(9): 502-506.
146. Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. Int Endod J. 2002; 35: 698–702.
147. Petersson K, Söderström C, Kiani-Anaraki M, Lévy G. Evaluation of the ability of thermal and electrical tests to register pulp vitality. Endodontics & Dental Traumatology. 1999; 15 Suppl 3: 127-131.
148. Petka KP. The sixteen deadly sins: a comprehensive approach to accurate diagnosis. Dent Today 2000; 19: 56-8, 60-61.
149. Petsch D, Anspach FB. Endotoxin removal from protein solutions. J Biotechnol. 2000; 21;76(2-3): 97-119.
150. Pinero G, Kiatpongsoh S, Hutchins MO, Hoover J. The effect of endotoxin on the synthesis of connective tissue matrix components by pulp fibroblasts in vitro. J Endod. 1983; 9: 2-7.

151. Pitts DL, Williams BL, Morton TH Jr. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. *J Endod.* 1982 Jan;8(1):10-18.
152. Puapichartdumrong P, Ikeda H, Suda H. Influence of the pulpal components on human dentin permeability *in vitro*. *Int Endod J.* 2005; 38: 152-159.
153. Rangel-Frausto MS. Sepsis: still going strong. *Arch Med Res.* 2005; 36: 672-681.
154. Reeh ES, Eldeeb M. Rapid furcation involvement associated with a devitalizing mandibular first molar. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol.* 1990; 69: 95 –98.
155. Reinhardt R, Bolton R, Hlava G. Effect of non sterile versus sterile water irrigation with ultrasonic scaling on post operative bacteremias. *J Periodontol.* 1982; 53: 96-99.
156. Ricucci D, Siqueira Jr JF. Fate of the Tissue in Lateral Canals and Apical Ramifications in Response to Pathologic Conditions and Treatment Procedures. *J Endod.* 2010; 36 (1): 1-15.
157. Rocas IN, F. SJ, Santos KRN, Coelho AMA. Red complex (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: A molecular approach. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91:468-471.
158. Ross IF. The relation between periodontal and pulpal disorders. *J Am Dent Assoc.* 1972; 84(1):134 –139.
159. Rotstein I, Simon JHS. Diagnosis, prognosis and decision-making in treatment of combined periodontal-endodontic lesions. *Periodontol 2000, 2004;* 34: 165-203.
160. Rubach WC, Mitchell DF. Periodontal disease, accessory canal and pulp pathosis. *J Periodontol.* 1965; 36: 34-38.
161. Ruiz LF, Mendonça JA, Estrela C. Interrelações entre a endodontia e a periodontia. In: Estrela C, Figueiredo JAP. *Endodontia: Princípios Biológicos e Mecânicos.* São Paulo: Artes Médicas; 2001. p. 249 – 291.
162. Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod.* 1993; 19: 76-78.

163. Saito D, Coutinho LL, Saito CPB, Hofling JF, Gonçalves RB. Real-time polymerase chain reaction quantification of *porphyromonas gingivalis* and *tannerella forsythia* in primary endodontic infections. J Endod. 2009; 35 (11): 1518-1524.
164. Sallum AW, Nascimento LMC, Sallum EA, Graner E. Periodontite e lesões pulpares: interação através de canais acessórios nas áreas de bifurcação em molares de ratos. Periodontia. 1993; 2 (3): 14-18
165. Santiago CN, Fonseca GA. Influência da Doença Periodontal na Polpa. Dental. Rev Bras Odontol. 1983; 40: 19-29.
166. Seltzer S, Bender IB, Ziontz M. The interrelationship of pulp and periodontal disease. Oral Surg. 1963; 16: 1474-1490.
167. Seltzer S, Bender IB, Nazimov H, Sinai I. Pulpitis-Induced Inter-radicular Periodontal Changes in Experimental Animals. J Periodontol. 1967;38: 124-129.
168. Seltzer S, Bender IB. The dental pulp: biological considerations in dental procedures, ed 3. Philadelphia: lippincott 1984.
169. Seltzer S, Farber PA. Microbiologic factors in endodontology. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1994; 78: 634-45.
170. Seol JH, Cho BH, Chung CP, Bae KS. Multiplex polymerase chain reaction detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. J Endod. 2006;32:110-114.
171. Seux, D *et al.* Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. Arch Oral Biol, Oxford. 1991; 36(2): 117-128
172. Shiloah J, Patters MR. DNA probe analyses of the survival of selected periodontal pathogens following scaling, root planing, and intra-pocket irrigation. J Periodontol. 1994 Jun;65(6):568-575.
173. Signoretti FGC. Avaliação in vitro da influência da CHX 2% gel no pH, liberação de cálcio e ação sobre endotoxinas do Ca(OH)₂ [monografia], 2009, Piracicaba, FOP/UNICAMP.

174. Silva LAB, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of Calcium Hydroxide on Bactérial Endotoxin In Vivo. *J Endod.* 2002; 28 (2): p.94-98.
175. Simon BI, Goldman HM, Ruben MP, Baker E. The role of endotoxin in periodontal disease. Correlation of the amount of endotoxin in human gingival exudate with the histologic degree of inflammation. *J Periodontol.* 1971; 42: 210–216.
176. Simon JHS, Glick DH, Frank AL. The relationship of endodontic-periodontic lesions. *J Periodontol.* 1972; 43: 202-208.
177. Simon JHS, Werksman LA. Intre-relação Endodontia e Periodontia. In: Cohen S, Burns RC. *Caminhos da polpa.* 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 515-532.
178. Simring M, Goldberg M. The pulpal pocket approach: retrograde periodontitis. *J Periodontol.* 1964; 35 (1): 22-28.
179. Sinai IH, Soltanoff W. The transmission of pathologic changes between the pulp and the periodontal structures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1973; 36(4): 558-568.
180. Siqueira JF Jr, Lima KC, Magalhães FAC, Lopes HP, Uzeda M. Mechanical Reduction of the Bactérial Population in the Root Canal by Three Instrumentation. *J Endod.* 1999; 25 (5): 332-335.
181. Siqueira JF Jr, Roças IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J Dent.* 2003; 31: 333-339.
182. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Santos SR, Lima KC, Magalhaes FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bactérial population within root canals. *J Endod.* 2002; 28:181-184.
183. Siqueira JF Jr, Lopes H P. Microbiologia endodôntica. In: Siqueira Jr. JF, Lopes HP. *Endodontia. Biologia e Técnica.* Rio de Janeiro: Medsi, 1999. 650 p.
184. Socransky SS, Haffajeee AD. The Bactérial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts. *Periodontol 2000.* 1992; 63:322-331.

185. Socransky SS, Haffajee AD. Microbiology of periodontal disease. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP, editors. *Clínical Periodontology and Implant Dentistry*: Blackwell Munksgaard; 2003. p. 106-149.
186. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998; 25:134-144.
187. Solomon C, Chalfin H, Kellert M, Weseley P. The endodontic-periodontal lesion: a rational approach to treatment. *J Am Dent Assoc*. 1995; 126: 473- 479.
188. Souza AO, Machado WAS. Inter-relação Entre Doença Periodontal e Comprometimento Endodôntico. *Rev Bras Odontol*. 1995; 52: 31-34.
189. Stallard RE. Periodontic-endodontic relationships. *Oral Surg*. 1972; 34: 314-326.
190. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod*. 1992; 18: 427–430.
191. Sundqvist G, Johansson E, Sjogren U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *J Endod*. 1989; 15: 13-19.
192. Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78: 522–530
193. Tal H, Kaffe I, Littner MM, Tamse A. Combined periodontic-endodontic lesions: A diagnostic challenge. *Quintessence Int*. 1984; 12: 1257 – 1265.
194. Tanabe S, Bodet C, Grenier D. *Peptostreptococcus micros* cell wall elicits a pro-inflammatory response in human macrophages. *J Endotoxin Res*. 2007;13: 219-226.
195. Tanner AC, Izard J. *Tannerella forsythia*, a periodontal pathogen entering the genomic era. *Periodontol* 2000; 2006 (42): 88–113.
196. Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru-Filho M, Bonetti Filho L, Silva LAB. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxid on bacterial LPS. *Int Endod J*. 2003; 36: 733-739.
197. Toledo BEC, Figueiredo FC, Sampaio JEC, Inter-relação endodontia-periodontia. In: opperman, RV; Rosing, CK *Periodontia- ciencia e clínica*, São Paulo, artes medicas, 2001; p. 321-336.
198. Toledo BEC, Rosetti EP. Lesões endo-periodontais combinadas. *In*: Leonardo MR. *Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos*. .ed. São Paulo: Artes Médicas, 2005.

199. Torabinejad M, Trope M. Endodontic and periodontal interrelationships. In: Walton RE, Torabinejad M, eds. Principles and practice of endodontics. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1996: 442–456.
200. Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK. Clínic implications of the smear layer in endodontics: a review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002;94:658–666.
201. Tronstad L, Andreassen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. J Endod. 1981; 7: 17-121.
202. Trope M, Delano EO, Orstavik D. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single vs multivisit treatment. J Endod .1999;25:345–350.
203. Turner JG, Drew AH. An Experimental Inquiry into the Bacteriology of Pyorrhoea. Proc R Soc Med. 1919;12 (Odontol Sect):104-118.
204. Van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. J Clin Periodontol. 2002; 29: 1023-1028.
205. Varella PPV, Forte WCN. Citocinas: revisão. Revista Brasileira de alergia e imunopatologia. 2001, 24 (4): 146-154.
206. Verma RK, Rajapakse S, Meka A, Hamrick C, Pola S, Bhattacharyya I, Nair M, Wallet SM, Aukhil I, Kesavalu L. *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* Mixed microbial infection in a rat model of periodontal disease. Interdisciplinary perspectives on infectious diseases. 2010; 1-10.
207. Vertucci FJ. Root canal anatomy of the human permanent teeth. Oral Surg. 1984; 58 (5): 589-599.
208. Vianna ME, Horz H-P, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. Oral Microbiol Immunol. 2007; 22: 411–418.
209. Walton RE, Torabinejad M. Princípios e Prática em Endodontia. 1. ed. São Paulo: Santos; 1997.

210. Wakabayashi H, Morita S, Koba K, Tachibana H, Matsumoto K. Effect of calcium hydroxide paste dressing on uninstrumented root canal wall. *J Endod.* 1995 Nov;21(11):543-545
211. Whyman RA. Endodontic-periodontic lesions Part I: Prevalence, aetiology and diagnosis. *New Zealand Dental Journal.* 1988; p. 74-77.
212. Wang C, Stashenko P. The role of interleukin-1 α in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8 (1): 50-56.
213. Wang HL, Glickman GN. Endodontic and Periodontic Interrelationships. In: Cohen S, Burns RC, editors. *Pathways of the pulp.* Eighth ed: Mosby; 2002. p. 651-664.
214. Wang Q, Zhou XD, Zheng QU, Wang Y, Tang L, Huang DM. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* fim A Genotypes in Chronic Apical Periodontitis Associated with Symptoms. *J Endod.* 2010; 36 (11): 1790 – 1795.
215. Warfvinge J. Dental pulp inflammation; experimental studies in human and monkey teeth. *Swed Dent J Suppl* 1986;39:1–36.
216. Warfvinge J, Dahlen G, Bergenholtz G. Dental pulp response to bacterial cell wall material. *J Dent Res* 1985;64:1046 –1050.
217. Whyman RA. Endodontic-periodontic lesions. Part I: Prevalence, aetiology, and diagnosis. *N Z Dent J.* 1988; 84(377): 74-77.
218. Weine FS. The enigma of the lateral canal. *Dental Clinics of North America.* 1984; 28 (4): 833-852.
219. Weine FS. Endodontic-periodontal problems. In: Weine F, ed. *Endodontic Therapy.* 4th edn. St. Louis: CV Mosby Co. 1989: 550–581.
220. Weinmann JP. Eruption of the teeth. In: Orban's oral histology and embryology 6th ed. Mosby company: st Louis. 1966; p. 128.
221. Yoneda M, Yoshikane T, Motooka N, *et al.* Stimulation of growth of *Porphyromonas gingivalis* by cell extracts from *Tannerella forsythia*. *J Periodontal Res* 2005; 40: 105–109.

222. Zehnder M. Endodontic infection caused by localized aggressive periodontitis: A case report and bacteriologic evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 92: 440-445.



**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 por PCR, quantificação de endotoxinas e monitoramento inflamatório em pacientes com doença periodontal crônica"**, protocolo nº 131/2010, dos pesquisadores Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e Thais Mageste Duque, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 15/12/2010.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Microbiological analysis by PCR, quantification of endotoxin and inflammatory monitoring in patients with chronic periodontal disease"**, register number 131/2010, of Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes and Thais Mageste Duque, 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 12/15/2010.

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.

ANEXO 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido específico para a pesquisa

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

As informações contidas neste prontuário foram fornecidas pela orientadora Professora. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e/ou pela aluna de mestrado Thais Mageste Duque, objetivando convidar e formar acordo, por escrito, mediante o qual o indivíduo, parte integrante da pesquisa, autoriza sua participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá por livre arbítrio e sem qualquer coação.

I. TÍTULO DA PESQUISA

"Análise microbiológica por PCR, quantificação de endotoxinas e monitoramento inflamatório em pacientes com Doença Periodontal Crônica".

II. PROPOSIÇÃO GERAL

Identificar por PCR a microbiota dos canais radiculares e bolsas periodontais de dentes com polpa vital, comprometimento periapical, sangramento gengival e bolsas periodontais e quantificar as endotoxinas e citocinas após o preparo químico-mecânico (PQM) e uso de medicamentos intracanais (MI).

III. JUSTIFICATIVA

Estudos sobre medicação intracanal e soluções irrigadoras fazem parte da linha de pesquisa do laboratório de Microbiologia aplicada à Endodontia, da FOP-UNICAMP, desta maneira haverá uma continuidade na linha de pesquisa. A atividade antimicrobiana da CHX gel, Ca(OH)₂ e da associação de ambos utilizados como medicação intracanal já foi testada em nosso laboratório por métodos *in vitro* com resultados satisfatórios quanto à ação antibacteriana no interior de túbulos dentinários necessitando, portanto, ser avaliada clinicamente. Esse trabalho mostra a ação antibacteriana de substâncias químicas auxiliares ao preparo mecânico na luz do canal radicular e em toda a extensão dos túbulos dentinários *in vitro*. Esse assunto faz parte da linha de pesquisa do Laboratório de Microbiologia aplicada à Endodontia de nossa disciplina, que foi montado graças ao financiamento da FAPESP. Dessa maneira, o presente trabalho promoverá uma continuidade na linha de pesquisa.

Este estudo possibilitará testar *in vivo*, o potencial antimicrobiano destas substâncias no interior do canal radicular e através dos túbulos dentinários, em bolsas periodontais, além de identificar patógenos de origem periodontal no interior dos canais radiculares através do método de PCR.

IV. PROCEDIMENTO DO EXPERIMENTO

Seleção dos pacientes

Serão selecionados 15 pacientes da Clínica de Especialização de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A faixa etária será entre 18 a 65 anos, independentemente do gênero. Os voluntários serão confirmados através da presença de perda óssea do dente envolvido detectado radiograficamente, acompanhado ou não de sinais e sintomas, e clinicamente pelo teste térmico confirmando uma sensibilidade pulpar positiva.

Alguns critérios deverão ser respeitados:

- a) Presença de bolsa periodontal com profundidade de sondagem maior ou igual a 6 mm em mais de uma face.
- b) Pacientes que não fizeram uso de antibióticos sistêmicos e/ou locais nos últimos 3 meses.
- c) Pacientes que estão sob tratamento periodontal por mais de 1 ano.

Serão obtidos os dados relativos ao gênero, idade, doenças sistêmicas e uso de medicamentos. Os pacientes com doenças sistêmicas e com história de antibioticoterapia recente e uso de antifúngicos não serão incluídos no estudo.

Aspectos clínicos e radiográficos

Para cada paciente serão anotados na anamnese: idade, sexo, estado pulpar, profundidade da bolsa periodontal, inserção clínica, mobilidade dental, presença de edema dos tecidos periodontais, história de medicação e os achados radiográficos. Os aspectos clínicos do dente envolvido, tais como presença ou não de cáries, restaurações e coroas metálicas serão também anotados, assim como presença ou ausência de dor. Também serão anotados dados da história médica e história dentária.

Serão realizados testes para verificar dor à percussão, à palpação e mobilidade dental, além da realização de uma sondagem periodontal e do teste térmico para confirmação da vitalidade pulpar

Como critérios de exclusão, teremos dentes abertos, com cárie comunicante à câmara pulpar, com trincas, calcificados, reabsorção externa e os casos que não for possível acessar todo o comprimento do canal radicular. Pacientes portadores de doenças sistêmicas (como por exemplo, diabetes melitus e AIDS) e com história de antibioticoterapia recente e uso de antifúngicos também não participarão deste trabalho.

Na consulta inicial será realizada tomada radiográfica periapical para avaliar o comprometimento da doença periodontal.

Os pacientes assinarão um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) elaborado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

Coleta de amostras

Amostras para análise de endotoxinas, análise microbiológica e de citocinas inflamatórias que habitam as bolsas periodontais e canais radiculares dos pacientes selecionados serão feitas antes e depois da instrumentação dos canais radiculares e durante as trocas de curativo (30 dias) com auxílio de cones de papel absorvente estéril introduzidos no comprimento de trabalho pré-estabelecido permanecendo nesta posição por 60 segundos, o que não afetará em nada a saúde dos mesmos já que é um procedimento corriqueiro no tratamento endodôntico (secagem do canal radicular antes da colocação de medicação no interior dos canais radiculares e obturação se faz da mesma maneira). A coleta das amostras dos canais radiculares será realizada sob fluxo contínuo de nitrogênio.

Os canais radiculares serão desinfetados seguindo uma técnica de instrumentação adequada e um potente agente antimicrobiano (CHX gel 2%).

Os 15 pacientes serão divididos em 3 grupos com diferentes medicações intracanaís:

- **Grupo I: (n=5) - Sessão única, sem uso de medicação intracanal.**
- **Grupo II: (n=5, MIC por 30 dias) -** os canais deste grupo serão secos com cones de papel, preenchidos com Ca(OH)_2 + CHX-gel 2 % (2:1) e a seguir colocar-se-á uma bolinha de algodão previamente esterilizada na embocadura do canal radicular. Em sequência uma camada de aproximadamente 2 mm de Coltosol, aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos, adesivo Single Bond 3M[®] (3M Dental Products, St Paul, USA) e aproximadamente 3 mm de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St Paul, USA) serão realizados.
- **Grupo III: (n=5, MIC por 30 dias):** os canais deste grupo serão secos com cones de papel, preenchidos com Ca(OH)_2 + SS estéril (1:1) e a seguir colocar-se-á uma bolinha de algodão previamente esterilizada na embocadura do canal radicular. Em sequência, uma camada de aproximadamente 2 mm de Coltosol, aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos, adesivo Single Bond 3^M[®] (3M Dental Products, St Paul, USA) e 3 mm de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St Paul, USA) serão realizados.

Após as coletas das amostras, o dente em questão será tratado e restaurado pelo mesmo operador. Além disso, será feito pela Área de Endodontia, um acompanhamento de todos os tratamentos realizados neste experimento, durante, no mínimo, 4 anos, e os pacientes serão encaminhados à clínica da FOP-UNICAMP para a finalização de um tratamento periodontal adequado. Para o tratamento endodôntico, não há método alternativo pois há a necessidade de uma instrumentação dos canais radiculares eficiente auxiliada por uma substância química antimicrobiana de comprovada ação contra os microrganismos encontrados no interior dos canais. Além da utilização de uma medicação intracanal que melhore ainda mais esta desinfecção Serão realizadas cinco coletas microbiológicas do canal radicular e da bolsa periodontal, durante a sessão de tratamento endodôntico, dessa forma os voluntários não terão que se deslocar à faculdade apenas para a concretização da pesquisa. Essas coletas serão divididas em duas sessões odontológicas, semelhante a qualquer outro tratamento endodôntico, finalizando com a obturação e selamento do dente envolvido.

No laboratório de Microbiologia da disciplina de Endodontia da FOP, os recipientes com o material colhido do canal radicular serão processados adequadamente para que se obtenha a identificação dos microrganismos.

V. DESCONFORTO OU RISCOS ESPERADOS

Não terá nenhum risco de vida ou mudança no seu atendimento convencional, já realizado diariamente nesta Faculdade. O processo é indolor. Se o paciente sentir dor, esta não será devido à coleta de amostra e sim a persistência da infecção nos canais radiculares e/ ou nos tecidos periapicais.

Os procedimentos desenvolvidos nesse trabalho apresentam em consonância com os tratamentos realizados atualmente na área de Endodontia da FOP/UNICAMP. Os tipos de medicações intracanal preconizadas no presente estudo são empregadas na Clínica de Especialização em Endodontia, assim como em algumas outras instituições do país.

Durante todo o tratamento de canal e coleta de bactéria serão utilizados luvas e óculos de segurança para proteção do operador e do paciente.

Se houver dor fora dos dias marcados para o tratamento, o paciente receberá uma assistência imediata dos responsáveis pela pesquisa, assim o mesmo deverá entrar em contato através dos telefones locais descritos a seguir:

(0xx19) 2106 5215 (laboratório de Endodontia)

(0xx19) 8827-9931 (celular da pesquisadora Thais Mageste Duque).

O paciente também poderá ser atendido no Plantão de Emergência da FOP-UNICAMP, que funciona normalmente de segunda à sexta-feira, de 8:00 às 12:00 hs e de 13:30 às 17:30 hs.

Para qualquer informação ou esclarecimento sobre o tratamento, o paciente poderá entrar em contato com os pesquisadores através dos telefones citados acima, e-mail: thaismageste@fop.unicamp.br e bpgomes@fop.unicamp.br, assim como no endereço Rua: Regente Feijó, nº 639, centro.

O paciente tem toda a liberdade de pedir esclarecimentos sobre a metodologia antes e durante a pesquisa, podendo ou não concordar em participar da mesma. Caso recuse, não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

Uma cópia deste termo (TCLE) será entregue ao voluntário, portanto o mesmo terá em mãos telefones e endereços para contato.

Apesar dos resultados clínicos e microbiológicos serem divulgados publicamente para fins acadêmicos e científicos, será preservada a privacidade do indivíduo quanto aos dados confidenciais que possam a ser envolvidos na pesquisa.

VI. BENEFÍCIOS DO EXPERIMENTO

Os benefícios esperados afetam indiretamente os voluntários, pois estarão relacionados com o desenvolvimento de um tratamento endodôntico mais eficaz e seguro, com o conhecimento dos microrganismos envolvidos nesses casos.

VII. Possibilidades de inclusão em grupo controle ou placebo

Não se aplica inclusão de grupo controle ou placebo.

VIII. Métodos alternativos para obtenção da informação ou tratamento da condição

Não se aplica métodos alternativos.

IX. INFORMAÇÕES

O voluntário tem a garantia de que receberá respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa.

Os resultados da pesquisa ficarão à disposição dos sujeitos envolvidos, sendo preservada a identidade dos mesmos.

A pesquisa não acarretará nenhum ônus ao paciente. Não haverá necessidade de deslocamentos ou procedimentos adicionais para coleta de amostra, além das necessárias para o tratamento endodôntico convencional (2 sessões).

X. RETIRADA DO CONSENTIMENTO

O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo e assim do grupo de amostra, este não será penalizado e não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

XI. CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, _____ certifico que tenho lido as informações acima e suficientemente esclarecido (a) de todos os itens pela Prof.^a. Dr.^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e/ou Thais Mageste Duque, estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, eu autorizo a execução da pesquisa, exposta acima, em mim.

Piracicaba, _____ de _____ de 2010.

Nome: _____

RG: _____

Assinatura:

ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos como voluntário da pesquisa, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da FOP – UNICAMP, endereçado a Av. Limeira, 901 – Caixa Postal 52, CEP 13414-903, fone (19) 2106-5349, e-mail cep@fop.unicamp.br, na cidade de Piracicaba/SP.

APÊNDICE 1

Ficha de Anamnese

DADOS PESSOAIS

Nome:
Idade: Profissão: Sexo: M F Estado Civil:
Endereço:
Bairro: Cidade / Estado: CEP.:
Tel. fixo: Tel. Celular: Tel. de Recado:
Indicado por:
Início do tratamento: / / Aluno:

HISTÓRIA CLÍNICA

Atualmente está em tratamento médico? SIM NÃO
Está tomando algum medicamento (receitado ou não)? SIM NÃO
Qual:

Tem ou teve algum desses problemas de saúde? Se sim, marque com X

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Problemas do coração | <input type="checkbox"/> Hepatite, do tipo: |
| <input type="checkbox"/> Pressão Alta | <input type="checkbox"/> Problema nos rins |
| <input type="checkbox"/> Alergias, a que? | <input type="checkbox"/> Problema de coagulação |
| <input type="checkbox"/> Diabetes | <input type="checkbox"/> Sífilis |
| <input type="checkbox"/> Distúrbios neurológicos | <input type="checkbox"/> Aids |
| <input type="checkbox"/> Epilepsia | <input type="checkbox"/> Sinusite |
| <input type="checkbox"/> Convulsão | <input type="checkbox"/> Asma |
| <input type="checkbox"/> Outros | <input type="checkbox"/> Úlceras |
| <input type="checkbox"/> Febre reumática | <input type="checkbox"/> Outros: |

Já tomou anestesia local para tratamento dentário? SIM NÃO
Foi observada alguma reação anormal? SIM NÃO
Já apresentou reação alérgica a medicamentos? SIM NÃO Qual?
Range os dentes? SIM NÃO
Se mulher, está grávida? SIM NÃO
Usa bebida alcoólica? SIM NÃO
Fuma? SIM NÃO
Usa drogas? SIM NÃO
Há alguma outra informação sobre sua saúde que deva ser comunicada?

EXAME CLÍNICO *(preenchido pelo Cirurgião Dentista)*

Pulso bpm. (normal: 60 a 90 batimentos por minuto)
Pressão arterial / mmHg (normal: diastólica \leq 90 mmHg)
Frequência respiratória: /min. (normal: 15 a 20 movimentos por minuto)
Temperatura (axilar): °C (normal: 36,8°C \pm 0,2°C)

(Declaro para todos os fins legais que as informações aqui relatadas são verdadeiras e que nada omiti na anamnese)
(Assinatura do paciente ou responsável)

Diagnóstico

Pulpar:

- Polpa Normal
- Pulpite Reversível
- Pulpite Irreversível
- Necrose Pulpar

Periapical:

- Normal
- Pericementite
- Abscesso
 - Intra-Ósseo
 - Sub-Perióstico
 - Sub-Mucoso
 - Sub-Cutâneo

Plano de Tratamento

- Dentisteria
- Urgência
 - Tratamento de pulpite
 - Drenagem de abscesso
- Extração

Motivo: _____

- Tratamento Endodôntico
 - Apicigênese
 - Apicificação
 - Com tratamento de perfuração
 - Com remoção de instrumento fraturado
 - Complementado por cirurgia

- Retratamento Endodôntico
 - Com remoção de pino/núcleo
 - Com tratamento de perfuração
 - Com remoção de instrumento fraturado
 - Complementado por cirurgia

- Procedimentos pré-protéticos
 - Preparo de espaço para retentor
 - Confeção e cimentação de núcleo metálico fundido
 - Confeção de pino de fibra de vidro reforçado com resina
 - Confeção de núcleo de preenchimento em resina composta
 - Reforço de raízes com paredes debilitadas
 - Confeção de coroa provisória

Dados Técnicos

Grampo utilizado:

Canal	Referência	CRC (mm)	CRT (mm)	Diâmetro do forame(LAI)	LAF	Diâmetro do cone

Procedimentos Realizados

Data	Procedimentos

Anestésico utilizado:

Técnica de preparo:

Patência foraminal: Sim Não

Substância irrigadora:

Técnica de obturação:

Cimento empregado:

Extravasamento de cimento: Sim Não

Preenchimento de canais laterais: Sim Não

Houve dor entre as sessões: Sim Não

Número de sessões: Uma Duas Mais:

Preparo de espaço para núcleo: Sim Não Canal

Profundidade _____ mm

Restauração:

Provisória

Selamento da Câmara Pulpar

Definitiva

Prognóstico:

Proservação Prevista

APÊNDICE 2

Espécies bacterianas encontradas nas coletas dos canais radiculares e bolsas periodontais.

CANAL INICIAL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
T. forsythia	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T. denticola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
P. micra	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
F. nucleatum	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
P. gingivalis	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
P. intermedia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CANAL FINAL APÓS PQM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
T. forsythia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
T. denticola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. micra	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
F. nucleatum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. gingivalis	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. intermedia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CANAL APÓS MEDICAÇÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
T. forsythia	-	-	Sessão única	Sessão única	-	Sessão única	Sessão única	-	-	Sessão única	+	-	-	-	-
T. denticola	-	-	Sessão única	Sessão única	-	Sessão única	Sessão única	-	-	Sessão única	-	-	-	-	-
P. micra	+	+	Sessão única	Sessão única	-	Sessão única	Sessão única	-	-	Sessão única	+	-	-	+	-
F. nucleatum	-	-	Sessão única	Sessão única	-	Sessão única	Sessão única	-	-	Sessão única	-	-	-	-	-
P. gingivalis	+	-	Sessão única	Sessão única	-	Sessão única	Sessão única	-	-	Sessão única	-	-	-	-	-
P. intermedia	-	-	Sessão única	Sessão única	-	Sessão única	Sessão única	-	-	Sessão única	-	-	-	-	-

BOLSA INICIAL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
T. Forsythia	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
T. denticola	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
P. micra	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
F. nucleatum	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
P. gingivalis	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
P. intermedia	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-

BOLSA FINAL APÓS PQM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
T. forsythia	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
T. denticola	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
P. micra	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
F. nucleatum	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
P. gingivalis	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
P. intermedia	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-

BOLSA APÓS MEDICAÇÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
T. forsythia	-	+	Sessão única	Sessão única	+	Sessão única	Sessão única	-	+	Sessão única	+	+	+	+	+
T. denticola	-	+	Sessão única	Sessão única	+	Sessão única	Sessão única	-	+	Sessão única	+	-	-	+	+
P. micra	-	+	Sessão única	Sessão única	+	Sessão única	Sessão única	-	+	Sessão única	+	+	+	+	+
F. nucleatum	+	-	Sessão única	Sessão única	+	Sessão única	Sessão única	+	+	Sessão única	+	+	-	-	+
P. gingivalis	-	+	Sessão única	Sessão única	+	Sessão única	Sessão única	-	+	Sessão única	-	+	+	+	+
P. Intermedia	-	+	Sessão única	Sessão única	+	Sessão única	Sessão única	-	+	Sessão única	-	-	-	-	+

APÊNDICE 3

Valores da concentração de Endotoxinas (pg/mL) dos pacientes em todas as fases do tratamento

Paciente	Bolsa Periodontal Inicial	Bolsa Periodontal Final	Bolsa Periodontal Após a Medicação	Canal Radicular Inicial	Canal Radicular Final antes EDTA	Canal Radicular Final após EDTA	Canal Radicular Após a Medicação
1	15,50	3,01	27,00	0,10	0,15	0,10	0,10
2	82,20	5,50	2,13	0,10	0,10	0,02	0,10
3	223,00	7,48	0,00	0,10	0,03	0,10	0,00
4	370,00	9,77	0,00	0,10	0,18	0,02	0,00
5	225,00	93,80	14,80	60,20	0,08	0,02	0,10
6	15,00	17,60	0,00	0,10	0,15	41,20	0,00
7	37,90	13,70	0,00	0,10	0,10	0,10	0,00
8	20,00	4,32	3,53	0,10	0,10	0,01	0,02
9	62,50	0,10	45,40	0,10	0,08	0,10	0,10
10	551,00	47,60	0,00	0,10	0,10	0,10	0,00
11	336,00	1,59	67,50	0,10	0,10	0,02	0,01
12	373,00	29,30	22,50	0,10	0,10	0,10	0,10
13	25,10	17,50	26,10	0,10	0,92	1,18	0,10
14	221,00	23,70	8,97	0,10	0,10	0,10	0,10
15	335,00	19,80	84,80	0,10	0,10	0,10	0,10

APÊNDICE 4

Valores de Citocinas (IL1 β) dos pacientes em todas as fases do tratamento

IL 1 – β				
	Bolsa Inicial	Canal Inicial	Bolsa Após MIC	Canal Após MIC
1	201,32	21,36	0,01	0,08
2	183,58	9,28	74,59	0,17
3	204,71	7,23	-	-
4	154,44	0,82	-	-
5	35,87	9,67	12,27	0,14
6	1,09	8,23	-	-
7	1,19	4,21	-	-
8	23,02	5,21	12,74	43,88
9	48,20	8,32	10,32	0,21
10	102,79	3,21	-	-
11	21,39	6,81	5,86	0,18
12	8,44	3,46	8,17	0,13
13	161,19	6,23	52,62	0,17
14	0,85	12,09	6,47	0,16
15	19,68	5,32	37,31	0,26

APÊNDICE 4

Valores de Citocinas (IL1 α) dos pacientes em todas as fases do tratamento

IL1 – α				
	Bolsa Inicial	Canal Inicial	Bolsa Após MIC	Canal Após MIC
1	12,35	3,94	88,32	7,47
2	118,59	1,72	173,17	62,99
3	47,93	2,54	-	-
4	83,15	6,21	-	-
5	101,47	0,63	3,46	1,06
6	33,92	2,75	-	-
7	8,73	0,53	-	-
8	131,22	8,16	110,68	30,29
9	93,20	2,76	16,72	83,50
10	5,79	1,12	-	-
11	47,33	13,32	89,01	1,69
12	57,95	2,83	26,66	0,15
13	78,92	1,48	110,68	30,29
14	33,18	1,11	16,72	83,50
15	802,37	3,61	64,83	42,56

APÊNDICE 4

Valores de Citocinas (TNF α) dos pacientes em todas as fases do tratamento

TNF – α				
	Bolsa Inicial	Canal Inicial	Bolsa Após MIC	Canal Após MIC
1	19,28	8,25	0,62	4,15
2	36,17	13,39	6,98	3,77
3	14,37	2,92	-	-
4	37,36	12,10	-	-
5	43,96	45,94	6,24	1,61
6	1,19	24,59	-	-
7	16,40	10,44	-	-
8	20,64	11,93	12,45	4,99
9	20,02	1,89	0,90	3,76
10	36,54	3,10	-	-
11	9,65	23,92	4,46	6,68
12	4,41	16,78	3,26	2,64
13	14,97	3,43	9,34	3,32
14	27,50	13,66	6,26	4,05
15	8,32	12,55	18,08	3,89

APÊNDICE 4

Valores de Citocinas (PGE2) dos pacientes em todas as fases do tratamento

PGE2				
	Bolsa Inicial	Canal Inicial	Bolsa Após MIC	Canal Após MIC
1	177,47	148,91	101,84	49,18
2	63,69	73,15	29,79	36,61
3	76,97	119,35		
4	88,58	170,06		
5	28,18	187,29	77,12	6,96
6	71,99	8,71		
7	34,47	11,79		
8	12,15	82,34	16,49	64,40
9	96,33	39,87	14,79	78,21
10	154,22	81,14		
11	105,83	192,35	226,18	69,54
12	133,61	58,20	41,53	105,15
13	75,66	95,26	63,82	124,94
14	41,37	93,21	126,71	83,05
15	9,30	13,83	87,89	171,72

APÊNDICE 5

Dados clínicos dos 15 dentes com bolsas periodontais profundas e sensibilidade pulpar

Casos	Dentes	Grupo	Idade	Sexo	Percussão / Palpação	Mobilidade	Bolsa (mm)	Inserção clínica (mm)	Coroa	Proservação 1 ano
1	41	Ca(OH) ₂ + CHX	31	F	-	3	V 6	8	H	Exodontia
2	14	Ca(OH) ₂ + CHX	46	M	-	2	V 6	8	R	Exodontia
3	34	Sessão Única	47	F	-	2	V 6	8	R	Mobilidade: 1 Bolsa : V 4 mm
4	25	Sessão Única	47	F	-	2	V 10	11	H	Mobilidade: 1 Bolsa : V 8 mm
5	11	Ca(OH) ₂ + CHX	40	F	-	2	V 7	8	H	Mobilidade: 1 Bolsa : V 6 mm
6	12	Sessão Única	33	F	-	2	V 5	12	H	Mobilidade: 1 Bolsa : V 3 mm
7	22	Sessão Única	25	M	-	2	M 5	10	H	Exodontia
8	22	Ca(OH) ₂ + CHX	33	F	-	2	M 4	12	H	Mobilidade: 0 Bolsa : M 3
9	46	Ca(OH) ₂ + CHX	35	M	-	3	M 10	12	R	Mobilidade: 2 Bolsa : M 10 mm
10	44	Sessão Única	33	M	-	2	M 8	8	H	Mobilidade: 1 Bolsa : M 6 mm
11	36	Ca(OH) ₂ + SS	53	M	-	3	D 9	10	R	Exodontia
12	46	Ca(OH) ₂ + SS	31	F	-	3	M 10	10	R	Mobilidade: 1 Bolsa : M 8 mm
13	36	Ca(OH) ₂ + SS	31	F	-	1	M 11	11	R	Mobilidade: 1 Bolsa : M 9 mm
14	26	Ca(OH) ₂ + SS	46	M	-	2	M 11	13	H	Mobilidade: 1 Bolsa : M 9 mm
15	11	Ca(OH) ₂ + SS	53	M	-	2	P 10	12	H	Exodontia

APÊNDICE 6

MEIO DE TRANSPORTE

VMGA III (Viability Medium Göteborg Agar)

1. Descrição

O meio de transporte VMGAIII (Viability Medium Göteborg Agar) foi descrito inicialmente por Moller (1966) e por Dahlén *et al.* (1993) e é preparado para suportar a sobrevivência de organismos anaeróbios estritos e aeróbios sem ocorrer crescimento. É aplicado para amostras pequenas, como as coletadas por pontas de papel absorvente. Se armazenado em recipiente bem fechado e sem contato com oxigênio, pode ser guardado por longo tempo. Deve ser protegido da luz. O indicador de oxi-redução é o azul de metileno e sua função é consumir o oxigênio, mantendo o meio reduzido. A solução protetora é a peptona 0,1% e a gelatina 5%. Sua consistência é semi-sólida em temperatura ambiente e semi-fluido acima de 30°C.

2. Preparo do meio

2.1. Componentes necessários

- a) Acetato de fenilmercúrio;
- b) Glicerofosfato de sódio;
- c) CaCl anidro ou CaCl₂.6H₂O
- d) KCl
- e) MgSO₄.7H₂O
- f) NaOH
- g) Agar bacteriológico
- h) Gelatina (DIFCO, Detroit, EUA)
- i) Triptose (DIFCO, Detroit, EUA)
- j) Thiotona e Peptona (BBL, Cockeyville, EUA)
- k) L-cisteína-dihidroclorito (Sigma, St. Louis, EUA)
- l) Ácido tioglicólico (Sigma, St. Louis, EUA)

Autoclavar previamente:

- a) Frascos de Eppendorf ou vidros pequenos com 3 bolinhas de vidro (Glass beads). A quantidade de Eppendorfs é de acordo com o volume que será preparado do meio. Neste caso, se for preparar 250 mL de VMGA III, autoclavar cerca de 130 frascos.
- b) Proveta de 50mL
- c) 2 frascos vazios de 500mL
- d) 2 frascos vazios de 1000mL
- e) 4 funis
- f) 4 tubos de ensaio
- g) 4 espátulas
- h) 1 frasco de Becker pequeno
- i) 2 provetas de 200mL
- j) 30 pedaços de papel alumínio
- k) 1 vidro de 500mL

2.2. Preparo dos volumes líquidos

Para os volumes de VMGA III, autoclavar os respectivos volumes de **água bidestilada**.

	500 mL	250 mL	125 mL
1 frasco	275 mL	137,5 mL	68,75 mL
1 frasco	150 mL*	75 mL*	37,5 mL*
1 frasco	600 mL	300 mL	150 mL
1 frasco	5 mL	2,5 mL	1,25 mL

*Colocar um peixinho para ajudar a dissolver a gelatina

Para os volumes de VMGA III, autoclavar os respectivos volumes de **SS**.

	500 mL	250 mL	125 mL
1 frasco	50 mL	25 mL	12,5 mL

2.3. Solução de Sais de Estoque IV

Verificar se tem a **solução de sais de estoque IV** (Cor azul) e autoclavar, caso não tenha, autoclavar:

1 frasco	60 mL de água bidestilada (1)
1 frasco	40 mL de água bidestilada (2)
1 frasco	60 mL de água bidestilada (3)
1 frasco	40 L de água bidestilada (4)

Verificar se tem a **solução de NaOH e KOH (8M)**, caso não tenha, preparar. Volume final de 200 mL. Modo de preparo: Pesar 64g de NaOH e 89,76g de KOH. Dissolver em 140 mL de água bidestilada. Depois de dissolvido, acrescentar água bidestilada q.s.p 200 mL. Autoclavar por 20 minutos.

No dia anterior, preparar as soluções:

a) SOLUÇÃO 1 – Água bidestilada estéril 60mL + Acetato de fenilmercúrio 0,1g (não pesar com espátula de metal). Dissolver em banho-maria e deixar overnight a 56°C.

b) SOLUÇÃO 2 – Água bidestilada estéril 40mL + Glicerofosfato de sódio 20g. Dissolver aquecendo levemente na manta e deixar overnight.

No dia do preparo do VMGA III, para preparar a solução azul:

c) SOLUÇÃO 3 – Água bidestilada estéril 60mL + CaCl anidro 0,24g ou CaCl₂.6H₂O 0,32g + KCl 0,84g + MgSO₄.7H₂O 0,2g.

Misturar bem as SOLUÇÕES 1, 2 e 3 e resfriar em uma proveta graduada.

Adicionar 40mL de água bidestilada já estéril para completar 200 mL. Ao final, adicionar 0,006g de azul de metileno e acondicionar na geladeira.

2.4. Mistura das soluções e preparo do VMGA III

a) Solução A:

SOLUÇÃO A	1000 mL	250 mL	125 mL
Água bidestilada	550 mL	137,5 mL	68,75 mL
Triptose	0,5 g	0,125 g	0,0625 g
Thitona e Peptona	0,5 g	0,125 g	0,0625 g

O frasco com água bidestilada deve estar estéril no dia anterior. Dissolver com agitação e aquecimento na manta ou no microondas por 10 segundos.

b) Solução B:

SOLUÇÃO B	1000 mL	250 mL	125 mL
Água Bidestilada	300 mL	75 mL	37,5 mL
Gelatina	50 g	12,5 g	6,25 g

A água bidestilada deve estar pré-aquecida. O frasco com água destilada e o peixinho já devem estar estéreis no dia anterior. Aquecer no microondas por 10 segundos + 10 segundos + 10 segundos (total de 30 segundos), observando atentamente se derrete a gelatina. Deixar em banho-maria caso não derreta tudo.

Essa solução não pode mais ser autoclavada.

c) Solução C:

SOLUÇÃO C	1000 mL	250 mL	125 mL
Água bidestilada	50 mL	12,5 mL	6,25 mL
Agar	2 g	0,5 g	0,25 g

Autoclavar a 121°C por 20 minutos, manter em banho-maria.

d) Solução D:

SOLUÇÃO D	1000 mL	250 mL	125 mL
Água bidestilada	10 mL	2,5 mL	1,25 mL
L-cisteína	0,05 g	0,125 g	0,0625 g

Autoclavar a 121°C por 20 minutos, manter em banho-maria.

e) Solução E:

SOLUÇÃO E	1000 mL	250 mL	125 mL
Solução salina	100 mL	25 mL	12,5 mL
Ácido Tioglicólico	0,5 mL	0,125 mL	0,0625 mL

A SS deve estar estéril no dia anterior. O ácido tioglicólico encontra-se no freezer, e deve ser manipulado com muito cuidado, empregando luvas e máscara.

Misturar as **SOLUÇÕES A + B + C** em frasco de 500 mL na manta. Resfriar a 45-50°C. Adicionar 25mL da solução de sais de estoque azul IV. Adicionar a solução de ácido tioglicólico (**SOLUÇÃO E**). Ferver a solução por 5 minutos até que a cor azul desapareça (fica amarelo). Resfriar em água morna sob fluxo de N₂. Levar para a câmara de anaerobiose. Adicionar a solução de cisteína (**SOLUÇÃO D**).

Ajustar o pH 7,2 a 7,4 com a solução de NaOH + KOH, adicionando de 10 em 10 microlitros. Adicionar aos poucos, pois não tem volta. A solução de NaOH + KOH vai diminuir o pH.

Colocar 1 mL da solução em cada eppendorf e deixar levemente aberto na cabine de anaerobiose. Passar parafilm para evitar qualquer tipo de contato com oxigênio e contaminação. Proteger da luz com papel alumínio.

APÊNDICE 7

EXTRAÇÃO DO DNA

(250 / QIAamp DNA mini kit – cat. Nº 51306)

OBS: não precisa manter kit na geladeira, mas se for manter refrigerado deve esperar ficar na temperatura ambiente para usar.

Quando deixa na geladeira, o reagente 1 (ATL) fica com precipitados brancos de dificultam pipetagem.

1- Agitar a amostra e pegar 300µl do VMGA (se tiver pouco vmga, diluir com água ultra-pura / miliQ estéril). Quando for usar eppendorf com o swab (raspa da biofilmemãe ou isoladas) vai acrescentar 500-400µl de água ultra-pura / miliQ estéril, centrifugar bem e pegar 300 µl. Depois vai guardar o resto da água com o swab , e não descartar!

2- Centrifugar a 8000 rpm / 5min.

3- Remover sobrenadante, com bastante cuidado para não aspirar as células também. Não precisa remover todo líquido sobrenadante, pois assim evita-se remover parte do pelet.

4- Adicionar 180µl de ATL (1) e 20µl de Proteinase K (2).

5- Agitar e incubar a 56°C por 30 min.

6- Adicionar 200µl de AL (3).

7- Agitar e incubar a 70°C por 10 min.

8- Adicionar 200µl de etanol (álcool etílico) 100%.

9- Agitar e transferi para tubos com filtros/colunas do Kit (QIAamp Mini Spim Collum).

10- Centrifugar a 8000 rpm / 1 min.

11- Transferir o filtro para outro tubo vazio do kit ou jogar líquido fora e reaproveitar mesmo tubo/coluna.

12- Adicionar 500µl de AW1 (4).

13- Centrifugar 8000 rpm / 1 min.

14- Transferir o filtro para outro tubo vazio do kit ou jogar líquido fora e reaproveitar mesmo tubo/coluna.

15- Adicionar 500µl do AW2 (5).

16- Centrifugar a 13000 rpm / 3 min

17- Transferir o filtro para um eppendorf normal de 1,5 ml com tampa.

18- Adicionar 100µl de AE (6) – é o eluente.

19- Aguardar 3 min.

20- Centrifugar a 8000 rpm / 1 min

21- Descartar filtro e Guardar seu DNA extraído a -20°C. (vai ter 100µl)

DILUIÇÃO DE PRIMER

“Quando chega liofilizado acrescentar x µL de água Mili-Q, esse volume dependerá de cada síntese. Deve-se verificar no rótulo do tubo do primer, ou naquele documento que vem junto, o valor indicativo da quantidade de nm (canto direito abaixo da OD). Esse valor será a quantidade de água que deverá ser utilizada para diluição do primer e assim vai ficar uma concentração de 1000 pMol (essa é a solução estoque). Para preparar a solução de uso, cuja concentração requerida é de 25 pMol, faz-se necessário uma diluição 1:40, ou seja, diluir 1 µl de primer estoque e 39 µl de água ultra pura/miliQ estéril. (USP)”

→EXEMPLO:

Solução Estoque (1000 pMol)

- Se estiver escrito no rótulo do primer “28,31 nm”

- Acrescenta “28,31 uL” de água Mili-Q estéril agita bem, centrifuga rapidamente apenas para concentrar o líquido no fundo do tubo e armazenar em -20°C.

Solução de Uso (25 pMol)

- Diluir 1:40 = 1ul do estoque + 39 ul de água Mili-Q estéril

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$1000 \times 1\text{ul} = 25 \times ?$$

? = 40 (quer dizer que pegando 1 ul da solução estoque, para ter a solução final de uso a 25pMol, o volume total deve ser 40ul, então colocar 39ul de água)

- Se quiser fazer uma quantidade maior de primer, é só aumentar proporcionalmente.

Ex: 5 ul de estoque + 195 ul de água

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$1000 \times 5 = 25 \times ?$$

? = 200 (para uma solução de uso de 200 ul, deve pegar 5 ul do estoque + 195 ul de água)

DNTPs

Acrescentar 10 uL de cada (A, T, C, G) em 360 uL de água MiliQ estéril

(100mM DNTPs Set, PCR Grade / Invitrogen, Cat Nº 10297117)

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

***Pequeno:** 0,63 g de agarose (0,7%) / 0,9 g agarose (1%) / 1,8g agarose (2%)

90 ml de TAE 1X ou TBE 1X

2 µl de solução de brometo de etídio (10mg/ml) ou se for usar Sybr Safe vai colocar 9 µl para 90 mL de TAE

***Grande:** 3x o médio

1 – Pesar (no copinho de café descartável) na balança de precisão de acordo com a concentração do gel (0,7%, 1% ou 2%)

2 – Misturar a agarose com 90 ml do tampão (TAE ou TBE) em Becker e aquecer em microondas até ficar transparente (+- 1min: deixa um pouco, tira para mexer e voltar p microondas, até desaparecer partículas)

3 – Passar conteúdo para o Becker contaminado com brometo e acrescentar 2uL do brometo de etídio.

CUIDADO É MUITO TÓXICO!!!

Dissolver 0,2 g de brometo de etídio em 20 ml de água destilada/MiliQ

Manter em temperatura ambiente e proteger da luz.

Invitrogen já vende solução pronta.

4 – Misturar e verter na bandeja.

Importante: Encaixar bem as borrachas para vedar as extremidades e colocar o pente.

5 – Observar se tem bolhas para remover e esperar esfriar/endurecer (+-30 min)

6 – Remover as borrachas e pentes.

7 – Levantar a bandeja com o gel para dentro da cuba e acrescentar tampão se necessário, até cobrir todo gel.

Importante: o tampão da cuba deve ser o mesmo usado no gel (TAE ou TBE)

8 – Aplicar 4 ul da amostra + 2ul do corante (loading dye) em cada poço.

Essa mistura é feita em um pedaço de parafilm, e não dentro do eppendorf.

9 – Fechar cuba e Ligar fonte de eletroforese

+/- 90 V / +/-40 minutos. Observar no visual a posição do corante pra ter noção de onde a banda está!

Obs: Quando vai fazer purificação a partir da banda, deve fazer receita dobrada (brometo tb é 2x) para os poços ficarem maior. No gel 2% o brometo não dobra.

APÊNDICE 8

QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINAS

Determinação da concentração de endotoxinas (Teste Turbidimétrico - ensaio de LAL)

O teste turbidimétrico (BioWhittaker, Inc., Walkersville, MD, EUA) foi utilizado para medir as concentrações de endotoxinas presentes nos canais radiculares e bolsas periodontais. Para isso, foi utilizado a técnica do Lisado de Amebócito Limulus (LAL).

- Preparo dos Reagentes:

Todos os reagentes foram retirados da geladeira para atingir a temperatura ambiente antes do uso.

Para calcular as concentrações desconhecidas de endotoxina nas amostras cada ensaio turbidimétrico de LAL deve apresentar uma curva padrão válida.

Por causa das grandes concentrações sobre os quais os valores de endotoxina podem ser determinados, é possível ajustar o intervalo quantitativo de qualquer ensaio, ajustando a concentração de padrões de endotoxina. Um mínimo de três padrões são necessários.

O ensaio PYROGENT-5000 é realizado podendo variar de 0,01 EU / ml a 100 EU / ml. No entanto, esses valores padrões podem variar em função das necessidades específicas do produto.

- Preparo das amostras:

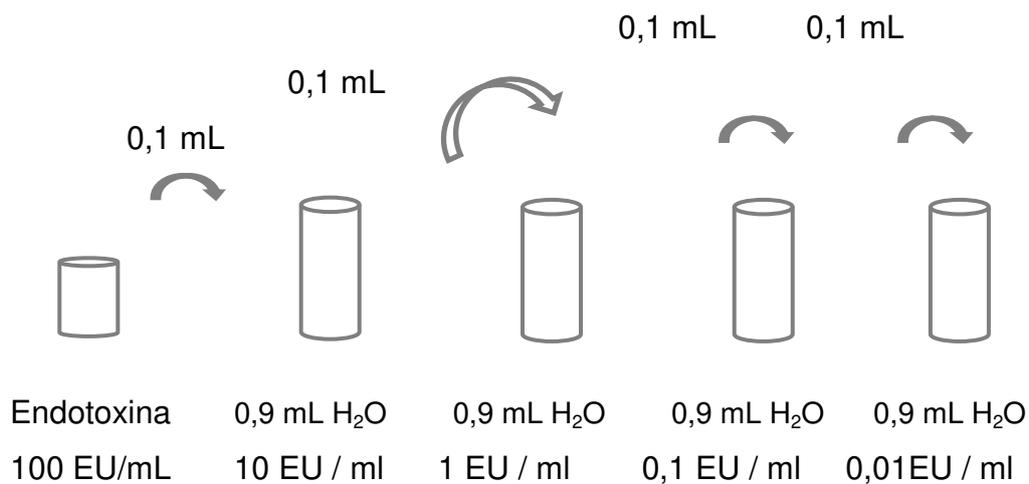
Todas as amostras de endotoxina que foram coletadas dos canais radiculares e das bolsas periodontais, foram suspensas em 1 mL de água LAL e agitadas em vortex durante 60 segundos. A água LAL foi considerada como o branco para todos os testes.

- Preparo da curva padrão:

Como um parâmetro para o cálculo da quantidade de endotoxinas das amostras, uma curva padrão foi representada graficamente utilizando com uma concentração conhecida de endotoxinas (100 EU / ml), e as suas diluições com as seguintes concentrações finais (ou seja, 0,01 , 0,10, 1, 10 UE / mL)

1. Prepare uma solução contendo 10 EU / ml de endotoxina, adicionando 0,1 ml do estoque de 100 EU / ml de endotoxinas em 0,9 ml de água reagente LAL. Esta solução deve ser vigorosamente agitada em vórtice, durante pelo menos 1 minuto antes de prosseguir.
2. Transferir 0,1 mL da UE 10 / ml de solução de endotoxina em 0,9 ml de água LAL. A água deve estar em um recipiente adequado com etiqueta 1 EU / ml. A solução deve ser vigorosamente agitada em vórtice, durante pelo menos 1 minuto antes de prosseguir.
3. Transferir 0,1 mL da UE 1 / ml de solução de endotoxina em 0,9 ml de reagente de LAL. A água deve estar em um recipiente adequado com etiqueta com rótulo 0,10 EU / ml. Esta solução deve ser vigorosamente agitada durante pelo menos 1 minuto antes de prosseguir.
4. Transferir 0,1 mL da UE 0.10 / ml de solução de endotoxina em 0,9 ml de LAL. A água deve estar em um recipiente adequado com etiqueta com rótulo 0,01 EU / ml. esta solução deve ser vigorosamente agitada em vórtice, durante pelo menos 1 minuto antes de prosseguir.

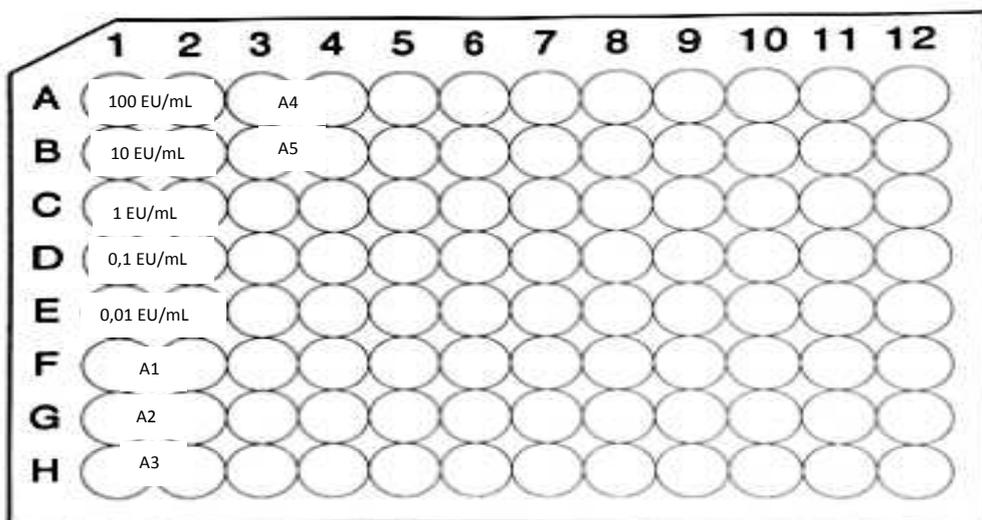
Essa curva era então realizada da seguinte forma: Eram colocados 0,9mL de água LAL em 4 tubos de ensaio apirogênicos. Em seguida, o frasco contendo a endotoxina, em uma concentração de 100EU/mL, era vortexado e, 0,1mL colocado no primeiro tubo de ensaio que sera também vortexado. Esse procedimento é repetido até o ultimo tubo de ensaio. Cada tubo de ensaio vai apresentar uma concentração de endotoxinas pré estabelecida e, essa diluição seriada é a curva padrão do ensaio. Esse processo est esquematizado no esquema abaixo.



Após preparo da curva padrão, preparamos a biofilme que será lido no leitor. A microbiofilme de 96 poços (Corning Costar, Cambridge, MA), será preparada da seguinte maneira:

1. Dispensar cuidadosamente 100 μ L de água apirogênica LAL em todos os poços
2. Dispensar cuidadosamente 100 μ L da diluição seriada nos primeiros poços (como mostra o esquema)
3. Dispensar cuidadosamente 100 μ L das amostras nos outros poços (como mostra o esquema)
4. Evitar a formação de bolhas!

Todas as amostras e as reações foram distribuídas e realizadas em duplicata, para validar o ensaio. O esquema abaixo ilustra esse procedimento.



O teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Após preenchimento da microplaca, ela é inserida em um leitor de placas (Ultramark, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA), a 340 nm, em um bloco de aquecimento a 37 ° C e mantida a esta temperatura durante todo o ensaio. Essa biofilme é pré incubada por mais ou menos 10 minutos.

Depois, como uma pipeta multicanal, distribuir 100 µL do Reagente PYROGENT 5000 em todos os poços, começando pela primeira coluna. Esse reagente deve ser colocado o mais rápido possível, evitando a formação de bolhas. O leitor é fechado e a leitura começa a ser realizada.

Uma vez que o valor da absorvância média dos padrões foi diretamente proporcional à concentração de endotoxinas apresenta, a concentração de endotoxina é determinada a partir da curva padrão

APÊNDICE 9

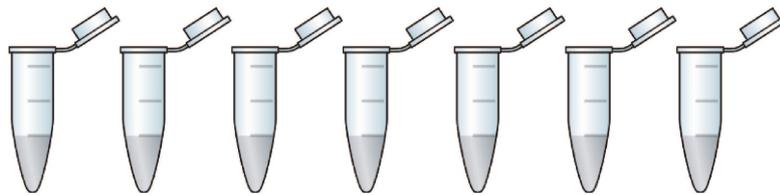
QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

IL-1 β e IL-1 α

1) Preparo dos reagentes:

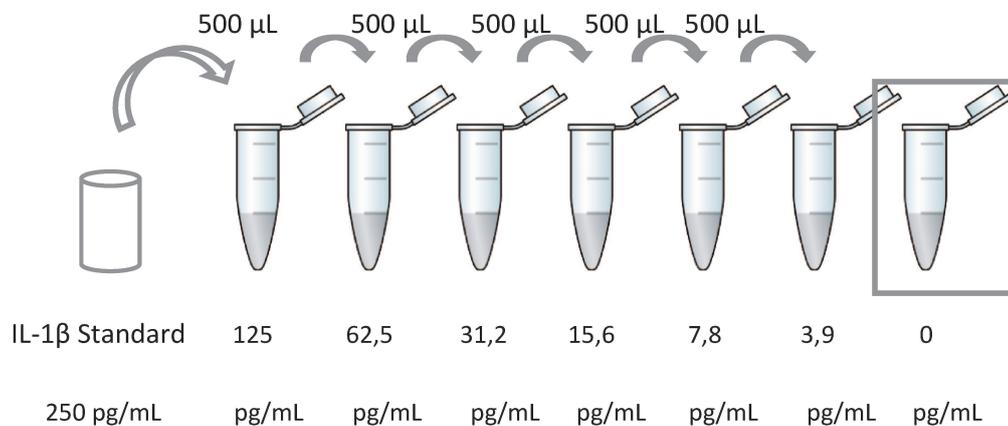
A primeira coisa que será feita é o preparo da curva padrão.

- Reconstituir o IL-1 β Standard. Colocar 5mL do “Calibrator Diluent RD6C”. O frasco deverá ser agitado suavemente e permanecer parado por um mínimo de 15 minutos antes de começar as diluições .
- Pegar ependorffs ou tubos de vidros estéreis e coloca-los em uma estante.
- Colocar 500 μ L do “Calibrator Diluent RD6C” nos 7 ependorffs /tubos de vidros estéreis previamente separados

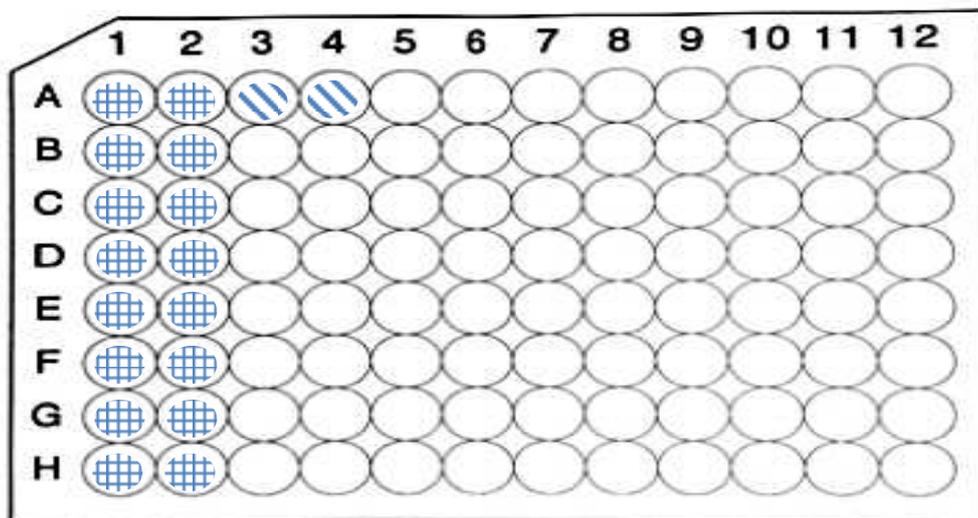


500 μ L

- A partir de agora será feito a diluição seriada de acordo com o esquema abaixo. Os tubos devem ser vortexados antes de ser feita a transferência para o tubo seguinte.



- e) Cuidado com o ultimo endorff /tubos de vidro. Este ultimo deve conter apenas 500 μ L do " Calibrator Diluent RD5-5". Ele vai servir como o zero padrão da curva (o pg/mL)
- 2) Retirar a biofilme do envelope e coloca-la dentro do fluxo. Vale ressaltar a importância de estar usando luvas e mascaras, para não contaminar a placa, alterando os resultados
 - 3) Adicionar 50 μ L do "Assay Diluent RD1-83" em cada poço da placa. Esse componente cont m um precipitado e por isso, deve ser bem misturado (vortex) antes e durante o seu uso.
 - 4) Vamos agora preencher toda a biofilme de 96 poços com 200 μ L para todos os componentes da curva padrão, do controle e das amostras, de acordo com o diagrama abaixo:



 Essas duas primeiras colunas são preenchidas com as dilui es para montar a curva padrão. Será realizada da seguinte forma:

- A1 e A2 com 200 μ L do IL-1 α Standard
- B1 e B2 com 200 μ L da dilui o 125 pg/mL
- C1 e C2 com 200 μ L da dilui o 125 pg/mL
- D1 e D2 com 200 μ L da dilui o 125 pg/mL
- E1 e E2 com 200 μ L da dilui o 125 pg/mL
- F1 e F2 com 200 μ L da dilui o 125 pg/mL

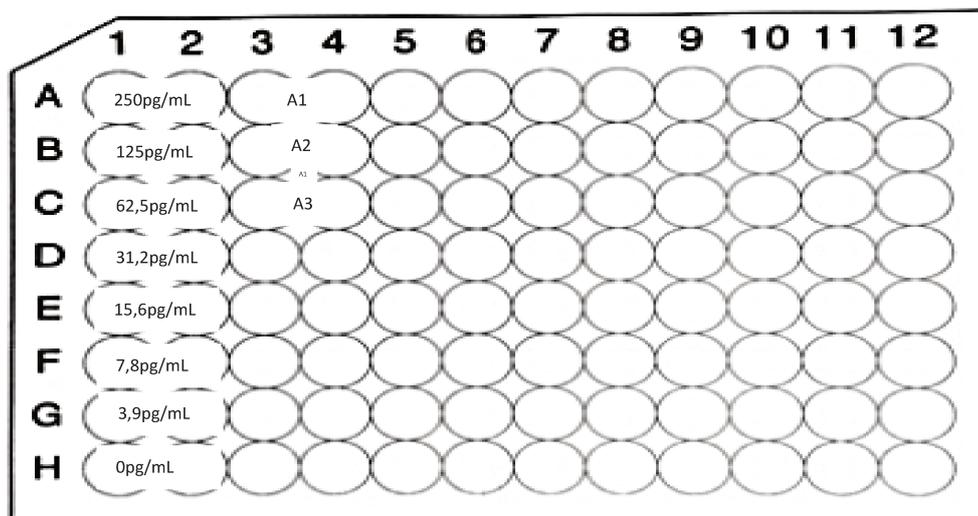
- G1 e G2 com 200 μ L da diluição 125 pg/mL

- H1 e H2 com 200 μ L da diluição 125 pg/mL



Agora cada poço da biofilme será preenchido, sempre em duplicatas e sempre 200 μ L de cada amostra.

- 5) Cubra a biofilme com a película protetora e a ela será incubada por 2 horas a uma temperatura ambiente. Nesse momento é bom fazer o layout da placa. Assim, pegamos o desenho da biofilme vazio no final do folheto e completamos com o nome das amostras que foram distribuídas na biofilme como exemplificado abaixo:



- 6) Nesse momento preparar o solvente para lavar a placa. Pegar o frasco do “Wash Buffer” e verificar se não existe cristais formados no frasco. Se houver, misture delicadamente até que todos tenham se dissolvido. Em seguida, colocar em um bequer 500 mL de água destilada e 20 μ L desse “Wash Buffer”.
- 7) Após as duas horas, fazer a lavagem da biofilme da seguinte forma: levar a biofilme na pia e tirar todo o líquido presente. Depois encher cada poço com 400 μ L da solução preparada no item 6, novamente dispensar todo o conteúdo na biofilme e em seguida, bater a biofilme na mesa sobre um papel toalha para remover o excesso. Esse procedimento deve ser realizado

3 vezes. Ao final, se necessário, remover todas as bolas presentes com pipetas, aspirando o conteúdo.

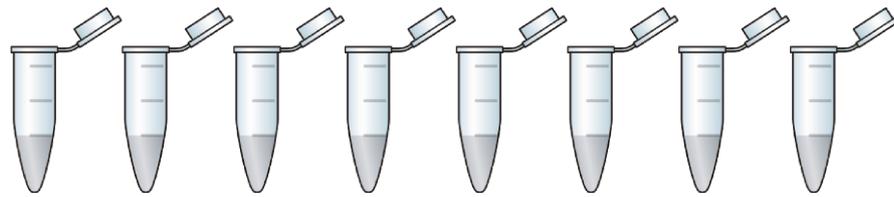
- 8) Colocar 200 μL do “IL-1 β Conjugate” em cada poço da placa. Cobrir a biofilme com outro adesivo e incubar por 2 horas à temperatura ambiente.
- 9) Realizar novamente a lavagem da placa, como descrito no item 7
- 10) Para preparar o próximo reagente, vamos misturar em uma biofilme de petri os “Color Reagents A e B” para preparar o “Substrate Solution”. Eles devem ser misturados juntos e usados em no máximo 15 minutos. Nessa hora, é bom apagar as luzes do laboratório, porque essa mistura tem que ser protegida da luz. E como o tempo é curto, é bom usar a pipeta multicanal para distribuir essa mistura nos poços da placa.
- 11) Adicionar 200 μL do “Substrate Solution” em cada poço da biofilme e cobrir ela com papel alumínio. Proteger da luz! Ela ficará incubada por 20 minutos à temperatura ambiente.
- 12) Já pode acender a luz
- 13) Adicionar 50 μL da “Stop Solution” em cada poço da placa. Nesse momento a cor dos poços deve mudar de azul para amarelo. Se a cor nos poços estiver verde ou com uma cor não uniforme devemos, suavemente, misturar o poço com um ponteira, para assim deixá-la homogênea
- 14) Levar a biofilme no leitor de Elisa para ser avaliar a densidade óptica em um prazo máximo de 30 minutos.

TNF- α

- 15) Preparo dos reagentes:

A primeira coisa que será feita é o preparo da curva padrão.

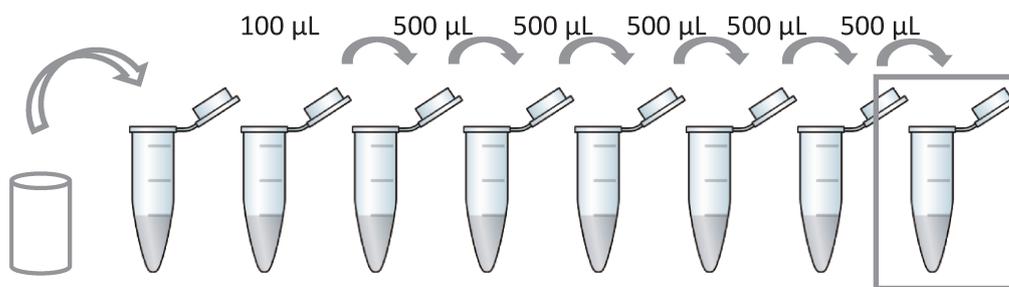
- f) Reconstituir o TNF- α Standard. Leia o rótulo do frasco para reconstituir o volume. Ele dirá quantos mL ou μL de água apirogênica ou água destilada deveremos colocar. O frasco deverá ser agitado suavemente e permanecer parado por um mínimo de 15 minutos antes de começar as diluições .
- g) Pegar ependorffs ou tubos de vidros estéreis e coloca-los em uma estante.
- h) Colocar 900 μL do “Calibrator Diluent RD6-35” no 1° ependorff /tubos de vidro nos e, 500 μL do mesmo calibrator nos outros 7 ependorffs /tubos de vidros estéreis previamente separados



900 µL

500 µL

- i) A partir de agora será feita a diluição seriada de acordo com o esquema abaixo. Os tubos devem ser vortexados antes de ser feita a transferência para o tubo seguinte.



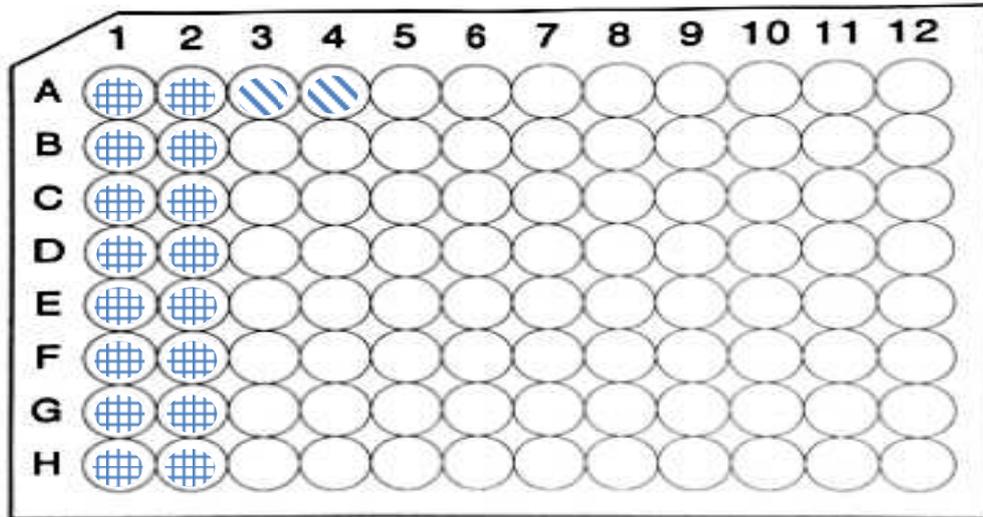
TNFα Standard	1000	500	250	125	62,5	31,2	15,6	0
	pg/mL							
10,000 pg/mL								

- j) Cuidado com o ultimo ependorff /tubos de vidro. Este ultimo deve conter apenas 500 µL do " Calibrator Diluent RD6-35". Ele vai servir como o zero padrão da curva (o pg/mL)

16) Retirar a biofilme do envelope e coloca-la dentro do fluxo. Vale ressaltar a importância de estar usando luvas e mascaras, para não contaminar a placa, alterando os resultados

17) Adicionar 50 µL do "Assay Diluent RD1F" em cada poço da placa. Esse componente contém um precipitado e por isso, deve ser bem misturado (vortex) antes e durante o seu uso.

18) Vamos agora preencher toda a biofilme de 96 poços com 200 µL para todos os componentes da curva padrão, do controle e das amostras, de acordo com o diagrama abaixo:



Essas duas primeiras colunas serão preenchidas com as diluições para montar a curva padrão. Será realizada da seguinte forma:

- A1 e A2 com 200 μ L do TNF α Standard
- B1 e B2 com 200 μ L da diluição 125 pg/mL
- C1 e C2 com 200 μ L da diluição 125 pg/mL
- D1 e D2 com 200 μ L da diluição 125 pg/mL
- E1 e E2 com 200 μ L da diluição 125 pg/mL
- F1 e F2 com 200 μ L da diluição 125 pg/mL
- G1 e G2 com 200 μ L da diluição 125 pg/mL
- H1 e H2 com 200 μ L da diluição 125 pg/mL



Agora cada poço da biofilme será preenchido, sempre em duplicatas e sempre 200 μ L de cada amostra.

19) Cubra a biofilme com a película protetora e a ela será incubada por 2 horas a uma temperatura ambiente. Nesse momento é bom fazer o layout da placa. Assim, pegamos o

desenho da biofilmevazio no final do folheto e completamos com o nome das amostras que foram distribuídas na biofilme como exemplificado abaixo:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000pg/m		A1									
B	500pg/mL		A2									
C	250pg/mL		A3									
D	125pg/mL											
E	62,5pg/mL											
F	31,2pg/mL											
G	15,6pg/mL											
H	0pg/mL											

- 20) Nesse momento preparar o solvente para lavar a placa. Pegar o frasco do “Wash Buffer” e verificar se não existe cristais formados no frasco. Se houver, misture delicadamente até que todos tenham se dissolvido. Em seguida, colocar em um bequer 500 mL de água destilada e 20 µL desse “Wash Buffer”.
- 21) Após as duas horas, fazer a lavagem da biofilme da seguinte forma: levar a biofilme na pia e tirar todo o líquido presente. Depois encher cada poço com 400 µL da solução preparada no item 6, novamente dispensar todo o conteúdo na biofilme e em seguida, bater a biofilme na mesa sobre um papel toalha para remover o excesso. Esse procedimento deve ser realizado 3 vezes. Ao final, se necessário, remover todas as bolas presentes com pipetas, aspirando o conteúdo.
- 22) Colocar 200 µL do “TNF-α Conjugate” em cada poço da placa. Cobrir a biofilme com outro adesivo e incubar por 2 horas à temperatura ambiente.
- 23) Realizar novamente a lavagem da placa, como descrito no item 7
- 24) Para preparar o próximo reagente, vamos misturar em uma biofilme petri os “Color Reagents A e B” para preparar o “Substrate Solution”. Eles devem ser misturados juntos e usados em no máximo 15 minutos. Nessa hora, é bom apagar as luzes do laboratório, porque essa mistura tem que ser protegida da luz. E como o tempo é curto, é bom usar a pipeta multicanal para distribuir essa mistura nos poços da placa.
- 25) Adicionar 200 µL do “Substrate Solution” em cada poço da biofilme e cobri-la com papel alumínio. Proteger da luz! Ela ficará incubada por 20 minutos à temperatura ambiente.

26) Já pode acender a luz

27) Adicionar 50 μL da "Stop Solution" em cada poço da placa. Nesse momento a cor dos poços deve mudar de azul para amarelo. Se a cor nos poços estiver verde ou com uma cor não uniforme devemos, suavemente, misturar o poço com um ponteira, para assim deixa-la homogênea

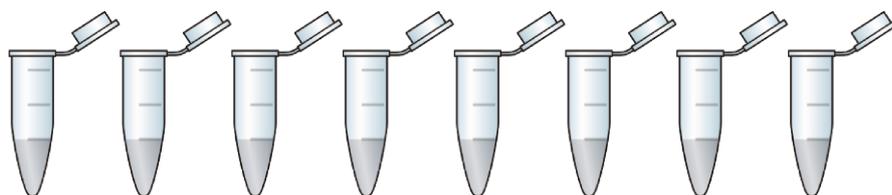
28) Levar a biofilme no leitor de Elisa para ser avaliar a densidade óptica em um prazo máximo de 30 minutos.

PGE₂

29) Preparo dos reagentes:

A primeira coisa que será feita é o preparo da curva padrão.

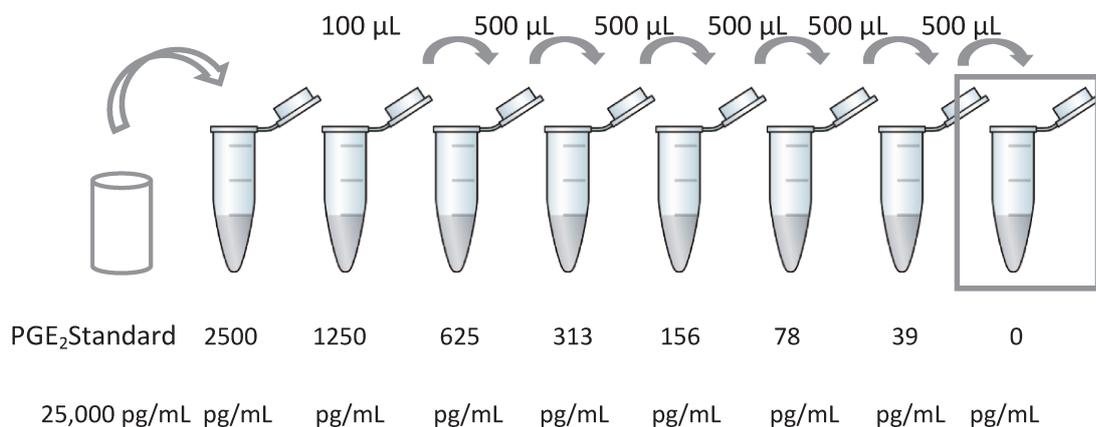
- k) Reconstituir o PGE₂ Standard colocando 1mL de água apirogênica ou água destilada. O frasco deverá ser agitado suavemente e permanecer parado por um mínimo de 15 minutos antes de começar as diluições
- l) Pegar ependorffs ou tubos de vidros estéreis e coloca-los em uma estante.
- m) Colocar 900 μL do "Calibrator Diluent RD5-56" no 1° ependorff /tubos de vidro nos e, 500 μL do mesmo calibrator nos outros 7 ependorffs /tubos de vidros estéreis previamente separados



900 μL

500 μL

- n) A partir de agora será feita a diluição seriada de acordo com o esquema abaixo. Os tubos devem ser vortexados antes de ser feita a transferência para o tubo seguinte.

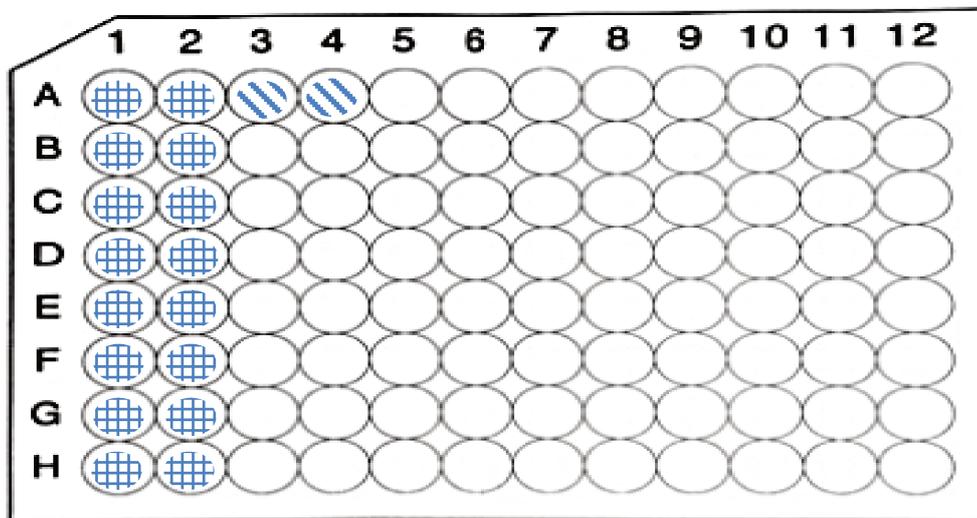


o) Cuidado com o ultimo ependorff /tubos de vidro. Este ultimo deve conter apenas 500 µL do " Calibrator Diluent RD6-35". Ele vai servir como o zero padrão da curva (o pg/mL)

30) Retirar a biofilmado envelope e coloca-la dentro do fluxo. Vale ressaltar a importância de estar usando luvas e mascaras, para não contaminar a placa, alterando os resultados

31) Adicionar 150 µL para todos os componentes da curva padrão, do controle e das amostras, de acordo com o diagrama abaixo:

32) Adicionar também 50 µL do "Primary Antibody Solution" em todos os poço da placa. Todos os poços ficarão na cor azul.



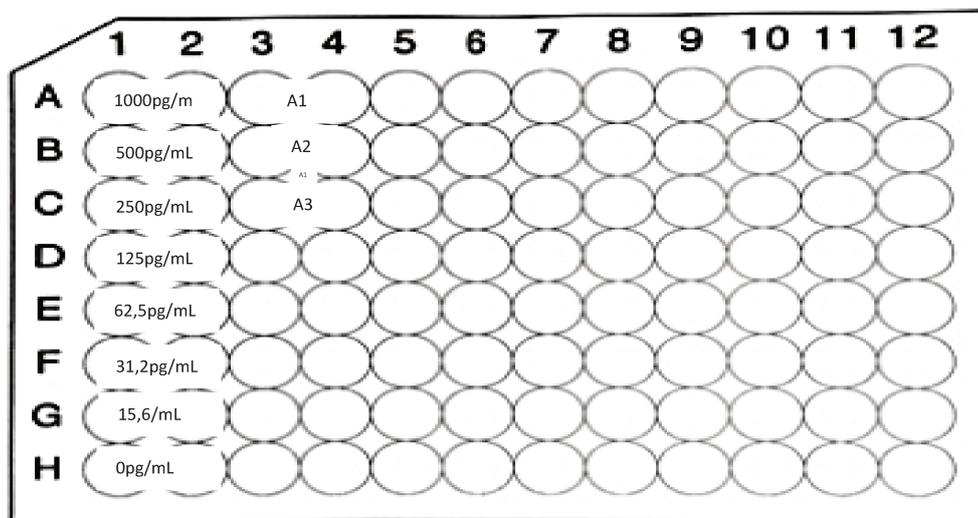
Essas duas primeiras colunas serão preenchidas com as diluições para montar a curva padrão. Será realizada da seguinte forma:

- A1 e A2 com 200 μ L do TNF α Standard
- B1 e B2 com 200 μ L da diluição 125 pg/mL
- C1 e C2 com 200 μ L da diluição 125 pg/mL
- D1 e D2 com 200 μ L da diluição 125 pg/mL
- E1 e E2 com 200 μ L da diluição 125 pg/mL
- F1 e F2 com 200 μ L da diluição 125 pg/mL
- G1 e G2 com 200 μ L da diluição 125 pg/mL
- H1 e H2 com 200 μ L da diluição 125 pg/mL



Agora cada poço da biofilme será preenchido, sempre em duplicatas e sempre 200 μ L de cada amostra.

33) Cubra a biofilme com a película protetora e a ela será incubada por 1 hora a uma temperatura ambiente. Nesse momento é bom fazer o layout da placa. Assim, pegamos o desenho da biofilme vazio no final do folheto e completamos com o nome das amostras que foram distribuídas na biofilme como exemplificado abaixo:



34) Após esse período **NÃO LAVAR A PLACA!**

35) Adicionar 50 μL do “PGE₂ Conjugate” em todos os poços. Nesse momento, todos os poços ficarão na cor violeta.

36) Cobrir a biofilme com a película protetora e incubar por 2 horas à temperatura ambiente e no vórtex. Colocar no vortex a estrutura própria para encaixar a biofilme de 96 poços e deixar vortexando em um nível baixo, para que não ocorra extravasamento dos líquidos.

37) Nesse momento preparar o solvente para lavar a placa. Pegar o frasco do “Wash Buffer” e verificar se não existe cristais formados no frasco. Se houver, misture delicadamente até que todos tenham se dissolvido. Em seguida, colocar em um bequer 500 mL de água destilada e 20 μL desse “Wash Buffer”.

38) Após as duas horas, fazer a lavagem da biofilme da seguinte forma: levar a biofilme na pia e tirar todo o líquido presente. Depois encher cada poço com 400 μL da solução preparada no item 6, novamente dispensar todo o conteúdo na biofilme e em seguida, bater a biofilme na mesa sobre um papel toalha para remover o excesso. Esse procedimento deve ser realizado 3 vezes. Ao final, se necessário, remover todas as bolas presentes com pipetas, aspirando o conteúdo.

39) Para preparar o próximo reagente, vamos misturar em uma biofilme petri os “Color Reagents A e B” para preparar o “Substrate Solution”. Eles devem ser misturados juntos e usados em no máximo 15 minutos. Nessa hora, é bom apagar as luzes do laboratório, porque essa mistura tem que ser protegida da luz. E como o tempo é curto, é bom usar a pipeta multicanal para distribuir essa mistura nos poços da placa.

- 40) Adicionar 200 μL do “Substrate Solution” em cada poço da biofilmee cobrir ela com papel alumínio. Proteger da luz! Ela ficará incubada por 30 minutos à temperatura ambiente.
- 41) Já pode acender a luz
- 42) Adicionar 100 μL da “Stop Solution” em cada poço da placa. Nesse momento a cor dos poços deve mudar de azul para amarelo. Se a cor nos poços estiver verde ou com uma cor não uniforme devemos, suavemente, misturar o poço com um ponteira, para assim deixa-la homogênea
- 43)**Levar ao leitor de Elisa para avaliar a densidade óptica em um prazo máximo de 30 minutos.