



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**FLÁVIA GOULART DA ROSA CARDOSO**

**QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINAS E SUA RELAÇÃO  
COM SINAIS / SINTOMAS E VOLUMETRIA DA LESÃO  
PERIAPICAL E DO CANAL RADICULAR EM DENTES COM  
INFECÇÃO ENDODÔNTICA PRIMÁRIA**

2014

**FLÁVIA GOULART DA ROSA CARDOSO**

**QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINAS E SUA RELAÇÃO COM SINAIS /  
SINTOMAS E VOLUMETRIA DA LESÃO PERIAPICAL E DO CANAL  
RADICULAR EM DENTES COM INFECÇÃO ENDODÔNTICA  
PRIMÁRIA**

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade Endodontia.

Orientador: Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera  
Co-orientador: Prof. Dr. Frederico Canato Martinho

São José dos Campos

2014

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:  
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para  
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos  
Campos: ICT/UNESP; 2014.

Cardoso, Flávia Goulart da Rosa

Quantificação de endotoxinas e sua relação com sinais /  
sintomas e volumetria da lesão periapical e do canal  
radicular em dentes com infecção endodôntica primária / Flávia  
Goulart da Rosa Cardoso. - São José dos Campos : [s.n.], 2014.  
130 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação  
em Odontologia Restauradora - Instituto de Ciência e  
Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual  
Paulista, 2014.

Orientadora: Márcia Carneiro Valera

Co-orientador: Frederico Canato Martinho.

1. Infecção endodôntica primária. 2. Endotoxinas. 3.  
Microorganismos cultiváveis. 4. Lesão periapical. 5.  
Tomografia computadorizada de feixe cônico. I. Valera, Márcia  
Carneiro, orient. II. Martinho, Frederico Canato, co-orient.  
III. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos  
Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. IV. Universidade  
Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. V. UNESP - Univ  
Estadual Paulista. VI. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,  
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

## AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 25 de junho de 2014  
E-mail: flaviacardoso.endodontia@gmail.com

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **BANCA EXAMINADORA**

### **Profa. Titular Marcia Carneiro Valera (Orientador)**

Instituto de Ciência e Tecnologia  
UNESP – Univ Estadual Paulista  
Campus de São José dos Campos

### **Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo**

Instituto de Ciência e Tecnologia  
UNESP – Univ Estadual Paulista  
Campus de São José dos Campos

### **Prof. Assist. Dr. Luiz Roberto Coutinho Manhães Júnior**

Instituto de Ciência e Tecnologia  
UNESP – Univ Estadual Paulista  
Campus de São José dos Campos

### **Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida**

Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
UNICAMP – Universidade de Campinas

### **Prof. Dr. Renato Miotto Palo**

Faculdade de Odontologia de Campinas  
UNIP - Universidade Paulista

São José dos Campos, 25 de junho de 2014.

## DEDICATÓRIA

*À minha querida mãe, Patrícia Goulart da Rosa Cardoso, pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incertezas, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos....*

*Ao meu querido pai Herval Lourenço Cardoso (in memoriam), minhas saudades são do tamanho do meu amor. Seu trabalho foi e está sendo cumprido. Espero estar fazendo por merecer...*

*Aos meus irmãos, Fernanda e Felipe Goulart da Rosa Cardoso, por mostrarem serem meus grandes amigos...  
Garantindo a mim todo apoio, carinho e amizade necessárias para realização de mais uma etapa da minha vida...*

*À vocês... Devo todas minhas conquistas... meus diplomas, meus títulos e tudo o que ainda irei conquistar na minha vida e carreira!!!*

## *AGRADECIMENTO ESPECIAL*

*À minha orientadora de especialização, mestrado e doutorado, Profa. Titular **Marcia Carneiro Valera**. Obrigada pela confiança e por ter acreditado em meu trabalho desde o início de nossa convivência.*

*Lembro-me de nosso primeiro contato e aula do curso de especialização. Um jeito sorridente, prazeroso e único de ministrar aula que me encantou e conquistou. Por meio de seus ensinamentos recebi o grande incentivo para iniciar minha carreira na área da docência.*

*Em nosso convívio pude experimentar seu senso de profundo amor ao trabalho, de respeito para com sua equipe, seus alunos e pacientes. Incansável na busca de novos conhecimentos e novas tecnologias, estudando com afinco para proporcionar a melhor formação a seus aprendizes. Para mim foi além de uma orientadora, mostrou-se uma pessoa extremamente humanitária.*

*Como uma boa instrutora que é, me mostrou as possibilidades e depositou em minhas mãos responsabilidades, e no*

*desenrolar dessa trajetória tenho certeza de ter construído  
uma amizade sincera e verdadeira.*

*Agradeço pelo apoio nos momentos de inquietação, de  
insegurança e de dificuldade que passei durante esses quase  
sete anos de convivência na pós-graduação.*

*Obrigada ainda por dividir seus ensinamentos, aperfeiçoando  
meus estudos com sua grande experiência e competência.*

*Meu carinho*

*Meu respeito*

**MUITO OBRIGADA!!!**

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, meu grande orientador, por me dar coragem e força de vontade para prosseguir mesmo diante dos obstáculos que apareceram no percurso desses anos de pós-graduação. Sem suas bênçãos nada seria possível.

À todos meus **familiares**, pela presença constante em todos os momentos. Meus primeiros e grandes incentivadores, obrigada pelo amor, carinho, emoção, paixão, bênçãos, mãos estendidas, sorrisos e lágrimas mostrando a importância da palavra família! Tenho orgulho de todos vocês!

À **Faculdade de Odontologia de São José dos Campos** – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, através de seu Diretor, Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora**, na pessoa da Coordenadora Profa. Titular Marcia Carneiro Valera.

Aos professores da disciplina de endodontia: **Prof. Adj. Ana Paula Martins Gomes, Prof. Adj. Cláudio Antônio Talge Carvalho e Prof. Assist. Dr. Bruno das Neves Cavalcanti**, pela contribuição na minha formação acadêmica, pelos ensinamentos transmitidos e atenção dispensada sempre que solicitada.

Ao **Prof. Assist. Dr. Frederico Canato Martinho**, pela ajuda despendida em todas as etapas da pesquisa, auxiliando como Co-orientador.



Ao **Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo**, pela oportunidade de compartilhar seus conhecimentos clínicos e científicos, pela atenção, estímulo, dedicação e exemplo.

Ao amigo e **Prof. Dr. Renato Miotto Palo**, pela simpatia e docilidade, demonstrada desde o início do curso de especialização, e que no longo dos anos se consolidou em uma amizade verdadeira.

Ao **Prof. Assist. Dr. Luiz Roberto Coutinho Manhães Jr.**, que sempre muito alegre e sorridente, me recebeu de braços abertos na disciplina de radiologia me ajudando no desenvolvimento da metodologia e nas tomografias dos pacientes.

Ao **Prof. Assist. Dr. Sérgio Lucio Pereira de Castro Lopes**. Sua simpatia e disponibilidade foram imprescindíveis no momento da finalização desta pesquisa.

Ao **Dr. Marco Antônio Rocco**, pelo auxílio e dedicação nas análises tomográficas da pesquisa.

Aos professores de Clínica Integrada, **Prof. Titular Clovis Pagani**, **Prof. Assist. Dr. Eduardo Galera da Silva**, **Prof. Assist. Dr. Antônio Braulino de Melo Filho** e **Profa. Adj. Maria Aparecida Neves Jardim**, pelos aprendizados transmitidos durante atividades clínicas.

Ao **Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida**, que prontamente aceitou fazer parte da minha banca examinadora, contribuindo com seu conhecimento na avaliação deste trabalho.

À amiga **Lilian Eiko Maekawa**, nossa amizade começou quando eu ainda era bolsista técnica. Sou imensamente grata pelos conhecimentos

transmitidos e pelo apoio constante em todas as etapas de pós-graduação. O convívio e apoio nesta caminhada da pós-graduação alicerçaram nossa amizade.

Ao **MSc. Gustavo Gicomelli Nascimento**, pelos ensinamentos e pelo suporte em toda análise estatística desta pesquisa.

À **Capes** pela concessão de bolsa de doutorado.

À secretária **Rosângela da Silva de Melo**, do Departamento de Odontologia Restauradora, pelas informações e atenção prestadas.

As técnicas de laboratório, **Josiana Maria Alves Carneiro e Fernanda Brito**, pelo suporte nos trabalhos realizados.

Aos secretários da Pós-Graduação **Erena Michie Hasegawa, Rosemary de Fátima Salgado, Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka e Ivan Oliveira Damasceno** pela ajuda sempre que solicitada e informações prestadas.

Aos meus colegas, **alunos do curso de Mestrado e Doutorado** em Odontologia Restauradora, especialidade Endodontia, pela amizade e companheirismo.

À **Nádia de Souza Ferreira**, companheira nesta pesquisa, pela disposição em sempre ajudar. Tenho certeza que fizemos uma excelente parceria.

À amiga **Aletéia Massula de Melo Fernandes**, pelo carinho, amizade verdadeira e ajuda em toda a minha vida profissional e pessoal. Amizade que com certeza levarei para a minha vida inteira.

Às amigas de pós-graduação **Adriana Chung, Gleyce Oliveira Silva e Tatiana Rocha**, pela amizade, conversas e apoio na minha vida pessoal e profissional.

Às queridas amigas **Carol Bertholini e Emily Khattar**, por me darem apoio, amizade e, principalmente por entender meus momentos de ausência. Tenho muito orgulho dessa amizade construída nos tempos de colégio.

Às amigas de graduação **Tássia Mendonça, Mirella Bernini e Renata Tavares**, que estiveram comigo desde o início da graduação, participando ativamente da minha história.

À todos os **alunos e ex-alunos de iniciação científica**. O processo de ensino e aprendizagem é uma via de mão dupla. Saibam que aprendi muito com vocês.

À **Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP**, através da diretora da Faculdade de Ciências da Saúde, **Profa. Dra. Emília Ângela Lo Schiavo Arisawa**. Tenho orgulho de ter me formado por esta instituição e hoje fazer parte dessa equipe.

À Coordenadora do curso de Odontologia da UNIVAP, **Profa. Dra. Renata Amadei Nicolau**, minha orientadora de iniciação científica nos tempos de graduação, e quem me incentivou a fazer pós-graduação.

As funcionárias da UNIVAP, **Jamelice Iama, Cidinha Muniz, Maria Paula Guimarães, Regina e Neyde Criscuolo**. Pelo excelente convívio e carinho que tenho por todas vocês.

À querida amiga **Profa. Dra. Marcia Sampaio Campos**, a quem além de

transmitir seus conhecimentos, me transmite aprendizados de vida e carreira.

Aos professores de clínica integrada – UNIVAP, **Prof. Dr. Jarbas Fernandes Francisco dos Santos, Prof. Dr. Antonio Carlos Victor Canettieri, Prof. Dra. Ana Christina Claro Neves e Profa. Dra. Priscila Christiane Suzi Liporoni**, tenho orgulho de ter aprendido com vocês e hoje fazer parte dessa equipe transmitindo esses ensinamentos.

À querida amiga **Prof. Dra. Íris Maria Frois**, com quem aprendi os primeiros passos na endodontia, e por quem tenho grande carinho, amizade e admiração. Obrigada por ter me recebido de braços abertos.

Ao amigo **Prof. MSc. Miguel Christian Castillo Marin**, por juntos estarmos construindo uma amizade e equipe de sucesso.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

***“Dormimos para sonhar e acordamos para realizar sonhos e só realizamos sonhos quando compreendemos que a vida se expande ou se encolhe de acordo com a nossa coragem”***

***(Palavras de minha avó Anita durante um momento de incerteza)***

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	15
<b>ABSTRACT</b> .....	17
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	24
<b>2.1 Microbiota das infecções primárias</b> .....	24
<b>2.2 Endotoxinas</b> .....	29
<b>2.3 Hidróxido de cálcio e associações</b> .....	35
<b>2.4 <i>Zingiber Officinale</i></b> .....	37
<b>2.5 Radiografias periapicais x Tomografias computadorizadas de feixe cônico na destruição óssea periapical</b> .....	42
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	47
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	48
<b>4.1 Monitoramento do tratamento endodôntico e efetividade das diferentes medicações intracanaís na desinfecção dos canais radiculares em dentes com infecção endodôntica primária.....</b>	48
4.1.1 Seleção de pacientes .....	48
4.1.2 Seleção dos casos .....	49
4.1.3 Intervenção Odontológica .....	49
4.1.4 Coletas do canal radicular .....	51
4.1.5 Preparo biomecânico .....	52
4.1.6 Medicação intracanal por 14 dias .....	52
4.1.7 Obturação dos canais radiculares .....	55
4.1.8 Atividade antimicrobiana .....	56
4.1.9 Quantificação de Endotoxinas .....	58
4.1.10 Análise Estatística .....	59

<b>4.2 Relação dos níveis de endotoxinas (EU/mL) e carga microbiana (UFC/mL) com sinais / sintomas clínicos e volumetria da lesão periapical (mm<sup>3</sup>) utilizando TCFC .....</b>	<b>60</b>
4.2.1 Seleção dos casos .....	60
4.2.2 Procedimentos de amostragem .....	61
4.2.3 Análise microbiológica (UFC/mL) .....	62
4.2.4 Quantificação de endotoxinas (EU/mL) .....	63
4.2.5 Volumetria da lesão periapical (mm <sup>3</sup> ) .....	64
4.2.6 Análise Estatística .....	68
<b>4.3 Relação dos níveis de endotoxinas (EU/mL) e carga microbiana (UFC/mL) com sinais / sintomas clínicos e volumetria (mm<sup>3</sup>) de canais radiculares com infecção endodôntica primária ...</b>	<b>68</b>
4.3.1 Procedimentos de cultura microbiana .....	70
4.3.2 Quantificação de endotoxinas .....	71
4.3.3 Volumetria dos canais radiculares (mm <sup>3</sup> ) .....	72
<b>4.4 Comparação das medidas das lesões periapicais utilizando TCFC em diferentes planos (longo eixo do dente e plano da maxila) com RP .....</b>	<b>75</b>
4.4.1 Segmentação 2D da TCFC do plano no longo eixo do dente ...	76
4.4.2 Segmentação 2D da TCFC do plano da maxila.....	78
4.4.3 Medidas radiográficas .....	79
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>81</b>
<b>5.1 Monitoramento do tratamento endodôntico e efetividade das diferentes medicações intracanaís na desinfecção dos canais radiculares em dentes com infecção endodôntica primária .....</b>	<b>81</b>
<b>5.2 Relação dos níveis de endotoxinas (EU/mL) e carga microbiana (UFC/mL) com sinais / sintomas clínicos e volumetria da lesão periapical (mm<sup>3</sup>) utilizando TCFC .....</b>	<b>86</b>
<b>5.3 Relação dos níveis de endotoxinas (EU/mL) e carga microbiana (UFC/mL) com sinais / sintomas clínicos e volumetria (mm<sup>3</sup>) de canais radiculares com infecção endodôntica primária ...</b>	<b>88</b>

<b>5.4 Comparação das medidas das lesões periapicais utilizando TCFC em diferentes planos (longo eixo do dente e plano da maxila) com RP .....</b>	<b>89</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>92</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>103</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>104</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>116</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>128</b>



Cardoso FGR. Quantificação de endotoxinas e sua relação com sinais / sintomas e volumetria da lesão periapical e do canal radicular em dentes com infecção endodôntica primária [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2014.

## RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram: a) quantificar endotoxinas e carga microbiana nas infecções endodônticas primárias, antes e após o preparo biomecânico (PBM) e uso de diferentes medicações intracanais (MIC); b) relacionar níveis de endotoxinas e microrganismos cultiváveis com a volumetria da lesão periapical (VLP), através do uso de tomografias computadorizadas de feixe cônico (TCFC), verificando possíveis relações com sinais e sintomas clínicos; c) relacionar os mesmos níveis com a volumetria dos canais radiculares (VCR); d) Comparar medidas das lesões utilizando radiografias periapicais (RP) e tomografias computadorizadas de feixe cônico (TCFC). Foram selecionados para o estudo trinta dentes com necrose pulpar e lesão periapical que foram submetidos a TCFC. Após abertura coronária, foi realizada coleta inicial para verificação da presença de infecção nos canais radiculares. Após, procedeu-se o tratamento endodôntico utilizando solução de NaOCl 2,5% e divididos em 3 grupos de acordo com a MIC: Ca(OH)<sub>2</sub> - hidróxido de cálcio P.A. + solução salina fisiológica; Ca(OH)<sub>2</sub> + GEN - hidróxido de cálcio P.A. + extrato glicólico de gengibre 20% e Ca(OH)<sub>2</sub> + CLX - hidróxido de cálcio P.A. + clorexidina gel 2%. Foram realizadas coletas do canal radicular após o PBM e após 14 dias de ação da MIC. Para todas as coletas foram realizados testes de atividade antimicrobiana por cultura microbiológica e análise da quantificação de endotoxinas pelo lisado de amebócitos de *Limulus*. Foi realizada a VLP e a VCR através da TCFC; e comparadas medidas de segmentação 2D das lesões periapicais das RP e das TCFC. Todos os dados foram analisados estatisticamente. Os resultados mostraram: a) presença de microrganismos na coleta inicial variando de 0 – 8,16 x 10<sup>6</sup> UFC/mL e níveis de endotoxinas de 1,75 – 149 EU/mL; havendo redução significativa de seus níveis após PBM e uso de MIC; b) Houve correlação positiva entre a VLP com os níveis de endotoxinas e presença de dor prévia, além de forte correlação entre presença de microrganismos anaeróbios e endotoxinas; c) houve correlação positiva entre VCR e presença de microrganismos cultiváveis; d) verificou-se uma correlação positiva da TCFC no sentido antero-

posterior ( $r = 0,965$ ) e no sentido supero-inferior ( $r = 0,943$ ); quando comparadas medidas radiográficas com medidas das TCFC utilizando longo eixo do dente, verificou-se uma forte correlação no sentido antero-posterior ( $r = 0,917$ ) e aceitável no sentido supero-inferior ( $r = 0,798$ ). Quando comparadas medidas de segmentação 2D utilizando o plano da maxila, houve correlação boa no sentido antero-posterior ( $r = 0,832$ ) e aceitável no sentido supero-inferior ( $r = 0,794$ ). Concluiu-se que a efetividade das diferentes MIC sobre microrganismos são semelhantes aos resultados encontrados após PBM, sendo o grupo  $\text{Ca(OH)}_2$  o que mais reduziu níveis de endotoxinas. Elevados níveis de endotoxinas foram correlacionados com maior volume de destruição óssea periapical, enquanto microrganismos cultiváveis foram correlacionados com maior volume dos canais radiculares. Houve correlação boa entre RP e TCFC quando utilizadas medidas em 2D. Quando analisada a imagem em 3D, observou-se que dentes que apresentam lesão periapical relativamente pequena na RP, podem apresentar uma maior área de destruição óssea em 3 dimensões.

Palavras-chave: Infecção endodôntica primária. Endotoxinas.  
Microrganismos cultiváveis. Lesão periapical. Tomografia  
computadorizada de feixe cônico.

Cardoso FGR. Quantification of endotoxins and its relation with signals/symptoms and volume of periapical lesion and volume of the lumen of the canal in teeth with primary endodontic infection [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

## **ABSTRACT**

The aims of the present study were: a) quantify endotoxins and bacterial CFU counts in primary endodontic infections before and after biomechanical preparation (BP) and after root canal medication (RCM); b) to correlate the levels of endotoxins and bacterial CFU counts with the volume of periapical bone destruction (VPBD) determined by Cone Beam Computed Tomography (CBCT) analysis as well as with the development of clinical signs and symptoms; c) to correlate the levels of endotoxins and bacterial CFU counts with the volume of the lumen of the canal (VLC); d) to correlate the size of periapical lesions determined by periapical radiographs images with the CBCT images. Thirty teeth with pulp necrosis and apical periodontitis were selected and submitted to CBCT analysis. After access to pulp cavity, a first root canal sampling was performed in order to determine the presence of root canal infection. Afterwards, BP was performed using 2.5% NaOCl followed by the placement of RCM according to the selection group: Calcium Hydroxide [Ca(OH)<sub>2</sub>] – Ca(OH)<sub>2</sub> + Saline Solution (SSL); Ca(OH)<sub>2</sub> + Ginger – Ca(OH)<sub>2</sub> + 20% glycolic Ginger extract ; Ca(OH)<sub>2</sub> + Chlorhexidine (CHX). A second collect were made after the BP and then the third after 14-days of RCM. Culture analysis was performed in order to determine antimicrobial activity. The levels of endotoxins were determined by the Limulus Ameboyte Lysate assay. The VPBD and the VLC were determined by CBCT-analysis and compared to periapical radiographs. Data were typed on a spreadsheet and statistical analyzed. At the baseline samples, CFU counts and endotoxins levels ranged from 0 - 8.16 CFU/mL and 1.75 -149 EU/mL, respectively. Both contents were reduced after BP and after RCM. Positive correlations were found between the levels of endotoxins and VPBD as well as with previous episode of pain. Thereby, a positive correlation was found between the bacterial CFU counts with the endotoxins contents. Additionally, positive correlation was found between the VLC and the bacterial CFU counts. When compared the sizes of CBCT using the maxilla plan and the long axis of tooth it was possible to verify a positive correlation in back-front ( $r = 0.965$ ) as in up-lower ( $r =$

0.943); when compared the radiographies sizes with the CBCT using the long axis of tooth, to verify a nice correlation in the back-front ( $r = 0.917$ ) and acceptable in up-lower ( $r = 0.798$ ). When compared the sizes using 2D segmental in the maxilla plan it could be verified a nice correlation in the back-front ( $r = 0.832$ ) and an acceptable in up-lower ( $r=0.794$ ). In conclusion, all RCM tested were effective against microorganisms, with  $\text{Ca(OH)}_2$  exhibiting the highest detoxifying activity. Higher level of endotoxins was correlated with VPBD and bacterial CFU counts was correlated with the VLC. Positive correlation was found between measurements of 2D-image determined in radiograph and 2-D image determined by the CBCT. When analyzing the 3D image, teeth with relatively small area of apical periodontitis showed a large area of bone destruction.

*Keywords: Primary endodontic infection. Endotoxins. Cultivable microorganisms. Cone-beam computed tomography.*

## 1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos representam importante papel no estabelecimento da lesão periapical (Takehashi et al., 1965). Estudos utilizando cultura microbiológica e métodos moleculares mostraram que as infecções endodônticas primárias são polimicrobianas, com presença de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, com predominância de bactérias anaeróbias, com o número de células bacterianas variando de  $10^2$  a  $10^8$  por canal radicular (Sundqvist, 1992; Gomes et al., 2004; Siqueira, Roças, 2005; Sakamoto et al., 2007). Alguns gêneros de bactérias anaeróbias estritas tais como *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Fusobacterium* estão envolvidas com sintomas clínicos e exercem um importante papel na patogênese das infecções inflamatórias periapicais (Jacinto et al., 2003; Gomes et al., 2004; Sakamoto et al., 2006).

Ainda, a alta prevalência de microrganismos anaeróbios Gram-negativos tem sido relacionada com canais radiculares com lesões apicais visíveis radiograficamente (Sundqvist, 1992; Assed et al., 1996). Sabe-se que durante a morte ou multiplicação celular, as bactérias Gram-negativas liberam endotoxinas (LPS - lipopolissacarídeos), conduzindo fenômenos que iniciam a resposta inflamatória, tais como: quimiotaxia de polimorfonucleares (PMNs), liberação de enzimas lisossomais de PMNs, ativação do sistema complemento, aumento da temperatura corporal, atração de osteoclastos (Farber, Seltzer, 1988), alteração da estrutura e função de vários órgãos e células, assim como das funções metabólicas e hemodinâmicas (Martich et al., 1993). Em canais radiculares infectados, endotoxinas podem contribuir na liberação de substâncias vasoativas e neurotransmissores das terminações nervosas dos tecidos periapicais, conduzindo a ocorrência de dor (Seltzer, Farber, 1994).

Além de mediar reação inflamatória, o LPS aderem

irreversivelmente nos tecidos mineralizados, como potente estimulador de reabsorção óssea atuando na síntese e liberação de citocinas que ativam os osteoclastos (Ito et al., 1996; Jiang et al., 2003), desempenhando um papel de suma importância na reabsorção óssea associada a lesões periapicais (Torabinejad et al., 1985).

A diminuição gradual da densidade mineral óssea causada pela infecção endodôntica primária aparece na radiografia como uma área radiolúcida em torno do ápice radicular (Bender, 1997; Bender, Seltzer, 2003). O tamanho da radiolucência periapical antes e após o tratamento endodôntico é rotineiramente comparado usando radiografias periapicais (RP) em duas dimensões (2D). No entanto, estudos *in vitro* e *in vivo* confirmaram que a RP é de uso limitado para detectar radiolucência periapical (Bender, 1997; Paula Silva et al., 2009), uma vez que a sensibilidade desse método é falho, devido à sobreposição dos tecidos adjacentes, a espessura do osso cortical sobrejacente, ou principalmente a falta de capacidade deste método para avaliar a profundidade (vestíbulo-lingual) de uma lesão periapical (Stavropoulos, Wenzel, 2007; Low et al., 2008; Bornstein et al., 2011; Tsai et al., 2012). Desta maneira, a tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) tem sido uma das maiores evoluções tecnológicas alcançadas pela radiologia odontológica nos últimos tempos. A captura de imagens via TCFC proporciona menor nível de exposição de radiação quando comparadas a outros tipos de tomografias e melhor qualidade de imagem, distinguindo estruturas dentárias e periféricas. Deve-se considerar que os benefícios da TCFC são indiscutíveis devido a alta resolução das imagens obtidas, evitando um falso diagnóstico que poderia resultar em erro no plano de tratamento (Cheng et al., 2011).

Durante a terapia endodôntica, para a desinfecção do sistema de canais radiculares (SCR) muitas substâncias químicas auxiliares e medicações intracanaís têm sido utilizadas. O hipoclorito de sódio em diferentes concentrações é a solução irrigadora mais utilizada

(Ercan et al., 2004; McGurkin-Smith et al., 2005), possuindo capacidade de dissolver o tecido necrótico, baixa tensão superficial e ação detergente (Haapasalo et al., 2005). Além disto, possui atividade antimicrobiana de amplo espectro eliminando bactérias vegetativas, esporos bacterianos, fungos, protozoários e vírus (Siqueira et al., 1998; Gomes et al., 2005).

Entretanto, mesmo que as substâncias químicas auxiliares tenham ação durante o preparo biomecânico (PBM), microrganismos e endotoxinas podem permanecer no SCR. Vários estudos demonstraram a importância do uso de uma medicação intracanal (MIC) com o objetivo de potencializar a sanificação do sistema de canais e túbulos dentinários e impedir que os microrganismos se multipliquem no intervalo entre sessões de tratamento (Bystrom, Sundqvist, 1981; Bystrom, Sundqvist, 1983). Tradicionalmente, o hidróxido de cálcio têm sido amplamente utilizado pela sua destacada ação antimicrobiana, solvente tecidual e indutor de mineralização. A atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio está associada a seu alto pH (Salgado et al., 2009). Além disso, possui efetiva ação sobre endotoxinas, pois promove hidrólise da porção lipídica da endotoxina, neutralizando parcialmente seus efeitos biológicos (Leonardo, 2005; Oliveira et al., 2005). Destacando as excelentes características do hidróxido de cálcio, resta saber se suas propriedades são potencializadas ou não quando utilizada em associação com outras substâncias.

A associação mais comumente utilizada do hidróxido de cálcio é a clorexidina (CLX), devido seus efeitos antimicrobianos sobre microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, ação residual e biocompatibilidade (Gomes et al., 2009; Maekawa et al., 2013). Maekawa et al. (2013) verificaram a efetividade desta substância sobre microrganismos, entretanto, não foi capaz de inativar completamente as endotoxinas.

A literatura mundial na área médica e ambiental mostra que existe um aumento crescente nas pesquisas utilizando produtos

naturais, que possivelmente apresentam menores possibilidades de agressão ao organismo e ao meio ambiente. Sendo assim, nos últimos anos a descoberta de novas drogas isoladas de plantas, bem como o interesse crescente em terapias alternativas, proporcionou um novo impulso à utilização de extratos naturais.

Dentre as diversas plantas existentes e utilizadas como terapia destaca-se a espécie vegetal *Zingiber officinale*, pertencente a família Zingiberaceae, e popularmente conhecida como gengibre. Devido a ação antiinflamatória, antimicrobiana e cicatrizante, o gengibre tem ganhado considerável reputação como suplemento fitoterápico no mundo inteiro. Porém, existem poucos relatos de sua aplicação na odontologia. Estudos recentes comprovam ação do extrato glicólico e alcoólico do gengibre sobre bactérias como *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella intermedia* (Park et al., 2008). No estudo de Grégio et al. (2006), o gengibre foi efetivo inclusive sobre *Candida albicans*, indicando sua ação antibacteriana e antifúngica.

Na endodontia, Cardoso et al. (2010) avaliaram *in vitro*, por cultura microbiana, a efetividade do extrato glicólico de gengibre como substância química auxiliar e medicação intracanal. Os resultados mostraram efetiva ação antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Escherichia coli* e redução de endotoxinas. Resultados semelhantes foram encontrados por Chung et al. (2010), Maekawa et al. (2010, 2013) e Valera et al. (2014). Além disso, Chung (2011) e Cardoso (2011) avaliaram *in vivo* por cultura microbiana e método molecular de reação em cadeia de polimerase (PCR) a efetividade do extrato glicólico de gengibre como substância química auxiliar em dentes com infecções endodônticas primárias e secundárias apresentando resultados semelhantes ao hipoclorito de sódio 1%.

Desta forma, é de extrema relevância estudar o efeito do extrato glicólico de gengibre na terapia endodôntica, bem como monitorar



os níveis de endotoxinas e carga microbiana encontrados antes do tratamento, após o preparo biomecânico e depois o uso das diferentes associações do hidróxido de cálcio como medicação intracanal, relacionando com sinais / sintomas clínicos e volumetrias do canal radicular e lesão periapical.

Diante da hipótese experimental, espera-se que o extrato glicólico de gengibre obtenha resultados semelhantes ao hidróxido de cálcio e a clorexidina como medicação intracanal, uma vez que, por ser uma substância natural possui menores efeitos indesejáveis, permitindo sua utilização na clínica diária. Além disso, acredita-se que quanto maior o nível de endotoxinas, maior a lesão observada na volumetria das lesões periapicais.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Microbiota das infecções primárias e sua relação com sinais e sintomas clínicos

Sabe-se que os microrganismos e seus produtos representam papel de suma importância no estabelecimento da lesão periapical (Takehashi et al., 1965). Desta forma, o entendimento da relação entre microrganismos e patologias de origem endodôntica torna-se fundamental para o sucesso do tratamento endodôntico.

Estudos pioneiros puderam identificar tipos morfológicos básicos de células bacterianas, tais como cocos, bacilos e espirilos. Em 1894, Miller sugeriu a correlação direta entre a ocorrência de patologias pulpares e a presença de bactérias, salientando a importância desses conhecimentos na compreensão e tratamento das patologias dos tecidos periapicais (Miller, 1894).

Takehashi et al. (1965), compararam as alterações resultantes de exposições pulpares não tratadas em ratos *germ-free* e em ratos portadores de microbiota convencional. Os ratos tiveram a polpa dos primeiros molares superiores expostas à alimentação esterilizada. Após 18 dias, verificaram que no grupo convencional, os dentes apresentaram tecido pulpar totalmente necrosado, com tecido inflamatório crônico e formação de abscesso na região periapical. No grupo *germ-free*, no entanto, não foram observados necrose pulpar, granuloma apical ou abscessos; apenas um mínimo infiltrado inflamatório, reparo da polpa dentária por deposição de dentina neoformada na área de exposição, concluindo que os microrganismos estão diretamente ligados à etiologia das alterações pulpares e periapicais.

Em um estudo clássico, Sundqvist (1976) avaliou microbiologicamente 32 canais de dentes unirradiculares utilizando técnicas para a identificação de microrganismos anaeróbios estritos. Os dentes avaliados apresentavam necrose pulpar devido à injúria traumática. Foram isoladas bactérias de 18 dos 19 dentes que apresentavam lesão periapical visível radiograficamente, havendo uma correlação positiva entre o tamanho da lesão periapical e o número de espécies bacterianas presentes nos canais radiculares. Além disso, bactérias anaeróbias estritas representaram cerca de 90% dos isolados, havendo uma correlação positiva entre sintomatologia e um maior número de bactérias encontradas no canal. Os resultados mostraram o papel fundamental dos microrganismos na etiologia e desenvolvimento das lesões periapicais.

Zavistoski et al. (1980) descreveram uma técnica quantitativa de cultura de espécies bacterianas endodônticas. As amostras foram coletadas com auxílio de cones de papel, mantidas em solução salina, e cultivadas quantitativamente, utilizando diluições seriadas semeadas em diferentes meios de cultura. Esse método foi utilizado em 10 dentes sem vitalidade pulpar. Presença de microrganismos aeróbios e anaeróbios, foi observada em 9 amostras, reiterando o conceito de que as bactérias desempenham papel significativo no desenvolvimento de patologias pulpares e periapicais.

Moller et al. (1981), com o objetivo de confirmar o papel exercido pelos microrganismos na etiopatogenia das lesões periapicais, induziram de forma asséptica e séptica, necrose em dentes de macacos após 6 e 7 meses. As análises clínica, radiográfica, microbiológica e histológica evidenciaram nos casos de polpas necrosadas e não infectadas, tecidos periapicais desprovidos de inflamação e indícios de reparação; enquanto nos dentes com polpa infectada, houve sempre o desenvolvimento de lesões periapicais.

Gomes et al. (2004) investigaram por métodos de cultura

microbiológica o perfil microbiano de 60 canais radiculares com infecções primárias (n = 41) e secundárias (n = 19) e a associação das espécies encontradas com os sinais e sintomas endodônticos. Setenta por cento dos isolados eram anaeróbios estritos sendo que os mais freqüentes foram *Peptostreptococcus micros* (35%), *Fusobacterium necrophorum* (23,3%), *Fusobacterium nucleatum* (11,7%), *Porphyromonas gingivalis* (6,7%) e *Porphyromonas endodontalis* (5%). Infecções endodônticas primárias foram caracterizadas por uma microbiota mista com predominância de anaeróbios estritos em contraste com as infecções endodônticas secundárias onde havia de 1 a 2 espécies por canal, em sua maioria anaeróbios facultativos.

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares de identificação microbiana, a lista de patógenos endodônticos expandiu detectando microrganismos que são muito difíceis de serem cultivados ou até mesmo bactérias que nunca tinham sido encontrados em infecções endodônticas (Siqueira, 2003; Gomes et al., 2006; Martinho et al., 2010). Como consequência, a microbiota endodôntica foi refinada e redefinida (Siqueira, Roças, 2005). Resultados satisfatórios obtidos por este método têm melhorado cada vez mais as terapias endodônticas, sendo possível correlacionar presença de determinados microrganismos, em especial microrganismos anaeróbios estritos Gram-negativos (Leonardo et al., 2004) com sinais e sintomas clínicos, além de correlacionar bactérias com presença de fístulas e reabsorções.

Gomes et al. (2005) realizaram um estudo a fim de verificar a presença de microrganismos anaeróbios estritos utilizando métodos de cultura microbiológica e molecular. Para cada coleta do canal radicular, foram feitos isolamento microbiano, testes bioquímicos e reação em cadeia de polimerase (PCR). Todos os microrganismos avaliados foram mais freqüentes em dentes com lesão primária do que em dentes com lesão secundária, sendo *P. gingivalis* o mais freqüente. O método molecular de PCR por ser mais sensível, foi capaz de detectar essas

espécies de coloração escura enquanto que, pelo método de cultura, a mesma bactéria não pôde ser detectada.

Foschi et al. (2005) avaliaram a presença de bactérias em canais radiculares de dentes com periodontite apical associando estas espécies bacterianas com sinais e sintomas clínicos. Adequada anamnese foi realizada a fim de coletar dados como dor a palpação e percussão. Foram realizadas coletas do conteúdo do canal radicular de 62 dentes com cones de papel e as amostras foram submetidas à análise por PCR. *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* foram detectadas, sendo que *T. denticola* estava associada com presença de reabsorção óssea e *E. faecalis* foi identificado em casos de insucesso do tratamento endodôntico. Isto sugere que essas espécies bacterianas têm papel importante nas patologias endodônticas.

Martinho et al. (2012) estudaram a correlação entre sinais e sintomas clínicos/radiográficos e níveis de interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) produzidas por macrófagos estimulados com conteúdo coletado de infecções endodônticas primárias. IL-6 e TNF- $\alpha$  apresentaram relação com tamanho de lesão periapical e presença de exsudato. Foi ainda encontrada correlação positiva entre PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  com presença de exsudato, ao passo que IL-6 e PGE<sub>2</sub> foram correlacionados com dor a palpação.

Seguindo os mesmos métodos, Martinho et al. (2014) investigaram a presença de diferentes espécies de bactérias Gram-negativas e níveis de endotoxinas encontrados em dentes com infecção endodôntica primária, determinando sua capacidade de estimulação sob macrófagos através dos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e de TNF- $\alpha$ , avaliando sua relação com achados clínicos e radiográficos. Os resultados evidenciam presença de DNA bacteriano em todas as amostras, sendo *Prevotella nigrescens* a espécie mais frequentemente encontrada. Altos

níveis de endotoxinas estavam relacionados com dor a palpação e presença de exsudato. Além disso, correlações positivas foram encontradas entre níveis de endotoxinas e TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Verificaram que microrganismos Gram-negativos e endotoxinas desempenham um importante papel no desenvolvimento de sinais / sintomas clínicos e maior destruição óssea periapical.

Desta forma, as infecções endodônticas primárias caracterizam-se por uma microbiota mista visivelmente dominada por bactérias anaeróbias e composta por 10 a 30 espécies por canal (Siqueira, Roças, 2005); sendo importante ressaltar que o perfil da microbiota endodôntica varia de indivíduo para indivíduo (Sakamoto et al., 2006), ou seja, cada indivíduo abriga uma microbiota endodôntica única em termos de riqueza de espécies e abundância. Isso indica que a periodontite apical primária tem uma etiologia heterogênea, onde espécies individuais não podem ser consideradas como o principal agente patogênico endodôntico e múltiplas combinações de bactérias desempenham um papel na causa da doença.

Coletivamente, os métodos de cultura e molecular têm permitido conhecer 391 espécies bacterianas, sendo que 261 espécies são únicas para as infecções primárias, isto é, não foram detectadas em amostras a partir de outros tipos de infecções (Siqueira, Roças, 2009). Diversos grupos de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas foram identificadas nas infecções primárias. Bactérias Gram-negativas produtoras de pigmento negro são nomeadas após formar colônias marrom ao preto em placas contendo ágar-sangue e foram classificados em dois gêneros: *Prevotella* e *Porphyromonas*. Espécies *Prevotella*, especialmente *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. tanneriae*, *P. baroniae* e *P. denticola*, estiveram entre as mais frequentemente detectadas em infecções primárias. Das espécies *Porphyromonas*, *P. endodontalis* e *P. gingivalis* foram consistentemente encontrado em infecções endodônticas, e são suspeitos de apresentar um papel na etiologia de abscessos agudos

(Haapasalo et al., 1986; Seol et al., 2006). Um patógeno periodontal importante, *Tannerella forsythia*, um anaeróbio Gram-negativo que nunca havia sido detectado em canais radiculares por cultura, foi pela primeira vez relatada em infecções endodônticas primárias em um estudo com PCR específica da espécie (Conrads et al., 1997). Estudos posteriores com diferentes abordagens de biologia molecular confirmaram que *T. forsythia* é uma espécie comum da microbiota endodôntica (Cardoso, 2011; Chung, 2011)

## 2.2 Endotoxinas

Ao longo dos anos, a alta prevalência de microrganismos anaeróbios Gram-negativos tem sido relacionada com canais radiculares com lesões apicais visíveis radiograficamente (Sundqvist, 1992; Assed et al., 1996). Sabe-se que durante a morte ou multiplicação celular, as bactérias Gram-negativas liberam endotoxinas, compostas por lipopolissacarídeos (LPS), causando importantes efeitos biológicos (Barthel et al., 1997), os quais levam à reação inflamatória (Rietschel, Brade, 1992) e reabsorção óssea periapical (Yamasaki et al., 1992).

A parede celular de bactérias Gram-negativas contém endotoxinas, que são moléculas estáveis ao calor compostas de polissacarídeos (açúcares polimerizados), lipídios (complexos contendo ácidos graxos) e proteínas. Em termos moleculares, o LPS é composto por três segmentos covalentemente ligados: o Lipídio A, o Core e o Antígeno O. O Lipídio A é a região da molécula de endotoxina responsável por seus efeitos tóxicos (Rietschel, Brade, 1992). Além da estrutura química, muito se tem pesquisado sobre o mecanismo de ação de endotoxinas. Quando liberadas, endotoxinas não causam lesões nas células ou nos tecidos diretamente, mas estimulam as células

competentes a liberar mediadores químicos. LPS agem sobre macrófagos (Rietschel, Brade, 1992), neutrófilos (Munford, Hall, 1986) e fibroblastos (Day et al., 1998) levando a liberação de mediadores químicos inflamatórios, como fator de necrose tumoral (TNF) (Blix, Helgeland, 1998), interleucinas (IL) IL-1, IL-5, IL-8 (Matsushita et al., 1999), interferon alfa e prostaglandinas. Além disso, LPS é citotóxico (Horiba et al., 1989) e um potente estimulador de produção de óxido nítrico (Blix, Helgeland, 1998).

Durante morte ou multiplicação celular, a endotoxina liberada conduz fenômenos que iniciam a resposta inflamatória, tais como: quimiotaxia de polimorfonucleares (PMNs), liberação de enzimas lisossomais de PMNs, ativação do sistema complemento, aumento da temperatura corporal, atração de osteoclastos (Farber, Seltzer, 1988), alteração da estrutura e função de vários órgãos e células, assim como das funções metabólicas e hemodinâmicas (Martich et al., 1993). Além de causar reação inflamatória, o LPS adere irreversivelmente nos tecidos mineralizados atuando como potente estimulador de reabsorção óssea, atuando na síntese e liberação de citocinas que ativam os osteoclastos (Ito et al., 1996; Jiang et al., 2003), desempenhando um papel de suma importância na reabsorção óssea associada com lesões periapicais (Torabinejad et al., 1985). Em canais radiculares infectados, endotoxinas podem contribuir na liberação de substâncias vasoativas e neurotransmissores das terminações nervosas dos tecidos periapicais, conduzindo a ocorrência de dor (Seltzer, Farber, 1994).

Pitts et al. (1982) avaliaram o papel da endotoxina sobre os tecidos apicais e periapicais de 16 dentes de cães. Doze dentes foram instrumentados no nível do delta apical e 4 dentes foram submetidos ao arrombamento apical. Metade dos canais radiculares de cada grupo foram preenchidos com 0,1 mL da solução de endotoxina de *Salmonella minnesota*, os demais foram preenchidos com solução salina. Semanalmente, as soluções foram renovadas no interior dos canais



radiculares. Os resultados mostram que as alterações radiográficas e periapicais ocorridas foram mais severas nas raízes contendo endotoxinas do que nas raízes contendo solução salina. A avaliação histológica também demonstrou maior destruição óssea periapical e maior resposta inflamatória nos espécimes contendo endotoxinas. Os autores concluíram que as endotoxinas podem desempenhar um papel de fundamental importância na inflamação periapical e na destruição óssea.

Mattison et al. (1987) também analisaram os efeitos da endotoxina sobre os tecidos periapicais de dentes de cães. Após a realização do exame radiográfico periapical padronizado, 28 dentes (56 raízes) foram submetidos à abertura coronária, pulpectomia, odontometria e preparo biomecânico com arrombamento apical. Quarenta e duas raízes foram preenchidas com 0,1 mL de endotoxina de *Eikenella corrodens*, 8 raízes com endotoxina de *Escherichia coli* e 6 raízes com água destilada. Este procedimento foi repetido, semanalmente, durante 4 semanas. Os resultados mostram que 90,4% das raízes tratadas com endotoxina de *E. corrodens* e 75% das raízes tratadas com endotoxina de *E. coli* exibiram lesões periapicais. As 6 raízes preenchidas com água, apresentaram leve espessamento do ligamento periodontal. A análise histopatológica evidenciou reação inflamatória, reabsorção óssea periapical e reabsorção radicular externa significantes, proliferação vascular, edema e infiltrado inflamatório intenso nos dentes preenchidos com endotoxina, sugerindo que a iniciação e perpetuação da inflamação e da reabsorção óssea periapical em dentes infectados pode ser mediada pela endotoxina de microrganismos Gram-negativos.

Altos níveis de endotoxinas têm sido associados com o desenvolvimento de dor espontânea (Horiba et al., 1991; Khabbaz et al., 2001; Jacinto et al., 2005) e sintomatologia clínica como dor à percussão (Martinho, Gomes, 2008) e dor à palpação (Jacinto et al., 2005).

Horiba et al. (1991) avaliaram a correlação entre o endotoxinas e sinais / sintomas clínicos como: dor espontânea, dor à

percussão, exsudato ou áreas radiolúcidas. Pontas de papel absorvente estéreis foram introduzidas por um minuto na região apical de 30 dentes unirradiculares com periodontite apical, para absorver o exsudato e microrganismos, e armazenados em soro fisiológico apirogênico. Endotoxina foi detectada nos 16 dentes sintomáticos e em 4 dos 14 dentes assintomáticos, em 19 dos 22 dentes com área radiolúcida e em 19 dos 20 dentes com presença de exsudato. O estudo indicou uma correlação positiva entre a presença de endotoxinas e os sintomas clínicos ou áreas radiolúcidas. Tal correlação sugere que um aumento no nível de endotoxina em canais radiculares infectados pode estar associado com um aumento da inflamação periapical.

Khabbaz et al. (2001) investigaram a presença de endotoxinas no tecido pulpar de 28 dentes unirradiculares cariados, sendo 15 sintomáticos e 13 assintomáticos. Também foram coletadas amostras de 5 dentes unirradiculares hígidos (grupo controle). Endotoxinas foram detectadas em todos os tecidos pulpares dos dentes sintomáticos e em 2/13 dentes assintomáticos. Nenhuma endotoxina foi encontrada no grupo controle. O estudo sugere que a concentração de endotoxinas tem papel importante na patogênese e sintomatologia pulpar, sendo que quanto maior a concentração de endotoxina, maior a severidade da dor.

Jacinto et al. (2005) quantificaram endotoxinas de 50 canais radiculares de dentes necrosados, e investigaram a relação entre a concentração de LPS com sinais e/ou sintomas de origem endodôntica. Além disso, através do método de cultura microbiana, foram registrados os números de unidades formadoras de colônias (UFCs) de cada amostra. Todas as amostras apresentaram crescimento de microrganismos e presença de endotoxinas. Nos casos associados à dor espontânea, a média de UFCs foi de  $1,43 \times 10^6$ , enquanto nos assintomáticos foi de  $9,1 \times 10^4$ . A concentração média de endotoxina nos casos com dor espontânea foi de 18540 EU/mL, enquanto que nos casos assintomáticos a média foi de 12030 EU/mL. Os resultados mostram uma

correlação positiva entre a concentração de endotoxina e os casos sintomáticos, concluindo que as endotoxinas estão presentes em altas concentrações nos canais radiculares de dentes sintomáticos.

Estudos *in vitro* e *in vivo* envolvendo a quantificação de endotoxinas em dentes com necrose pulpar e lesão periapical, assim como estudos após o preparo biomecânico, mostram a eficácia dos procedimentos endodônticos na redução e/ou eliminação do conteúdo endotóxico (Oliveira et al., 2007; Valera et al., 2014)

Oliveira et al. (2007) avaliaram o efeito de irrigantes endodônticos sobre endotoxinas em dentes humanos extraídos. Endotoxina de *Escherichia coli* foi inoculada em 98 canais radiculares, e divididos em sete grupos (n=14) de acordo com a solução irrigante preconizada: hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% (G1); NaOCl 5,25% (G2); clorexidina (CLX) 2% (G3); solução de hidróxido de cálcio 0,14% (G4); polimixina B (G5); controle positivo (solução salina, G6) e controle negativo (G7). Foram coletadas amostras dos canais radiculares imediatamente após a instrumentação e após 7 dias da coleta inicial. A quantificação de endotoxinas foi mensurada pelo teste do Lisado de Amebócito de *Limulus* e produção de anticorpos em cultura de linfócitos B. Em ambas as coletas, os grupos G4, G5 e G7 apresentaram resultados significativamente melhores que os grupos G1, G2, G3 e G6 (p<0,05). Os autores concluíram que as substâncias do grupo G4 e G5 inativaram endotoxinas dos canais radiculares e alteraram as propriedades do LPS de estimular a produção de anticorpos pelos linfócitos B. O NaOCl e a CLX não inativaram as endotoxinas.

Vianna et al. (2007) investigaram em 24 dentes necrosados a concentração de endotoxinas e bactérias cultiváveis antes e após o preparo biomecânico (PBM) com clorexidina gel (CLX) 2% e após 7 dias de medicação intracanal, com o objetivo de verificar os efeitos antimicrobianos e anti-endotóxicos dos procedimentos endodônticos. As medicações utilizadas foram: pasta de hidróxido de cálcio [Ca(OH)<sub>2</sub>], CLX

gel 2% e associação  $\text{Ca(OH)}_2$  + CLX gel 2%. Endotoxinas e bactérias foram detectadas em todas as amostras na coleta inicial, sendo que a média de redução de endotoxina e de microrganismos após o PBM foi de 44,4% e 99,96%, respectivamente. Não foi constatada nenhuma melhora após utilização da medicação intracanal por uma semana.

Martinho e Gomes (2008) avaliaram *in vivo* a presença de microrganismos e quantificação de endotoxinas em 24 canais radiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical. Foram realizadas coletas antes e após o PBM, utilizando como solução irrigadora NaOCl 2,5%. Além disso, correlacionaram endotoxina e bactéria cultivável com a presença de sintomatologia clínica. Todas as amostras iniciais apresentaram bactérias cultiváveis e endotoxinas, com mediana de  $2,64 \times 10^5$  UFC/mL e 139 EU/mL, respectivamente. Altos níveis de LPS foram encontrados em dentes com sintomatologia clínica ( $p < 0,05$ ). A redução bacteriana e de endotoxina após o PBM obteve uma média de 99,78% e 59,99%, respectivamente. Os autores concluíram que a instrumentação utilizando NaOCl 2,5% foi mais efetiva contra bactérias que endotoxinas na infecção do canal radicular, e observaram uma associação significativa entre altos níveis de endotoxinas e sintomatologia clínica.

Gomes et al. (2009) estudaram o efeito do PBM com NaOCl 2,5% e CLX gel 2% na redução e/ou eliminação de LPS. Foram analisados 54 canais radiculares de dentes com necrose pulpar, divididos em 2 grupos de acordo com a solução química auxiliar. Foi detectada endotoxina em todas as amostras. A porcentagem da redução de endotoxina após o PBM foi de 57,98% (NaOCl 2,5%) e 47,13% (CLX gel 2%). Os autores concluíram que ambos os grupos não apresentaram efetividade na eliminação de endotoxina em infecções endodônticas primárias.

Valera et al. (2014) avaliaram o efeito do extrato glicólico de gengibre como medicação intracanal associado ou não ao  $\text{Ca(OH)}_2$  sobre microrganismos e endotoxinas em 48 dentes humanos extraídos.

Foram feitas coletas dos canais radiculares após 28 dias de contaminação (coleta inicial), após PBM utilizando NaOCl 2,5% como solução irrigadora (1ª coleta) e após 7 dias do PBM (2ª coleta). Os espécimes foram divididos em 4 grupos de acordo com a medicação intracanal:  $\text{Ca(OH)}_2$ , extrato glicólico de gengibre 20% (GEN), associação de  $\text{Ca(OH)}_2$  + GEN (3ª coleta), solução salina (grupo controle). Ainda foram feitas coletas dos canais radiculares após 14 dias da ação das medicações intracanal (MIC) (3ª coleta) e após 7 dias da remoção das MIC (4ª coleta). Todas as medicações contribuíram para eliminação de microrganismos e redução significativa de endotoxinas, sendo que os melhores resultados foram encontrados na medicação de  $\text{Ca(OH)}_2$ , seguido do extrato glicólico de gengibre (GEN).

### **2.3 Hidróxido de cálcio e associações**

O hidróxido de cálcio [ $\text{Ca(OH)}_2$ ] é empregado rotineiramente como medicação intracanal devido a sua atividade antimicrobiana (Gomes et al., 2002), indução de mineralização e capacidade de dissolução tecidual (Nerwich et al., 1993). Sua propriedade antibacteriana deve-se ao fato do estabelecimento de um pH altamente alcalino dentro do canal radicular, possibilitando a destruição da membrana citoplasmática, desnaturação enzimática e protéica, e a ruptura do DNA bacteriano (Siqueira, Lopes, 1999).

A associação do  $\text{Ca(OH)}_2$  com um veículo, permite a dissociação iônica do composto em íons cálcio e hidroxila, uma vez que suas propriedades são dependentes dessa ionização. Alguns veículos podem ser destacados como biologicamente ativo (clorexidina), e inerte (soro fisiológico) (Lopes, Siqueira Jr, 2004). Safavi e Nichols (1994), demonstraram que o  $\text{Ca(OH)}_2$  tem a capacidade de hidrolisar a porção

lipídica do LPS bacteriano, promovendo sua degradação, além de alterar as propriedades biológicas. Entretanto, o  $\text{Ca(OH)}_2$  tem se mostrado ineficaz contra *E. faecalis* (Gomes et al., 2009), pois esse microrganismo tem a capacidade de sobreviver em canais radiculares sozinho e sem auxílio de outra bactéria (Siren et al., 1997), assim como em um ambiente com baixa disponibilidade de nutrientes.

Gomes et al. (2006) investigaram *in vitro* a atividade antimicrobiana da CLX 2% gel,  $\text{Ca(OH)}_2$  e associação de ambos. Foram utilizados o método da difusão em ágar e contato direto. A CLX apresentou os maiores halos de inibição, sendo necessário um minuto ou menos para eliminar os microrganismos testados. A pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  teve ação apenas em contato direto e necessitou de 30 minutos a 6 horas para inibir o crescimento microbiano. Já a associação dos dois medicamentos foi necessária de 30 a 60 minutos para inibir o crescimento dos microrganismos. Os autores concluíram que a combinação dos dois medicamentos diminuiu a atividade antimicrobiana da CLX, entretanto, aumentou a atividade antimicrobiana do  $\text{Ca(OH)}_2$ .

Wang et al. (2007) investigaram a redução bacteriana *in vivo* da CLX 2% gel durante o preparo do canal radicular e a associação do  $\text{Ca(OH)}_2$  + CLX 2% gel como MIC. Foram selecionados 43 pacientes com periodontite apical, e 4 pacientes com pulpite irreversível como controle negativo. As amostras foram coletadas antes (C1), após instrumentação rotatória (C2) e depois de duas semanas de medicação intracanal (C3). Os resultados mostraram que em quatro amostras não houve crescimento microbiano em C1, os quais foram excluídos. Em todas as outras verificaram presença bacteriana em C1; nos momentos C2 e C3 corresponderam 10,3% (4/39) e 8,3% (4/36), respectivamente. Ao comparar C1 e C2 foi observado uma redução bacteriana significativa ( $p < 0.01$ ) diferente de C2 e C3 ( $p = 0.692$ ). Diante do exposto, concluíram que a CLX 2% gel é um efetivo agente irrigante e que a medicação

intracanal não melhorou a redução bacteriana das amostras analisadas.

Valera et al. (2009) analisaram *in vitro* a ação da irrigação com hipoclorito de sódio 1% associada a medicações intracanaís de hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% durante 14 dias sobre *E. faecalis* e *C. albicans*. Todas as medicações intracanaís testadas foram eficientes em reduzir microrganismos após o PBM, sendo que a associação do  $\text{Ca(OH)}_2$  + CLX apresentou melhores resultados. Assim, é possível que esta associação possa combinar a atividade antimicrobiana da CLX à potente ação mineralizadora e neutralizadora de endotoxinas do  $\text{Ca(OH)}_2$ .

Valera et al. (2014) avaliaram o efeito do extrato glicólico de gengibre como medicação intracanal associado ou não ao  $\text{Ca(OH)}_2$  sobre microrganismos e endotoxinas em 48 dentes humanos extraídos. Os espécimes foram divididos em 4 grupos de acordo com a medicação intracanal:  $\text{Ca(OH)}_2$ , extrato glicólico de gengibre 20% (GEN), associação de  $\text{Ca(OH)}_2$  + GEN (3ª coleta), solução salina (grupo controle). Os resultados mostram que todas as medicações contribuíram para eliminação de microrganismos e redução significativa de endotoxinas, sendo que os melhores resultados foram encontrados na medicação de  $\text{Ca(OH)}_2$ .

## **2.4 Zingiber Officinale**

O *Zingiber officinale*, conhecido como gengibre, pertence à família Zingiberaceae, gênero Zingiber, tem sido alvo de estudos científicos na sua forma de extrato bruto, extrato etanólico e cetônico. O gengibre é rico em óleos voláteis, gingerol e shogaol. O componente da raiz gengibre possui atividade antibacteriana sobre as bactérias *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Burkholderia pseudomallei* e *Staphylococcus aureus* (Pereira,

2002; Ruff et al., 2006).

Analisando os componentes ativos do gengibre, Lantz et al. (2007), verificaram que o gingerol e o shogaol foram capazes de inibir significativamente a produção de prostaglandinas E<sub>2</sub> induzidas pelo LPS de *Escherichia coli*. Os extratos contendo principalmente gingerol tiveram a capacidade de inibir a produção de COX-2, enquanto que os extratos contendo shogaol não tiveram efeito sobre a COX-2.

Além destas propriedades, o gengibre tem mostrado também atividade antimicrobiana e cicatrizante (Grégio et al., 2006).

Pereira et al. (2003) avaliaram o efeito do gengibre no processo de cicatrização de úlceras na mucosa bucal de ratos e verificaram que o gengibre, na sua forma de extrato aquoso, não possui efeitos farmacológicos significativos, porém o seu extrato óleo resinoso é farmacologicamente ativo, promovendo a cicatrização das áreas ulceradas.

Pessa et al. (2008) verificaram que o gel de gengibre 0,5% apresentou reepitelização mais rápida quando comparada à solução salina e ao peróxido de carbamida 16% no período de 7 a 14 dias. Aos 7 dias, o grupo do gengibre apresentou deposição de colágeno enquanto que os grupos da solução salina e do peróxido de carbamida apresentaram infiltrado inflamatório intenso com presença de macrófagos e neutrófilos. Ainda, aos 21 dias, foi observada a presença de vasos, sugerindo uma rica vascularização promovida pelo gengibre, concluindo que preparações farmacêuticas contendo este fitoterápico possuem ação cicatrizante e protetora da mucosa oral.

Grégio et al. (2006) avaliaram o extrato glicólico e alcoólico do gengibre sobre *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* e verificaram que tanto o extrato glicólico quanto o alcoólico apresentaram atividade antimicrobiana e antifúngica relevante para odontologia, podendo contribuir para o tratamento de doenças causadas por esses microrganismos presentes na



cavidade oral.

Park et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana do gengibre sobre três bactérias anaeróbias Gram-negativas: *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *P. intermédia*, causadoras de periodontites. Concluíram que apenas dois componentes do gengibre ([10]-gingerol e [12]-gingerol) são capazes de eliminar e inibir efetivamente o crescimento dos microrganismos testados. O gengibre também apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli* em um estudo realizado por Indu et al. (2006).

O óleo de gengibre possui atividade fungistática e fungicida sobre o biofilme de *C. albicans* e outras espécies de fungos, podendo ser usado futuramente em estratégias terapêuticas (Ficker et al., 2003; Agarwal et al., 2008).

Aguiar et al. (2009) avaliaram *in vitro* a atividade do extrato glicólico de gengibre e do hipoclorito de sódio 2,5% sobre *C. albicans* verificando sua atividade antifúngica em diferentes concentrações. Os resultados mostram que o extrato glicólico de gengibre apresentou ação fungicida a partir da concentração 12,5% (DFM – diluição fungicida mínima) enquanto o hipoclorito de sódio 2,5% apresentou atividade fungicida desde a concentração 6%.

Cardoso et al. (2010) avaliaram *in vitro* a ação do extrato glicólico de gengibre como solução irrigadora e MIC sobre *E. faecalis*, *C. albicans*, *E. coli* e endotoxinas concluindo que o gengibre apresentou atividade antimicrobiana, foi capaz de diminuir significativamente endotoxinas, mas não foi capaz de neutralizá-las completamente. Resultados semelhantes foram observados por Maekawa et al. (2010).

Chung (2011) e Cardoso (2011) avaliaram *in vivo* a efetividade do extrato glicólico de gengibre como solução irrigadora em dentes com infecções endodônticas primárias e secundárias apresentando resultados semelhantes ao hipoclorito de sódio 1%.

Chung (2011) teve como objetivo detectar microrganismos e avaliar *in vivo* a ação do extrato glicólico de gengibre 20%, do hipoclorito de sódio 1% e da clorexidina gel 2% como substâncias químicas auxiliares e da medicação intracanal de hidróxido de cálcio sobre microrganismos e endotoxinas em dentes com necrose pulpar e lesão periapical. Para isso, 36 pacientes portadores de dente com necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente foram submetidos ao tratamento endodôntico e divididos de acordo com a substância química auxiliar utilizada durante a instrumentação. Foram realizadas coletas do conteúdo do canal radicular após a abertura do dente, após a instrumentação e, após 14 dias da ação da medicação intracanal. Para todas as coletas foram realizados os seguintes testes: avaliação da atividade antimicrobiana pela contagem de UFC/mL e método molecular – PCR e análise da quantidade de endotoxina verificada pelo lisado de amebócitos de *Limulus*. A instrumentação com as substâncias testadas reduziram significativamente microrganismos e endotoxinas dos canais radiculares. A utilização da medicação intracanal não foi capaz de potencializar os efeitos antimicrobianos nem sobre endotoxinas. Pôde-se concluir que a instrumentação utilizando extrato glicólico de gengibre foi eficiente tanto em reduzir microrganismos quanto endotoxinas dos canais radiculares. A medicação intracanal de  $\text{Ca(OH)}_2$  não foi capaz de potencializar a neutralização de endotoxinas após instrumentação.

Cardoso (2011), detectou espécies bacterianas e quantificou endotoxinas em canais radiculares com insucesso endodôntico e presença de lesão periapical, correlacionando-os com os sinais e sintomas clínicos e, avaliar a ação do hipoclorito de sódio 1% e extrato glicólico de gengibre 20% sobre estes microrganismos e endotoxinas. Foram selecionados para o estudo dez dentes tratados endodonticamente com lesões periapicais persistentes que foram divididos de acordo com a substância química auxiliar utilizada durante a

instrumentação: hipoclorito de sódio 1% e extrato glicólico de gengibre 20% intercalado com solução salina fisiológica. Foram realizadas coletas do conteúdo do canal radicular imediatamente após a desobturação do dente, imediatamente após a instrumentação e, imediatamente após 14 dias da ação da medicação intracanal de hidróxido de cálcio. Para todas as coletas foram realizadas avaliação da atividade antimicrobiana por cultura microbiológica e através do método molecular – PCR; quantificação de endotoxinas verificada pelo lisado de amebócitos de *Limulus*. Os resultados mostraram que tanto a instrumentação quanto à medicação intracanal foram capazes de reduzir a quantidade de microrganismos e de endotoxinas, independente da solução utilizada. No entanto, endotoxinas não foram completamente neutralizadas. Espécies de *E. faecalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. nigrescens*, *P. intermedia*, *P. micra* foram detectadas nos canais radiculares. Observou-se correlação positiva entre a quantidade de endotoxinas e o diâmetro das lesões. Concluiu-se que as substâncias testadas foram eficazes na redução de microrganismos e de endotoxinas.

Em 2013, Valera et al. avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana de substâncias químicas auxiliares e extratos naturais sobre *C. albicans* e *E. faecalis* inoculados em canais radiculares. Setenta e duas raízes de dentes humanos foram contaminados com *C. albicans* e *E. faecalis* por 21 dias. Os grupos foram divididos de acordo com a substância química auxiliar utilizada: hipoclorito de sódio 2,5%, clorexidina gel 2%, óleo de mamona, extrato glicólico de Aloe Vera e extrato glicólico de gengibre 20%. As amostras dos canais radiculares foram coletadas em diferentes intervalos: 21 dias após a contaminação, após a instrumentação e 7 dias após a instrumentação. Amostras microbiológicas foram cultivadas em meio de cultura e incubação a 37 °C durante 48 horas. Concluiu-se que o hipoclorito de sódio 2,5% e clorexidina gel 2% foram mais eficazes na eliminação de *C. albicans* e *E. faecalis*, seguido

do óleo de mamona e extrato glicólico de gengibre. O extrato de Aloe Vera não mostrou atividade antimicrobiana.

Ainda em 2013, Maekawa et al. avaliaram a eficácia de medicações intracanaís contra *C. albicans*, *E. faecalis*, *E. coli* e suas endotoxinas em canais radiculares. Após 28 dias de contaminação, os canais foram instrumentados e divididos de acordo com a medicação intracanal utilizada: Hidróxido de cálcio + solução salina, clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio + clorexidina gel 2%, extrato glicólico de própolis 12%, hidróxido de cálcio + extrato glicólico de própolis 12%, extrato glicólico de gengibre 20%, hidróxido de cálcio + extrato glicólico de gengibre 20%. As amostras dos canais radiculares foram coletadas em diferentes intervalos: 28 dias após a contaminação, após a instrumentação, 14 dias após a utilização das medicações intracanaís e 7 dias após a remoção das medicações intracanaís. Amostras microbiológicas foram cultivadas em meio de cultura e incubação a 37° C durante 48 horas. Quantificação de endotoxinas foi realizado pelo teste cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus*. Concluiu-se que todas as medicações intracanaís testadas foram capazes de eliminar microrganismos dos canais radiculares e reduzir os níveis de endotoxinas. O hidróxido de cálcio foi a medicação mais eficaz na neutralização de endotoxinas, no entanto, menos eficaz na eliminação de *C. albicans* e *E. faecalis*, exigindo a utilização de combinações de medicamentos para obtenção de maior sucesso na terapia endodôntica.

## **2.5 Radiografias periapicais x Tomografias computadorizadas de feixe cônico na destruição óssea periapical**

A diminuição gradual da densidade mineral óssea causada pela periodontite apical aparece na radiografia como uma área radiolúcida em torno do ápice radicular (Bender, 1997; Bender, Seltzer, 2003). A

detecção desta radiolucência periapical e as mudanças ao longo do tempo em seu tamanho (volume) desempenham um papel significativo na decisão de um plano de tratamento. O tamanho da radiolucência periapical antes e após o tratamento endodôntico é rotineiramente comparado usando radiografias periapicais (RP) em duas dimensões (2D). No entanto, estudos *in vitro* e *in vivo* confirmaram que a RP é de uso limitado para detectar radiolucência periapical (Bender, 1997; Paula Silva et al., 2009) uma vez que a sensibilidade desse método é falho, devido à sobreposição dos tecidos adjacentes, a espessura do osso cortical sobrejacente, ou principalmente a falta de capacidade deste método para avaliar a profundidade (vestíbulo-lingual) de uma lesão periapical (Stavropoulos, Wenzel, 2007; Low et al., 2008; Bornstein et al., 2011; Tsai et al., 2012).

Dessa forma, a reconstrução de um espaço anatômico em 3 dimensões (3D) com uma dose relativamente baixa de radiação tornou-se possível através da tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) (Hirsch et al., 2008; Pauwels et al., 2012). A TCFC é uma tecnologia que vem se aproximando do cirurgião-dentista, objetivando suprir as limitações radiográficas durante os passos operatórios (Durack, Patel, 2012). A aplicação do exame tomográfico permite desvendar toda a composição do elemento dentário, necessário para o planejamento do tratamento endodôntico (Bornstein et al., 2011; Cheng et al., 2011). Em imagens de TCFC é possível distinguir qual a raiz ou raízes estão envolvidos na lesão periapical, assim como a sua localização exata e seu volume (Stavropoulos, Wenzel 2007; Paula-Silva et al., 2009; Bornstein et al., 2012).

Paula-Silva et al. (2009) compararam os resultados de tratamentos endodônticos por RP e TCFC. Noventa e seis raízes de dentes de cães foram utilizadas e divididas em quatro grupos (n = 24). No grupo 1, os tratamentos endodônticos foram realizados em dentes portadores de polpa viva. Nos grupos 2 a 4 os canais radiculares foram

infectados até formação de periodontite apical confirmada por radiografia. Raízes com periodontite apical foram tratados por sessão única (grupo 2), duas sessões (grupo 3), e não tratada (grupo 4). A área radiolúcida nas RP e volume de lesões através do uso de TCFC foram medidas antes e após 6 meses do tratamento endodôntico. Nos grupos 1, 2 e 3, um resultado favorável (lesões ausente ou reduzida) foi mostrado em 57 raízes (79%) através do uso de RP, e apenas em 25 raízes (35%) utilizando exames tomográficos. Os resultados mostram superioridade da TCFC para detecção de lesão periapical quando comparado com RP.

Ordinola-Zapata et al. (2011) avaliaram a influência das RP, medidas de segmentação (cortes sagital e coronal) e volumetria das TCFC para determinação da destruição óssea periapical. *Enterococcus faecalis* foram inoculados em 30 canais radiculares de dois cães a fim de induzir periodontite apical. Após 60 dias, os canais radiculares de 15 raízes distais foram submetidos ao tratamento endodôntico. Os canais radiculares das raízes mesiais foram utilizadas como controle (sem tratamento). A destruição óssea foi avaliada após 6 meses utilizando RP e TCFC (cortes sagital e coronal). Após o período experimental, a área das lesões nas RP e secções das TCFC foram medidas em mm<sup>3</sup> usando o software ImageTool e medida das volumetrias foram realizadas utilizando o software OsiriX. Os resultados mostraram a presença de periodontite apical crônica em todos os dentes inoculados com *E. faecalis*. RP, secções coronais da TCFC e dados volumétricos evidenciaram menor destruição óssea em dentes tratados, em comparação ao grupo controle. Os resultados evidenciaram que embora no corte sagital das TCFC apresentaram valores semelhantes de destruição óssea em dentes tratados e não tratados, os dados tomográficos volumétricos mostraram que as lesões periapicais de canais radiculares com tratamento endodôntico tinha metade do volume de lesões periapicais.

Metska et al. (2013) avaliaram por TCFC as mudanças volumétricas de radiolucência periapical em dentes tratados

endodonticamente 1 ano após o retratamento endodôntico. Quarenta e cinco dentes tratados e com presença de periodontite apical persistente exigindo retratamento endodôntico foram incluídos no estudo. Foram realizados dois exames tomográficos para cada paciente, o primeiro antes de retratamento e o segundo um ano depois. Dois observadores independentes mediram o volume de radiolucência em imagens de TCFC, utilizando o Software AMIRA. O coeficiente de correlação intraclassa foi utilizado para avaliar a concordância entre observadores e o teste de *Wilcoxon* foi utilizado para avaliar o tamanho do volume pré-tratamento e pós-tratamento. Os coeficientes de correlação intraclassa foram 0,994 e 0,998 para os exames antes de retratamento e após 1 ano, respectivamente. A mudança volumétrica em radiolucência periapical 1 ano após o retratamento foi estatisticamente significativa. O volume de radiolucência periapicais foram reduzidas em 20 dentes (57%), manteve-se inalterada em 8 (23%), e um aumento em 7 (20%). Os autores concluíram que após 1 ano do retratamento endodôntico, o volume de radiolucência periapicais foram significativamente reduzidos em 57% dos dentes.

Van der Borden et al. (2013) avaliaram as mudanças no tamanho das lesões após tratamentos endodônticos, e as lesões foram medidas tanto em RP como em TCFC. Os autores relataram concordância de 54,9% entre os resultados dos dois métodos de avaliação. Concluíram que as mudanças no tamanho da lesão determinadas por TCFC e RP são diferentes e, portanto, o resultado radiográfico determinado com RP poderia ser falso positivo.

Em um estudo recente, Abella et al. (2014) avaliaram a presença ou ausência de radiolucência periapical em dentes unirradiculares com necrose pulpar através de RP digitais e TCFC. Os resultados mostraram que as TCFC revelaram maior radiolucência quando comparadas as RP digitais.

Desta forma, os exames tomográficos produzem imagens a partir de secção da estrutura de interesse e possuem três vantagens básicas em relação às radiografias convencionais: apresenta exame tridimensional em uma sequência de cortes finos, com ausência de sobreposição (Patel et al., 2007), possui sensibilidade acurada na identificação de tecidos (Cheng et al., 2011) e facilita a manipulação de imagem após aquisição, permitindo aumento de brilho, nitidez, realce de bordos e contraste. O volume de imagens captadas pelo aparelho e transportadas para o software permite uma completa visualização da anatomia de cada elemento dentário e área circundante, capacitando a quantificação do tamanho real (Cheng et al., 2011; Durack, Patel, 2012).



### 3 PROPOSIÇÃO

- a) Investigar e quantificar endotoxinas nas infecções endodônticas primárias através do método de LAL; realizando monitoramento dos níveis de endotoxinas (EU/mL) e carga microbiana (UFC/mL) antes do tratamento, após o preparo biomecânico e após o uso das medicações intracanaís: hidróxido de cálcio P.A.; hidróxido de cálcio P.A. associado ao extrato glicólico de gengibre 20% e hidróxido de cálcio P.A. associado à clorexidina gel 2%;
- b) Relacionar os níveis de endotoxinas (EU/mL) e carga microbiana (UFC/mL) com sinais / sintomas clínicos e volumetria da lesão periapical ( $\text{mm}^3$ ) através do uso de TCFC;
- c) Relacionar os níveis de endotoxinas (EU/mL) e carga microbiana (UFC/mL) com sinais / sintomas clínicos e volumetria dos canais radiculares ( $\text{mm}^3$ ) por meio da TCFC;
- d) Comparar medidas das lesões periapicais utilizando TCFC em diferentes planos (longo eixo do dente e plano da maxila) com RP.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Para facilitar o entendimento das metodologias propostas, esta seção foi subdividida de acordo com os objetivos impostos na proposição.

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP (ANEXO A).

### **4.1 Monitoramento do tratamento endodôntico e efetividade das diferentes medicações intracanaís na desinfecção dos canais radiculares em dentes com infecção endodôntica primária**

#### **4.1.1 Seleção de pacientes**

Para a realização da presente pesquisa foram selecionados 30 dentes de pacientes encaminhados para a Clínica de Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (UNESP) com necessidade de tratamento endodôntico em dentes portadores de necrose pulpar e presença de lesão periapical (Figura 1). Foi realizada anamnese, selecionando pacientes com condições favoráveis de saúde, local e sistêmica. Os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, aceitando fazer parte do estudo e também em cumprir as condições estabelecidas para a pesquisa (APÊNDICE A).

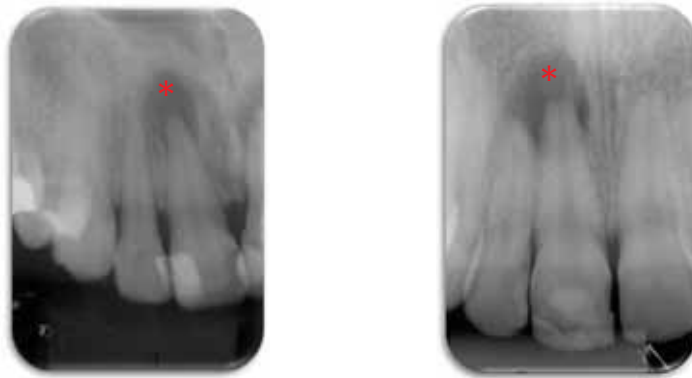


Figura 1 – Radiografias periapicais de dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical com indicação de tratamento endodôntico.

#### 4.1.2 Seleção dos casos

Os 30 dentes de pacientes foram selecionados seguindo critérios de inclusão e exclusão pré-estabelecidos. Foram excluídos da pesquisa dentes com doença periodontal, fratura radicular, exposição da câmara pulpar, pacientes que fizeram utilização de antifúngicos e antibióticos (nos últimos 3 meses), impossibilidade de isolamento absoluto e de inserção do cone de papel no canal radicular em seu comprimento de trabalho.

#### 4.1.3 Intervenção Odontológica

Todos os instrumentais e materiais utilizados nesta pesquisa foram submetidos à esterilização por radiação gama com cobalto 60 (dose 20 KGy por 6 horas) pela Embrarad (Empresa Brasileira de Radiação, Cotia, SP, Brasil) e todos os passos subsequentes foram realizados de forma asséptica. Inicialmente os pacientes foram submetidos à anestesia, isolamento absoluto seguido de profilaxia com pasta profilática (Vigodent S/A Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ,

Brasil) e escova de Robinson (Microdont – Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Após, os dentes foram lavados com solução salina fisiológica (Laboratório Sanobiol, Pouso Alegre, MG, Brasil) e um vedamento da interface coroa/lençol foi feito utilizando uma barreira física de resina fotopolimerizável (Top Dam – FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil). Em seguida, foi realizada desinfecção do campo operatório utilizando *swabs* (Jiangsu Medical Materials Co. Ltda, Jiangsu, China) estéreis umedecidos em água oxigenada 30 volumes (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) seguido de hipoclorito de sódio 5,25% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil). Para evitar a contaminação química do canal radicular com essa solução e a interferência com a cultura microbiológica, foi realizada a neutralização do hipoclorito com o tiosulfato de sódio 5% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil). Realizou-se abertura coronária com auxílio de brocas acionadas em alta rotação, sob refrigeração com solução salina fisiológica apirogênica (Figura 2). Terminada a abertura coronária, foi realizada a **1ª coleta** do conteúdo do canal radicular.

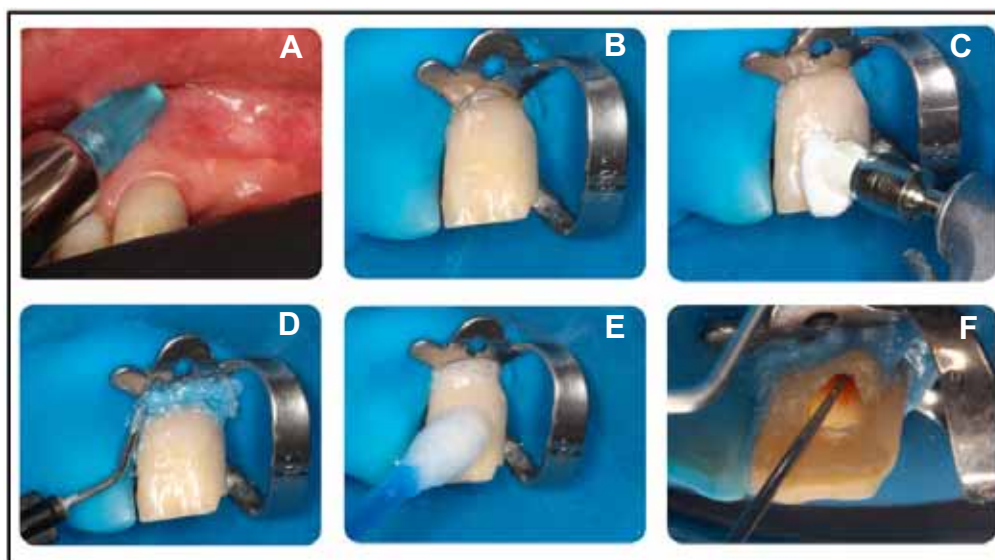


Figura 2 – Sequência da intervenção odontológica. A) anestesia infiltrativa; B) isolamento absoluto; C) profilaxia; D) vedamento interface dente/lençol; E) desinfecção do campo operatório; F) abertura coronária com irrigação com solução salina fisiológica estéril e apirogênica.

#### 4.1.4 Coletas do canal radicular

Para a coleta de amostras do canal radicular, 4 cones de papel absorventes (Dentsply Maillefer Ind. E Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil) apirogênicos foram introduzidos um de cada vez no interior do canal radicular respeitando-se o comprimento pré-odontométrico (CPO = comprimento aparente radiográfico subtraído em 2 mm) permanecendo nesta posição por 60 segundos. O primeiro cone de papel introduzido no canal radicular foi armazenado em tubo tipo eppendorf (1,5 mL) (Axygen INC, Union City, CA, USA) estéril e apirogênico contendo 1 mL de água apirogênica (Equiplax Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) para posterior análise de endotoxinas. Os próximos 3 cones de papel foram armazenados em tubo tipo eppendorf (1,5 mL) esterilizado contendo VMGA III para posterior análise microbiológica (Figura 3).

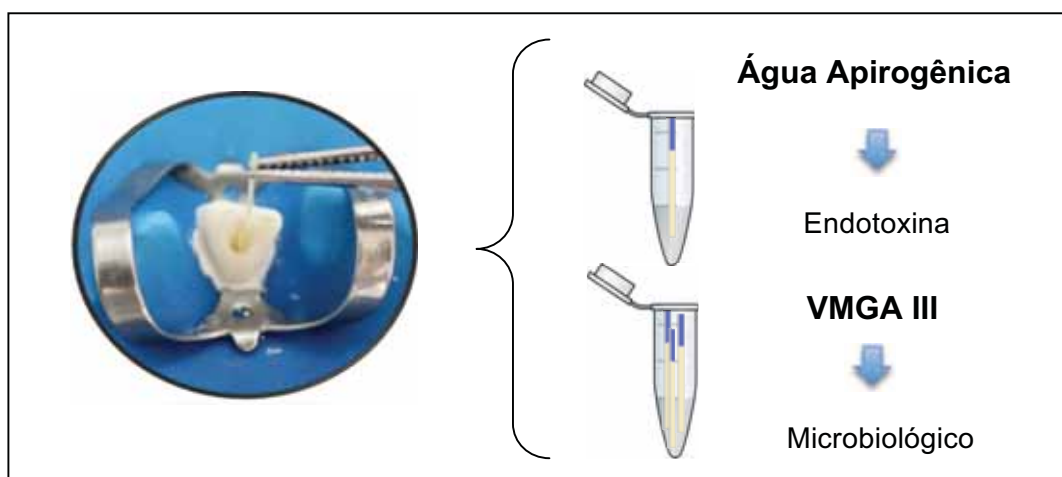


Figura 3 – Coletas do conteúdo do canal radicular: 1º cone de papel armazenado em 1 mL de água apirogênica e 3 cones de papel armazenados em 1 mL de VMGA III.

#### 4.1.5 Preparo biomecânico

Após a primeira coleta, foi realizada neutralização do conteúdo séptico do canal radicular e concomitante preparo biomecânico utilizando hipoclorito de sódio 2,5% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) como solução irrigadora. O comprimento de trabalho (CT) foi determinado radiograficamente e com o uso do localizador apical Root ZX II (J. Morita Brasil Imp. E Distrib. Ltda, São Paulo, SP, Brasil); 1 mm aquém do comprimento total do dente. Em seguida, foi realizado o preparo apical com a utilização do kit 701 e 702 do Sistema Rotatório Mtwo (RomiBras LTDA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) conforme orientação do fabricante. Todos os canais radiculares foram desbridados a nível foraminal até lima Kerr #30.

Durante todo o preparo, o canal foi irrigado com 5 mL de hipoclorito de sódio 2,5% a cada troca de instrumento. Ao final do preparo biomecânico, para neutralização da solução de NaOCl, os dentes foram irrigados com 5 mL de tiosulfato de sódio 5%. Após, os dentes receberam irrigação final com 10 mL de solução salina fisiológica estéril e apirogênica e, em seguida, a **2ª Coleta** foi realizada da mesma forma descrita anteriormente.

#### 4.1.6 Medicação intracanal por 14 dias

Após a segunda coleta, os canais foram preenchidos com solução de EDTA 17% (Inodon, Porto Alegre, RS, Brasil) durante 3 minutos e lavados com 10 mL de solução salina fisiológica apirogênica para posterior colocação da medicação intracanal (MIC). Os dentes foram divididos de acordo com a MIC utilizada (Quadro 1) (Figura 4).

Quadro 1 – Divisão dos grupos experimentais

GRUPOS	SOLUÇÃO IRRIGADORA	MEDICAÇÃO INTRACANAL	PROCEDÊNCIA
Ca(OH) <sub>2</sub> + SS	Hipoclorito de Sódio 2.5%	Hidróxido de Cálcio + Solução salina fisiológica	Biodinâmica, Ibirapurã, PR, Brasil Laboratório Sanobiol, Pouso Alegre, MG, Brasil
Ca(OH) <sub>2</sub> + CLX		Hidróxido de Cálcio + Clorexidina gel 2%	Biodinâmica, Ibirapurã, PR, Brasil Concepts V - Ultradent Products, Utah, USA
Ca(OH) <sub>2</sub> + GEN		Hidróxido de Cálcio + Extrato glicólico de gengibre 20%	Biodinâmica, Ibirapurã, PR, Brasil Apis Flora, Ribeirão Preto, SP, Brasil



Figura 4 – Medicamentos intracanaís. A) hidróxido de cálcio associado a solução salina; B) hidróxido de cálcio associado a clorexidina gel 2%; C) hidróxido de cálcio associado ao extrato glicólico de gengibre 20%.

A associação das medicações foi realizada na proporção 1:1 em volume e levadas ao canal radicular com o auxílio de limas e lentulo (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland) até completo preenchimento do canal. Em seguida, os dentes foram selados inserindo uma camada de coltosol (Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) seguido de restauração provisória com cimento de ionômero de vidro (S.S. White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Figura 5).

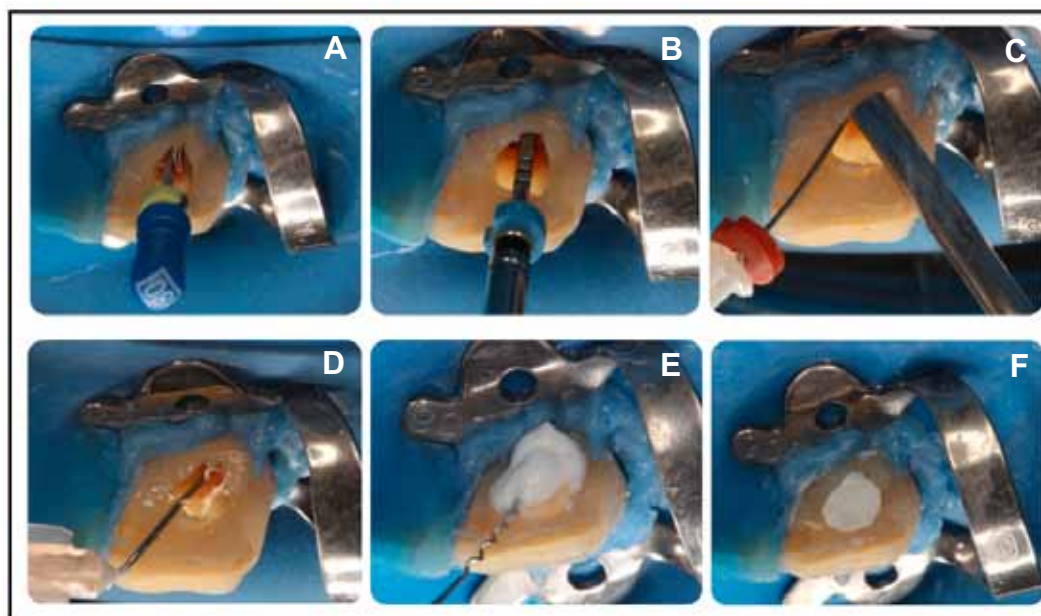


Figura 5 – Sequência do tratamento endodôntico. A) odontometria; B) preparo biomecânico utilizando sistema Mtwo; C) irrigação com hipoclorito de sódio 2.5% a cada troca de lima; D) preenchimento do canal com EDTA 17% e irrigação com solução salina fisiológica; E) colocação de medicação intracanal; F) selamento coronário.

A Figura 6 ilustra esquema da primeira sessão do tratamento endodôntico o qual o paciente foi submetido.

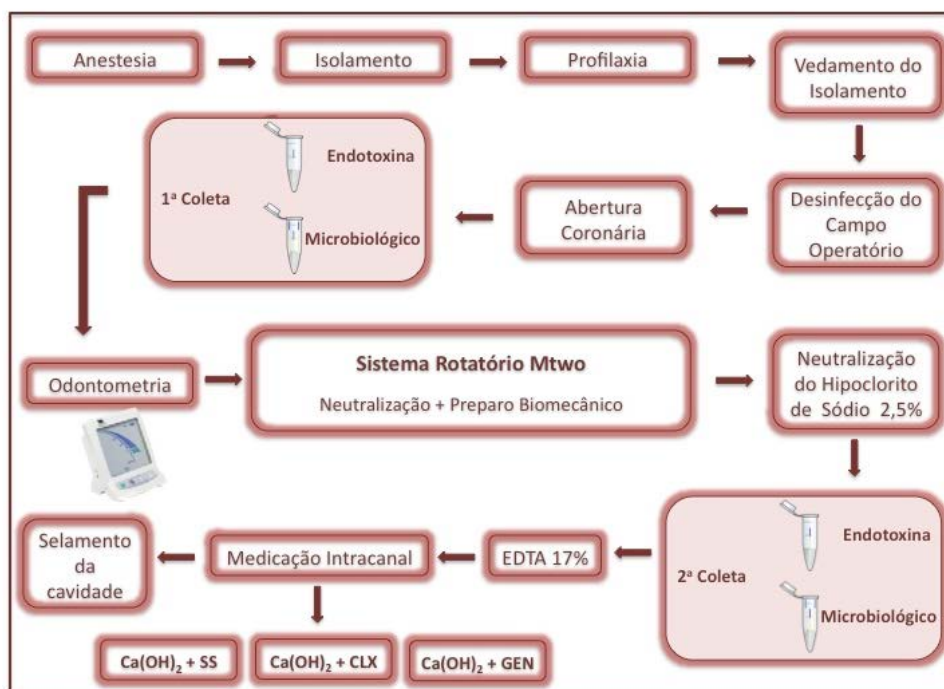


Figura 6 – Esquema da 1ª sessão de atendimento clínico.



Transcorrido o período de 14 dias, o paciente foi novamente submetido à anestesia, isolamento e antissepsia do campo operatório (semelhante à primeira sessão de atendimento), remoção do selamento coronário, remoção da MIC com lima Kerr #30 (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland) e irrigação com 20 mL de solução salina fisiológica aprotínica. Em seguida, foi realizada a **3ª coleta** de forma semelhante às coletas anteriormente descritas.

#### 4.1.7 Obturação dos canais radiculares

Terminada a 3ª coleta, os dentes foram inicialmente preenchidos com solução de EDTA 17% durante 3 minutos e lavados com 10 mL de solução salina fisiológica aprotínica. Os casos que apresentaram sem dor, sem odor e secos, foram obturados com cones de guta-percha (Dentsply Maillefer Ind. Com. Ltda. Petrópolis, RJ, Brasil) e cimento obturador AH Plus (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz). Em seguida, os dentes foram radiografados para comprovação de adequado preenchimento em lateralidade da obturação do canal radicular.

A Figura 7 ilustra esquema da segunda sessão do tratamento endodôntico o qual o paciente foi submetido.



Figura 7 - Esquema da 2ª sessão de atendimento clínico.

#### 4.1.8 Atividade antimicrobiana

Para todas as coletas, a atividade antimicrobiana foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de microrganismos remanescentes no canal radicular. O eppendorf contendo os 3 cones de papel (amostra matriz) armazenados em 1 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III foi agitado até a dessorção do conteúdo para facilitar a dispersão dos microrganismos. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas transferindo 100  $\mu\text{L}$  da amostra matriz para a diluição  $10^{-1}$  e assim consecutivamente até a diluição  $10^{-3}$  em tubos eppendorf (1,5 mL) contendo 900  $\mu\text{L}$  de Caldo Infuso Cérebro Coração (BHI) (*Brain Heart Infusion Broth* - HiMedia Laboratories Pvt. Ltda, Mubai, Índia) (Figura 8).

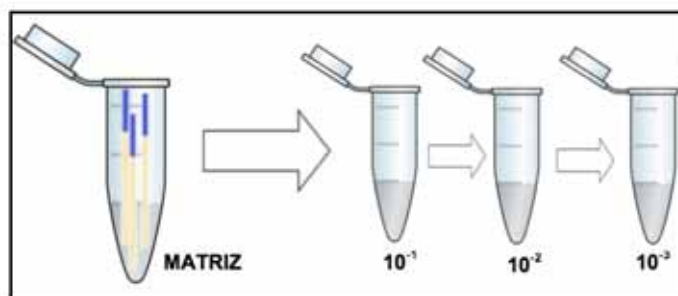


Figura 8 – Diluições seriadas a partir da amostra matriz.

Vale ressaltar que anteriormente a realização do experimento, foi realizado um estudo piloto para determinar quais seriam as amostras semeadas para detecção de microrganismos anaeróbios e facultativos.

Desta forma, foram semeados 50  $\mu$ L da amostra matriz (sem diluição) e 50  $\mu$ L da diluição  $10^{-3}$  em placas de Petri (Interlab distribuidora de produtos científicos, São Paulo, SP, Brasil) contendo *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA – Neogen Corporation, Michigan, USA), acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado suplementados por hemina (5 mg/L) e vitamina K1 (1 mg/L) (APÊNDICE B). Essas placas foram incubadas em jarra de anaerobiose a 37 °C por 14 dias, para permitir a detecção de microrganismos anaeróbios e facultativos.

O número de unidade formadora de colônias (UFCs) foi determinado a partir da contagem do número de colônias nas placas analisadas. Para a obtenção do número de UFCs presentes na amostra por mL (amostra inicial) foi necessário multiplicar por 20 ou 20.000 o número de UFCs observadas na contagem das placas, dependendo da diluição utilizada. A escolha da placa para contagem de UFCs estava relacionada à possibilidade de contar de forma individual o número de UFCs presentes. Quando não possibilitado a contagem na amostra inicial, foi utilizada a diluição  $10^{-3}$ . Ou seja, quando a diluição  $10^{-3}$  foi escolhida, o valor correspondente a essa diluição é 1000 vezes menor que o inicial (1 mL). A alíquota plaqueada foi de 50  $\mu$ L, ou seja, 20 vezes menor que 1

mL. Portanto o fator de multiplicação do número de UFCs obtido seria 20.000.

#### 4.1.9 Quantificação de Endotoxinas

Para verificar a neutralização da endotoxina, as amostras coletadas dos canais radiculares foram submetidas à análise quantitativa pelo teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (cinético QCL - LAL) (Lonza, Walkersville, MD, EUA).

Inicialmente foi realizado uma curva-padrão (APÊNDICE C). O controle padrão de endotoxina de *Escherichia coli* foi reconstituído com um volume especificado, no certificado de qualidade, da água apirogênica. Esta suspensão contém 50 EU/mL. Foram realizadas diluições a partir deste padrão de endotoxina em diferentes concentrações (50; 5; 0,5; 0,05; 0,005 EU/mL). Para cada amostra, foi realizado um controle positivo (amostra do conteúdo do canal radicular adicionada de uma quantidade conhecida de endotoxina).

Em uma placa apirogênica de 96 poços, foram adicionados 100 µL de água apirogênica (branco da reação), os padrões de endotoxina, as amostras coletadas do canal radicular e os controles positivos. A placa foi incubada no leitor cinético QCL a  $37 \pm 1$  °C por 10 minutos, o qual estava acoplado a um microcomputador com software WinkQCL™ específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Após, foram adicionados em cada poço da placa 100 µL do reagente cinético cromogênico do LAL, com uma micropipeta multicanal e ponteiros apirogênicos (Figura 12). Após o início do ensaio cinético, o software da leitora de microplacas monitorava, de forma contínua durante todo o ensaio, a absorvância a 405 nm em cada poço da microplaca. O software WinkQCL™ automaticamente calculou 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 de impressão.

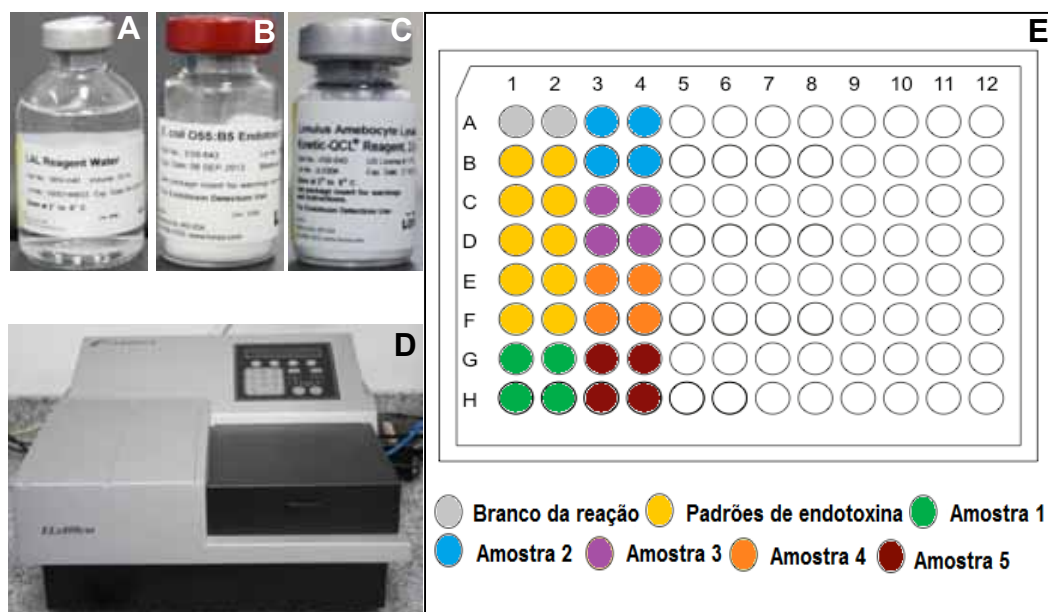


Figura 12 – Quantificação de endotoxinas. A) água apirogênica; B) endotoxina padrão de *E. coli*; C) reagente cinético cromogênico do LAL; D) leitor cinético QCL; E) esquema de montagem da placa de 96 poços.

#### 4.1.10 Análise Estatística

Para avaliar o efeito do preparo biomecânico e das diferentes medicações intracanaís na redução da concentração de unidades formadoras de colônias e de endotoxinas ao longo das diferentes etapas do tratamento endodôntico, utilizou-se o teste de Friedman ( $p < 0,05$ ). Quando o referido teste indicou significância estatística, foi utilizado o teste pareado de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ).

## **4.2 Relação dos níveis de endotoxinas (EU/mL) e carga microbiana (UFC/mL) com sinais / sintomas clínicos e volumetria da lesão periapical (mm<sup>3</sup>) utilizando TCFC**

### 4.2.1 Seleção dos casos

Para uma maior padronização das TCFC, foram excluídos desta etapa seis dentes inferiores, selecionando apenas vinte e quatro dentes superiores unirradiculares que apresentavam necrose pulpar e presença de lesão periapical de pacientes atendidos na Clínica de Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (UNESP). Os pacientes foram submetidos à anamnese, selecionando pacientes com condições favoráveis de saúde, local e sistêmica.

Foram excluídos da pesquisa dentes com doença periodontal, fratura radicular, exposição da câmara pulpar ao meio oral, pacientes que fizeram utilização de antifúngicos e antibióticos (nos últimos 3 meses), impossibilidade de isolamento absoluto e de inserção do cone de papel no canal radicular em seu comprimento de trabalho. Os pacientes incluídos nos estudos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, aceitando fazer parte do estudo e também em cumprir as condições estabelecidas para a pesquisa.

Para cada paciente foram anotados dados pessoais, história médica e história dentária (APÊNDICE D). No exame subjetivo foram obtidas informações sobre a condição atual do dente a ser tratado e quanto à presença ou ausência de dor. No exame objetivo foram anotados dados tais como a presença de edema, fístulas, presença ou não de restaurações, cáries e fraturas. Foram realizados testes para verificar dor à percussão, à palpação e mobilidade, além da realização de sondagem periodontal. Foram realizadas radiografias periapicais que

foram padronizadas com uso de posicionadores onde constatou-se a presença de lesão periapical.

Todas essas características clínicas referentes ao dente investigado foram anotadas na ficha clínica de cada paciente.

Em seguida, os pacientes foram submetidos a TCFC Classic I-Cat (Imaging Science International, Hatchfield, EUA) na região dos dentes selecionados, antes da intervenção odontológica, confirmando a presença de destruição óssea periapical.

#### 4.2.2 Procedimentos de amostragem

Todos os passos da intervenção odontológica foram realizados de forma asséptica e todos os instrumentais utilizados foram submetidos à esterilização por radiação gama com cobalto 60 (dose 20 KGy por 6 horas) pela Embrarad (Empresa Brasileira de Radiação, Cotia, SP, Brasil). Os pacientes foram submetidos à anestesia, isolamento absoluto seguido de profilaxia com pasta profilática (Vigodent S/A Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e escova de Robinson (Microdont – Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, os dentes foram lavados com solução salina fisiológica (Laboratório Sanobiol, Pouso Alegre, MG, Brasil) e foi realizado um vedamento da interface coroa/lençol utilizando barreira física de resina fotopolimerizável (Top Dam – FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil). Após, foi realizada desinfecção do campo operatório utilizando *swabs* (Jiangsu Medical Materials Co. Ltda, Jiangsu, China) estéreis umedecidos em água oxigenada 30 volumes (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) seguido de hipoclorito de sódio 5,25% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) e neutralização do hipoclorito com o tiosulfato de sódio 5% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil).

Foi realizada abertura coronária com auxílio de brocas acionadas em alta rotação, sob refrigeração com solução salina fisiológica aprotogênica. Terminada a abertura coronária, foi realizada a coleta do conteúdo do canal radicular.

Para a coleta de amostras do canal radicular, 4 cones de papel absorventes (Dentsply Maillefer Ind. E Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil) aprotogênicos foram introduzidos um de cada vez no interior do canal radicular respeitando-se o comprimento pré-odontométrico (CPO = comprimento aparente radiográfico subtraído em 2 mm) permanecendo nesta posição por 60 segundos. O primeiro cone de papel introduzido no canal radicular foi armazenado em tubo tipo eppendorf (1,5 mL) (Axygen INC, Union City, CA, USA) estéril e aprotogênico contendo 1 mL de água aprotogênica (EquiPLEX Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) para posterior análise de endotoxinas. Os próximos 3 cones de papel foram armazenados em tubo tipo eppendorf (1,5 mL) esterilizado contendo VMGA III para posterior análise microbiológica.

#### 4.2.3 Análise microbiológica (UFC/mL)

Foi agitado até a completa dessorção do conteúdo para facilitar a dispersão dos microrganismos, o eppendorf contendo os 3 cones de papel armazenados em 1 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III. Após, foram realizadas diluições seriadas até  $10^{-3}$ . Foram semeados 50  $\mu$ L da amostra matriz e 50  $\mu$ L da diluição  $10^{-3}$  em placas de Petri (Interlab distribuidora de produtos científicos, São Paulo, SP, Brasil) contendo *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA – Neogen Corporation, Michigan, USA), acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado suplementados por hemina (5 mg/L) e vitamina K1 (1 mg/L). Essas placas foram incubadas em jarra de anaerobiose a 37 °C por 14



dias, para permitir a detecção de microrganismos anaeróbios e facultativos.

#### 4.2.4 Quantificação de endotoxinas (EU/mL)

Para verificar os níveis de endotoxinas existentes, foi utilizado o teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (análise quantitativa) (Lonza, Walkersville, MD, EUA).

Inicialmente foi realizado uma curva-padrão. O controle padrão de endotoxina de *Escherichia coli* foi reconstituído com um volume especificado, no certificado de qualidade, de água apirogênica. Esta suspensão contém 50 EU/mL. Foram realizadas diluições a partir deste padrão de endotoxina em diferentes concentrações (50; 5; 0,5; 0,05; 0,005 EU/ml).

Em uma placa apirogênica de 96 poços, foram adicionados 100 µL de água apirogênica (branco da reação), os padrões de endotoxina, as amostras coletadas do canal radicular e os controles positivos. A placa foi incubada no leitor cinético QCL a  $37 \pm 1$  °C por 10 minutos, o qual estava acoplado a um microcomputador com software WinkQCL™ específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Após, foram adicionados em cada poço da placa 100 µL do reagente cinético cromogênico do LAL, com uma micropipeta multicanal e ponteiras apirogênicas. Após o início do ensaio cinético, o software da leitora de microplacas monitorava, de forma contínua durante todo o ensaio, a absorbância a 405 nm em cada poço da microplaca. O leitor determinou o tempo necessário para aumentar a absorbância de cada poço a 0.200 unidades de absorbância, que foi denominado tempo de reação. O software WinkQCL™ automaticamente calculou 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 de impressão.

#### 4.2.5 Volumetria da lesão periapical

As TCFC realizadas antes do tratamento endodôntico foram submetidas a medidas através da volumetria da lesão periapical. Os exames tomográficos foram realizados na Clínica Tomoface (São José dos Campos, SP, Brasil). Para a aquisição do volume da TCFC, o plano de oclusão do paciente foi orientado paralelamente ao plano horizontal (correspondente ao plano axial) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Todos os exames foram feitos usando o tomógrafo Classic I-Cat (Imaging Science International, Hatchfield, EUA) com 6 cm de campo de visão ou FOV (*field of view*), voxel isotrópico de 0,25 mm, 120 kVp, 36,15 mAs e 12 bits de profundidade de escala de cinza. Todos os exames foram trabalhados em formato DICOM (Digital Image and Communication in Medicine) e lidos em software específico. Os dados DICOM de cada varredura foram salvos em arquivos separados, e, em seguida, importados e avaliados com o software Nemotec® (Nemotec®, Madrid, Espanha).

O processo de segmentação e as medições volumétricas no software Nemotec® foram feitas baseadas no seguinte protocolo com orientação do plano da maxila para a referência dos cortes:

- a) De posse da tela de reconstrução multiplanar (MPR) foi realizado o posicionamento das coordenadas “X”, “Y” e “Z” nos planos axial, sagital e coronal, de acordo com a arcada superior: **corte axial** – orientado com o plano

intermaxilar alinhado ao sagital; **corte sagital** – orientado pelo plano maxilar formado pela espinha nasal anterior com a posterior, posicionado paralelamente ao plano horizontal; e **corte coronal** – orientado com a base da cavidade nasal paralela com o plano horizontal; sendo que todos os cortes deveriam passar pela região de maior dimensão da lesão periapical (Figura 13);

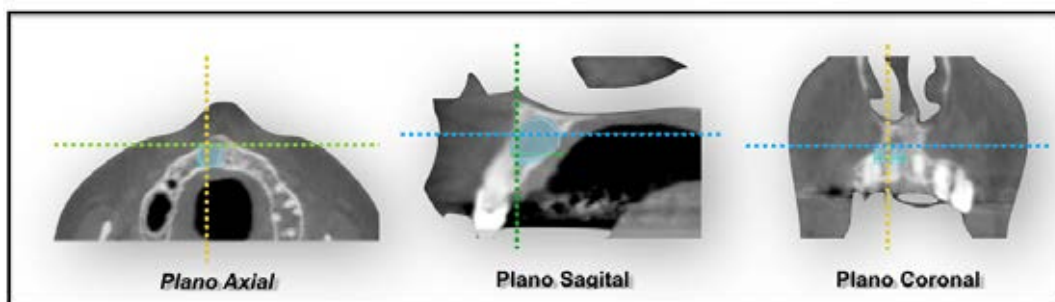


Figura 13 – Reformatação da imagem para o plano da maxila, utilizando as ferramentas de posicionamento do software Nemotec®.

- b) Realização da segmentação 2D e medidas das lesões periapicais (corte axial: medidas antero-posterior e vestibulo-palatina; corte sagital: medidas vestibulo-palatina e supero-inferior; corte coronal: medidas supero-inferior e antero-posterior) em todos os 3 planos para determinar a área radiolúcida que delimita a lesão (Figura 14);

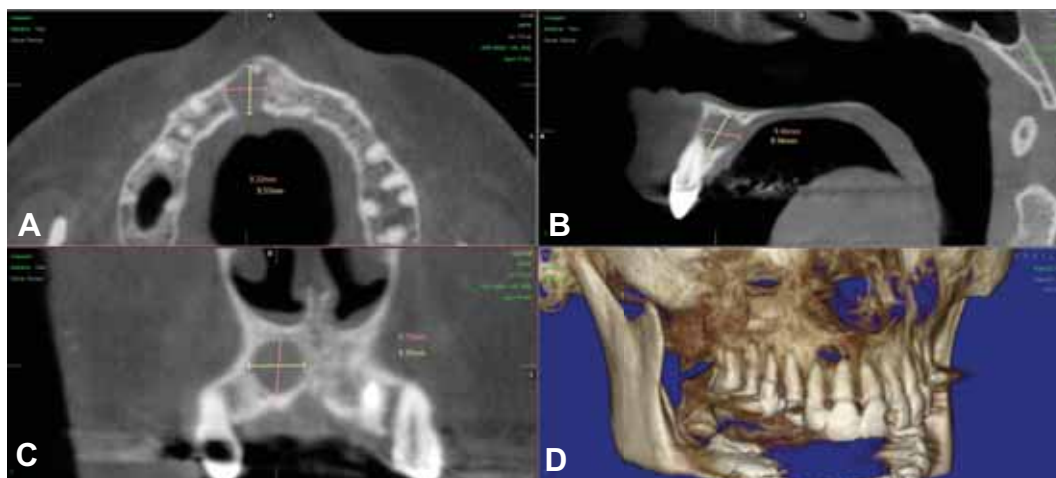


Figura 14 – Imagem da TCFC da verificação pré-operatória transferidas para o software Nemotec® e segmentação 2D da lesão periapical nos diferentes planos de corte. A) plano axial: em vermelho - medida antero-posterior, em amarelo – medida vestibulo-palatina; B) plano sagital: em vermelho – medida vestibulo-palatina, em amarelo – medida supero-inferior; C) plano coronal: em vermelho – medida supero-inferior, em amarelo – medida antero-posterior; D) imagem 3D da arcada dentária superior.

- c) Após a criação das medidas nos planos de corte, sagital, coronal e axial, foi determinado um polígono que abrangesse todo o limite da lesão, com margem de segurança, para a formatação da reconstrução 3D da radiolucência periapical, com tolerância de 350 HU (Hounsfield Unit). A escolha do número de tolerância de leitura para a geração do volume deu-se baseado em um estudo piloto no qual se testou diferentes opções de HU, sendo de consenso entre o radiologista e o endodontista o valor que melhor representava a lesão (Figura 15);
- d) Inspeccionou-se os limites da lesão para verificar se estava contemplada no polígono gerado e corrigiu-se quando necessário;

- e) Utilizou-se a opção “detectar volume” do software para automaticamente calcular o volume da lesão;
- f) Com a obtenção do volume, gerado em  $\text{cm}^3$ , conseguiu-se duas medidas de área, sendo a mínima sessão e a sessão axial da lesão.

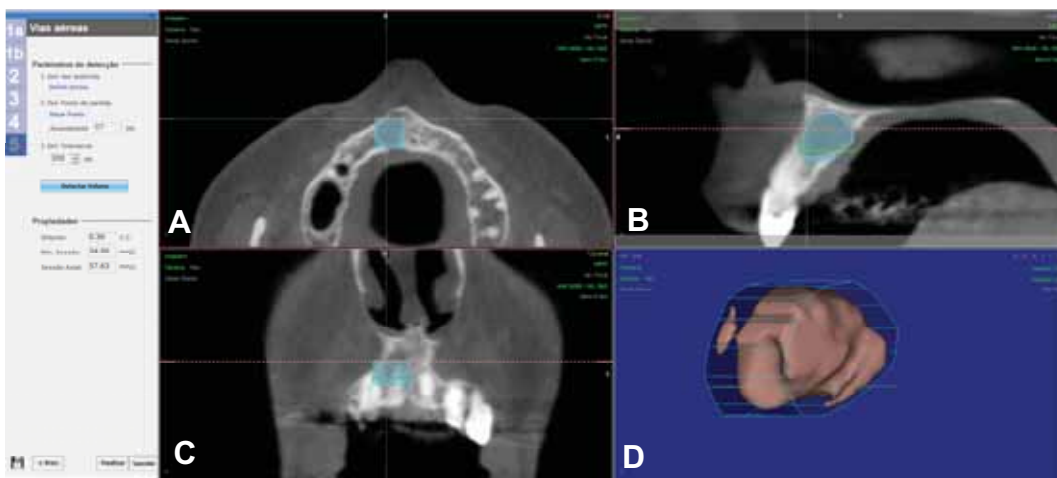


Figura 15 – Imagem da TCFC da verificação pré-operatória transferidos para o software Nemotec® após criação das medidas nos diferentes planos de corte, formando um polígono que abrangesse todo o limite da lesão. A) plano axial; B) plano sagital; C) plano coronal; D) reconstrução 3D da radiolucência periapical.

Dois examinadores independentes (um endodontista e um radiologista) avaliaram todos os exames. O volume de cada radiolucência periapical foi medido pelo radiologista e confirmado pelo endodontista seguindo o mesmo procedimento de segmentação no software Nemotec® e salvos em um arquivo do Programa Microsoft Office Excel.

Foram realizadas tabelas contendo dados dos dentes selecionados, tais como volumetria da lesão periapical utilizando TCFC ( $\text{mm}^3$ ), níveis de endotoxinas e microrganismos, e sinais / sintomas clínicos como dor prévia, sensibilidade a palpação e a percussão, presença de fístula e exsudato.

#### 4.2.6 Análise Estatística

Foram testadas possíveis relações entre os níveis de endotoxinas (EU/mL) e unidades formadoras de colônias (UFC/mL) em dentes com necrose pulpar com a volumetria ( $\text{mm}^3$ ) da destruição óssea periapical obtidas através das TCFC por meio da correlação de *Pearson* e de modelos de predição baseados em regressão linear simples e multivariável.

Foi utilizado o teste one-way ANOVA para verificar a diferença de volumetria da lesão ( $\text{mm}^3$ ) de acordo com os diferentes sinais e sintomas clínicos. Ainda, para comparação entre os níveis de UFC/mL com todas as condições da coroa foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

#### **4.3 Relação dos níveis de endotoxinas (EU/mL) e carga microbiana (UFC/mL) com sinais / sintomas clínicos e volumetria ( $\text{mm}^3$ ) de canais radiculares com infecção endodôntica primária**

Para uma maior padronização das TCFC, foram excluídos desta etapa seis dentes inferiores e quatro pré-molares superiores, selecionando apenas vinte dentes superiores e unirradiculares diagnosticados com necrose pulpar e presença de lesão periapical de pacientes atendidos na Clínica de Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (UNESP) foram incluídos na pesquisa. Os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, aceitando fazer parte do estudo e também em cumprir as condições estabelecidas pela mesma. Foram excluídos da pesquisa dentes com doença periodontal, fratura radicular, exposição da câmara pulpar, pacientes que fizeram utilização

de antifúngicos e antibióticos nos últimos 3 meses, impossibilidade de isolamento absoluto e de inserção do cone de papel no canal radicular em seu comprimento de trabalho.

Para cada paciente selecionado, foram anotados dados pessoais, história médica e história dentária. No exame subjetivo foram obtidas informações sobre a condição atual do dente a ser tratado e quanto à presença ou ausência de dor. No exame objetivo foram anotados dados tais como a presença de edema, fístulas, presença ou não de restaurações, cáries e fraturas. Foram realizados testes para verificar dor à percussão, à palpação e mobilidade, além da realização de sondagem periodontal.

Todas essas características clínicas referentes ao dente investigado foram anotadas na ficha clínica de cada paciente.

Os pacientes selecionados foram submetidos a TCFC Classic I-Cat (Imaging Sciences International, Hatchfield, EUA) na região dos dentes em estudo, antes da intervenção odontológica, diagnosticando o volume do canal radicular antes do preparo endodôntico (preparo cervical e batente apical).

Após, iniciou-se o tratamento endodôntico propriamente dito. Todos os instrumentais utilizados nesta pesquisa foram submetidos à esterilização por radiação gama com cobalto 60 (dose 20 KGy por 6 horas) pela Embrarad (Empresa Brasileira de Radiação, Cotia, SP, Brasil) e todos os passos do tratamento foram realizados de forma asséptica. Os pacientes foram submetidos à anestesia, isolamento absoluto seguido de profilaxia com pasta profilática (Vigodent S/A Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e escova de Robinson (Microdont – Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Após, os dentes foram lavados com solução salina fisiológica (Laboratório Sanobiol, Pouso Alegre, MG, Brasil) e um vedamento da interface coroa/lençol foi feito utilizando uma barreira física de resina fotopolimerizável (Top Dam – FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil). Em seguida, foi realizada

desinfecção do campo operatório utilizando *swabs* (Jiangsu Medical Materials Co. Ltda, Jiangsu, China) estéreis umedecidos em água oxigenada 30 volumes (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) seguido de hipoclorito de sódio 5,25% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) e tiosulfato de sódio 5% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil). Foi realizada abertura coronária com auxílio de brocas acionadas em alta rotação, sob refrigeração com solução salina fisiológica apirogênica. Terminada a abertura coronária, foi realizada a coleta do conteúdo do canal radicular.

Quatro cones de papel absorventes (Dentsply Maillefer Ind. E Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil) apirogênicos foram introduzidos um de cada vez no interior do canal radicular respeitando-se o comprimento pré-estabelecido (comprimento aparente radiográfico subtraído em 2 mm) permanecendo nesta posição por 60 segundos. O primeiro cone de papel introduzido no canal radicular foi armazenado em tubo tipo eppendorf (1,5 mL) (Axygen INC, Union City, CA, USA) estéril e apirogênico contendo 1 mL de água apirogênica (EquiPLEX Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) para posterior análise de endotoxinas. Os próximos 3 cones de papel foram armazenados em tubo tipo eppendorf (1,5 mL) esterilizado contendo VMGA III para posterior análise microbiológica.

#### 4.3.1 Procedimentos de cultura microbiana

Eppendorfs contendo 900 µL de Caldo Infuso Cérebro Coração (*Brain Heart Infusion Broth*) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda, Mubai, Índia) foram preparados para a realização de diluições seriadas. Inicialmente o eppendorf contendo os 3 cones de papel armazenados em 1 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III foi agitado até a



dessorção do conteúdo para facilitar a dispersão dos microrganismos. Em seguida, foi transferido 100  $\mu\text{L}$  da amostra matriz para a diluição  $10^{-2}$ , agitada a amostra  $10^{-2}$  e transferida 100  $\mu\text{L}$  para a diluição  $10^{-3}$ .

Foram semeados 50  $\mu\text{L}$  da amostra matriz e 50  $\mu\text{L}$  da diluição  $10^{-3}$  em placas de petri contendo *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA – Neogen Corporation, Michigan, USA), acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado suplementados por hemina (5 mg/L) e vitamina K1 (1 mg/L). Essas placas foram incubadas em jarra de anaerobiose a 37 °C por 14 dias, para permitir a detecção de microrganismos anaeróbios e facultativos.

#### 4.3.2 Quantificação de endotoxinas

Para verificação dos níveis de endotoxinas, foi utilizado o teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (análise quantitativa) (Lonza, Walkersville, MD, EUA). Em uma placa apirogênica de 96 poços, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de água apirogênica (branco da reação), os padrões de endotoxina, as amostras coletadas do canal radicular e os controles positivos. A placa foi incubada no leitor cinético QCL a  $37 \pm 1$  °C por 10 minutos, o qual estava acoplado a um microcomputador com software WinkQCL™ específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Após, foram adicionados em cada poço da placa 100  $\mu\text{L}$  do reagente cinético cromogênico do LAL, com uma micropipeta multicanal e ponteiras apirogênicas. Após o início do ensaio cinético, o software da leitora de microplacas monitorava, de forma contínua durante todo o ensaio, a absorbância a 405 nm em cada poço da microplaca. O leitor determinou o tempo necessário para aumentar a absorbância de cada poço a 0.200 unidades de absorbância, que foi denominado tempo de reação. O

software WinkQCL™ automaticamente calculou 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 de impressão.

#### 4.3.3 Volumetria dos canais radiculares (mm<sup>3</sup>)

Os exames tomográficos foram realizados na Clínica Tomoface (São José dos Campos, SP, Brasil). De acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante, o plano de oclusão do paciente foi orientado paralelamente ao plano horizontal.

As TCFC realizadas antes do tratamento endodôntico foram submetidas a medidas a fim de determinar o volume dos canais radiculares de dentes com infecção endodôntica primária. Destaca-se a importância de se verificar a existência da relação entre os níveis de endotoxinas e carga microbiana com o volume do canal radicular. Será que canais mais amplos apresentam maiores níveis de endotoxinas e microrganismos? Não existem trabalhos na literatura que elucidam essa dúvida.

Todos os exames foram feitos usando o tomógrafo Classic I-Cat com 6 cm de campo de visão ou FOV (*field of view*), voxel isotrópico de 0,25 mm, 120 kVp, 36,15 mAs e 12 bits de profundidade de escala de cinza. Todos os exames foram trabalhados em formato DICOM e lidos em software específico. Os dados DICOM de cada varredura foram salvos em arquivos separados, e, em seguida, importados e avaliados com o software Nemotec® (Nemotec®, Madrid, Espanha). Dois examinadores independentes (um endodontista e um radiologista) avaliaram todos os exames. O volume de cada canal radicular foi medido pelo radiologista e confirmado pelo endodontista seguindo o mesmo

procedimento de segmentação no software Nemotec® e salvos em um arquivo do Programa Microsoft Office Excel.

O processo de segmentação e as medições volumétricas foram feitas seguindo as seguintes etapas:

- a) De posse da tela de reconstrução multiplanar (MPR) foi realizado o posicionamento das coordenadas “X”, “Y” e “Z” nos planos axial, coronal e sagital, de acordo com o dente a ser avaliado: **corte axial** – perpendicular ao longo eixo do dente, **corte sagital** – paralelo ao longo eixo do dente, alinhado ao rebordo alveolar, **corte coronal** – alinhado ao longo eixo do dente;
- b) realizou-se a segmentação 2D e medidas dos canais radiculares em todos os 3 planos (axial, sagital e coronal) para determinar a área radiolúcida que delimita o canal radicular;
- c) Após a criação das medidas nos planos de corte sagital, coronal e axial, foi determinado uma forma que abrangesse todo o limite do canal radicular, com margem de segurança, para formatação da reconstrução 3D da radiolucência do canal, com tolerância de 500 HU (Hounsfield Unit). A escolha do número de tolerância de leitura para a geração do volume se deu baseado em um estudo piloto no qual se testou diferentes opções de HU, sendo de consenso entre o radiologista e o endodontista o valor que melhor representava o canal radicular (Figura 16);

- d) Inspeccionou-se os limites do canal para verificar se estava contemplada na forma gerada e corrigiu-se quando necessário;
- e) Utilizou-se a opção “detectar volume” do software para automaticamente calcular os volumes dos canais radiculares.

Foram testadas possíveis relações entre os níveis de endotoxinas (EU/mL) e carga de microrganismos cultiváveis (UFC/mL) com o volume ( $\text{mm}^3$ ) do canal radicular obtidas em TCFC por meio da correlação de *Pearson* e de modelos de predileção baseados em regressão linear simples e multivariável.



Figura 16 – Imagem da TCFC da verificação pré-operatória transferidos para o software Nemetec® após criação das medidas do canal radicular nos diferentes planos de corte, formando um polígono que abrangesse todo o limite do canal. A) plano axial: linha roxa acompanha o longo eixo do dente; B) plano sagital: linha verde acompanha o longo eixo do dente; C) plano coronal: linha roxa acompanha o longo eixo do dente; D) reconstrução 3D da radiolucência do canal radicular.

#### **4.4 Comparação das medidas das lesões periapicais utilizando TCFC em diferentes planos (longo eixo do dente e plano da maxila) com RP**

Para maior padronização, dos 30 dentes foram selecionados vinte e quatro dentes superiores diagnosticados com infecção endodôntica primária de pacientes atendidos na Clínica de Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (UNESP) foram incluídos na pesquisa. Os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, aceitando fazer parte do estudo e também em cumprir as condições estabelecidas pela pesquisa.

Os dentes de pacientes selecionados foram submetidos a RP com uso de posicionadores e em seguida, TCFC na região dos dentes em estudo, confirmando a presença de destruição óssea periapical. Os exames tomográficos foram realizados na Clínica Tomoface (São José dos Campos, SP, Brasil). O plano de oclusão do paciente foi orientado paralelamente ao plano horizontal de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Destaca-se a importância clínica de se verificar a existência da relação entre as imagens obtidas por radiografias periapicais com as imagens obtidas por tomografias computadorizadas de feixe cônico. Será que as radiografias periapicais realmente representam de forma adequada a destruição óssea periapical? Será que é de suma importância delinear medida de profundidade (vestíbulo-lingual) só conseguida com o uso de TCFC? Não existem trabalhos na literatura que elucidam essa dúvida.

Para avaliar a diferença entre as duas formas de análise da TCFC com as radiografias periapicais, foram realizadas medidas de segmentação da lesão periapical em todos os exames. Para as TCFC, utilizou-se o melhor plano de corte que representava a região para estas medidas uma vez que dependendo do posicionamento dentário na

arcada, os cortes anatômicos, sagital e coronal, se mesclam devido a forma elíptica da arcada.

Desta maneira, as TCFC foram submetidas a medidas de segmentação nos cortes axial, sagital e coronal da destruição óssea periapical. Todos os exames foram feitos usando o tomógrafo Classic I-Cat (Imaging Science International, Hatchfield, EUA) com 6 cm de campo de visão ou FOV (*field of view*), voxel isotrópico de 0,25 mm, 120 kVp, 36,15 mAs e 12 bits de profundidade de escala de cinza. Todos os exames foram trabalhados em formato DICOM e lidos em software específico. Os dados DICOM de cada varredura foram salvos em arquivos separados, e, em seguida, importados e avaliados com o software Nemotec® (Nemotec®, Madrid, Espanha).

Dois examinadores independentes (um endodontista e um radiologista) avaliaram todos os exames. As segmentações nos diferentes planos da radiolucência periapical foi medido pelo radiologista e confirmado pelo endodontista seguindo o mesmo procedimento de segmentação no software Nemotec® e salvos em um arquivo do Programa Microsoft Office Excel.

#### 4.4.1 Segmentação 2D da TCFC do plano no longo eixo do dente

O processo de segmentação foi realizado seguindo o seguinte protocolo com orientação do longo eixo dentário:

- a) De posse da tela de reconstrução multiplanar (MPR) foi realizado o posicionamento das coordenadas “X”, “Y” e “Z” nos planos axial, sagital e coronal, de acordo com o dente a ser avaliado: **corte axial** – alinhado perpendicular ao

longo eixo do dente; **corte sagital** – alinhado paralelamente ao longo eixo do dente, acompanhando a inclinação do rebordo alveolar; e **corte coronal** – alinhado com o longo eixo do dente; sendo que todos os cortes deveriam passar pela região de maior dimensão da lesão periapical;

- b) Realizou-se a segmentação 2D e medidas das lesões periapicais (corte sagital: medidas vestibulo-palatina e supero-inferior; corte coronal: medidas supero-inferior e antero-posterior);
- c) Inspecionou-se os limites da segmentação realizada nos diferentes cortes e corrigiu-se quando necessário (Figura 17).



Figura 17 - Segmentação 2D da TCFC utilizando o longo eixo do dente. Em amarelo: medida supero-inferior, em vermelho: antero-posterior.

#### 4.4.2 Segmentação 2D da TCFC do plano da maxila

O processo de segmentação foi realizado seguindo o seguinte protocolo com orientação do plano da maxila:

- a) De posse da tela de reconstrução multiplanar (MPR) foi realizado o posicionamento das coordenadas “X”, “Y” e “Z” nos planos axial, coronal e sagital, de acordo com o dente a ser avaliado: **corte axial** – orientado com o plano intermaxilar alinhado ao sagital; **corte sagital** – orientado pelo plano maxilar formado pela espinha nasal anterior com a posterior, posicionado paralelamente ao plano horizontal; e **corte coronal** – orientado com a base da cavidade nasal paralela com o plano horizontal; sendo que todos os cortes deveriam passar pela região de maior dimensão da lesão periapical (Figura 18);

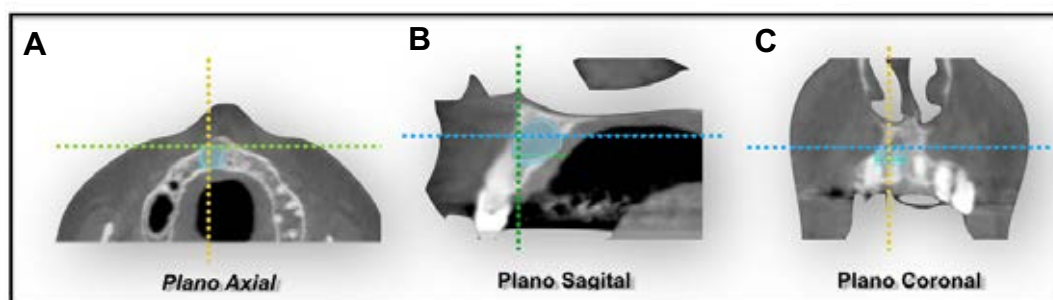


Figura 18 - Reformatação da imagem para o plano da maxila, utilizando as ferramentas de posicionamento do software Nemotec®. A) plano axial; B) plano sagital; C) plano coronal.



- b) Realizou-se a segmentação 2D e medidas das lesões periapicais (corte sagital: medidas vestibulo-palatina e supero-inferior; corte coronal: medidas supero-inferior e antero-posterior);
- c) Inspecionou-se os limites da segmentação realizada nos diferentes cortes e corrigiu-se quando necessário (Figura 19).



Figura 19 – Segmentação 2D da TCFC utilizando o plano da maxila. Em amarelo: medida antero-posterior, em vermelho: medida supero-inferior.

#### 4.4.3 Medidas radiográficas

As radiografias foram digitalizadas por meio do scanner de mesa HP Scanjet 4050 (Hewlett Packard, Vancouver, WA, EUA), tendo como acessório um leitor de transparência que permitiu a varredura da imagem e a digitalização dos filmes radiográficos. Foi colocada uma régua milimetrada junto às radiografias no momento da captura das imagens. As radiografias, juntamente com a régua milimetrada, foram digitalizadas de forma padronizada: sempre na mesma posição de escaneamento, sem mudança na configuração do scanner, e sem

desligar e ligar o aparelho entre os escaneamentos. A imagem da régua foi utilizada como referência de uma medida conhecida, no momento da calibração da magnificação da imagem, realizada pelo programa Image J® (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). As imagens foram escaneadas com 300 dpi (dots per inch: pontos por polegada) e 24 bits e salvas no formato JPEG com máxima qualidade. Estas imagens foram, então, transmitidas para a memória do computador, onde foi realizada a mensuração linear supero-inferior e antero-posterior das radiografias periapicais, utilizando como limite os pontos de maior extensão da lesão periapical (APÊNDICE E) (Figura 24).

Após a tabulação dos dados, todas as medidas foram submetidas à análise estatística pelo teste one-way ANOVA e análises de correlação de *Pearson*, obtendo os respectivos coeficientes de correlação para testar resultados comparativos entre os exames.

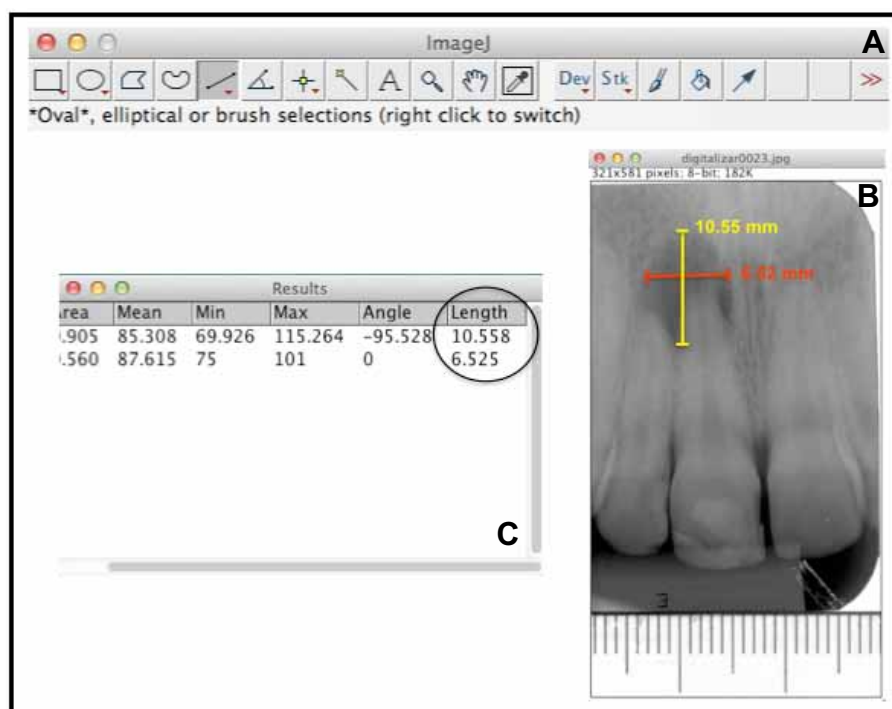


Figura 24 – Imagem do software Image J®. A) barra de ferramentas do programa; B) radiografia periapical digitalizada juntamente com a régua milimetrada para padronização das medidas; C) resultados expressos em milímetros.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Monitoramento do tratamento endodôntico e efetividade das diferentes medicações intracanais na desinfecção dos canais radiculares em dentes com infecção endodôntica primária

O crescimento de microrganismos anaeróbios e facultativos foi verificado em 96,6% das amostras iniciais coletadas (29/30) (Figura 25). Na tabela 2 pode-se verificar a prevalência destes microrganismos na coleta inicial (1ª coleta), mostrando redução nas etapas seguintes. Após o preparo biomecânico utilizando hipoclorito de sódio 2,5% (2ª coleta), observou-se ausência de crescimento microbiano em dezenove casos (19/30 – 63,3%).

Na segunda sessão, 14 dias após a colocação de diferentes medicações intracanais (3ª coleta), houve ausência de crescimento microbiano em 14/30 dentes (46,66%).

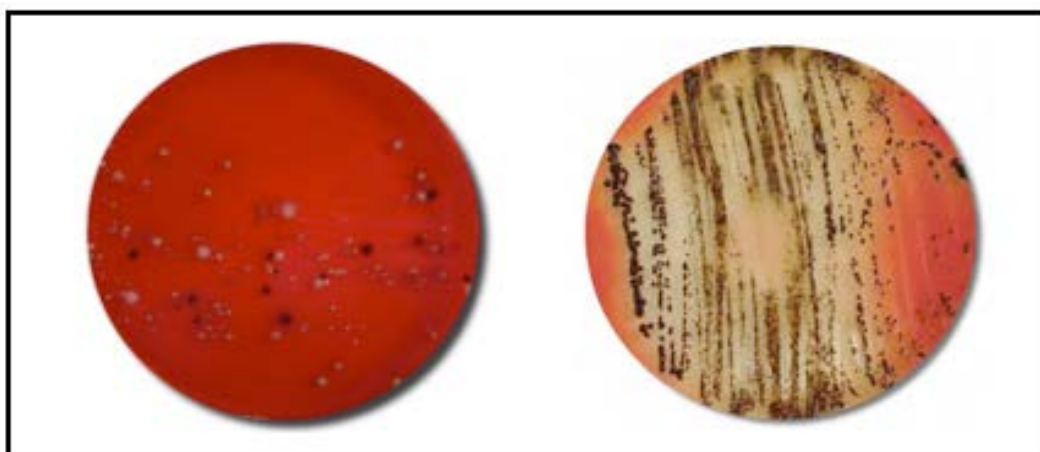


Figura 25 – Imagens ilustrando placas onde, após semeadura do conteúdo do canal, observou-se crescimento bacteriano de microrganismos anaeróbios e facultativos pelo método de cultura microbiológica.

Na tabela 1 é possível observar a redução de microrganismos após o uso do hipoclorito de sódio 2,5% como solução irrigadora e após o uso de diferentes medicações intracanáis quando comparado com o número inicial obtido a partir da 1ª coleta. Pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos após o uso de  $\text{Ca(OH)}_2$  + SS,  $\text{Ca(OH)}_2$  + GEN e  $\text{Ca(OH)}_2$  + CLX como medicações intracanáis.

Tabela 1 – Porcentagens e números de microrganismos anaeróbios e facultativos nas coletas realizadas antes e após PBM e após uso da MIC de 30 canais radiculares de dentes com necrose pulpar e lesão periapical

Coletas	Grupos			
	$\text{Ca(OH)}_2$ + SS	$\text{Ca(OH)}_2$ + GEN	$\text{Ca(OH)}_2$ + CLX	
<b>1ª</b>	Nº total de casos	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
	Casos positivos	9 (96,6%)	10 (100%)	10 (100%)
	Casos negativos	1 (3,4%)	0	0
	<b>Coleta</b> Mediana UFC/mL	$4,5 \times 10^9$	$8,4 \times 10^9$	8720
	Range*	$(0 - 6,58 \times 10^6)$	$(7,68 \times 10^3 - 8,16 \times 10^6)$	$(8,4 \times 10^2 - 5,12 \times 10^6)$
	Letras**	Aa	Aa	Aa
<b>2ª</b>	Nº total de casos	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
	Casos positivos	5 (50%)	3 (30%)	3 (30%)
	Casos negativos	5 (50%)	7 (70%)	7 (70%)
	<b>Coleta</b> Mediana UFC/mL	10	0	0
	Range*	$(0 - 2,2 \times 10^3)$	$(0 - 40)$	$(0 - 5,92 \times 10^3)$
	Letras**	Ab	Ab	Ab
<b>3ª</b>	Nº total de casos	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
	Casos positivos	5 (50%)	5 (50%)	6 (60%)
	Casos negativos	5 (50%)	5 (50%)	4 (40%)
	<b>Coleta</b> Mediana UFC/mL	20	10	170
	Range*	$(0 - 1 \times 10^3)$	$(0 - 1,28 \times 10^3)$	$(0 - 2,52 \times 10^3)$
	Letras**	Ab	Ab	Ab

\* Valores máximos e mínimos

\*\* Letras maiúsculas significam diferenças inter-grupos; letras minúsculas significam diferenças intra-grupos.

A figura 26 ilustra a redução de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) na 1ª, 2ª e 3ª coletas nos diferentes grupos experimentais.

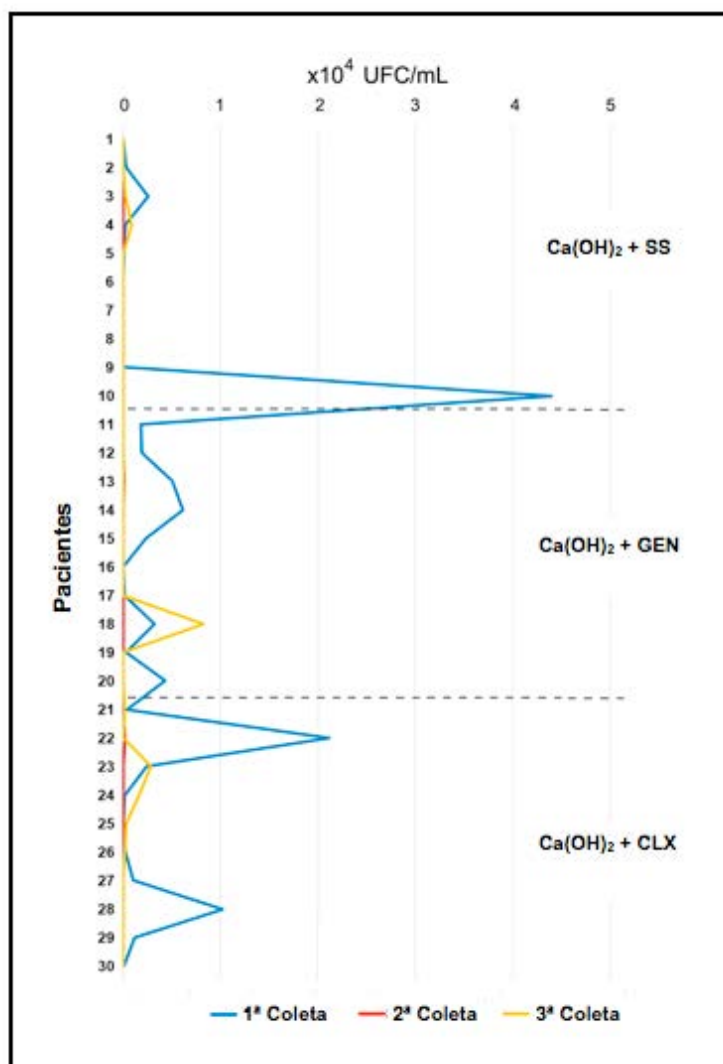


Figura 26 – Redução de UFC/mL nos diferentes tempos de coleta (1ª coleta – após abertura coronária, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de MIC) em 30 dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical.

A tabela 2 mostra a redução de endotoxinas da 2ª e 3ª coletas comparando-as à coleta inicial (1ª coleta) e também comparando redução da 3ª coleta em relação a 2ª coleta de 30 canais radiculares portadores de necrose pulpar e presença de lesão periapical.

Tabela 2 – Redução dos níveis de endotoxinas (mediana e range) de 30 canais radiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical

Coletas		Grupos		
		Ca(OH) <sub>2</sub> + SS	Ca(OH) <sub>2</sub> + GEN	Ca(OH) <sub>2</sub> + CLX
1 <sup>a</sup> Coleta	Mediana EU/mL	15,41	8,76	14,2
	Range*	(5,95 – 93)	(1,75 – 65.6)	(4,65 – 149)
	Letras**	Aa	Aa	Aa
2 <sup>a</sup> Coleta	Mediana EU/mL	1,55	1,74	5,11
	Range*	(0 – 3,59)	(0 – 7,92)	(0 – 42,2)
	Letras**	Ab	Ab	Bb
3 <sup>a</sup> Coleta	Mediana EU/mL	0,99	2,08	4,96
	Range*	(0,70 – 1,92)	(0,59 – 14,2)	(2,64 – 25)
	Letras**	Ab	Ab	Bb

\* Valores máximos e mínimos

\*\* Letras maiúsculas significam diferenças inter-grupos; letras minúsculas significam diferenças intra-grupos.

A figura 27 ilustra os níveis de endotoxinas após a abertura coronária (1<sup>a</sup> coleta), após PBM (2<sup>a</sup> coleta) e após o uso das diferentes MIC (3<sup>a</sup> coleta).

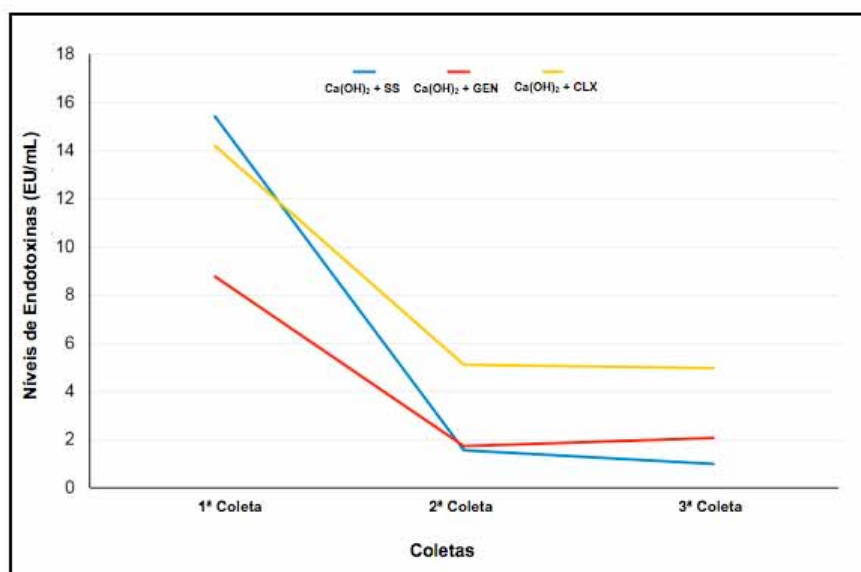


Figura 27 – Níveis de endotoxinas (EU/mL) nos diferentes tempos de coletas, para cada grupo experimental.

Analisando a tabela 2 e a figura 28, é possível verificar que houve redução dos níveis de endotoxinas após PBM utilizando hipoclorito de sódio 2,5% como solução irrigadora. No entanto, pode-se observar que houve diferença estaticamente significativa entre os grupos de MIC, sendo que  $\text{Ca(OH)}_2 + \text{CLX}$  teve um menor índice de redução dos níveis de endotoxinas, tanto comparando com a coleta inicial quanto após o PBM.

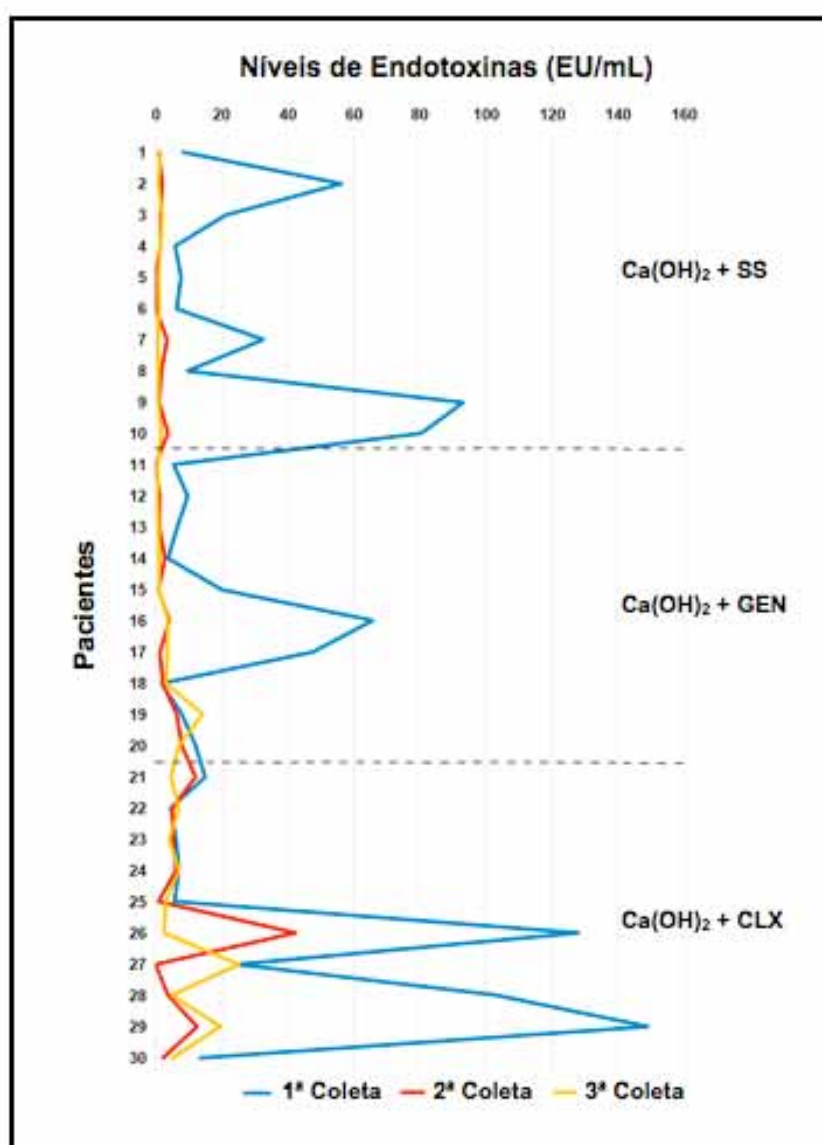


Figura 28 – Redução dos níveis de endotoxinas (EU/mL) nos diferentes tempos de coleta em dentes com infecção endodôntica primária.

## **5.2 Relação dos níveis de endotoxinas (EU/mL) e carga microbiana (UFC/mL) com sinais / sintomas clínicos e volumetria de destruição óssea periapical (mm<sup>3</sup>) utilizando TCFC**

As coletas foram realizadas em dentes unirradiculares superiores para padronização da volumetria utilizando como referência o plano da maxila. Os dentes tratados foram: dez incisivos centrais (10/24), seis incisivos laterais (6/24), três caninos (3/24) e cinco segundos pré-molares (5/24). Durante anamnese 8/24 relataram dor prévia.

Clinicamente foi observado 5/24 pacientes com dor à percussão, 2/24 pacientes com dor à palpação na região periapical, 7/24 pacientes com presença de fístula, 2/24 pacientes apresentavam exsudato e 8/24 pacientes não apresentavam qualquer tipo de sintomatologia no momento da coleta. Após análise clínica e radiográfica, foi verificada restauração definitiva adequada em 6/24 dentes, restauração provisória em 10/24 dentes, restauração deficiente em 3/24 dentes, 4/24 dentes cariados e 1/24 dente íntegro. Vale ressaltar, que apesar dos dentes apresentarem situações diferentes da coroa (restauração definitiva adequada, restauração provisória, restauração deficiente, dentes cariados e íntegros), quando aplicou-se o teste estatístico de Mann - Whitney, não verificou correlação entre a situação da coroa com carga microbiana e endotoxinas.

Ainda foi avaliado neste estudo a relação entre os níveis de endotoxinas e carga microbiana com a volumetria das lesões periapicais associadas a dentes com infecções primárias. Verificou-se que os volumes das lesões variavam entre 10 – 450 mm<sup>3</sup>, a quantidade de endotoxinas entre 1,75 e 128 EU/mL e carga microbiana entre  $3,2 \times 10^2$  –  $8,16 \times 10^6$  UFC/mL. Com a realização do teste de correlação de *Pearson*, pode-se observar que existe uma correlação positiva entre o volume das lesões periapicais e a quantidade de endotoxinas ( $p < 0.05$ ). Além disso, foi encontrada uma forte correlação entre microrganismos anaeróbios e



níveis de endotoxinas ( $p < 0.01$ ) em dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical (Figuras 29 e 30).

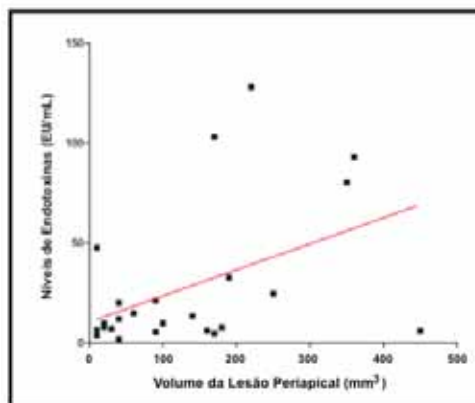


Figura 29 – Relação entre a volumetria das lesões periapicais e níveis de endotoxinas em dentes com infecção endodôntica primária.

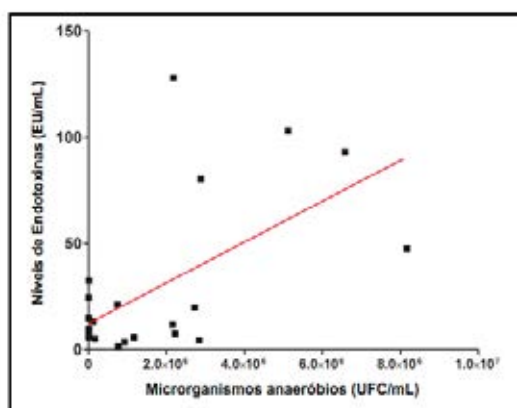


Figura 30 – Relação entre os níveis de endotoxinas e microrganismos anaeróbios em dentes com infecção endodôntica primária.

Analisando as figuras 29 e 30 pode-se observar que os pontos que se encontram próximo a linha mostram correlação positiva. Da mesma maneira, os pontos dispersos mostram fraca correlação.

Após realização do teste de correlação de *Pearson*, foi feito o teste de regressão linear simples, onde foi confirmada a forte correlação entre a concentração de endotoxina e volume de lesão periapical ( $R^2$  0.23,  $\beta$  0.16,  $P = 0.015$ ) verificada através da TCFC.

Ainda foi usado o teste one-way ANOVA para testar a possível associação entre sinais e sintomas clínicos com a volumetria da lesão periapical. Analisando a tabela 3 verifica-se que houve uma relação positiva entre volumetria da lesão periapical e dor prévia (P = 0.031).

Tabela 3 – Média e desvio-padrão da relação entre sinais e sintomas clínicos com a volumetria da lesão periapical.

Volumetria	Sinais e Sintomas Clínicos														
	Dor Prévia			Palpação			Percussão			Fistula			Exsudato		
	Sim	Não	P	Sim	Não	P	Sim	Não	P	Sim	Não	P	Sim	Não	P
Média	0.16	0.06	0.031	0.18	0.11	0.179	0.19	0.11	0.232	0.19	0.10	0.121	0.26	0.11	0.127
DP*	0.12	0.02		0.15	0.11		0.17	0.10		0.16	0.09		0.12	0.12	

\* Desvio-padrão

### 5.3 Relação dos níveis de endotoxinas (EU/mL) e microrganismos cultiváveis (UFC/mL) com sinais / sintomas clínicos e volumetria (mm<sup>3</sup>) de canais radiculares com infecção endodôntica primária

Os níveis de endotoxinas variaram entre 1,75 – 103 EU/mL, microrganismos cultiváveis entre  $1,16 \times 10^3$  –  $6,58 \times 10^6$  UFC/mL e volume dos canais radiculares entre 10 – 40 mm<sup>3</sup>.

Os dados de microrganismos cultiváveis obtidos foram transformados em log<sub>10</sub> para que obtivesse uma distribuição normal e fosse realizado o teste de correlação de *Pearson*. Não foram observadas relações entre o volume do canal radicular e as diferentes características clínicas avaliadas. Observou-se uma correlação positiva entre o volume do canal radicular e presença de microrganismos cultiváveis (r = 0,438; P = 0,038), mas não com os níveis de endotoxinas. Pelo teste de regressão linear simples foi confirmada a associação positiva entre volume do canal radicular e presença de microrganismos cultiváveis (R<sup>2</sup> 0.17, β 0.01, P = 0.043) (Figura 31).

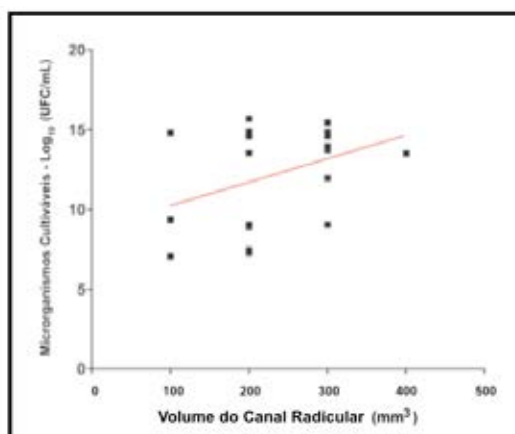


Figura 31 – Relação entre microrganismos cultiváveis e volumetria dos canais radiculares de 20 dentes com infecção endodôntica primária.

#### 5.4 Comparação das medidas das lesões periapicais utilizando TCFC em diferentes planos (longo eixo do dente e plano da maxila) com RP

Após realização do teste one-way ANOVA determinando as médias finais e feita a correlação de *Pearson*, pode-se observar que não há diferenças estatisticamente significantes quando comparamos medidas de segmentação 2D em tomografias, apresentando uma forte correlação entre o plano da maxila ou o longo eixo do dente tanto no sentido supero-inferior ( $r = 0,943$ ) quanto no sentido antero-posterior ( $r = 0,965$ ) (Figura 32).

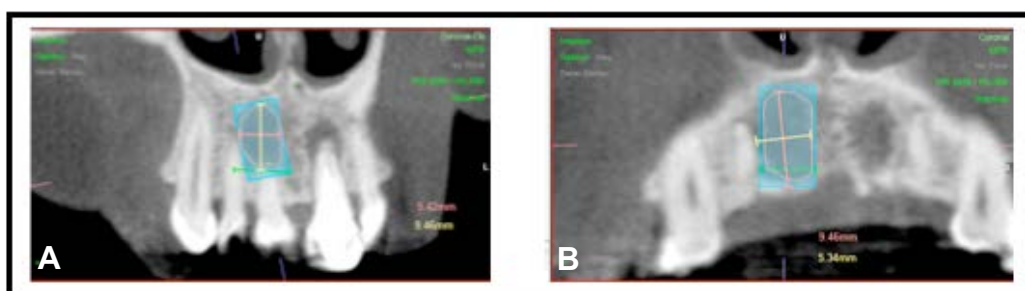


Figura 32 – Medidas de segmentação 2D realizadas nas TCFC no sentido supero-inferior e antero-posterior. A) longo eixo do dente; B) plano da maxila.

Da mesma forma, foi comparada as medidas de segmentação 2D entre as TCFC (plano da maxila e longo eixo do dente) e RP. No sentido antero-posterior, os resultados mostram que houve uma correlação boa na TCFC utilizando o plano da maxila ( $r = 0,832$ ) e longo eixo do dente ( $r = 0,917$ ). No sentido supero-inferior, os resultados mostram que houve uma correlação aceitável quando comparamos RP com TCFC tanto utilizando o plano da maxila ( $r = 0,794$ ) quanto o longo eixo do dente ( $r = 0,798$ ).

Tanto utilizando Coeficiente de *Pearson*, como one-way ANOVA demonstraram que não houve diferença significativa entre os métodos de detecção, e que esses métodos podem ser utilizados com a mesma equivalência.

Ao analisar as lesões periapicais utilizando a TCFC em 3D observou-se que dentes que apresentam uma lesão periapical relativamente pequena na RP, podem apresentar uma grande área de destruição óssea nas três dimensões da tomografia (Figura 33).

Quando analisada a volumetria da destruição óssea periapical utilizando os diferentes planos (plano da maxila e longo eixo do dente), verifica-se que não houve diferença estatisticamente entre as análises ( $P = 0,976$ ). Se olharmos o coeficiente de correlação, o valor é de 0,930, o que representa que 93% dos resultados são coincidentes.

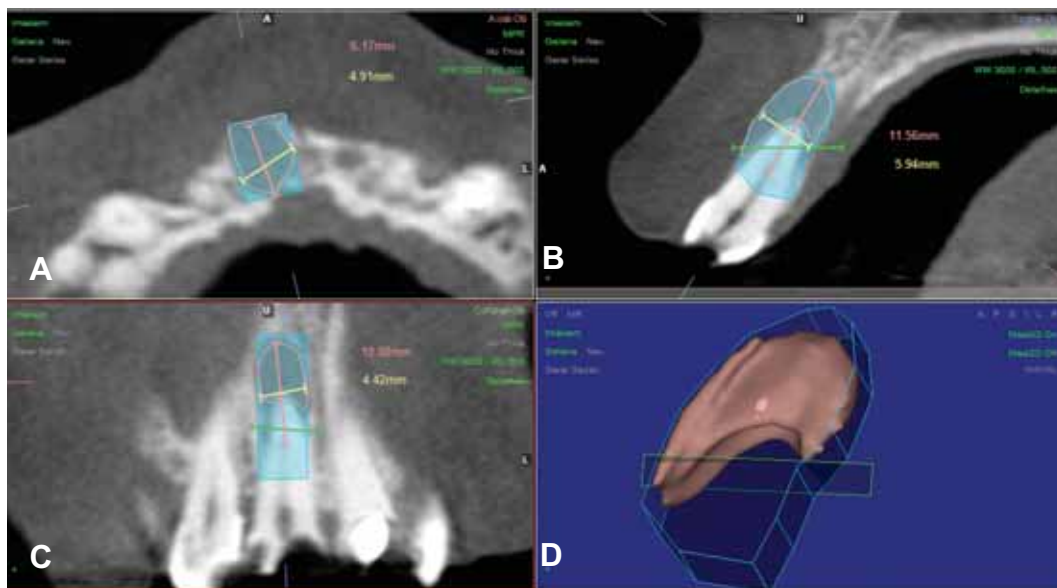


Figura 33 – Imagem de tomografia 3D ilustrando a lesão periapical nos três cortes. A) axial; B) sagital; C) coronal; D) formação 3D da lesão periapical.

## 6 DISCUSSÃO

Segundo Sundqvist et al. (1998), dois fatores são essenciais no prognóstico dos tratamentos endodônticos: a presença de infecção no momento da obturação e o tamanho da lesão periapical. Assim, neste estudo procurou-se avaliar estes dois fatores. Para avaliar a presença de infecção, realizou-se a cultura microbiológica bem como a análise de endotoxinas, que é um lipopolissacarídeo presente nas bactérias anaeróbias Gram-negativas. E, para avaliar o tamanho da lesão, utilizou-se a análise tomográfica, quantificando o volume da destruição óssea periapical.

O método de cultura microbiológica foi usado a fim de identificar microrganismos viáveis no interior do canal radicular após a abertura coronária (1ª coleta), após o preparo biomecânico utilizando hipoclorito de sódio 2,5% (2ª coleta) e antes da obturação, após o uso de diferentes medicações intracanaís (3ª coleta).

As infecções endodônticas primárias são causadas por microrganismos que, inicialmente, invadem e colonizam o tecido pulpar necrosado (Siqueira, Roças, 2009). Caracterizam-se por uma infecção polimicrobiana com predominância de bactérias anaeróbias, variando de 10 a 30 espécies (Siqueira, Roças, 2005b), e número de células de  $10^2$  -  $10^8$  por canal radicular (Sundqvist, 1976; Sakamoto et al., 2007). No presente estudo, o conteúdo coletado do interior do canal radicular foi armazenado em VMGA III e, logo em seguida, semeado em placas contendo meio de cultura FAA para verificação de viabilidade de microrganismos anaeróbios e facultativos presentes nos canais radiculares. Apesar dos cuidados na preservação do conteúdo coletado, tanto no transporte, como na semeadura; é possível que muitas células

bacterianas, devido à alta sensibilidade ao oxigênio não tenham sobrevivido, e, a quantificação dos anaeróbios, principalmente, possa ser na realidade maior. Apesar disto, verificou-se que na coleta inicial (1ª coleta) houve crescimento de microrganismos viáveis em 96,6% (29/30) dos casos com número de células bacterianas variando de 0 –  $8,16 \times 10^6$  UFC/mL, confirmando que os dentes necessitavam de tratamento endodôntico e que havia presença de infecção no SCR. É provável que, o não crescimento em uma amostra dos casos selecionados (1/30) deve-se a infecção existente ser de microrganismos sensíveis à presença de oxigênio e de difícil crescimento em placas de ágar; sendo que estes microrganismos poderiam ser facilmente detectados por métodos moleculares (Pinheiro et al., 2003) que, por serem mais sensíveis, podem detectar DNA bacteriano mesmo em quantidades mínimas (Jacinto et al., 2003). Além de serem oxigênio sensitivos e fastidiosos, requerendo condições especiais de cultivo, as bactérias anaeróbias são mais sensíveis à manipulação, contribuindo para perda destes microrganismos durante o processamento da amostra. No entanto, detectou-se crescimento de bactérias acima de 90%, semelhante a Chung (2011), que também detectou a presença de microrganismos anaeróbios em 85,02% e Fabricius et al. (1982), que verificaram predomínio de anaeróbios em infecções endodônticas primárias. Fatores como a disponibilidade de nutrientes, a baixa tensão de oxigênio e as interações entre os microrganismos favorecem a seleção de bactérias anaeróbias para que estas colonizem não somente a luz do canal principal, mas todo SCR (Sundqvist, 1992; Seltzer, Farber, 1994).

Ao realizar o preparo biomecânico do canal radicular verificou-se diminuição significativa dos microrganismos presentes. Esta redução refere-se a ação mecânica dos instrumentos e as ações física e química do NaOCl. O hipoclorito de sódio, ao entrar em contato com matéria orgânica, ou seja, com a célula bacteriana, forma ácido hipocloroso, que libera cloro nascente, o qual se liga ao grupamento

amina (NH) dos aminoácidos, formando cloraminas, interferindo no metabolismo celular e inibindo a função enzimática bacteriana à partir de uma oxidação irreversível dos grupos SH (sulfidril) de enzimas bacterianas essenciais (Haapasalo et al., 2014). Desta forma, após a utilização do NaOCl 2,5% pode-se verificar diminuição de microrganismos em 63,3% (19/30) dos casos, com número de células bacterianas variando de 0 –  $5,92 \times 10^3$  UFC/mL. Esta redução se deve a ação conjunta do PBM e da solução de NaOCl, uma vez que Bystrom e Sundqvist (1981) demonstraram que a instrumentação mecânica por si só pode reduzir o número de bactérias presentes em canais radiculares somente em 50% necessitando assim, estar associada com o uso de soluções irrigadoras. Enquanto que, Kuruvilla e Kamath (1998) obtiveram valores de redução de 59,4% utilizando o hipoclorito de sódio 2,5% em infecções endodônticas primárias, e Martinho e Gomes (2008) obtiveram diminuição de microrganismos anaeróbios em todas as amostras, mas eliminação somente em 5/24 casos, obtendo valores de eliminação de 20%. Os resultados do presente estudo foram superiores aos citados acima. Provavelmente, isto se deve ao uso do NaOCl associado à instrumentos rotatórios. Os instrumentos rotatórios Mtwo, são eficientes na limpeza de canais radiculares, devido ao seu “design”, uma vez que suas arestas de corte, facilitam a eliminação de detritos do interior dos canais radiculares (Burklein et al., 2011), com isto, melhorando a ação da solução irrigadora utilizada durante o preparo.

Após ação de diferentes MIC (3ª coleta) verificou-se que ainda havia crescimento de microrganismos. Estes resultados evidenciam que ainda não existe uma técnica operatória considerada ideal no combate à infecção no interior do SCR. Independente da MIC utilizada, observando as tabelas 1 e 2, é possível verificar que houve crescimento microbiano em 53,3% (16/30) dos dentes, sendo que nos grupos  $\text{Ca(OH)}_2$  + SS e  $\text{Ca(OH)}_2$  + GEN houve redução de 50% (5/10) e no grupo  $\text{Ca(OH)}_2$  + CLX houve redução de 40% (4/10). Desta maneira, ao avaliar a ação da



MIC, esta não foi capaz de reduzir significativamente quantidade de microrganismos em comparação ao PBM. Esses microrganismos que cresceram após o uso da MIC, deveriam estar localizados no interior dos túbulos dentinários e ramificações do canal radicular onde, provavelmente, as condições locais são mais favoráveis ao seu desenvolvimento. Além disso, em alguns espécimes, pôde ser observado aumento de UFC/mL após a remoção das diferentes MIC, sendo este aumento observado em três casos do grupo  $\text{Ca(OH)}_2$  + SS, cinco casos do grupo  $\text{Ca(OH)}_2$  + GEN e seis casos do grupo  $\text{Ca(OH)}_2$  + CLX. Nota-se também que, independentemente da MIC utilizada, 13/30 casos apresentaram crescimento microbiano onde logo após o PBM, os microrganismos haviam sido eliminados (pacientes 1, 2, 3, 13, 14, 17, 18, 20, 21, 23, 26, 28 e 30). Isto indica que bactérias permaneceram viáveis dentro dos túbulos dentinários durante todo o tratamento ressaltando assim, a dificuldade de eliminação destes microrganismos. De acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que a utilização da MIC não interferiu significativamente na quantidade de UFC/mL. A sobrevivência destes microrganismos, seguida pela sua multiplicação após o uso da MIC, significam que esses microrganismos invadiram os túbulos dentinários protegendo-se da ação da solução irrigadora e que, num segundo momento, o medicamento pode ter sido inativado pela dentina (George et al., 2005).

Estudos mostram que a baixa solubilidade e difusibilidade do  $\text{Ca(OH)}_2$ , bem como a capacidade tampão na dentina, pode torná-lo difícil de atingir um pH capaz de eliminar bactérias localizadas no interior dos túbulos dentinários ou em variações anatômicas (Gomes et al., 2003). Ainda relata que a difusão dos íons com carga negativa, como a hidroxila ( $\text{OH}^-$ ), pode ser inibida pela capacidade tampão, pela adsorção e pela carga da dentina. A capacidade tampão ocorre quando doadores de prótons de camada hidratada da hidroxiapatita fornecem prótons adicionais com o objetivo de manter o pH da dentina inalterado. Uma vez

que esses íons hidroxila, além de serem responsáveis pelo aumento do pH são também oxidantes sobre microrganismos (Siqueira, Lopes, 1999), ao serem inibidos, a eficácia antimicrobiana do  $\text{Ca(OH)}_2$  pode ter sido parcialmente diminuída, explicando a persistência de microrganismos mesmo após o uso da MIC. Desta maneira, acreditava-se que a associação com outro medicamento poderia potencializar a ação do  $\text{Ca(OH)}_2$ , complementando o efeito antimicrobiano; porém não foi alcançada.

A clorexidina (CLX) é uma biguanida catiônica que adsorve à superfícies recobertas com proteínas ácidas, como a hidroxiapatita, e é gradualmente liberada na forma de um cátion ativo (substantividade) (Souza et al., 2012), justificando seu uso neste estudo. Entretanto, sua excelente atividade antimicrobiana é conseguida entre pH 5,5 – 7,0 (Athanassiadis et al., 2007). Portanto, é provável que a alcalinização do pH através da adição de  $\text{Ca(OH)}_2$  irá levar à precipitação de moléculas de CLX, diminuindo assim sua eficácia (Mohammadi, Abbott, 2009). Desta forma, explica-se o resultado do grupo  $\text{Ca(OH)}_2$  + CLX que não apresentaram melhores resultados nesta pesquisa (3ª coleta: 0 – 2520 UFC/mL). No estudo de Haenni et al. (2003) não foi possível demonstrar qualquer efeito antibacteriano adicional por misturar  $\text{Ca(OH)}_2$  com CLX relatando que a CLX apresentou uma reduzida ação antibacteriana, concordando com este trabalho.

O extrato glicólico de gengibre já foi utilizado na odontologia em estudos *in vitro* e *in vivo*. Estudos realizados por nossa equipe (Cardoso, 2011; Chung, 2011; Maekawa et al., 2013; Valera et al., 2014) obtiveram resultados interessantes e promissores deste extrato sobre microrganismos e endotoxinas. Neste estudo, pôde-se comprovar sua efetividade uma vez que apresentou resultados semelhantes à outros medicamentos utilizados como MIC. Sua ação satisfatória sobre microrganismos ainda não foi bem elucidada na literatura. Estudos

indicam que os óleos voláteis gingerol e shogaol, parecem ser os responsáveis pela ação benéfica deste rizoma (Lantz et al., 2007).

Avaliando o efeito das MIC sobre a microbiota do canal radicular, observa-se que a mesma não mostrou melhora na redução destes microrganismos. Entretanto, vale ressaltar que, embora a MIC não tenha mostrado melhoras na redução dos microrganismos do canal radicular, e que casos com ausência de microrganismos após o PBM, com o uso da MIC voltaram a ter bactérias, isto não inviabiliza o uso da MIC, uma vez que estes microrganismos estavam presentes no SCR que pode estar comunicando com áreas de reabsorção externa, mantendo a infecção periapical. Assim, o PBM eficaz com o uso de soluções antimicrobianas, associado ao uso de MIC capaz de se difundir no SCR e áreas de reabsorção pode favorecer a máxima eliminação dos microrganismos do SCR.

Quanto às endotoxinas, na etapa inicial (1ª coleta), verificou-se de 1,75 – 149 EU/mL em 30 dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical. Dwyer e Torabinejad (1981) já relacionavam as endotoxinas com a iniciação e perpetuação de lesões periapicais uma vez que elas induzem reação inflamatória aguda e reabsorção óssea pela estimulação de atividade osteoclástica (Pitts et al., 1982). Após preparo biomecânico (2ª coleta), verificou-se redução dos níveis de endotoxinas variando de 0 – 42,2 EU/mL. Esses resultados concordam com estudos anteriores que mostram que o NaOCl auxilia na redução das endotoxinas (Martinho, Gomes, 2008; Xavier et al., 2013). Jacinto et al. (2005) e Gomes et al. (2009) redução do conteúdo de endotoxina em 50% usando instrumentação convencional associada ao NaOCl 2,5% e 98% utilizando instrumentos rotatórios (Martinho et al., 2010). Os resultados destes estudos e do presente trabalho, mostram que somente o hipoclorito de sódio tem pouco efeito na redução de endotoxinas.

Após a MIC (3ª coleta) verificou-se diminuição dos níveis de endotoxinas. Todas as MIC utilizadas neste estudo estavam

associadas ao  $\text{Ca(OH)}_2$ , bastante conhecido na literatura por ser capaz de neutralizar endotoxinas. A neutralização do lipídio A, parte tóxica da endotoxina, ocorre por substâncias alcalis, que removem ésteres de ácidos graxos, alterando a conformação química da macromolécula de LPS (Safavi, Nichols, 1994). A utilização do  $\text{Ca(OH)}_2$  foi capaz de diminuir níveis de endotoxinas, apresentando melhores resultados nos grupos  $\text{Ca(OH)}_2$  + SS (0,70 – 1,92 EU/mL) e  $\text{Ca(OH)}_2$  + GEN (0,59 – 14,2 EU/mL), apresentando diferença estatisticamente significativa com o grupo  $\text{Ca(OH)}_2$  + CLX (2,64 – 25 EU/mL) (tabela 2). No entanto, deve-se considerar que os níveis de endotoxina neste grupo antes do tratamento foram em média maiores que nos demais grupos.

Ainda, neste estudo, fez-se o uso de TCFC a fim de determinar a volumetria ( $\text{mm}^3$ ) da lesão periapical de 30 dentes com infecções endodônticas primárias, correlacionando o volume das lesões com os níveis de endotoxinas, carga microbiana e sinais e sintomas clínicos. Verificou-se que os volumes das lesões periapicais variaram entre 10 – 450  $\text{mm}^3$ , e os níveis de endotoxinas variaram de 1,75 – 128 EU/mL; apresentando uma forte correlação entre níveis elevados de endotoxinas e maior volume de radiolucência periapical. Diversos estudos (Horiba et al., 1991; Nelson-Filho et al., 2002) comprovaram a correlação entre quantidade de endotoxinas e tamanho de lesões periapicais, indicando que a quantidade de EU/mL é diretamente proporcional à reabsorção óssea. Além disso, foi verificado uma correlação positiva entre a presença de microrganismos anaeróbios e os níveis de endotoxinas. Isso pode ser explicado pelo fato das bactérias anaeróbias serem em grande número Gram-negativas e durante morte ou multiplicação celular, liberarem endotoxinas (lipopolissacarídeos). As endotoxinas estimulam células como macrófagos, neutrófilos e fibroblastos desencadeando a liberação de um grande número de mediadores químicos inflamatórios bioativos ou citocinas, que levam a reação inflamatória, imunológica e reabsorção óssea periapical (Mattison et al., 1987; Yamasaki et al., 1992;

Leonardo et al., 2004). Essa reação ocorre devido a uma ligação entre a endotoxina e o receptor CD-14 na superfície de monócitos e macrófagos, desencadeando liberação de citocinas, tais como IL-1, IL-6 e IL-8 (Matsushita et al., 1999), Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e metaloproteinases, que estão ligados à destruição da matriz extracelular e reabsorção óssea periapical, estimulando também terminações nervosas dos tecidos periapicais, conduzindo à dor (Seltzer, Farber, 1994; Leonardo et al., 2004). Isto explica a correlação positiva encontrada neste estudo entre volumetria da lesão e presença de dor prévia.

No entanto, não houve correlação entre volumetria da lesão periapical e outras sintomatologias, tais como dor a percussão, palpação, presença de fístula ou exsudato. Onze casos (pacientes 1, 2, 7, 8, 11, 12, 14, 16, 18, 21 e 24) que apresentavam restaurações deficientes, provisórias ou ainda tecido cariado, apresentavam alta quantidade de microrganismos anaeróbios facultativos (UFC/mL). Estes casos, estavam relacionados à dor prévia, ou à percussão, palpação, presença de fístulas ou exsudato purulento. No entanto, os casos considerados com restaurações adequadas também apresentavam dor prévia, a percussão ou presença de fístula. Desta forma, não foi verificada correlação entre as cavidades bem seladas com àquelas que apresentassem alguma infiltração microbiana ou exposição na cavidade bucal. Vários estudos indicaram que há uma relação entre a infecção polimicrobiana de canais radiculares, especialmente as espécies anaeróbicas Gram-negativas, e os sinais e sintomas clínicos como dor espontânea, sensibilidade à percussão, dor à palpação, edema e exsudato purulento (Haapasalo et al., 1986; Gomes et al., 2004). Entretanto, não se verificou estudos que correlacionassem volumetria da lesão com níveis de endotoxinas e sinais/sintomas clínicos. No presente estudo verificou-se correlação entre o volume da lesão, quantidade de endotoxinas e presença de dor prévia.

Entretanto, três pacientes apresentavam ausência de sintomatologia, restaurações provisórias, porém grande área de destruição óssea periapical e conseqüentemente altos níveis de endotoxinas (pacientes 17, 22 e 23).

Trabalhos evidenciaram que o uso da TCFC permite detectar radiolucência periapical antes que as mesmas sejam visíveis em radiografias convencionais (Lofthag-Hansen et al., 2007; Estrela et al., 2008; Paula-Silva et al., 2009). Alguns estudos têm mostrado que uma lesão periapical pode estar presente sem ser visível radiograficamente, uma vez que a imagem radiográfica corresponde a um aspecto em 2 dimensões de uma estrutura tridimensional (Bender, Seltzer, 1961; White et al., 1995). Lesões confinadas dentro do osso esponjoso pode não ser detectada, enquanto que lesões com envolvimento cortical vestibulo-lingual podem produzir áreas radiográficas distintas de rarefação. Para ser visível radiograficamente, uma radiolucidez periapical deve chegar cerca de 30% a 50% de perda óssea mineral (Bender, Seltzer, 1961). Outras condições, tais como variações morfológicas apicais em torno da densidade óssea, angulações de raios-X, e contraste radiográfico, também influenciam a interpretação radiográfica (Halse et al., 2002).

Um grande número de estudos com diferentes métodos diagnósticos têm avaliado o tipo e incidência de lesões periapicais (Nair et al., 1996; Laux et al., 2000; Simon et al., 2006). O consenso científico foi alcançado para o fato de que a periodontite apical é identificada com precisão por análise histológica (Laux et al., 2000). Por outro lado, foi demonstrado que a TCFC pode determinar diferenças de densidade, por exemplo entre o conteúdo da cavidade cística e do tecido granulomatoso, favorecendo a escolha para o diagnóstico não invasivo (Simon et al., 2006).

No entanto, poucos estudos compararam as diferenças de interpretação de imagens de lesões periapicais usando TCFC e RP convencional. TCFC tem proporcionado resultados promissores com uma

detecção mais precisa das lesões periapicais (Cotton et al., 2007; Lofthag-Hansen et al., 2007). Por outro lado, o conhecimento da presença e gravidade das periodontites apicais é muitas vezes baseada na RP, cuja precisão é questionável.

Observando os resultados no item 5.4, pode-se verificar que não houve diferenças estatisticamente significantes quando comparadas medidas de segmentação 2D entre TCFC e RP, havendo uma boa correlação quando comparado esses métodos no sentido antero-posterior na TCFC do plano da maxila ( $r = 0,832$ ) e longo eixo do dente ( $r = 0,917$ ). No sentido supero-inferior, os resultados também mostraram uma boa correlação quando comparado radiografia periapical e TCFC no sentido utilizando o plano da maxila como referência ( $r = 0,794$ ) e longo eixo do dente ( $r = 0,798$ ). Ainda não existe elucidado na literatura este tipo de avaliação, uma vez que as medidas das TCFC foram realizadas em 2 dimensões, ou seja, somente utilizando a imagem verificada nas radiografias periapicais. Quando analisada a imagem em 3D, observa-se que dentes que apresentam lesão periapical relativamente pequena na RP (< que 1 mm), apresentaram uma maior área de destruição óssea nas 3 dimensões da tomografia. Esses resultados corroboram com achados de Cotton et al. (2007), Lofthag-Hansen et al. (2007) e Estrela et al. (2008). Além disso, a quantidade de osso cortical e esponjoso, a espessura do osso, e a extensão de tridimensional da lesão pode apenas ser adequadamente interpretado nas TCFC (Estrela et al., 2008). Desta maneira, a utilização de imagens radiográficas convencionais para detecção de periodontites periapicais deve ser cuidadosa devido à grande possibilidade de diagnóstico ser falso negativo. Por outro lado, a grande vantagem do uso da TCFC em endodontia refere-se a sua utilidade em auxiliar na identificação de lesões periapicais e em um diagnóstico diferencial com uma técnica com alta precisão.

Finalizando, deve-se considerar que os benefícios da TCFC a tornaram uma das maiores evoluções tecnológicas alcançadas pela radiologia odontológica nos últimos anos. Apesar de possuir custo elevado, comparado aos exames radiográficos convencionais, os benefícios são excelentes devido a alta resolução das imagens obtidas, evitando falso diagnóstico que poderia resultar em erro no plano de tratamento (Patel et al., 2009; Cheng et al., 2011). No entanto, para boa utilização da TCFC, torna-se necessário um aprendizado técnico para operar o software.

Futuramente, outras pesquisas podem ser realizadas a fim de mostrar a preservação dos casos, ou seja, avaliar taxa de sucesso e insucesso utilizando TCFC.



## 7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e de acordo com as metodologias propostas neste estudo pode-se concluir que:

- a) O preparo biomecânico reduziu mas não eliminou os níveis de endotoxinas e microrganismos anaeróbios e facultativos; sendo que esta redução não ocorreu com o uso das medicações intracanaís;
- b) Houve correlação positiva entre elevados níveis de endotoxinas com maior volumes de lesões periapicais; presença de microrganismos anaeróbios e endotoxinas; maiores volumes de lesões periapicais e presença de dor prévia;
- c) Verificou-se uma correlação positiva entre a volumetria dos canais radiculares e presença de microrganismos cultiváveis;
- d) Houve uma boa correlação entre RP e TCFC quando utilizadas medidas em 2D. Houve uma ótima correlação quando comparadas TCFC medidas em 3D utilizando longo eixo do dente versus plano da maxila.

## 8 REFERÊNCIAS\*

Abella F, Patel S, Duran-Sindreu F, Mercade M, Bueno R, Roig M. An evaluation of the periapical status of teeth with necrotic pulps using periapical radiography and cone-beam computed tomography. *Int Endod J*. 2014 Apr;47(4):387-96.

Agarwal V, Lal P, Pruthi V. Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. *Mycopathologia*. 2008 Jan;165(1):13-9.

Aguiar APS, Caires LP, Maekawa LE, Valera MC, Koga-Ito CY. Avaliação in vitro da ação do extrato glicólico de gengibre sobre *Candida albicans*. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo*. 2009; 21(2):144-9.

Assed S, Ito IY, Leonardo MR, Silva LA, Lopatin DE. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. *Endod Dent Traumatol*. 1996 Apr;12(2):66-9.

Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J*. 2007 Mar;52(1 Suppl):S64-82.

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

Bender IB. Factors influencing the radiographic appearance of bony lesions. *J Endod*. 1997 Jan;23(1):5-14.

Bender IB, Seltzer S. Roentgenographic and direct observation of experimental lesions in bone: I. 1961. *J Endod*. 2003 Nov;29(11):702-6; discussion 701.

---

\* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2010 set; citado em 14 set.] Disponível em: [http://nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Blix IJ, Helgeland K. LPS from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and production of nitric oxide in murine macrophages J774. *Eur J Oral Sci*. 1998 Feb;106(1):576-581.

Bornstein MM, Lauber R, Sendi P, Von Arx T. Comparison of periapical radiography and limited cone-beam computed tomography in mandibular molars for analysis of anatomical landmarks before apical surgery. *J Endod*. 2011 Feb;37(2):151-7.

Bürklein S, Hiller C, Huda M, Schäfer E. Shaping ability and cleaning effectiveness of Mtwo versus coated and uncoated EasyShape instruments in severely curved root canals of extracted teeth. *Int Endod J*. 2011 May;44(5):447-57.

Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res*. 1981 Aug;89(4):321-8.

Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1983;55(3):307-12.

Cardoso FGR. Detecção da ação antimicrobiana e antiendotóxica do extrato glicólico de gengibre utilizado como substância química auxiliar durante o retratamento endodôntico [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

Cardoso FGR, Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CAT, Camargo CHR, et al. Avaliação do extrato glicólico de gengibre como solução irrigadora e medicação intracanal sobre microrganismos e endotoxinas [resumo PNc 057]. 27 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, Águas de Lindóia - SP - Brasil, *Braz Oral Res*; 2010.

Cheng L, Zhang R, Yu X, Tian Y, Wang H, Zheng G, Hu T. A comparative analysis of periapical radiography and cone-beam computerized tomography for the evaluation of endodontic obturation length. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Sep;112(3):383-9.

Chung A. Detecção de microrganismos, quantificação de endotoxinas e ação in vivo do *Zingiber officinale* em dentes com necrose pulpar e lesão periapical [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

Chung A, Maekawa LE, Valera MC, Jorge AOC, Oliveira LD, Carvalho CAT. Avaliação do hipoclorito de sódio e medicação intracanal do extrato glicólico de gengibre sobre microrganismos e sua endotoxina [resumo PNb 059]. 27 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica Águas de Lindóia - SP - Brasil, Braz Oral Res; 2010.

Cobankara F K, Ozkan H B, Terlemez A. Comparison of organic tissue dissolution capacities of sodium hypochlorite and chlorine dioxide. J Endod. 2010 Feb;36(2):272-4.

Conrads G, Gharbia SE, Gulabivala K, Lampert F, Shan HN. The use of a 16s rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. J Endod. 1997 Jul;23(7):433-8.

Cotton TP, Geisler TM, Holden DT, Schwartz SA, Schindler WG. Endodontic applications of cone-beam volumetric tomography. J Endod. 2007 Sep;33(9):1121-32.

Day AL, Langkamp HH, Bowen LL, Ascencio F, Agarwal S, Piesco NP. Signal transduction during LPS-mediated activation of pulp fibroblasts. J Dent Res. 1998;77:673.

Durack C, Patel S. Cone beam computed tomography in endodontics. Braz Dent J. 2012;23(3):179-91.

Dwyer TG, Torabinejad M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat. J Endod. 1981 Jan;7(1):31-5.

Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gui K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. J Endod. 2004 Feb;30(2):84-7.

Estrela C, Bueno MR, Leles CR, Azevedo B, Azevedo JR. Accuracy of cone beam computed tomography and panoramic and periapical radiography for detection of apical periodontitis. J Endod. 2008 Mar;34(3):273-9.

Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Möller AJR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. Scand J Dent Res. 1982 Apr;90(2):134-44.

Farber PA, Seltzer S. Endodontic microbiology. I. Etiology. J Endod. 1988 Jul;14(7):363-71.

Ficker C, Smith ML, Akpagana K, Gbeassor M, Zhang J, Durst T, et al. Bioassay-guided isolation and identification of antifungal compounds from ginger. *Phytother Res.* 2003 Sep;17(8):897-902.

Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol.* 2005 Oct;20(5):289-95.

Gomes BP, Ferraz CC, Garrido FD, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, et al. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. *J Endod.* 2002 Nov;28(11):758-61.

Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, et al. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol.* 2005 Aug;20(4):211-5.

Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod.* 2006 Oct;32(10):937-40.

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

Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, et al. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent.* 2009 Jan;37(1):76-81.

Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Apr;19(2):71-6.

Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J.* 2003 Apr;36(4):267-75.

Gomes BP, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, de 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 Oct;102(4):544-50.

Grégio AMT, Fortes ESM, Rosa EAR, Simeoni RB, Rosa RT. Ação antimicrobiana do *Zingiber officinale* frente à microbiota bucal. *Estud Biol*. 2006;28(62):61-6.

Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil J. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endod Top*. 2005 Jun;10:71-102.

Haapasalo M, Ranta H, Ranta K, Shah H. Black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. *Infect Immun*. 1986 Jul;53(1):149-53.

Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br Dent J*. 2014 Mar;216(6):299-303.

Halse A, Molven O, Fristad I. Diagnosing periapical lesions: disagreement and borderline cases. *Int Endod J*. 2002 Aug;35(8):703–9.

Hirsch E, Wolf U, Heinicke F, Silva MA. Dosimetry of the cone beam computed tomography Veraviewepocs 3D compared with the 3D Accuitomo in different fields of view. *Dentomaxillofac Radiol*. 2008 Jul;37(5):268–73.

Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1991 Apr;71(4):492-5.

Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H, et al. Cytotoxicity against various cell lines of lipopolysaccharides purified from *Bacteroides*, *Fusobacterium*, and *Veillonella* isolated from infected root canals. *J Endod*. 1989 Nov;15(11):530-4.

Indu M, Hatha A, Abirosh C, Harsha U, Vivekanandan G. Antimicrobial activity of some of the south-indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and *Aeromonas hydrophila*. *Braz J Microbiol*. 2006;37(2):153-8.

Ito HO, Shuto T, Takada H, Koga T, Aida Y, Hirata M. Lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* promote osteoclastic differentiation in vitro. *Arch Oral Biol*. 1996 May;41(5):439-44.

Jacinto RC, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some

isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 2003 Oct;18(5): 285-92.

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

Jiang J, Zuo J, Chen SH, Holliday LS. Calcium hydroxide reduces lipopolysaccharide-stimulated osteoclast formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Mar;95(3):348-54.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965 Sep;20:340-9.

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 May;91(5):587-93.

Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod*. 1998 Jul;24(7):472-6.

Lantz RC, Chen GJ, Sarihan M, Solyom AM, Jolad SD, Timmermann BN. The effect of extracts from ginger rhizome on inflammatory mediator production. *Phytomedicine*. 2007 Feb;14(2-3):123-8.

Laux M, Abbott PV, Pajarola G, Nair PNR. Apical inflammatory root resorption: a correlative radiographic and histological assessment. *Int Endod J*. 2000 Nov;33(6):483-93.

Leonardo MR. *Endodontia: Tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos*. São Paulo: Artes Médicas; 2005.

Leonardo MR, Silva RA, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *J Appl Oral Sci*. 2004 Jun;12(2):93-8.

Lofthag-Hansen S, Huuonen S, Grondahl K, Grondahl HG. Limited cone-beam CT and intraoral radiography for the diagnosis of periapical pathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod*. 2007 Jan;103(1):114-9.

Lopes HP, Siqueira Jr JF. *Endodontia: biologia e técnica*. Rio de Janeiro: Medsi; 2004.

Low KM, Dula K, Burgin W, Von Arx T. Comparison of periapical radiography and limited cone-beam tomography in posterior maxillary teeth referred for apical surgery. *J Endod.* 2008 May;34(5):557–62.

Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CAT, Camargo CHR, Koga-Ito CY. Avaliação dos extratos de própolis e de gengibre como medicação intracanal sobre endotoxinas em canais radiculares [resumo PNa 048]. 27 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica 2010; Água de Lindóia - SP - Brasil. *Braz Oral Res*; 2010.

Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CA, Camargo CH, Jorge AO. Effect of zingiber officinale and propolis on microorganisms and endotoxins in root canals. *J Appl Oral Sci.* 2013 Jan-Feb;21(1):25-31.

Martich GD, Boujoukos AJ, Suffredini AF. Response of man to endotoxin. *Immunobiology.* 1993 Apr;187(3-5):403-16.

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

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

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

Martinho FC, Leite FR, Nascimento GG, Cirelli JA, Gomes BP. Clinical investigation of bacterial species and endotoxin in endodontic infection and evaluation of root canal content activity against macrophages by cytokine production. *Clin Oral Investig.* 2014 Feb 13. [Epub ahead of print].

Matsushita K, Tajima T, Tomita K, Takada H, Nagaoka S, Torii M. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. *J Endod.* 1999 Dec;25(12):795-9.



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

McGurkin-Smith R, Trope M, Caplan D, Sigurdsson A. Reduction of intracanal bacteria using GT rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca(OH)<sub>2</sub>. *J Endod*. 2005 May;31(5):359-63.

Metska ME, Parsa A, Aartman IHA, Wesselink PR, Ozok AR. Volumetric changes in apical radiolucencies of endodontically treated teeth assessed by cone-beam computed tomography 1 year after orthograde retreatment. *J Endod*. 2013 Dec;39(12):1504-9.

Miller WD. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. *Dent. Cosmos*. 1894;36(7):505-28.

Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J*. 2009 Apr;42(4):288-302.

Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res*. 1981 Dec;89(6):475-84.

Munford RS, Hall CL. Detoxification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) by a human neutrophil enzyme. *Science*. 1986 Oct;234(4773):203-5.

Nair PNR, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996 Jan;81(1):93-102.

Nelson-Filho P1, Leonardo MR, Silva LA, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod*. 2002 Oct;28(10):694-6.

Nerwich A, Figdor D, Messer HH. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod*. 1993 Jun;19(6): 302-6.

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

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

Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Duarte MH, Ramos Fernandes LM, Camargo EJ, de Moraes IG, et al. The influence of cone-beam computed tomography and periapical radiographic evaluation on the assessment of periapical bone destruction in dog's teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Aug;112(2):272-9.

Park M, Bae J, Lee DS. Antibacterial activity of [10]-gingerol and [12]-gingerol isolated from ginger rhizome against periodontal bacteria. *Phytother Res*. 2008 Nov;22(11):1446-9.

Patel S, Dawood A, Whaites E, Pitt Ford T. The potential applications of cone beam computed tomography in the management of endodontic problems. *Int Endod J*. 2007 Oct;40(10):818–30.

Paula-Silva FW, Hassan B, Bezerra da Silva LA, Leonardo MR, Wu MK. Outcome of root canal treatment in dogs determined by periapical radiography and cone-beam computed tomography scans. *J Endod*. 2009 May;35(5):723-6.

Pauwels R, Beinsberger J, Collaert B, Theodorakou C, Rogers J, Walker A, et al. Effective dose range for dental cone beam computed tomography scanners. *Eur J Radiol*. 2012 Feb;81(2):267–71.

Pereira, A. Efeito do *Zingiber officinale* sobre o processo de reparo de lesões ulceradas na mucosa bucal de ratos - análise clínica e morfológica - Relatório apresentado ao PIBIC. Paraná: Pontifícia Universidade Católica do Paraná; 2002.

Pereira A, Grégio A, Barbosa A, Marques F, Lima A, Ribas M, editors. Estudo do efeito do gengibre no processo de cicatrização de úlceras na mucosa bucal de ratos [resumo Ib166]. *Pesqui Odontol Bras*; 2003.

Pessa M, Bardeli LS, Pinto CP, Brum R, Caldas DBM, Grégio AMT, et al., editors. Efeito do gel de gengibre e do peróxido de carbamida no processo de reparo de lesões ulceradas de mucosa oral de ratos - Análise histopatológica [resumo Ple 192]. *Braz Oral Res*; 2008.

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

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*. 2003 Jan;36(1):1–11.

Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am*. 1992 Aug;267(2):54-61.

Ruff ML, McClanahan SB, Babel BS. In vitro antifungal efficacy of four irrigants as a final rinse. *J Endod.* 2006 Apr;32(4):331-3.

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

Sakamoto M, Rocas IN, Siqueira Jr JF, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2006 Apr;21(2):112-122.

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

Salgado RJ, Moura-Netto C, Yamazaki AK, Cardoso LN, de Moura AA, Prokopowitsch I. Comparison of different irrigants on calcium hydroxide medication removal: microscopic cleanliness evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Apr;107(4):580-4.

Seltzer S, Farber PA. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994 Nov;78(5):634-45.

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 Feb;32(2):110-4.

Simon JHS, Enciso R, Malfaz JM, Rogers R, Bailey-Perry M, Patel A. Differential diagnosis of large periapical lesions using cone beam computed tomography measurements and biopsy. *J Endod.* 2006 Sep;32(9):833-7.

Siqueira Jr JF. Taxonomic changes of bacteria associated with endodontic infections. *J Endod.* 2003 Oct;29(10): 619-23.

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

Siqueira JF, Jr., Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* 1999 Sep;32(5):361-9.

Siqueira Jr JF, Rocas IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1 - current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod.* 2005 Jun;31(6):411-23.

Siqueira Jr JF, Jr. Rocas IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2 - Redefining the endodontic microbiota. *J Endod.* 2005 Jul;31(7):488-98.

Siqueira Jr JF, Rocas IN. Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Jun;107(6):870-8.

Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J.* 1997 Mar;30(2):91-5.

Souza M, Cecchin D, Farina AP, Leite CE, Cruz FF, Pereira Cda C, et al. Evaluation of chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. *J Endod.* 2012 Sep;38(9):1249-52.

Stavropoulos A, Wensel A. Accuracy of cone beam dental CT, intraoral digital and conventional film radiography for the detection of periapical lesions. An ex vivo study in pig jaws. *Clin Oral Investig.* 2007 Mar;11(1):101-6.

Sundqvist G. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps [dissertation]. Sweden: University of Umea; 1976.

Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod.* 1992 Sep;18(9):427-30.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral radiol Endod.* 1998 Jan; 85(1):86-93.

Tsai P, Torabinejad M, Rice D, Azevedo B. Accuracy of cone-beam computed tomography and periapical radiography in detecting small periapical lesions. *J Endod.* 2012 Jul;38(7):965-70.

Torabinejad M, Eby WC, Naidorf IJ. Inflammatory and immunological aspects of the pathogenesis of human periapical lesions. *J Endod.* 1985 Nov;11(11):479-88.

Valera MC, da Rosa JA, Maekawa LE, de Oliveira LD, Carvalho CA, Koga-Ito CY, et al. Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Oct;110(4):e70-4.

Valera MC, Maekawa LE, Chung A, Cardoso FG, Oliveira LD, Oliveira CL, et al. The effect of sodium hypochlorite and ginger extract on microorganisms and endotoxins in endodontic treatment of infected root canals. *Gen Dent J*. 2014 May-Jun;62(3):25-9.

Valera MC, Maekawa LE, de Oliveira LD, Jorge AO, Shygei E, Carvalho CA. In vitro antimicrobial activity of auxiliary chemical substances and natural extracts on *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Appl Oral Sci*. 2013 Mar-Apr;21(2):118-23.

Valera MC, Silva CK, Maekawa LE, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Camargo CH, et al. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. *J Appl Oral Sci*. 2009 Nov-Dec;17(6):555-9.

Van der Borden WG, Wang X, Wu MK, Shemesh H. Area and three dimensional volumetric changes of periapical lesions after root canal treatments. *J Endod*. 2013 Oct;39(10):1245-9

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

Wang CS, Arnold RR, Trope M, Teixeira FB. Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacteria. *J Endod*. 2007 Nov;33(11):1283-9.

White SC, Atchison KA, Hewlett ER, Flack VF. Efficacy of FDA guidelines for prescribing radiographs to detect dental and intraosseous conditions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995 Jul;80(1):108-14.

Yamasaki M, Nakane A, Kumazawa M, Hashioka K, Horiba N, Nakamura H. Endotoxin and gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. *J Endod*. 1992 Oct;18(10):501-4.

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

Zavistoski J, Dzink J, Onderdonk A, Bartlett J. Quantitative bacteriology of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1980 Feb;49(2):171-4.

## APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Caro(a) Senhor(a)



Eu, Marcia Carneiro Valera, professora Titular da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, portadora do CPF 039.137.548-22, estabelecido à Avenida Eng. Francisco José Longo, 777, na cidade de São José dos Campos-SP, telefone para contato (12) 3947 9048, sou responsável pela pesquisa cujo título é **“Microbiota endodôntica, quantificação de endotoxinas e sua correlação com sinais e sintomas em dentes com necrose pulpar e lesão periapical”**.

O objetivo deste estudo é avaliar a eficácia de soluções (Hipoclorito de sódio 2,5%) e medicamentos (hidróxido de cálcio, clorexidina gel 2% e extrato glicólico de gengibre 20%), que serão utilizados durante o tratamento endodôntico (tratamento de canal) com a finalidade de eliminar microrganismos e produtos destes microrganismos (neutralização de endotoxinas), responsáveis pelas falhas no tratamento endodôntico. Para esta avaliação, será coletado material do interior do canal dos dentes a serem tratados e, em seguida, em laboratório, o material coletado será submetido a análise, avaliando os microrganismos e seus produtos presentes nos canais radiculares; estes serão identificados e quantificados antes do tratamento endodôntico e após o uso dos medicamentos anteriormente citados.

O projeto não acarretará risco algum para o paciente uma vez que será realizado dentro das normas de biossegurança. Além disso, o protocolo de conduta adotado é o mesmo já utilizado na prática clínica odontológica desta faculdade. Serão necessários de 2 a 4 atendimentos (3 horas cada atendimento) até a conclusão do tratamento de canal. O paciente receberá número de telefone para entrar em contato em caso de dor e será atendido imediatamente. Os pacientes serão chamados para acompanhamento radiográfico após 1 ano do tratamento finalizado.

Se houver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética (CEP) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, situada na Av. Engº Francisco José Longo, 777 – CEP 12245000, em São José dos Campos-SP, fone 012-3947-9076, e-mail [janete@fosjc.unesp.br](mailto:janete@fosjc.unesp.br) e

comunique-se com a Coordenadora Profa.Dra. JANETE DIAS ALMEIDA. Informo que será garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela colaboração.

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Acredito ter sido esclarecido(a) a respeito das informações que leram para mim, descrevendo o estudo a ser realizado e concordo em receber atendimento em consultório odontológico. Declaro conhecer os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, e que minha participação não implicará em nenhuma despesa.

NOME/RESPONSÁVEL \_\_\_\_\_  
RG \_\_\_\_\_ CPF \_\_\_\_\_  
ENDEREÇO COMPLETO \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura Responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura Pesquisador

## **APÊNDICE B – Meio de Cultura**

### ***Fastidious Anaerobe Ágar* (FAA – Neogen Corporation, Michigan, USA)**

#### Preparo

Adicionar 23,0 g do pó em 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min e depois agitada. É esterilizada em autoclave a 121° C por 15 min e após resfriamento adicionado assepticamente 5% de sangue desfibrinado de carneiro.

#### Enriquecimento do Meio

Solução Vitamina K1 (1 mg/mL) Menadione, 25 g (Sigma-Aldrich, EUA)

Pesar 0,1 g de vitamina K1 e adicionar a um tubo contendo 100 mL de etanol absoluto. Armazenar o vidro em refrigerador, devidamente vedado e protegido da luz. Adicionar 1µL da solução a cada mL de meio produzido.



### Solução de Hemina (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA)

Dissolver 0,5 g de Hemina em 10 mL de hidróxido de sódio 1 N. Completar com água destilada até atingir 100 mL. Autoclavar a 121° C por 15 min. Adicionar 1µL da solução a cada mL de meio produzido.

### Armazenamento do meio preparado

O meio preparado deve ser armazenado em placas de petri por até 7 dias, em temperatura média de 4° C, fora do alcance de luz.

### APÊNDICE C – Realização da curva padrão

- A) Ver certificado para conferência do número do lote e quantidade de volume para endotoxina.
- B) Colocar a quantidade de água apirogênica (Lonza, Walkersville, MD, EUA) de acordo com as instruções do fabricante na endotoxina de *E. coli*, encontrado no kit fornecido pela empresa (Figura 9).

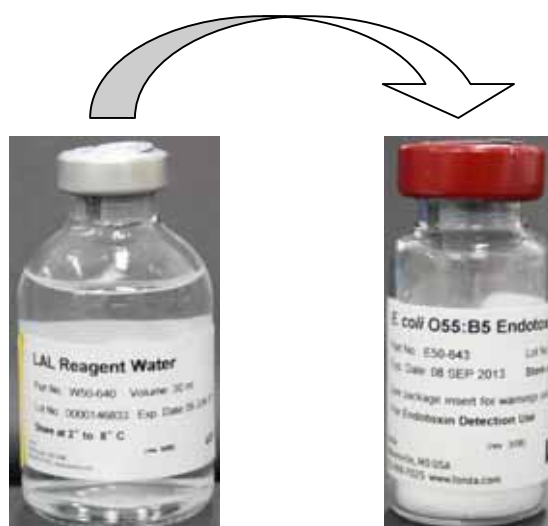


Figura 9 – Esquema para suspender endotoxina de *E. coli* utilizando água apirogênica.

- C) Agitar a suspensão durante 15 minutos.
- D) Separar 4 tubos de vidro apirogênicos, tamanho 13 mm x 100 mm (Lonza, Walkersville, MD, EUA), identificá-los de acordo com as diluições ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) e pipetar 900  $\mu\text{L}$  de água apirogênica em cada tubo de vidro (Figura 10).



Figura 10 – Tubos de vidro apirogênicos necessários para diluição da endotoxina.

E) Decorridos os 15 minutos, transferir 100  $\mu$ L da suspensão de endotoxina para o tubo “5” (referente à diluição  $10^{-1}$ ). Agitar 1 minuto, transferir 100  $\mu$ L para o próximo tubo “0,5” (referente à diluição  $10^{-2}$ ) e assim sucessivamente (Figura 11).

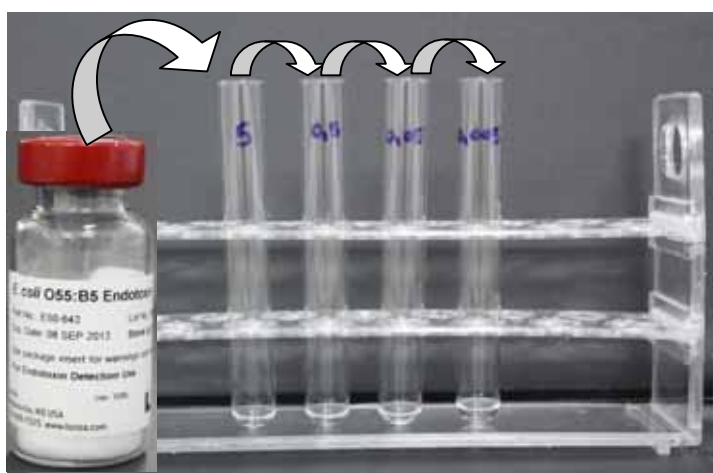


Figura 11 – Esquema de diluições da endotoxina para realização da curva padrão.

**APÊNDICE D – Ficha Clínica**

Nome: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ DENTE \_\_\_\_\_

**HISTÓRIA MÉDICA**

Estado de saúde geral:				
Medicamento em uso:				
<input type="checkbox"/> Diabete	<input type="checkbox"/> Hepatite	<input type="checkbox"/> Coração	Pressão:	<input type="checkbox"/> Sinusite
<input type="checkbox"/> Rim	<input type="checkbox"/> Alergia	<input type="checkbox"/> Úlceras	<input type="checkbox"/> Alcoolismo	<input type="checkbox"/> Fígado
<input type="checkbox"/> Doença mental	<input type="checkbox"/> Doenças sangue	<input type="checkbox"/> Outras		
Problemas com anestesia:				
Outros:				

**HISTÓRIA CLÍNICA**

Queixa principal:				
TIPO DE	<input type="checkbox"/> Provocada	<input type="checkbox"/> Espontânea	<input type="checkbox"/> Intermitente	<input type="checkbox"/> Contínua
DOR:	<input type="checkbox"/> Localizada	<input type="checkbox"/> Difusa		
Tomou analgésico ou outro medicamento?				
A dor cessa com analgésico?				
Dói a quanto tempo?				

**EXAME CLÍNICO LOCAL**

<input type="checkbox"/> Dente cariado	<input type="checkbox"/> Dente restaurado	<input type="checkbox"/> Edema	<input type="checkbox"/> Alteração de cor	<input type="checkbox"/> Mobilidade
<input type="checkbox"/> Fístula	<input type="checkbox"/> Extrusão	<input type="checkbox"/> Oclusão	<input type="checkbox"/> Problema periodontal	

**TESTES**

<input type="checkbox"/> Frio	<input type="checkbox"/> Calor	<input type="checkbox"/> Palpação	<input type="checkbox"/> Percussão
-------------------------------	--------------------------------	-----------------------------------	------------------------------------

**EXAME RADIOGRÁFICO**

Câmara pulpar:	Canal radicular:
----------------	------------------

Estruturas adjacentes:	Diagnóstico provável:
Tratamento indicado:	

**TRATAMENTO RADICAL**

Medida aparente do dente no RX inicial:
---

Canal	Ponto de Referencia	Comprimento real do instrumento ao ser retirado do canal:	Diferença entre ponta do instrumento ao ápice radicular:	Comprimento Real do canal (I.A.F.):	Comprimento de trabalho C.T. (I.A.I.):

Diâmetro do I.A.F. (n° do instrumento):
Diâmetro do I.A.I. (n° do instrumento):
Diâmetro cirúrgico do canal:
Escalonamento até:
Irrigação:
Curativo de demora:
Obturação (técnica e material):
Selamento:

DATA	TRATAMENTO	Visto Professor
OBS. Pós-operatória:		
Terapêutica sistêmica:		

**CONTROLES RADIOGRÁFICOS**

Data	Observações
1°	
2°	
3°	

## APÊNDICE E – Utilização do software Image J®

- A) Inicialmente todas as radiografias foram digitalizadas utilizando o scanner de mesa HP Scanjet 4050 (Hewlett Packard, Vancouver, WA, EUA), tendo como acessório um leitor de transparência que permitiu a varredura da imagem e a digitalização dos filmes radiográficos.
- B) Foi colocada uma régua milimetrada junto às radiografias no momento da captura das imagens. As radiografias, juntamente com a régua milimetrada, foram digitalizadas de forma padronizada: sempre na mesma posição de escaneamento, sem mudança na configuração do scanner, e sem desligar e ligar o aparelho entre os escaneamentos.

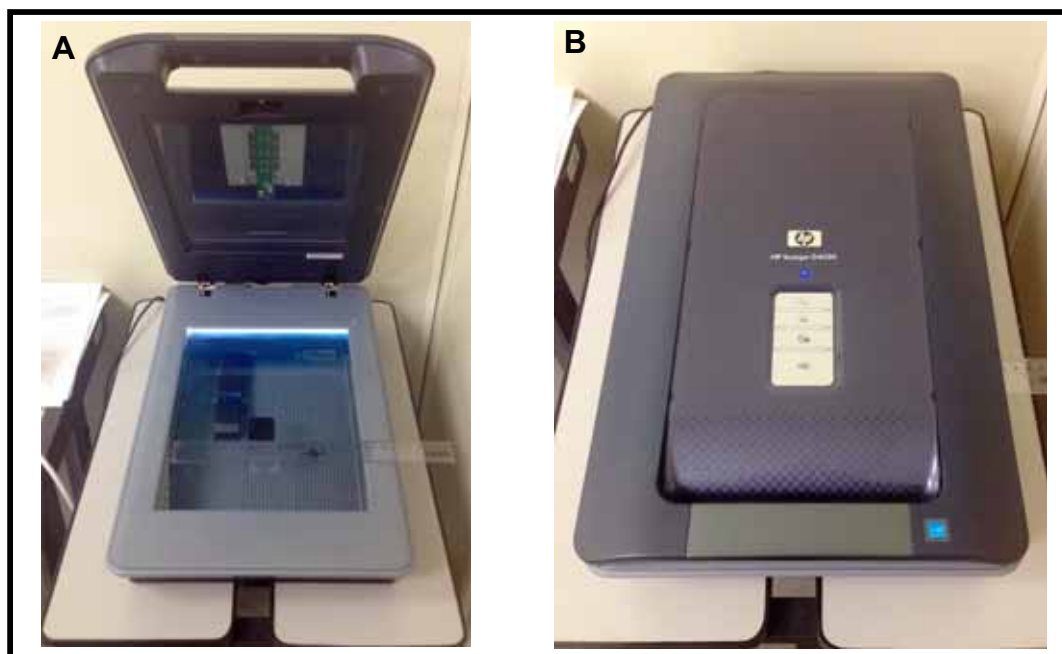


Figura 20 – Imagem do aparelho de scanner de mesa HP Scanjet 4050 utilizado. A) radiografia periapical juntamente com régua milimetrada para padronização de calibração; B) digitalização da radiografia periapical.

- C) As imagens digitalizadas foram transmitidas para a memória do computador, onde foi realizada a mensuração linear supero-inferior e antero-posterior das radiografias periapicais, utilizando como limite os pontos de maior extensão da lesão periapical utilizando o software Image J®.
- D) Para realizar as medições de forma padronizada, foi necessário padronizar a milimetragem no software Image J®: primeiramente deve-se abrir o arquivo com a radiografia periapical a ser avaliada.
- E) Certifique-se que a imagem esta sem escala. No menu *Analyze*, clique em *Set Scale*. Quando o diálogo aparecer, clique em *Remove Scale*. Depois feche o diálogo (Figura 21).

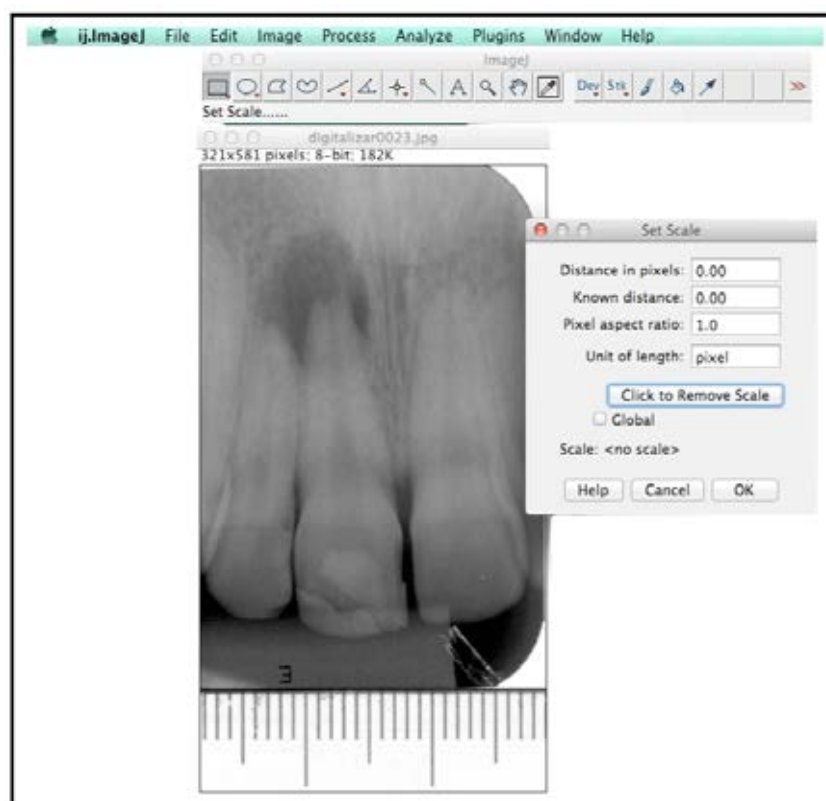


Figura 21 – Ilustração da imagem mostrando que a mesma esta sem escala no software Image J®.

- F) Use a ferramenta de medir linha para saber alguma distância em pixels. No exemplo, com auxílio da régua foi medido 5 mm. A

imagem irá aparecer abaixo do menu principal do image J®. Abra novamente o diálogo *Set Scale*, e a medida pré-estabelecida deve aparecer na primeira caixa de texto. Preencha as outras caixas de texto com as informações e clique ok (Figura 22).

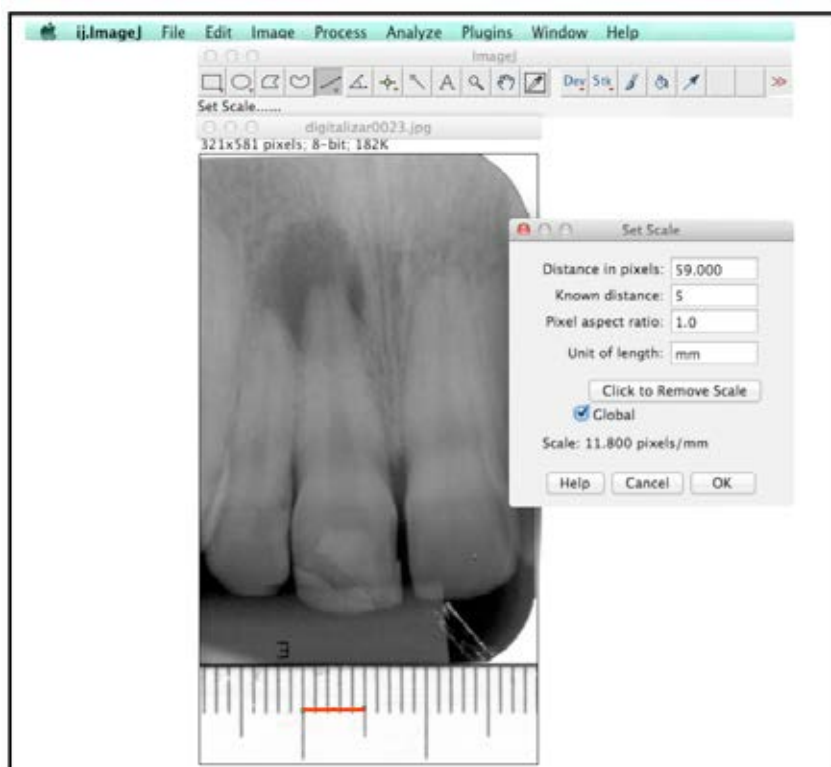


Figura 22 – Ilustração da imagem mostrando a calibração de pixels para milímetros no software Image J®.

- G) Note que o Image J® calculou a escala e colocou na parte de baixo do diálogo, na unidade milímetros. A partir desse ponto todas as medidas que o programa informar, estarão em milímetros.
- H) Realizar as medições no sentido supero-inferior e antero-posterior, utilizando como limites os pontos de maior extensão da lesão periapical (Figura 23).



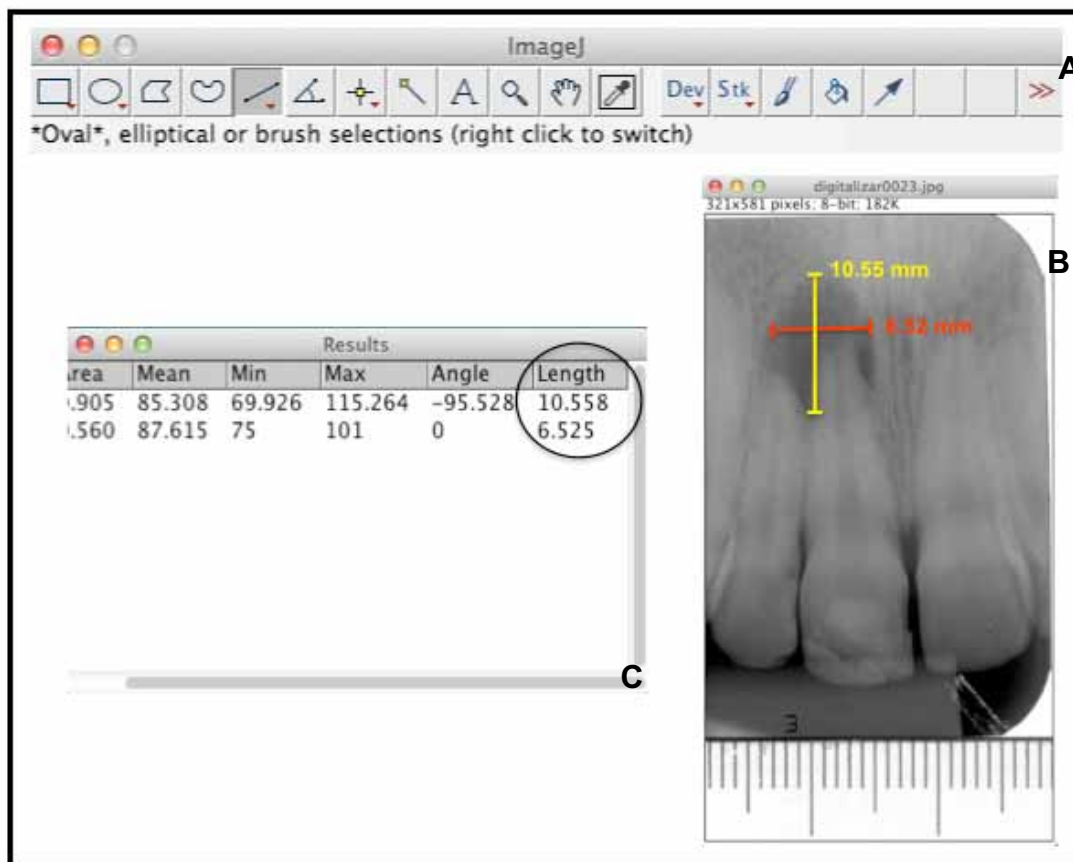


Figura 23 – Imagem do software Image J®. A) barra de ferramentas do programa; B) radiografia periapical digitalizada juntamente com a régua milimetrada para padronização das medidas; C) resultados expressos em milímetros.

## ANEXO A – Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE SÃO JOSÉ  
DOS CAMPOS-UNESP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** DETECÇÃO IN VIVO DE MICRORGANISMOS E QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINAS EM DENTES COM NECROSE PULPAR UTILIZANDO *Zingiber Officinallis* COMO MEDICAÇÃO INTRACANAL

**Pesquisador:** Marcia Carneiro Valera

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 09994512.8.0000.0077

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 179.380

**Data da Relatoria:** 11/12/2012

#### Apresentação do Projeto:

Trinta dentes unirradiculares com necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente serão submetidos a tomografia de feixe único (CT). Após, será realizado o tratamento endodôntico utilizando hipoclorito de sódio 2,5% como solução irrigadora e

divididos em 3 grupos de acordo com a medicação intracanal (MIC) utilizada: hidróxido de cálcio P.A. + solução salina fisiológica; extrato glicólico de gengibre 20% e hidróxido de cálcio P.A. + extrato glicólico de gengibre 20%. Serão realizadas coletas do canal radicular com cones de papel absorvente após a abertura coronária, após a instrumentação e, após 14 dias de ação da medicação intracanal. Para análise do conteúdo

microbiológico dos canais radiculares, será extraído o DNA de cada amostra e as mesmas serão analisadas a partir de sondas de DNA pelo método checkerboard e será realizada quantificação de microrganismos pelo método PCR em tempo Real. Além disso, 10 amostras serão clonadas e também seqüenciadas. Serão realizados os testes de avaliação da atividade antimicrobiana por cultura microbiológica e análise da quantidade de endotoxina verificada pelo lisado de amebócitos de *Limulus*. Serão ainda realizadas medidas das lesões periapicais com CT e o tamanho das lesões bem como os outros sinais e sintomas serão correlacionados com os níveis de endotoxinas. Os resultados serão submetidos à análise descritiva e estatística.

#### Objetivo da Pesquisa:

1) Conhecer o perfil microbiano envolvido nos canais radiculares de dentes com necrose pulpar e

**Endereço:** Av. Engº Francisco José Longo 777  
**Bairro:** Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000  
**UF:** SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS  
**Telefone:** (12-)3947-9078 **Fax:** (12-)3947-9010 **E-mail:** ceph@fosjc.unesp.br

FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE SÃO JOSÉ  
DOS CAMPOS-UNESP



lesão periapical, utilizando a técnica  $\mu$  multiplex -checkerboard hibridização DNA-DNA $\mu$ , para detecção de 40 espécies bacterianas; 2) Monitoramento genético do perfil infeccioso envolvido em dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical através da técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA nas diferentes fases da terapia endodôntica: coleta inicial (1ª coleta); após o preparo biomecânico com uso de hipoclorito de sódio 2,5% (2ª coleta) e após ação da medicação intracanal de hidróxido de cálcio (3ª coleta); 3) Quantificar as espécies e determinar a efetividade do preparo biomecânico (PBM) e medicações intracanaís (MIC) na redução microbiana das espécies pertencentes ao complexo nos canais radiculares através da técnica de PCR em Tempo Real (RT-PCR); 4) Avaliar a efetividade do preparo biomecânico e do uso de diferentes MIC na redução da carga microbiana infecciosa inicial presente nos canais radiculares através de contagem de colônias (UFC/mL); 5) Investigar e quantificar endotoxinas nas infecções endodônticas primárias; realizando monitoramento dos níveis de endotoxinas antes do tratamento, após o PBM e após o uso das MIC. 6) Correlacionar os níveis de endotoxinas com os níveis de destruição óssea periapical através do uso de tomografias de feixe único.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Não existe nenhum tipo de risco para os pacientes participantes da pesquisa, a não ser os riscos inerentes a realização de tratamento endodôntico.

Benefícios:

Ao paciente que se disponibilizar em participar da pesquisa será conferido o benefício de realização de tratamento endodôntico.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Demonstra ser uma pesquisa de relevância para a área da endodontia, considerando o detalhamento apresentado, a bibliografia apresentada e a metodologia proposta, bem como os critérios de inclusão e exclusão, além do benefício de tratamento aos participantes da pesquisa.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE encontra-se adequado, com utilização de termos técnicos seguidos de esclarecimentos de forma que o candidato consiga compreender o teor da pesquisa.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto de pesquisa aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Endereço:** Av. Engº Francisco José Longo 777  
**Bairro:** Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000  
**UF:** SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS  
**Telefone:** (12-)3947-9078 **Fax:** (12-)3947-9010 **E-mail:** ceph@fosjc.unesp.br

FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE SÃO JOSÉ  
DOS CAMPOS-UNESP



**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Colegiado concorda com o parecer do relator, aprovando o projeto

SAO JOSE DOS CAMPOS, 20 de Dezembro de 2012

---

**Assinador por:**  
**Denise Nicodemo**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Engº Francisco José Longo 777  
**Bairro:** Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000  
**UF:** SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS  
**Telefone:** (12-)3947-9078 **Fax:** (12-)3947-9010 **E-mail:** ceph@fosjc.unesp.br