



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

**EMANUEL DA SILVA ROVAI**

**ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA E NÍVEIS DE  
ENDOTOXINAS EM LESÕES ENDO-PERIODONTAIS**

2014

**EMANUEL DA SILVA ROVAI**

**ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA E NÍVEIS DE  
ENDOTOXINAS EM LESÕES ENDO-PERIODONTAIS**

Dissertação 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 obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, especialidade Endodontia.

Orientador: Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho

2014

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Adj. Cláudio Antônio Talge Carvalho (Orientador)**

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

**Prof. Assist. Dr. Eduardo Bresciani**

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos  
UNESP – Univ Estadual Paulista  
Campus de São José dos Campos

**Profa. Dr. Luis Gustavo Oliveira de Vasconcellos**

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos  
UNESP – Univ Estadual Paulista  
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 14 de novembro de 2014.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais Fernando Rovai e Roseli da Silva Rovai, que fizeram grandes sacrifícios na vida para criar, educar e dar bons valores para mim e meus irmãos.

Dedico à minha namorada Mariana por todo apoio, incentivo e paciência nas horas difíceis. Por toda sua companhia e amor. Nunca esquecerei todo o seu cuidado e carinho comigo.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP, ao Diretor, Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli e Vice-Diretor, Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora na pessoa da Coordenadora do Programa, Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera.

Ao meu orientador Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho, uma pessoa muito especial. Desde o começo se mostrou muito bondoso, amigo e um grande mestre. Aprendi muito com você, espero não ter te dado muito trabalho. Muito obrigado pela sua paciência e disposição.

À Titular Marcia Carneiro Valera, por toda a colaboração em minha pesquisa, pelos ensinamentos e também pelo meu acolhimento. A senhora sempre teve muita paciência e boa vontade de me ajudar. Sou eternamente grato.

Ao Prof. Frederico Martinho, por toda ajuda e colaboração nesta pesquisa.

Agradeço ao Prof. Assist. Dr. Warley David Kerbauy por toda sua ajuda neste processo e incentivo. Uma pessoa que eu admiro muito, como dentista, professor e ser humano. Sempre presente,

dedicado e atencioso. Sou também muito agradecido por todo conhecimento em que consegui absorver enquanto seu aluno.

À Profa. Ana Paula, por todo seu empenho, ajuda e amizade durante esse período.

À todos os professores do departamento de odontologia restauradora, pelo ótimo convívio.

Aos professores Eduardo Bresciani e Luis Gustavo Oliveira de Vasconcellos, por aceitarem participar da minha banca e por toda ajuda nesta importante etapa.

À Flávia Cardoso, por sua paciência e ajuda nos ensaios clínicos de endotoxinas. Uma pessoa muito bondosa e gentil. Sempre muito disposta a ajudar.

Ao Rafael Junqueira, que se tornou um grande amigo nessa jornada. Obrigado pela amizade, ajuda e colaboração durante todo o meu processo de aprendizado do mestrado.

Aos amigos e colegas da pós graduação por todo o convívio e amizade. Todos foram excelentes companheiros. Agradeço à Flávia T, Flávia L, Nádia, Rose, Monique, Camila, Rafaela, Tereza, Luciana, Gleyce, Ivany, Ana Cláudia e Cláudia Bin

À Universidade de Guarulhos, Profa. Luciene Figueiredo e à técnica Izilvânia Barreto por toda a ajuda, paciência e disposição na realização do teste microbiológico.

À Capes pelo auxílio financeiro durante o período de mestrado.

Aos pacientes que participaram da pesquisa, muito obrigado.

Aos meus avós que mesmo morando longe sempre me apoiaram. Amo vocês.

Aos meus irmãos Tiago, Felipe e Rebeca que estiveram em toda minha vida, cedendo toda a amizade e companheirismo.

Aos meus amigos Paulo Augusto, Renan Guimarães, Ewerton Bruzaferro, Andre Leite e Guilherme Xavier por todos os anos de amizade.

Agradeço aos técnicos das clínicas, Guilherme, Marcinha, Jaque, Jose e Fernanda.

Muito obrigado à todos que de alguma forma colaboraram para essa pesquisa e para o meu aprendizado.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
<b>2.1 Intercomunicação dos tecidos endodônticos e periodontais</b> ...	15
<b>2.2 Patogênese das doenças endo-periodontais</b> .....	18
<b>2.3 Classificação das lesões endo-periodontais</b> .....	21
<b>2.4 Microbiologia</b> .....	25
2.4.1 Microbiologia na doença periodontal.....	26
2.4.2 Microbiologia na endodontia.....	28
2.4.3 Microbiologia das lesões endo-periodontais.....	30
<b>2.5 Endotoxinas</b> .....	32
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	36
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
<b>4.1 População</b> .....	37
4.1.1 Critérios de inclusão.....	38
4.1.2 Critérios de exclusão.....	38
<b>4.2 Procedimentos clínicos e coleta microbiológica da bolsa periodontal e canal radicular</b> .....	38
4.2.1 Coleta das amostras da bolsa periodontal.....	39
4.2.2 Coleta das amostras do canal radicular.....	40
<b>4.3 Análise por checkerboard DNA-DNA</b> .....	41
4.3.1 Extração do DNA bacteriano.....	41
4.3.2 Colocação das amostras na membrana de nylon.....	42
4.3.3 Hibridização da Membrana com as sondas de DNA.....	42
4.3.4 Detecção das espécies.....	46



4.3.5 Extração de endotoxinas dos canais radiculares e bolsa periodontal.....	47
<b>4.4 Quantificação de endotoxinas.....</b>	<b>47</b>
4.4.1 Análise Estatística.....	49
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
5.1 Resultados da endotoxinas.....	51
5.2 Resultados checkerboard DNA-DNA hybridization.....	53
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
6.1 Da metodologia.....	59
6.2 Dos resultados.....	61
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>69</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>87</b>

Rovai ES. Estudo da diversidade microbiana e níveis de endotoxinas em lesões endo-periodontais [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

## RESUMO

A lesão endo-periodontal é caracterizada pela associação da doença endodôntica e periodontal no mesmo elemento dentário. A evolução dessa lesão ocorre pela infecção por microrganismos, na sua grande maioria gram-negativas anaeróbias. O presente estudo teve como objetivo, identificar os microrganismos presentes em lesões endo-periodontais pelo método do DNA-DNA checkerboard hybridization, avaliar os níveis de endotoxinas pelo ensaio LAL e correlacionar com sinais e sintomas clínicos de pacientes com lesões endo-periodontais. Dez pacientes com lesões endo-periodontais foram selecionados do ICT-UNESP, foram coletadas 10 amostras endodônticas e 10 periodontais, as amostras foram armazenadas e posteriormente realizado os ensaios laboratoriais(LAL para endotoxinas e Checkerboard para microbiológico). Os resultados mostraram maiores níveis de endotoxinas na bolsa periodontal com média e desvio padrão de  $39096 \pm 39312$ . A média e desvio padrão dos valores de endotoxinas no canal radicular foram  $3240 \pm 4001$  (significativamente menores  $p = 0,002$ ). O teste de correlação de Pearson mostrou correlação moderada, com  $p = 0,084$ . A espécie *P. nigrescens* foi associada com a microbiota periodontal ( $p = 0,0198$ ) enquanto na microbiota endodôntica as espécies *E. faecium*( $p = 0,0031$ ), *P. acnes*( $p = 0,0325$ ), *G. morbillorum*( $p = 0,0108$ ), *C. sputigena*( $p = 0,0031$ ) e *L. buccalis*( $p = 0,0055$ ), foram fortemente relacionadas. Os microrganismos *P. intermedia*, *V. parvula* e *P. endodalis* tiveram pequena correlação quando associadas as microbiotas endodônticas e periodontais. O estudo concluiu que a bolsa periodontal apresenta maiores níveis de endotoxinas em relação ao canal radicular. O estudo sugere que a microbiota das lesões endo-periodontais parece a mesma presente em lesões endodônticas e periodontais separadamente. No entanto, devido a sua grande prevalência, o complexo laranja parece exercer um papel importante neste tipo de lesão.

Palavras-chave: Lesão endo-periodontal. Endotoxina. Checkerboard DNA-DNA hybridization.

Rovai ES. Study of microbiology diversity and endotoxin levels in endoperiodontal lesions [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

## ABSTRACT

The endo-periodontal lesion is characterized by the association of endodontic and periodontal disease in the same tooth. The evolution of this lesion occurs by the presence of microorganisms with vast majority gram-negative anaerobes. Therefore this study aims to identify the microorganisms in endo-periodontal lesions by DNA-DNA checkerboard hybridization method, evaluate and compare the levels of endotoxins with clinical signs and symptoms. 10 teeth with endo-periodontal lesions in agree with the inclusion criteria were selected from patients in the ICT-UNESP, 10 endodontic and 10 periodontal samples were collected, stored and subsequently performed the laboratory assays. The results showed higher levels of endotoxin in periodontal pockets with mean and standard deviation of  $39096 \pm 39312$ . The mean and standard deviation values of endotoxins in root canals were  $3240 \pm 4001$  (significantly lower  $p = 0.002$ ). The Pearson correlation test showed moderate correlation, with  $p = 0.084$ . *P. nigrescens* species was associated with periodontal microflora ( $p = 0.0198$ ) whereas in endodontic microbiota the species *E. faecium* ( $p = 0.0031$ ), *P. acnes* ( $p = 0.0325$ ), *G. morbillorum* ( $p = 0.0108$ ) *C. sputigena* ( $p = 0.0031$ ) and *L. buccalis* ( $p = 0.0055$ ) were strongly correlated. The species *P. intermedia*, *V. parvula* and *P. endodontalis* showed low correlation in endo-periodontal microflora. The study concluded that the periodontal pocket has higher levels of endotoxins in relation to the root canal. The microbiota of endo-periodontal lesions seems to be almost the same in their infections separated. The study suggests that the orange complex must play an important role in this type of infection.

Keywords: Endoperiodontal lesion. Endotoxin. Checkerboard DNA-DNA hybridiation

## 1 INTRODUÇÃO

A lesão endo-periodontal é caracterizada pela associação da doença endodôntica e periodontal no mesmo elemento dentário. Esta relação foi primeiramente descrita por Simring e Goldberg em 1964, quando o termo surgiu para descrever as lesões causadas por produtos inflamatórios em vários níveis nos tecidos periodontais e endodônticos.

Para ocorrer a manifestação clínica de infecções endo-periodontais, microorganismos são de fundamental importância na instalação e manutenção do processo patológico dos tecidos envolvidos, sendo assim, essa infecção pode transcorrer por algumas vias de acesso tais como: forame apical, túbulos dentinários, canais laterais e acessórios e uma vez instalada, poderá resultar em: aumento da profundidade de sondagem, sangramento, supuração, inchaço, formação de fistula, dor à percussão, aumento na mobilidade e perda óssea vertical (Lang et al., 1999).

Diversos estudos buscaram devedar os perfis de patógenos periodontais em lesões pulpares e periodontais no mesmo dente. Rupf et al. (2000) observaram a presença de patógenos periodontais nas infecções radiculares. Vários autores também já concluíram que dentes com periodontite severa podem servir como fonte de microorganismos na infecção de canais radiculares. (Kipiotti et al., 1984; Kerekes, Olsen, 1990; Kobayashi et al. 1990; Kurihara et al. 1995). Didilescu et al. (2012), observaram 6 espécies bacterianas, 4 do complexo laranja e 2 do complexo verde, verificando então a sua associação a infecções endo-periodontais. Em seu estudo, as espécies *Fusobacterium nucleatum*, *Parviromona Micra* e *Capnocytophaga sputigena*, foram as mais correlacionadas por estarem presentes em

ambos os tecidos inflamados, porém, tanto na lesão endodôntica quanto na periodontal é difícil determinar a porção de microbiota que realmente provoca o problema e aqueles que são apenas residentes (Zehnder et al., 2002).

Socransky et al. (1998), estudaram a microbiota presente nas doenças periodontais, e dividiram em grupos ou complexos que representam as associações bacterianas no biofilme sub-gengival. O complexo vermelho e laranja foram os mais associados a doença e os complexos verde, amarelo e roxo com sinais de saúde.

Tradicionalmente a identificação dos microrganismos em amostras endodônticas e periodontais é baseada em métodos de cultura que envolve isolamento, crescimento e identificação laboratorial através da morfologia microbiana e testes bioquímicos. Entretanto, a prevalência de alguns patógenos orais pode ser subestimada por esta técnica, pois a mesma, por conter várias etapas, pode fracassar no isolamento e crescimento de algumas bactérias, principalmente as mais fastidiosas, como as espiroquetas (Vianna et al., 2006; Montagner et al., 2010).

Com o avanço das técnicas moleculares, principalmente com o aparecimento de técnicas baseadas na hibridização DNA-DNA e no PCR (polymerase chain reaction; reação em cadeia da polimerase) e seus derivados, foi possível a caracterização mais acurada da microbiota presente nas infecções endodônticas. O DNA-DNA Checkerboard é considerado um método rápido, sensível, custo relativamente baixo e capaz de identificar um grande número de amostras de microrganismos ao mesmo tempo, o que não se mostra possível por outras técnicas como, o PCR entre outros (Socransky et al., 1994).

O envolvimento das bactérias gram-negativas, principalmente das espécies anaeróbias, em processos inflamatórios pulpares e periapicais parece estar relacionado com a presença de endotoxinas – um dos constituintes da membrana externa, responsável pela organização e estabilidade bacteriana (Vaara, Nikaido, 1984).

Aproximadamente 3/4 da superfície bacteriana é formada por esta molécula (Petsch, Anspach, 2000); a qual, mesmo em baixas concentrações, é considerada um potente estimulador da resposta inata do sistema de defesa do hospedeiro (Nattermann et al., 2000), podendo gerar danos teciduais e destruição óssea (Darveau, 2000).

Ao longo dos últimos 100 anos, endotoxina bacteriana é considerada uma das moléculas mais potente e de maior interesse encontrada na natureza (Petsch, Anspach, 2000). Suas peculiaridades estruturais, diversidade química e física e seu amplo espectro de atividade biológica resultaram em uma das linhas de pesquisa mais fomentadas mundialmente. Ainda que sua composição química e estrutural tenha sido amplamente explorada (Rietschel et al., 1984; Raetz, 1990), perguntas surgem quanto ao real papel das endotoxinas nas infecções humanas (Petsch, Anspach, 2000).

A literatura revela a detecção de LPS bacteriano em 100% dos canais radiculares analisados de dentes com infecções endodônticas primárias e lesão periapical (Jacinto et al., 2005; Vianna, et al., 2008; Martinho, Gomes, 2008; Martinho et al., 2010, 2011; Xavier et al., 2013). Altas concentrações de endotoxinas parecem estar relacionadas com dor espontânea (Jacinto et al., 2005) e presença de sintomatologia clínica (Martinho, Gomes, 2008; Xavier et al., 2013), sugerindo forte associação entre a presença de LPS no canal radicular e o desenvolvimento de lesão periapical.

Até o momento nenhum estudo relacionou microrganismos e endotoxinas nos processos da infecção em lesões endoperiodontais. Estudos mostrando uma correlação qualitativa e quantitativa desses patógenos, sua inter-relação com endotoxinas e sinais e sintomas clínicos em dentes com lesão endoperiodontal, poderão oferecer novas perspectivas para o diagnóstico microbiológico, voltado para tratamento e melhorando o prognóstico dos dentes afetados

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Intercomunicação dos tecidos endodônticos e periodontais**

Os tecidos periodontais e endodônticos possuem origem embriológica, anatômica e funções semelhantes (Mandel et al., 1993). Acredita-se primeiramente que as células precursoras do periodonto de suporte como cementoblastos e fibroblastos, do ligamento periodontal, tenham origem do folículo dental e fatores ambientais seriam capazes de induzir a formação tecidual. O complexo dentina-polpa possui origem embriológica da papila dental (Ten Cate, 2013).

O Canal radicular percorre o dente e termina no forame apical encontrando o periodonto, essa é a maior ligação entre esses tecidos. No entanto comunicações entre estes tecidos também ocorrem ao longo da superfície lateral da raiz, geralmente constituídos por vasos e nervos. Este tipo de comunicação é denominado de canal acessório e ocorrem com certa frequência em alguns dentes (Ten Cate, 2013; Bender, Seltzer, 1972).

Após o desenvolvimento embriológico, o ligamento periodontal e o canal radicular ficam interligados através de forames apicais, canais acessórios, canais laterais e túbulos dentinários, o que demonstras grande interrelação entre eles (Bender, Seltzer, 1972). A possibilidade da doença periodontal estar relacionada, ou causar alterações pulpares, primeiro foi sugerido por Colyer e Cahn em 1947. No entanto, o termo endo-perio caracterizado para lesões nos tecidos pulpares e periodontais no mesmo elemento dentário foi descrito por primeiramente por Simring e Goldberg em 1964.

Apesar de alguns autores sugerirem que para ocorrer alguma influência dos microrganismos da doença periodontal na polpa dental fosse necessário que o biofilme atingisse o forame apical (Czarnecki, Schilder, 1979; Langeland et al., 1974). Vários outros autores concluíram que canais laterais, canais acessórios e túbulos dentinários também podem servir como meio de comunicação entre infecções no tecido periodontal e polpa dental, e vice-versa.

Lindhe et al. (2008) acreditam que apesar de canais acessórios, laterais e túbulos dentinários formarem uma comunicação da polpa com o periodonto, o cemento e a dentina podem atuar como uma barreira entre agentes irritantes das alterações pulpares e o periodonto. Afirmam também que polpas inflamadas ou em processo de reparação não seriam capazes de produzir irritantes suficientes para causar alguma alteração significativa no periodonto. No entanto concluíram que, somente a pulpectomia não poderia causar nenhum benefício para o tratamento de dentes com lesões periodontais.

Apesar de vários estudos correlacionarem infecções endodônticas com periodontais, Czarnecki e Schilder (1979) analisaram histologicamente 46 dentes humanos com vários níveis de periodontite e não conseguiram correlacionar a doença periodontal a alterações pulpares. Os autores também sugeriram que a doença periodontal não afetaria o canal ao menos se houvesse uma comunicação da bolsa periodontal com o forame apical.

De Deus (1975), em um estudo analisou 1140 dentes humanos extraídos e verificou por diafanização: frequência, local e direção de canais laterais, canais acessórios e canais secundários. O estudo revelou que 27,4% dos dentes demonstraram algum tipo de ramificação e o terço apical da raiz dos dentes foi local com maior frequência de acometimento dessas ramificações. O estudo demonstrou também que os dentes pré-molares e molares foram os dentes que



apresentaram maior número e variedade de ramificações dos canais radiculares.

Haznedaroğlu et al. (2003), analisaram a frequência de canais acessórios na furca de 50 primeiros molares superiores, 50 primeiros molares inferiores, 50 segundos molares inferiores e 50 segundos molares superiores. Os resultados mostraram que a incidência de inter-radiculares na furca de molares foi de, 24% nos primeiros molares superiores, 16% nos segundos molares superiores, 24% nos primeiros molares inferiores e 20% nos segundos molares inferiores.

Os túbulos dentinários são considerados uma via importante na propagação de infecções, principalmente em dentes submetidos a tratamentos de periodontites onde é realizado a raspagem e aplainamento radicular, a camada de dentina e cemento são removidas e assim acabam ficando expostas na cavidade oral. Esses túbulos dentinários podem chegar à quantidade de 15000 por milímetro quadrado e podem servir de local para invasão, multiplicação e penetração de patógenos (Tang et al., 2002).

Kontakiotis et al. (2014) analisaram por microscopia eletrônica de varredura 12 dentes, 6 de pessoas com até 30 anos de idade e 6 de pessoas com até 50 anos. Sendo assim comparou a quantidade e o diâmetro dos túbulos dentinários desses dois grupos. Ao fim do estudo concluíram que com o passar da idade o número e diâmetro dos túbulos dentinários diminuem significativamente.

Harrán Ponce et al. (2001) acreditam que os túbulos dentinários são o meio de ligação entre a polpa e o cemento, e agentes externos poderiam vir a causar dano a polpa e em consequência ao ligamento periodontal. Dado essa importância aos túbulos dentinários, esses autores avaliaram a densidade numérica, forma, superfície individual, área de aberturas tubulares e a porcentagem de dentina ocupada por estes. Foram avaliados oito pré-molares extraídos por razões ortodônticas e então feita análise por microscopia eletrônica de

varredura. Ao fim do estudo verificaram que o número de túbulos é menor em relação ao terço apical do dente em relação ao terço coronal, os túbulos dentinários possuíam formato cônico, o formato dos túbulos era circular no terço coronal e mais irregular conforme mais apical fosse e seria mais importante considerar a área do túbulo em si do que o diâmetro, para reservatórios de microrganismos.

Em um cálculo do volume dos túbulos dentinários, autores descreveram que um dente humano teria entre 11% e 20% de túbulos dentinários em seu volume total (Hoppe, Stiiben, 1965). Brännström e Garberoglio (1972) verificaram os túbulos dentinários por microscopia eletrônica de varredura 30 dentes humanos hígidos de pessoas de idades variadas. Perto da polpa o número de túbulos chegou a 45000 por milímetro quadrado e diâmetro de 2,5 micrômetros, já no meio da dentina o número chegou a 29000 túbulos por  $\text{mm}^2$  e diâmetro de 1,2 micrômetros e na superfície periférica do dente 20000  $\text{mm}^2$  e 0,9 micrômetros. Sugerindo que conforme o túbulo vai em direção à polpa o mesmo aumenta e quantidade e diâmetro. Neste estudo também visualizaram prolongamentos odontoblásticos apenas nos túbulos perto da polpa.

## **2.2 Patogênese das doenças endo-periodontais**

Infecções em canais radiculares e do periodonto geralmente são de origem bacteriana. Entretanto, vírus e fungos também podem estar relacionados. Vários estudos já confirmaram que patógenos podem percorrer, multiplicar-se e instalar-se em canais acessórios, canais laterais, túbulos dentinários e forame apical. Sendo assim podendo ocorrer infecções simultâneas em ambos os tecidos.

Lesões de cárie ou qualquer exposição direta a cavidade oral da dentina ou polpa podem levar ao ingresso de bactérias e

consequentemente uma lesão é instalada. Infecções desse gênero são predominantemente de bactérias anaeróbias. As lesões são mais frequentemente iniciadas e sustentadas pelo forame apical, seguido pelo canal acessório e canais laterais, e com pouca frequência por túbulos dentinários. Uma lesão periapical pode perfurar o osso cortical próximo ao ápice, alcançar o periósteo, sobrepondo-se aos tecidos moles e drenar para o sulco gengival, podendo formar bolsas periodontais. (Lindhe et al., 2008)

Seltzer et al. (1967), em um estudo com macacos e cachorros observaram a possibilidade da ocorrência de lesões periodontais entre duas raízes de um dente onde foi feita indução de lesões pulpares por exposição pulpar mecânica. Após análise histológica foi possível notar uma alta ocorrência de canais laterais que se comunicavam com o assoalho da câmara pulpar com o ligamento periodontal, acreditando poder existir uma relação destas lesões pulpares com o aparecimento de lesões de furca em dentes posteriores de macacos e cães, assim depois correlacionar com dentes humanos. As alterações no ligamento periodontal na região de furca foram observados em 21 dos 100 casos de dentes examinados. Observaram de 30 a 90 dias após a reparação destes tecidos inflamados e em cinco casos a inflamação e a reabsorção óssea persistiu. Sendo assim os autores concluíram que lesões de furca podem ser iniciadas por alterações pulpares ou por polpas necrosadas através de canais acessórios ou laterais na região de molares e pré-molares em macacos e cachorros.

O biofilme gengival é o fator principal das doenças periodontais. Há um consenso na literatura dizendo que a placa subgengival contém aproximadamente 350 espécies bacterianas cultiváveis, e cerca de 100 dessas espécies podem ser encontradas em uma única pessoa. (Consensus report, 1996).

Mediadores químicos da inflamação levam a alterações vasculares, perda de inserção gengival, perda óssea e destruição de

ligamento periodontal. Estudos tem mostrado a capacidade de agentes irritantes da doença periodontal causar alterações pulpares (Bender, Seltzer, 1972; Solomon et al., 1995). Geralmente o cimento radicular atua como uma boa barreira física, mas a raspagem e alisamento radicular, procedimentos realizados para o tratamento de periodontites visando a remoção de placa bacteriana, cálculos, e superfícies contaminadas, podem remover essa camada de cimento, levando então a exposição de túbulos dentinários, favorecendo a transcorrência da infecção e causando danos a polpa (Preetinder, 2011). Análises histológicas de estudos mostraram células inflamatórias e necrose pulpar presente perto de canais acessórios e laterais em dentes comprometidos periodontalmente (Bergenholtz, Lindhe, 1978).

Jansson et al., (1993) compararam a profundidade de bolsa em dentes sem nenhuma alteração periapical endodôntica e em dentes com alterações, sendo assim concluíram que dentes com alterações periapicais estavam relacionados a aumento de profundidade de sondagem e destruição óssea vertical.

Em outro estudo, Ehnevid et al. (1993) mostraram que dentes com doença periodontal possuem bolsas mais profundas quando são acometidas por infecções endodônticas concomitantemente. Bactérias relacionadas à infecção endodôntica causam alterações no periodonto, levando a uma reação inflamatória em cadeia nos tecidos periodontais, isso seria possível de retardar a cicatrização nesses casos mesmo após o tratamento periodontal. Os autores sugerem que dentes acometidos por esse tipo de infecção devem obter tratamentos periodontal e endodôntico simultâneos.

### 2.3 Classificação das lesões endo-periodontais

A inter-relação de lesões endodônticas e periodontais sempre trouxe questionamentos, confusão e controvérsia. Em casos de infecções endodônticas e periodontais simultâneas, o diagnóstico correto é difícil, porém de vital importância para o planejamento e tratamento apropriado do caso. No entanto, observar de onde vem a dor, fazer um exame radiográfico e exame clínico apurado podem ajudar bastante para desvendar esse problema. (Al-Fouzan, 2014)

Simon et al. (1972) foi o primeiro a classificar as lesões endo-perio baseada na etiologia, diagnóstico e prognóstico do dente envolvido.

Segue a classificação:

- a) Lesões endodônticas primárias;
- b) Lesões endodônticas primárias com envolvimento periodontal secundário;
- c) Lesões periodontais primárias;
- d) Lesões periodontais primárias com envolvimento endodôntico secundário;
- e) Lesões verdadeiras ou combinadas.

Levando para o lado do tratamento dessas lesões Torabinejad e Trope em 1996 fizeram uma nova classificação voltada para visão clínica das lesões, baseando-se então na origem da bolsa periodontal.

- a) Origem endodôntica;
- b) Origem periodontal;
- c) Lesão endo-perio combinados.

- d) Lesões endodônticas e periodontais separadas;
- e) Lesões com comunicação;
- f) Lesões sem comunicação.

Outra classificação foi recomendada no work-shop de classificações das doenças periodontais em 1999.

Periodontite associada à lesão endodôntica:

- a) Lesão endodôntica-periodontal;
- b) Lesão periodontal-endodôntica;
- c) Lesão combinada.

Com base nestas classificações, a mais amplamente utilizada classificação de lesões endo-perio é a que foi classificada por Simon *et al.* 1972, classificação de acordo com a principal causa da doença. Um dos principais itens, a doença endodôntica primária, foi modificada por Al-Fouzan (2014) acreditando na existência de uma lesão sem qualquer relação periodontal. Sendo assim (Al-Fouzan, 2014) lançou a mais nova classificação:

- a) A doença periodontal retrógrada:
  - Lesão endodôntica primária com drenagem através do ligamento periodontal;
  - Lesão endodôntica primária com envolvimento periodontal secundário;
- b) Lesão periodontal primária;
- c) Lesão periodontal primária com envolvimento endodôntico secundário;
- d) Lesão endodôntica-periodontal combinada;
- e) Lesões periodontais iatrogênicas.

Em detalhes:

**a) Doença Periodontal retrógrada. Poderia ser dividida em duas subcategorias.**

- **Lesão endodôntica primária com drenagem através do Ligamento Periodontal.** Quando há profundidade de sondagem apenas em uma face do dente. Ocorre exacerbação aguda de uma lesão apical crônica em um dente com necrose pulpar, pode drenar através do ligamento periodontal pelo sulco gengival. O quadro pode mimetizar, clinicamente, a presença de um abscesso periodontal. Na realidade, é um trato sinusal de origem pulpar que se abre através do ligamento periodontal. Para fins de diagnóstico, é fundamental para o clínico inserir um cone de guta-percha na fístula e tirar uma ou mais radiografias para determinar a origem da lesão. Quando sondar a bolsa, ela será caracterizada por se estreita. Doenças endodônticas primárias geralmente tendem a curar apenas com o tratamento endodôntico.

- **Lesão endodôntica primária com envolvimento periodontal secundário.** Quando há uma extensão da bolsa periodontal, a qual ocorre como resultado da drenagem de agentes tóxicos presentes na infecção do sistema canal-raiz. Há longo prazo a existência do defeito ósseo resultou no depósito de placa e cálculos na bolsa periodontal e então o subsequente avanço da doença periodontal. A integridade do ligamento periodontal será restabelecida após o tratamento endodôntico completo.

**b) Lesão periodontal primária.** A doença periodontal gradualmente se espalha pela superfície radicular em direção ao ápice do dente. A polpa pode permanecer vital, mas é possível mostrar algumas mudanças degenerativas ao longo do tempo. Nesses casos, é aconselhável tratar apenas o tecido periodontal.

**c) Lesão periodontal primária com envolvimento endodôntico secundário.** A progressão da doença periodontal e as bolsas periodontais levam a um envolvimento pulpar através de canais laterais, canais acessórios, ou do forame apical. A polpa

subseqüentemente se torna necrótica e infectada. Nesses casos é aconselhável o tratamento de ambos os tecidos envolvidos.

**d) Lesão endodôntica-periodontal combinada.** O dente se apresenta despulpado, com infecção no sistema de canais e a coexistência de um defeito periodontal. Uma maneira mais simples de classificar seria definir qualquer situação que ocorra envolvimento periodontal e endodôntico simultâneo como uma “lesão periodontal e endodôntica combinada”. Entretanto deve-se tentar identificar a causa primária da lesão, porém nem sempre será possível. Nesses casos não é essencial a determinar onde começou a lesão, uma vez que o tratamento envolverá ambos tecidos, periodontal e endodôntico. Se apenas um dos problemas forem tratados, então será esperado que a lesão não se repare adequadamente. Em geral é aconselhável que seja tratados ambos tecidos simultaneamente com intuito de criar o mais favorável ambiente para a cura da lesão.

**e) Lesão periodontal iatrogênica.** Esse tipo de lesão é resultado de erros no tratamento como por exemplo: perfurações radiculares, infiltrações, trauma, agentes químicos utilizados na odontologia e fraturas verticais.

Segundo Harrington em (1979), para ocorrer uma lesão endodôntica e periodontal concomitante, ou seja, uma lesão endo-periodontal verdadeira, este dente precisa corresponder a três características primordiais: o dente deve apresentar necrose pulpar; deve ocorrer destruição periodontal comunicante com o sulco gengival; deve estar presente uma bolsa periodontal que se estenda até um canal lateral ou forame apical. No entanto, também se espera que neste caso apenas apresente sucesso se forem realizados ambos os tratamentos, periodontal e endodôntico concomitantes.

As lesões endo-perio verdadeiras são de baixa prevalência e extremamente raras, no entanto, este tipo de lesão



caracteriza-se pela presença de bolsa periodontal e alteração pulpar irreversível no mesmo dente. Para caracterizar uma lesão endo-perio verdadeira precisa-se respeitar três critérios; o dente deve estar com necrose pulpar ou alteração irreversível na polpa; deve apresentar destruição do tecido periodontal de suporte com comunicação até o ápice dental; e para a resolução da lesão deve-se realizar o tratamento periodontal e endodôntico (De Deus, 1975).

A análise radiográfica, sondagem periodontal e testes de vitalidade são extremamente importantes para o diagnóstico apurado da origem da lesão. Autores acreditam que uma sondagem cuidadosa com distanciamento de 1 mm da raiz do dente pode fornecer informações importantes. É citado na literatura que bolsas estreitas, por exemplo, podem sugerir origem endodôntica da lesão, já que esse espaço pode apenas pertencer ao caminho de uma fistula. Geralmente nesses tipos de caso apenas o tratamento endodôntico é capaz de resolver a lesão. De outra forma, se uma sondagem apresentar uma bolsa periodontal e este dente apresentar sinais positivos a frio, ou a testes elétricos, é muito discutido se o cirurgião dentista deve ignorar esse fato e providenciar apenas o tratamento periodontal ou se deve fazer o tratamento endodôntico concomitante. Sendo assim muito importante identificar primeiro a origem do defeito na inserção do dente para posteriormente trata-lo (Harrington et al., 2000).

## **2.4 Microbiologia**

### 2.4.1 Microbiologia na doença periodontal

Socransky et al. (1994) introduziu o Checkerboard dna-dna hybridization, um método rápido, sensível, custo relativamente baixo e capaz de identificar um grande número de amostras de microrganismos ao mesmo tempo, o que não se mostrava possível ao determinado momento por outras técnicas como, o PCR entre outros. Tudo isso foi possível pelo uso de um grande número de sondas de DNA, contra uma única membrana de suporte. É desnaturado o DNA de até 43 amostras e fixado em colunas separadas, em uma única membrana montada em um Miniblotter 45. A membrana é, então, rodada em 90 graus no mesmo dispositivo, o que permite a hibridização simultânea com 43 sondas de DNA diferentes. Em seu estudo as hibridações foram realizadas em canaletas verticais, quer com sondas genômicas completas de digoxigenina marcada ou com sondas de oligonucleótidos à base de rRNA 16S diretamente conjugadas com a fosfatase alcalina. No fim do estudo concluiu que este método permite a determinação simultânea da presença de várias espécies de bactérias em amostras de placas dentárias únicas ou múltiplas, sugerindo assim a sua utilidade para compreensão de ecossistemas e complexos bacterianos presentes no biofilme oral. Em 1998 Socransky et al., testaram o uso método DNA DNA checkerboard e PCR, para avaliar complexos microbianos de amostras de biofilme subgengivais, foram selecionados pacientes com periodontite crônica, antes e depois da terapia periodontal para o estudo. E ao fim do estudo concluiu que o DNA DNA checkerboard além de ser uma importante ferramenta para entender complexos e ecossistemas de microrganismos, se demonstrou um método mais eficaz, rápido e simples.

Socransky et al. (1998), estudaram a microbiota presente nas doenças periodontais, e dividiram em grupos ou complexos que representam as associações bacterianas no biofilme sub-gengival. O

complexo vermelho é o primeiro complexo e o mais associado a patogenicidade das doenças periodontais, e é formado por três bactérias; *Tanerella forsythius*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. Em seguida vem o complexo laranja, composto por; *Fusobacterium nucleatum* spp., *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*. As bactérias; *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Streptococcus constellatus* e *Campylobacter gracilis* são associadas a este complexo também. Os microrganismos *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus intermedius* formam o complexo amarelo. O quarto complexo ou complexo verde é constituído *Capnocytophaga* ssp, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tipo a. O complexo roxo é formado por *Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*. *A. actinomycetemcomitans* tipo b. *Selenomonas noxia* e *Actinomyces* são relacionados com os demais complexos. Espécies do complexo vermelho possuem maior fator de virulência e geralmente estão mais presentes em lugares onde há perda de inserção, sangramento a sondagem e bolsas recorrentes. (Holt, Ebersole, 2000).

Dahlén et al. (1993) avaliaram 500 pré-adolescentes com média de idade de aproximadamente 13 anos, e 2 anos depois. Foi avaliado o nível de inserção por sondagem periodontal e a microbiota subgingival presente pelo método checkerboard DNA-DNA. Os resultados mostraram grande frequência de espécies como *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia* (99%). A presença do *A. actinomycetemcomitans* foi de cerca de 50% dos casos. Sendo o *A. Actinomycetemcomitans* microrganismo relacionado com a periodontite agressiva, onde ocorre rápida perda óssea. Houve forte correlação entre perda óssea rápida e microrganismos como *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis*, mostrando que outras bactérias além do *A. Actinomycetemcomitans* podem estar relacionadas com a periodontite

agressiva, entre eles o *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis*. O estudo mostrou também relação entre casos com maiores perda de inserção e sítios com a presença da *Prevotella intermedia*.

Teles et al. (2012), observaram em seu estudo a sequência de colonização de microrganismos do biofilme supragengival e subgengival, em indivíduos saudáveis e com periodontite, as análises foram feitas pelo teste molecular checkerboard DNA-DNA nos períodos de 1, 2, 4 e 7 dias, logo após uma profilaxia profissional. Ao final do estudo foi possível definir uma ordem de colonização de espécies bacterianas sendo assim; No dia 1 as bactérias prevalentes foram *Streptococcus mitis* e *Neisseria mucosa*, em seguida o *Capnocytophaga gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *Veillonella parvula* e *Streptococcus oralis* mostraram grandes proporções durante o período de 1–4 dias. No período de 4–7 dias, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Prevotella melaninogenica* e *Prevotella nigrescens* foram as espécies bacterianas mais observadas. Enfim, a sequência de espécies definidas por esse período foi; *S. mitis* como primeira colonizadora, seguido por *V. parvula* e *C. gingivalis*, e no sétimo dia, *Capnocytophaga sputigena* e *P. nigrescens*. Ao fim do estudo os autores concluíram também que a recolonização do biofilme sub-gengival foi mais devagar e diferente em comparação com o biofilme supra-gengival.

#### **2.4.2 Microbiologia na endodontia**

Infecções microbianas da polpa dental são geralmente resultadas de cáries dentais, representando em si a forma mais comum de infecção que ocasiona em tratamento endodôntico. O sucesso do tratamento endodôntico depende diretamente da eliminação ou

diminuição desses microrganismos, a sua falha geralmente é resultante de uma infecção persistente (Farber, Seltzer, 1988).

Microrganismos são capazes de aderir à superfícies formando colônias, também conhecidas como biofilmes. O mais famoso biofilme estudado no campo da odontologia é o biofilme que compõe a placa dental. Na endodontia os biofilmes podem ser divididos em; intracanal, extracanal e periapical (Mohammadi et al., 2013).

Siqueira et al. (2000) examinaram 28 canais radiculares pelo método Checkerboard DNA-DNA, com 42 sondas de DNA para a identificação microbiana. O PCR foi utilizado para a confirmação da presença de DNA bacteriano, no entanto foi utilizado primers contendo as amostras mais comuns de DNA das bactérias envolvidas na infecção endodôntica. Ao teste Checkerboard DNA-DNA, 22 sondas utilizadas foram reativas com pelo menos uma das amostras. O número de espécies bacterianas em cada amostra foi em média 4,7 espécies, variando de 1 a 17. Das 28 amostras, 17 foram positivas para pelo menos uma das sondas de DNA. As espécies prevalentes foram *Tanerella forsythia*, *Haemophilus aphrophilus*, *Corynebacterium matruchoti*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. Autores concluíram que técnicas moleculares são importantes pra adicionar conhecimento da microbiota endodôntica, principalmente permitindo a detecção de bactérias difíceis ou impossíveis de cultivar. As infecções endodônticas são mistas e de etiologia polimicrobiana.

Murad et al. (2014) examinaram os microrganismos relacionados a infecções persistentes, foram coletadas amostras de 36 dentes e o teste microbiológico usado foi o checkerboard DNA-DNA. *Enterococcus faecium* (36%), *Streptococcus epidermidis* (36%), *Eubacterium saburreum* (28%), *Parvimonas micra* (28%), *Streptococcus sanguis* (28%), *Capnocytophaga sputigena* (28%), *Leptotrichia buccalis* (28%), *Enterococcus faecalis* (28%), e *Staphylococcus warneri* (28%), foram as espécies encontradas mais prevalentes, e tiveram pouca

prevalência o *Treponema socranskii* (3%), *Fusobacterium periodonticum* (3%), *Capnocytophaga gingivalis* (3%) e *Spiroplasma ixodetis* (3%). No entanto, os microrganismos que mostraram maiores índices de ocorrência foram; *E. faecium*, *Dialister pneumosintes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Helicobacter pylori*. Os autores concluíram que a microbiota presente em dentes com infecções persistentes é mista e complexa. *E. faecium* e *S. epidermidis* são as mais prevalentes espécies neste tipo de infecção. Não foi possível achar nenhuma correlação das espécies de microrganismos com sinais e sintomas clínicos. Entretanto, lesões periapicais com maiores áreas foram correlacionadas com maiores contagens de microrganismos gram-negativos e espiroquetas.

#### **2.4.3 Microbiologia das lesões endo-periodontais**

O primeiro a pesquisar a microbiota presente em dentes com infecções endo-periodontais foram Kipioti et al. (1984). Os autores estudaram a microbiota periodontal e endodôntica de 6 dentes necrosados, hígidos, sem a presença de lesões periapicais e com bolsa relacionada ao canal necrosado. Neste estudo foi observado que a microbiota presente nos tecidos periodontais e endodôntica era similar. E os microrganismos mais frequentemente isolados em ambos os locais foram *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus spp*, *Capnocytophaga spp*, *Actinomyces spp* e *Streptococcus spp*. Os autores concluíram que a bolsa periodontal poderia servir de fonte de microrganismos para infecções no canal radicular.

Kurihara et al. (1995) avaliaram a microbiota de 5 pacientes com dentes necrosados e sem cáries, e as bolsas periodontais associadas. A maior prevalência de microrganismos foi na bolsa

periodontal, em comparado com o canal radicular. A microbiota periodontal consistia em maior parte por bacilos e cocos. Na bolsa periodontal também foram encontradas espiroquetas. Espécies mais encontradas no canal radicular foram *Peptostreptococcus* e *Streptococcus* (cocos Gram-positivos) e *Actinomyces* e *Rothia* (bacilos Gram-positivos). As bactérias mais encontradas nas bolsas periodontais foram bastonetes anaeróbios facultativos e obrigatórios (Gram-negativos e positivos), *Campylobacter spp*, *Fusobacterium spp*, *Peptostreptococcus productus* e *Peptostreptococcus spp*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans* e *spp*.

Rupf et al. (2000) observaram os perfis de espécies bacterianas em dentes com doenças endo-periodontais pelo método PCR, os patógenos avaliados foram; *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Treponema denticola*. Neste estudo os autores puderam verificar que a carga de microrganismos nas amostras periodontais se relacionava de alguma forma com a carga bacteriana no canal radicular. Os autores concluíram que patógenos periodontais geralmente acompanham infecções endodônticas, fortalecendo assim a ideia que a inter-relação entre os tecidos endodônticos-periodontais, podem ser considerados como caminhos críticos para reinfecções em dentes com doença periodontal e infecções endodônticas.

Segundo Dahlén (1993), infecções em tecidos endodônticos e periodontais possuem perfis de patógenos muito parecidos. Na literatura há alguns estudos tentando desvendar este perfil microbiano, porém com número de amostras geralmente baixos. No entanto o autor sugere que lesões endo-periodontais possam não ter nenhum perfil microbiológico único.

Didilescu et al. (2012), investigaram 6 espécies bacterianas do complexo laranja e verde pelo método Checkerboard DNA-

DNA e PCR, em 46 pacientes que continham dente com lesão endoperiodontal primária e secundária (dentes tratados endodonticamente). As espécies investigadas foram; *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Eikenella corrodens* e *Capnocytophaga sputigena*. Resultados mostraram grande quantidade de *P. micra*, *F. nucleatum* e *C. sputigena* nas amostras dos canais radiculares, enquanto nas amostras periodontais foram encontradas grandes quantidades das mesmas espécies do canal radicular, mais a espécie *C. rectus*. Os achados sugeriram que *F. nucleatum*, *P. micra* e *C. sputigena* podem apresentar um importante papel na patogênese de lesões endo-periodontais.

## 2.5 Endotoxinas

Bactérias gram-negativas, principalmente anaeróbias, vêm sendo relacionadas a processos inflamatórios nos tecidos periodontais, pulpares e pericápicais. Esse processo parece estar relacionado com a presença de endotoxinas (Vaara, Nikaido, 1984). A endotoxina bacteriana (lipopolissacarídeo – LPS) é um glicolípido complexo composto por uma porção de polissacarídeos hidrófilos e outra porção hidrofóbica conhecida como lipídio. O LPS é o componente mais importante da membrana extracelular de bactérias gram-negativas e um dos mais potentes iniciadores da cascata da inflamação. (Raetz, 1990; Cohen, 2002). Endotoxinas possuem a capacidade de ativar monócitos e macrófagos a produzir citocinas pro-inflamatórias, tais como; fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL)-1, IL-6, IL-8, e IL-12. A produção de citocinas e mediadores químicos por macrófagos e monócitos colaboram para um eficiente controle do crescimento e disseminação de patógenos pelo tecido. Entretanto produções excessivas



e descontroladas dessas substâncias podem levar a destruições teciduais e perda óssea. (Fujihara et al., 2003)

Maidwell-Smith et al., (1987) verificaram a presença de LPS de dentes extraídos devido a periodontite. LPS foi encontrado em todas as amostras, com variações de 19-394 ng/dente. Os autores relataram uma baixa correlação da quantidade de endotoxinas com a perda de inserção.

Cadosch et al. (2003), avaliaram a remoção de endotoxinas em vinte e quatro dentes extraídos devido a periodontite após sessões de raspagem. Os valores obtidos de LPS pelo método LAL na superfície radicular foram de 0,03-2,62 EU/ml. Foi observado que a maior massa de LPS removida foi devido às primeiras sessões de raspagem. Após a remoção de todos os cálculos presentes na superfície radicular, os níveis de endotoxinas chegaram perto de zero, defendendo a hipótese que não há necessidade de remoção de cemento ou dentina durante sessões de raspagens e alisamentos radiculares.

Lee et al. (2008), avaliaram o uso de clorexidina 0,02% como solução irrigadora no debridamento periodontal de 18 pacientes, quanto aos níveis de LPS e IL-6 circulante no tempo zero, cinco minutos e cento e vinte minutos, do tratamento periodontal. Vários estudos suportam a ideia em que, devido a morte de microrganismos gram-negativos durante o tratamento periodontal, concentrações altas de endotoxinas são liberadas em bolsas periodontais e conseqüentemente levadas a corrente sanguínea. Em seu estudo, o uso de clorexidina a 0,02% não mostrou nenhuma vantagem em comparação com água destilada como solução irrigadora, os dois grupos obtiveram valores semelhantes de endotoxinas e IL-6 circulantes.

Martinho, Gomes, (2008), analisaram os níveis de LPS em pacientes, antes e depois, do preparo biomecânico com o uso da solução irrigadora hipoclorito de sódio 2,5%. Em seu estudo os autores confirmaram que os casos em que apresentaram sintomatologia,

obtiveram maiores níveis de endotoxinas presentes nos canais radiculares. O uso do hipoclorito de sódio a 2,5% se mostrou ineficaz na neutralização das endotoxinas, mostrando redução de 60%. Altas concentrações de endotoxinas após o tratamento endodôntico podem estar relacionadas com o desenvolvimento e persistência da sintomatologia.

Gomes et al. (2012) através de um estudo clínico avaliaram pelo método limulus amoebocyte lysate (LAL), os níveis de endotoxinas em 15 pacientes com infecções endodônticas primárias e 15 pacientes com infecções endodônticas secundárias/persistentes. No estudo foi possível observar endotoxinas em 100% dos casos, tanto em infecções primárias, quanto secundárias. Os níveis de LPS em infecções primárias foram maiores que nos casos de infecções secundárias, sendo os dados estatisticamente significativos para  $p < 0,05$ . Infecções endodônticas secundárias possuem uma carga microbiana gram-positiva na sua maioria, sendo assim os autores explicam essa diferença. Os casos com maior perda óssea foram relacionados com os maiores níveis de endotoxinas presentes, assim como os sinais e sintomas em infecções primárias.

Endo et al. (2012), quantificaram endotoxinas pelo método LAL em casos de retratamento endodôntico, antes e depois do retratamento. Foram realizadas 15 coletas de pacientes que se enquadravam nos critérios de inclusão. O teste LAL indicou que as concentrações de endotoxinas nas amostras do canal tiveram média de 3.96 EU/ml, o que foi menor em comparação a infecções primárias (média: 9.19 EU/ml). Maiores níveis de endotoxinas foram encontradas em dentes com tratamento endodôntico a mais de 10 anos, os autores explicam que esse fato deve ter ocorrido devido à uma desinfecção deficiente no tratamento endodôntico inicial, deixando bactérias gram-negativas presentes no canal radicular. Com os dados deste estudo os autores conseguiram relacionar altos níveis de LPS, com maiores perdas

ósseas e sintomatologia clínica. O preparo biomecânico foi eficiente na redução de endotoxinas e microrganismos.

Xavier et al. (2013), verificaram a quantidade de bactérias cultiváveis e a redução de níveis de endotoxinas no tratamento endodôntico em uma sessão e duas sessões. Foram coletadas amostras de 48 pacientes, o teste microbiológico usado foi o método de cultura, o LAL foi usado para a quantificação de endotoxinas. Autores observaram que ambos os tratamentos obtiveram redução nos níveis de endotoxinas e microrganismos, no entanto não conseguiram eliminá-los. Também foi possível verificar que o tratamento em duas sessões foi mais eficaz na redução nos níveis de endotoxinas.

Martinho et al. (2014), analisaram a capacidade de eliminar LPS dos canais radiculares no tratamento endodôntico, comparando então quatro sistemas rotatórios mais utilizados na endodontia. Os grupos foram divididos em; WaveOne (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) (n = 12); Reciproc (VDW, Munich, Germany) (n = 12), ProTaper (Dentsply Maillefer) (n = 12), e Mtwo (VDW) (n = 12). A solução irrigadora foi o hipoclorito de sódio a 2,5%. Neste estudo foi encontrado endotoxinas em todas as amostras analisadas, com média de 103-126.5 EUs/mL. Todos os sistemas reduziram mais de 90% do LPS encontrado no baseline e não diferiram estatisticamente.

### **3 PROPOSIÇÃO**

Os objetivos deste estudo foram:

- a) Correlacionar características clínicas e radiográficas com a microbiota presente e níveis de endotoxinas;
- b) Verificar o perfil microbiano da lesões endoperiodontais;
- c) Quantificar níveis de endotoxinas na bolsa periodontal e canal radicular de dentes com lesão endo-peridontais.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

Este projeto de Pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP. Sob protocolo nº (698.107/2014-CEP) (ANEXO A).

### 4.1 População

Para a realização da presente pesquisa foram selecionados pacientes com lesões endo-periodontais que estavam em tratamento odontológico nas clínicas do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos (UNESP) (Figura 1). Foi realizada anamnese detalhada e selecionados 10 dentes. Os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A) aceitando fazer parte do estudo.



Figura 1 – Radiografias iniciais de dentes selecionados para o estudo onde podem ser observadas lesões endo-periodontais.

#### **4.1.1 Critérios de inclusão**

Pacientes que apresentavam dentes com diagnóstico de necrose pulpar, apresentando lesão periapical, sangramento gengival e bolsa periodontal associada com profundidade de sondagem maior ou igual a 6 mm em mais de uma face.

Os mesmos não poderiam ter feito uso de antibióticos sistêmicos e/ou locais nos últimos 3 meses. E também não terem sido submetidos a nenhum tratamento periodontal no último ano.

#### **4.1.2 Critérios de exclusão**

Dentes com câmara pulpar exposta a cavidade oral, tratamento endodôntico prévio, cárie comunicante à câmara pulpar, presença de trincas, calcificações, reabsorção externa, foram descartados deste estudo.

Também foram excluídos fumantes e pacientes portadores de diabetes melitus.

#### **4.2 Procedimentos clínicos e coleta microbiológica e de endotoxinas da bolsa periodontal e canal radicular**

Os procedimentos de coleta das amostras da bolsa periodontal e do canal radicular foram realizados de maneira distintas.

#### 4.2.1 Coleta das amostras da bolsa periodontal

Alguns princípios foram observados na coleta das amostras: utilização de técnicas assépticas, promoção de um fácil acesso para a coleta das amostras como remoção de cálculo supragengival e evitar a contaminação química do periodonto. Isolamento relativo com o auxílio de roletes de algodão foi utilizado com o intuito de evitar a contaminação por saliva.

A placa supragengival foi removida esfregando-se uma gaze esterilizada umedecida em soro fisiológico, em todas as faces, da coroa do dente. Jatos de ar foram aplicados a fim de manter a superfície dental seca.

A coleta da amostra periodontal foi realizada na bolsa de maior profundidade com 4 pontas de papel absorventes apirogênicos numero 30 FM Dentsply (Petrópolis, Rio de Janeiro), uma de cada vez, introduzidas até o fundo da bolsa e mantida em posição por 1 minuto. O primeiro cone foi transferido para tubos eppendorfs apirogênicos e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise de endotoxinas e estimulação celular.

Em seguida outros três cones de papel foram introduzidos na bolsa periodontal da mesma forma que o anterior, logo após, foram transferidos imediatamente para um tubo tipo *eppendorf* previamente esterilizado e apirogênico, contendo 1,0 mL de meio de transporte Tris HCl EDTA(TE) e posteriormente adicionado 1,0 ml de solução de NaOH(Dahlén et al., 1993). As amostras foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise pelo método checkerboard dna-dna hybridization.

Após a coleta da bolsa periodontal, o próximo passo realizado foi a coleta das amostras do canal radicular.

#### 4.2.2 Coleta das amostras do canal radicular

Inicialmente o dente envolvido recebeu polimento coronário com escova de Robinson e pedra-pomes e em seguida foi isolado com lençol de borracha (isolamento absoluto). Após, foi realizado o vedamento da interface coroa/lençol com cianocrilato (Super Bonder; Loctite, SP) para evitar infiltração de saliva. A anti-sepsia do campo operatório (superfície externa da coroa, grampo, lençol de borracha, arco e cianoacrilato) foi realizada com *swabs* estéreis umedecidos primeiramente em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% (v/v), e depois em NaOCl 5,25% por 30 segundos cada, subseqüentemente neutralizado com solução estéril de tiosulfato de sódio a 5% (Möller, 1966).

A fase de acesso coronário foi realizada em duas etapas operatórias. Durante a abertura coronária, a irrigação foi realizada manualmente com solução salina estéril e apirogênica. Brocas de alta rotação diamantadas estéreis/ apirogênicas (esterilizadas através de calor seco, em estufa por um período de tempo de 4 horas a 200 °C) foram utilizadas. Na primeira etapa operatória realizou-se a remoção dos contaminantes coronários (restaurações, tecido cariado, microrganismos). Na segunda etapa, na fase de confecção da cavidade de acesso, nova broca estéril/ apirogênica foi utilizada. Após a confecção da cavidade de acesso, nova desinfecção foi realizada, e sua face interna foi checada quanto à esterilidade. Prosseguindo, com o completo acesso ao canal radicular com uma nova broca esférica diamantada estéril/ apirogênica.

Após a abertura coronária, o campo operatório e a câmara pulpar foram novamente submetidos a esses procedimentos. Nos casos de dentes multirradiculares, foi coletada amostra de um único canal radicular associado mais diretamente à bolsa periodontal de maior profundidade, de maneira a confinar o exame microbiológico em um único



ambiente ecológico. Foram usados cones de papel absorvente estéreis e apirogênicos, calibre 30 FM Dentsply (Petrópolis, Rio de Janeiro) padronizados com diâmetro da ponta correspondente a uma lima K número 20, foram introduzidos, um de cada vez, no comprimento aparente do dente (determinado pela radiografia pré-operatória) permanecendo nesta posição por 1 minuto (os 4 cones foram introduzidos na mesma sequência das amostras periodontais). Em casos onde o canal estava seco, este foi umedecido com soro fisiológico estéril para assegurar uma amostra viável.

Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos eppendorf com a mesma distribuição citada no método das coletas das amostras periodontais.

### **4.3 Análise por checkerboard DNA-DNA**

*Checkerboard DNA-DNA hybridization* foi utilizado para estudar a diversidade microbológica das lesões endo-peridontais investigando 40 espécies bacterianas encontradas nas infecções.

#### **4.3.1 Extração do DNA bacteriano**

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

### 4.3.2 Colocação das amostras na membrana de nylon

Uma membrana de nylon (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences, Chicago, IL- USA) foi montada em Minislot 30® (Immunetics, Cambridge, MA – USA). Cada suspensão de amostra contendo DNA livre foi depositada nas fendas do Minislot 30® e o DNA permaneceu depositado na membrana de *nylon*. A membrana foi removida do aparato e o DNA, previamente depositado na mesma, foi fixado por intermédio de aquecimento em forno a 120 °C, por 20 minutos. As duas últimas canaletas do *Minislot* 30® foram reservadas para a colocação dos controles, contendo uma mistura das espécies dos microrganismos que foram investigados pelas sondas de DNA, em duas concentrações,  $10^5$  e  $10^6$  células bacterianas.

### 4.3.3 Hibridização da Membrana com as sondas de DNA

Após a fixação do DNA na membrana, esta foi pré-hibridizada a 42°C, por uma hora, numa solução de 50% formamida, 1% caseína, 5 X SSC (Solução Salina Citrada), 25 nM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/mL de RNA de levedura. A membrana foi então colocada sob a placa acrílica do *Miniblotter* 45® (Immunetics, Cambridge, MA – USA), rotacionada 90° de sua posição original, com as linhas contendo o DNA fixado, perpendiculares às canaletas do *Miniblotter* 45®. O *Miniblotter* 45® contém 45 canaletas que servem, cada uma, para a colocação de uma sonda de DNA.

As sondas de DNA específicas para as 40 espécies que foram usadas neste estudo (Tabela 1) foram confeccionadas usando

*random primer digoxigenin labeling kit* (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN – USA), como descrito por Feinberg e Volgelstein (1983). Essas espécies foram selecionadas devido à sua associação as infecções endodônticas/periodontais ou a sua presença em outras infecções orais e saliva (Gomes et al., 2004; Haffajee et al., 1997; Socransky et al., 1998; Jung et al., 2000; Siqueira Jr. et al., 2001).

Quadro 1 - Relação das cepas empregadas para o desenvolvimento das sondas de DNA bacteriano

(continua)

<b>Espécies</b>	<b>Cepas</b>	<b>Gram</b>	<b>Metabolismo</b>
<b>Complexo vermelho</b>			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Tannerella forsythia</i>	43037 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Treponema denticola</i>	B1b	Gram -	Anaeróbio estrito
<b>Complexo roxo</b>			
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929 <sup>a</sup>	Gram +	Anaeróbio facultativo
<i>Veillonella parvula</i>	10790 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio estrito
<b>Complexo verde</b>			
<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans</i> (a+b)	43718 <sup>a</sup> e 29523 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio facultativo
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Eikenella corrodens</i>	23837 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio facultativo
<b>Complexo laranja principal</b>			
<i>Fusobacterium nucleatum ssp Nucleatum</i>	25586 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Fusobacterium nucleatum ssp Polymorphum</i>	10953 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio estrito

Quadro 1 - Relação das cepas empregadas para o desenvolvimento das sondas de DNA bacteriano

(continua)

<b>Espécies</b>	<b>Cepas</b>	<b>Gram</b>	<b>Metabolismo</b>
<i>Fusobacterium nucleatum ssp Vincentii</i>	49256 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Parvimonas micra</i>	33270 <sup>a</sup>	Gram +	Anaeróbio estrito
<i>Prevotella intermédia</i>	25611 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 <sup>a</sup>	Gram +	Anaeróbio facultativo
<b>Complexo laranja periférico</b>			
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Campylobacter showae</i>	51146 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 <sup>a</sup>	Gram +	Anaeróbio estrito
<b>Complexo Amarelo</b>			
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 <sup>a</sup>	Gram +	Anaeróbio facultativo
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 <sup>a</sup>	Gram +	Anaeróbio facultativo
<i>Streptococcus mitis</i>	49456 <sup>a</sup>	Gram +	Anaeróbio facultativo
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 <sup>a</sup>	Gram +	Anaeróbio facultativo
<b>Outras espécies</b>			
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 <sup>a</sup>	Gram +	Anaeróbio facultativo
<i>Actinomyces oris</i>	43146 <sup>a</sup>	Gram +	Anaeróbio facultativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212 <sup>a</sup>	Gram +	Anaeróbio facultativo
<i>Enterococcus faecium</i>	6569 <sup>a</sup>	Gram +	Anaeróbio facultativo
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271 <sup>a</sup>	Gram +	Anaeróbio estrito
<i>Gemella morbillorum</i>	27824 <sup>a</sup>	Gram +	Anaeróbio estrito

a ATCC (American Type Culture Collection); b Forsyth Institut

Quadro - Relação das cepas empregadas para o desenvolvimento das sondas de DNA bacteriano

(conclusão)

Espécies	Cepas	Gram	Metabolismo
<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Neisseria mucosa</i>	19696 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio facultativo
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Propionibacterium acnes</i> (I+II)	11827 <sup>a</sup> e 11282 <sup>a</sup>	Gram +	Anaeróbio aerotolerante
<i>Seimonas noxia</i>	43541 <sup>a</sup>	Gram -	Anaeróbio estrito
<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 <sup>a</sup>	Gram +	Anaeróbio facultativo
<i>Treponema socranskii</i>	S1b	Gram -	Anaeróbio estrito

a ATCC (American Type Culture Collection); b Forsyth Institut

Anteriormente ao seu uso, as sondas foram testadas com uma mistura controle contendo as espécies investigadas, numa concentração de  $10^4$  células bacterianas. Suas concentrações foram ajustadas de tal modo que a intensidade dos sinais de todas as sondas sejam semelhantes.

Cada sonda de DNA contida numa solução de hibridização (45% formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/mL de RNA levedura, 10% de sulfato de dextrano, 1% de caseína e 20 mg/mL de sonda de DNA). Cada canaleta do *Miniblotter* 45® foi preenchida com 135  $\mu$ L de uma determinada sonda. As sondas hibridizaram perpendicularmente às linhas contendo o DNA bacteriano fixado, propiciando um formato xadrez com as linhas de DNA horizontais, e as sondas verticais. O aparato *Miniblotter* 45® e a membrana com as sondas e o DNA das amostras bacteriana fixado, foi colocado dentro de um saco plástico umedecido para evitar a desidratação das mesmas e incubado a 42 °C para que a hibridização ocorra. A hibridização das

membranas com as sondas ocorreram durante um período mínimo de 12 horas (*overnight*).

#### 4.3.4 Detecção das espécies

Após a hibridização com as sonda, as membranas foram removidas do *Miniblotter* 45® e lavadas por 40 minutos a 65 °C, numa solução adstringente de  $PO_4$  *Buffer* (Tampão de fosfato), a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por 1 hora, sob agitação, numa solução bloqueadora contendo 0,1 M ácido maleico, 3 M NaCl, 0,2 M NaOH, 0,3% Tween 20, 0,5% caseína, pH 8,0 e por 30 minutos na mesma solução contendo anticorpo anti-digoxigenina (*Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments* – Roche Diagnostics GmbH, Mannheim – Germany) conjugado à fosfatase alcalina (Boehringer, Mannheim – Germany), numa diluição 1/25.000<sup>8</sup>. As membranas foram, então, lavadas com uma solução de 0,1 M ácido maleico, 3 M NaCl, 0,2 M NaOH, 0,3% Tween 20, pH 8,0, duas vezes por 20 minutos, e uma vez por 5 minutos em 0,1 M Tris HCl, 0,1 NaCl, 50 mM  $MgCl_2$ , pH 9,5. Em seguidas as membranas foram incubadas em solução detectora, *CDP-Star Detection Reagent* ®(Amershan Biosciences UK Limited, Buckinghamshire – UK), por 60 minutos a 37 °C. Finalmente, as membranas foram colocadas em cassete sob um filme radiográfico (Kodak® X-OMAT Kodak Brasileira Com. E Ind. Ltda, São José dos Campos, SP) por aproximadamente 40 minutos, e os filmes foram revelados logo em seguida.

Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra dos canais radiculares foi comparado ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles contendo  $10^5$  e  $10^6$ .

#### **4.3.5 Extração de endotoxinas dos canais radiculares e bolsa periodontal**

Nas coletas foram adicionados 1000  $\mu$ L de água de LAL (Limulus Amebocyte Lysate assay) estéril e apirogênica. A extração da endotoxina do cone de papel foi realizada através da agitação mecânica em vortex durante 60 segundos.

#### **4.4 Quantificação de endotoxinas**

A quantificação das endotoxinas presentes nas bolsas periodontais e canais radiculares infectados foram feitas através do teste cromogênico LAL.

O eppendorf contendo o cone de papel (amostra matriz) armazenados em 1 mL de água apirogênica foi agitado durante 1 minuto. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas transferindo 50  $\mu$ L da amostra matriz para a diluição  $10^{-1}$  e após transferido 50  $\mu$ L da diluição  $10^{-1}$  para diluição  $10^{-2}$  em tubos eppendorf (1,5 mL) contendo 450  $\mu$ L de água apirogênica.

Vale ressaltar que anteriormente a realização do experimento, foi realizado um estudo piloto para determinar quais seriam as amostras utilizadas durante o teste de endotoxinas.

Para verificar a neutralização da endotoxina, as amostras coletadas 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 B). 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  $\mu$ L de água apirogênica (branco da reação), os padrões de endotoxina, as amostras coletadas ar 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  $\mu$ L do reagente cinético cromogênico do LAL, com uma micropipeta multicanal e ponteiras apirogênicas (Figura 2). 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.



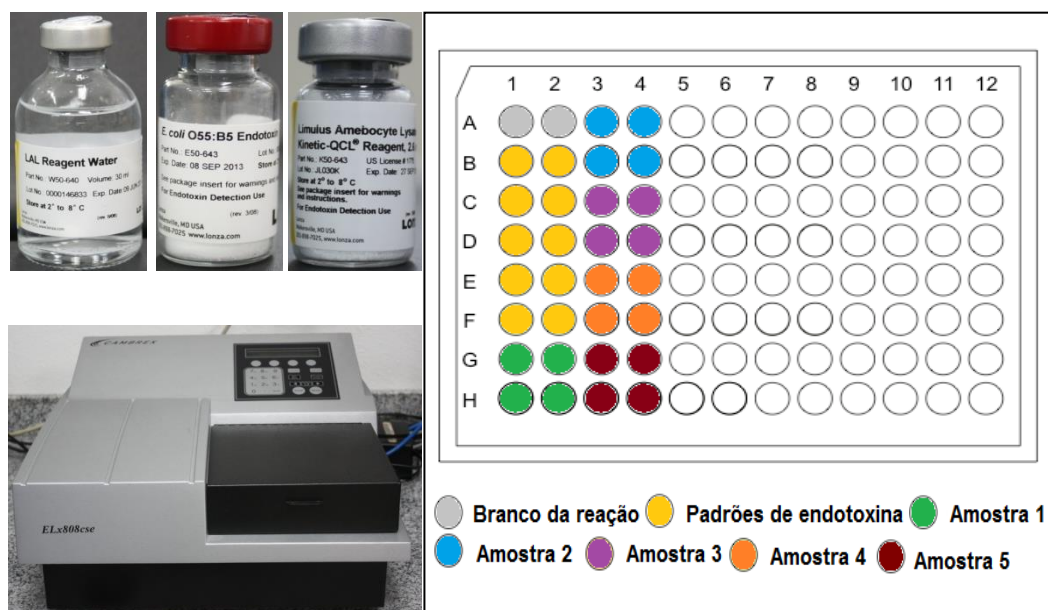


Figura 2 – Quantificação de endotoxinas. A) água apirrogênica; B) endotoxina padrão de *E. coli*; C) reagente cinético cromogênico do LAL; D) leitor cinético QCL; E) esquema de montagem da placa de 96 poços.

#### 4.4.1 Análise Estatística

Para avaliar a correlação entre grupos e sinais e sintomas foi usado o coeficiente de correlação de Pearson com significância de 5%. Para análise dos níveis de endotoxinas da bolsa e canal radicular foi usado o teste de wilcoxon. Para correlação de microrganismos foi usado o teste exato de fisher.

## 5 RESULTADOS

Foram realizados neste estudo coletas de 10 dentes de pacientes com lesões endo-periodontais. Durante a anamnese, 2/10 relataram dor em algum momento previamente as coletas das amostras.

Durante o exame clínico, foi observado que 3/10 pacientes apresentaram dor à percussão, 3/10 pacientes relataram dor à palpação apical, 6/10 não apresentaram qualquer tipo de dor (percussão, palpação, prévia), 4/10 pacientes apresentavam fístula, 5/10 pacientes apresentaram presença de exsudato no canal radicular e 6/10 apresentaram exudato na bolsa periodontal. Cinco dos 10 dentes encontravam-se com restaurações definitivas adequadas e 5/10 estavam íntegros. Foi constatado que 6/10 casos eram originariamente infecções periodontais e 4/10 endodônticos. As características clínicas e radiográficas podem ser observadas no Quadro 2.

Quadro 2 – Características clínicas e radiográficas dos dentes submetidos à coleta

Caso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dente	12	27	43	33	47	11	16	21	35	37
Pa	não	sim	não	não	sim	não	não	não	sim	não
Pe	não	sim	não	não	não	não	não	não	sim	sim
Prévia	não	sim	não	não	não	não	não	não	não	sim
F	não	sim	não	não	não	sim	sim	sim	não	não
Exu canal	não	sim	não	não	não	sim	sim	sim	sim	não
Exu bolsa	sim	sim	não	não	não	sim	não	sim	sim	sim
bolsa mm	6	13	8	8	6	12	7	12	11	9
lesão mm	2	7	3	4	3	4	3	3	5	6
Mob	2	1	1	1	2	3	2	3	2	3
Condição	hígido	rest	hígido	hígido	rest	hígido	rest	rest	hígido	rest
Origem	perio	perio	endo	endo	endo	perio	endo	perio	perio	perio

Pe: Dor a percussão; Pa: Dor a palpação; Prévia: Dor prévia; F: Fístula; Exu: Exsudato.

## 5.1 Resultados endotoxinas

A Tabela 1 mostra os valores de endotoxinas por Eu/ml referentes as coletas das amostras do canal radicular e da bolsa periodontal. Maiores valores foram encontrados nas amostras da bolsa periodontal. Foram encontradas unidades de LPS em todas as amostras, tanto periodontais quanto endodônticas.

Tabela 1. Valores de endotoxinas (Eu/ml) encontrado nas amostras do canal radicular e bolsa periodontal.

Pacientes	Coletas	
	Canal Radicular	Bolsa Periodontal
1	1990	2490
2	10000	35500
3	51,0	9780
4	2630	102600
5	10600	89100
6	59,6	90100
7	2830	12900
8	5,43	22500
9	11,2	2090
10	4220	23900

Os valores de endotoxinas referentes ao canal radicular foram consideravelmente menores em comparação com os valores da bolsa periodontal, com média e desvio padrão de  $3240 \pm 4001$  e  $39096 \pm 39312$ . Ao teste de wilcoxon, os níveis de endotoxinas referentes a bolsa e o canal foram significativamente diferentes ( $p = 0,002$ ). A figura 6 representa os valores de mínima, máxima e mediana obtidos.

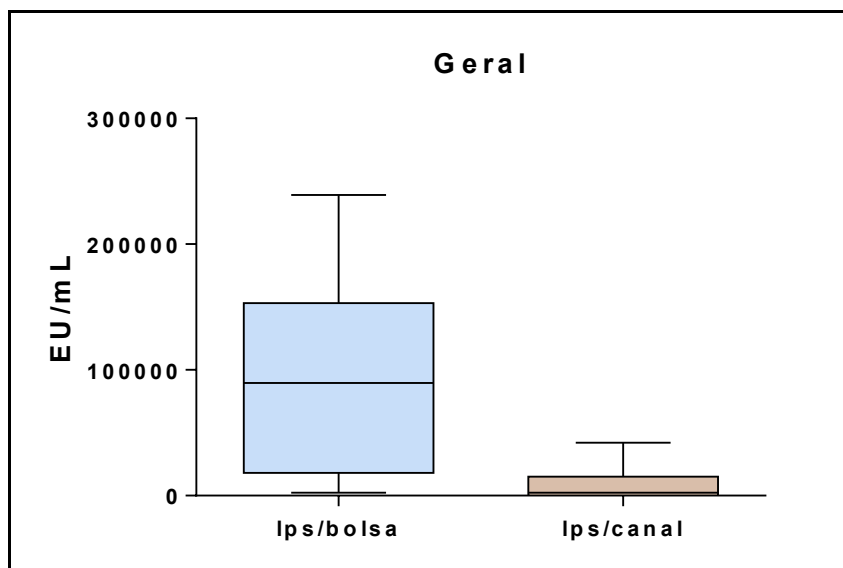


Figura 6 - Mínima, máxima e mediana dos valores de endotoxinas encontradas no canal radicular e bolsa periodontal em Eu/ml.

Entre os valores obtidos no canal radicular e bolsa periodontal, houve correlação moderada quando aplicado o coeficiente de correlação de Pearson, com  $p = 0,084$ .

Em relação a origem da infecção, os casos de origem periodontal mostraram correlação moderada ( $r = 0,02857$ ) com os níveis de endotoxinas encontradas no canal radicular e bolsa periodontal. A correlação para os casos de origem endodôntica também mostraram

correlação moderada( $r = 0.8000$ ) pelo coeficiente de correlação de Pearson.

Os níveis de endotoxinas encontrados nos casos com ausência de sinais e sintomas foram menores no canal radicular e bolsa periodontal, com média e desvio padrão de  $5514 \pm 11219$  (Figura 7.), sem significância estatística com  $p = 0,232$ .

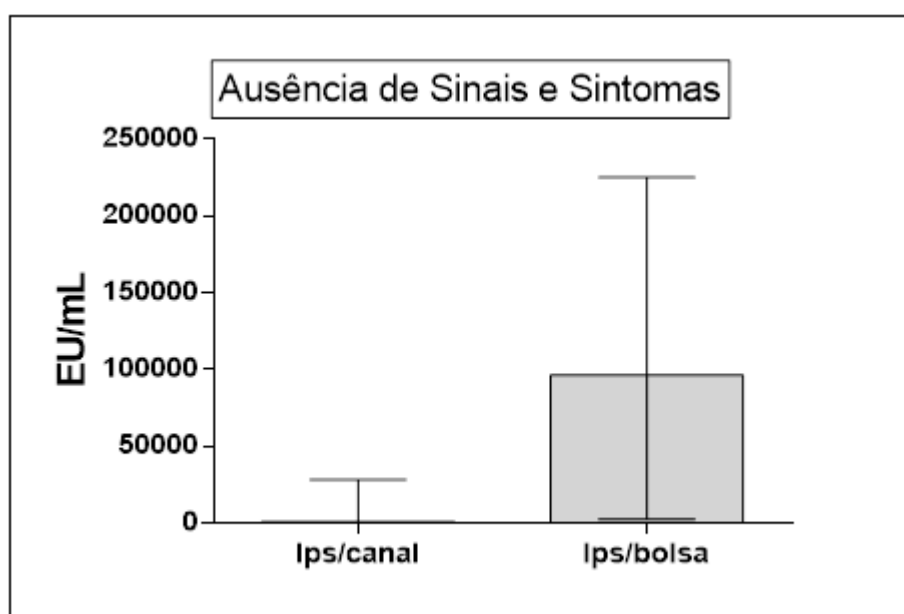


Figura 7 - Mediana, valores máximos e mínimos dos níveis de endotoxinas encontradas no canal radicular e bolsa periodontal.

## 5.2 Resultados checkerboard DNA-DNA hybridization

Foram encontrados microrganismos em 100% das amostras através do teste checkerboard dna-dna hybridization.

Referente as amostras periodontais, 14 microrganismos não foram encontrados, sendo eles: *C. gracillis*, *C. sputigena*, *G.*

*morbilorum*, *E. corrodens*, *P. acnes*, *S. noxia*, *C. gingivalis*, *N. mucosa*, *A. odontolyticus*, *E. faecium*, *C. ochracea*, *S. sanguinis*, *E. saburreum* e *A. actinomycetencomytans*. Os microrganismos mais prevalentes nessas amostras foram *P. nigrescens*(70%), *P. intermedia* (50%), *V. parvula*(50%), *F. nucleatum sp. vicentii* (50%), *P. gingivalis*(40%), *P. endodontalis*(40%), *F. nucleatum* (40%) e *E. nadatum* (40%).(Figura 8).

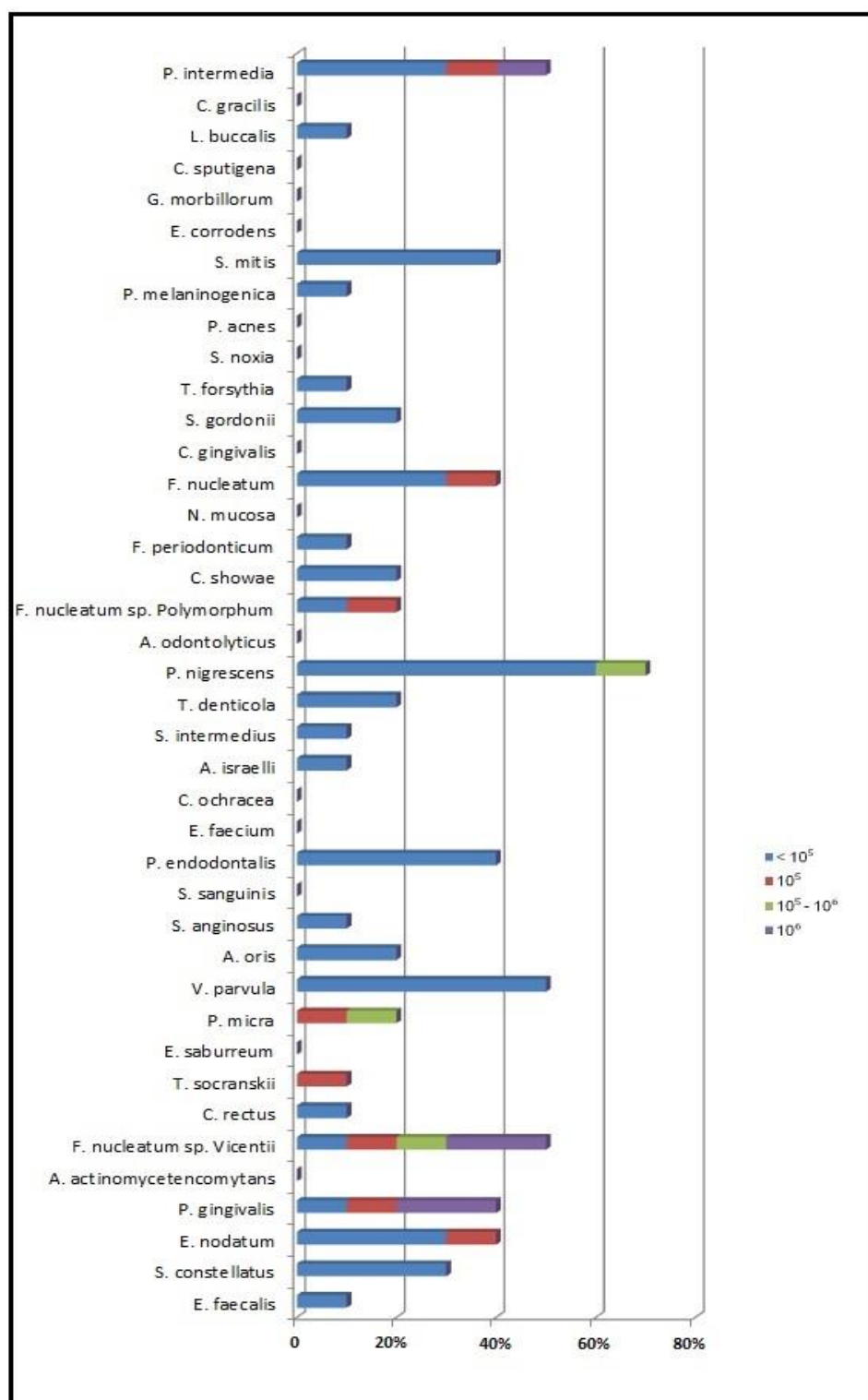


Figura 8 - Gráfico de barras de frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano em amostras das bolsa periodontais de lesões endo-periodontais. O comprimento total de cada barra indica porcentagem de amostras positivas. Cores diferentes no interior de cada barra indicam porcentagem de amostras contendo diferentes concentrações de DNA bacteriano.

No entanto, nas amostras do canal radicular, 6 microrganismos não foram detectados, sendo eles: *S. noxia*, *S. gordini*, *F. nucleatum sp. polymorphum*, *S. anginosus*, *E. saburreum* e *A. actinomycetencomytans*. As espécies mais prevalentes foram *P. endodontalis*(80%), *L. bucallis*(80%), *C. sputigena*(70%), *E. faecium*(70%), *A. oris*(70%), *V. parvula*(70%), *P. micra*(70%), *P. intermedia* (60%), *G. morbillorum* (60%) e *E. nadatum* (60%). (Figura 9).



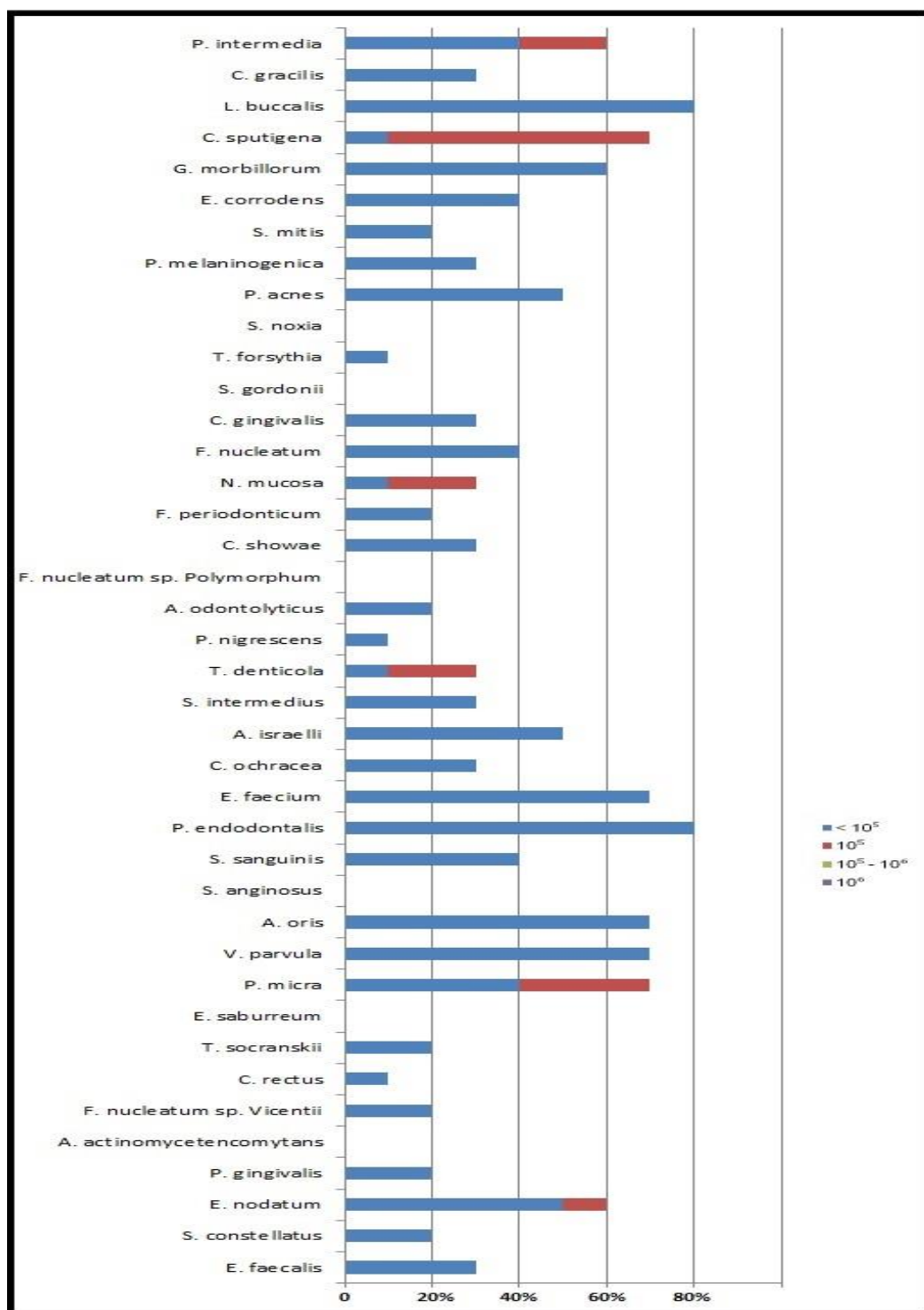


Figura 9 - Gráfico de barras de frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano em amostras do canal radicular de lesões endo-periodontais. O comprimento total de cada barra indica porcentagem de amostras positivas. Cores diferentes no interior de cada barra indicam porcentagem de amostras contendo diferentes concentrações de DNA bacteriano.

Ao teste exato de fisher, a espécie *P. nigrescens* foi fortemente relacionada com a microbiota periodontal, estatisticamente significativa ( $p = 0,0198$ ). Entretanto, as espécies *E. faecium* ( $p = 0,0031$ ), *P. acnes* ( $p = 0,0325$ ), *G. morbillorum* ( $p = 0,0108$ ), *C. sputigena* ( $p = 0,0031$ ) e *L. buccalis* ( $p = 0,0055$ ), foram fortemente relacionadas com a microbiota endodôntica.

Houve uma fraca associação entre *P. intermedia* encontrado na bolsa periodontal e no canal radicular ( $p = 0,75$ ), *P. endodontalis* ( $p = 0,34$ ) e *V. parvula* ( $p = 0,34$ ).

## **6 DISCUSSÃO**

### **6.1 Da metodologia**

Durante a coleta das amostras periodontais foram utilizadas técnicas assépticas, remoção de cálculo supragengival, isolamento relativo, e antes da coleta a placa supragengival foi removida esfregando-se uma gaze esterilizada umedecida em soro fisiológico e um jato de ar a fim de manter a superfície do dente seca. Para as coletas do canal radicular, foi realizada a desinfecção do campo operatório e a utilização de solução salina fisiológica estéril e apirogênica durante a abertura coronária a fim de evitar contaminação externa ao canal radicular. Estes métodos apresentam bons resultados para controle da assepsia e estão bem estabelecidos na literatura (Rupf et al., 2000; Didilescu et al., 2012; Gomes et al., 2004; Sassone et al., 2008; Rôças et al., 2001).

O meio de transporte para as coletas microbiológicas foi a solução TE(Tris-Hcl EDTA), esta solução permite a sobrevivência de organismos anaeróbios estritos e aeróbios, sem que ocorra o seu crescimento. No intervalo de no máximo 4 horas após a coleta, foi adicionado 1,0ml de solução de NaOH no intuito de evitar a degradação do DNA dos microrganismos nas amostras. Essas amostras devem ser processadas o mais rápido possível, pois após 24 horas pode haver a multiplicação de microrganismos entéricos, o que pode alterar as proporções originais da amostra. Ao final das coletas, as mesmas foram armazenadas a -20 °C (Socransky et al., 1998; Dahlén et al., 1993; Ali et al., 1995).

A metodologia do *checkerboard DNA-DNA hybridization* permite a detecção de 40 microrganismos diferentes, em até 28 amostras. Em comparação com outras técnicas moleculares, como PCR convencional, nested-PCR, RT-PCR e PCR-*real time*, a hibridização de DNA-DNA é considerada um método rápido, eficaz e com custo relativamente baixo. É também um método útil para avaliação de microbiota de um determinado ambiente. A tecnologia de hibridização ainda apresenta vantagem sobre outros métodos moleculares por não amplificar a amostra, pois se houver um contaminante microbiano, esse agente estaria abaixo dos limites de detecção do método ( $10^3$  a  $10^4$  células). Entretanto, microrganismos não contaminantes, que também estiverem em pequenos números também não são detectados (Socransky et al., 1998; Siqueira et al., 2000).

O processo de esterilização em autoclaves não permite a eliminação de possíveis endotoxinas preexistentes, sendo assim o material usado para as coletas de endotoxinas foi enviado para a EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiação, Cotia, SP, Brasil), e submetida ao tratamento com a radiação gamma, este processo realiza a esterilização e eliminação de possíveis endotoxinas presentes. Após a coleta, as amostras foram transferidas para tubos eppendorfs apirogênicos e armazenados a  $-20$  °C para posterior análise de endotoxinas (Xavier et al., 2013).

O teste LAL (limulus amoebocyte lysate) foi usado para detecção e quantificação das endotoxinas presentes em ambos os ambientes (bolsa periodontal e canal radicular). De acordo com Martinho et al. (2011a) este teste é o mais indicado pra esse tipo de análise, sendo considerado um teste fácil e preciso. Foram seguidas todas as indicações empregadas pelo fabricante (Lonza, Walkersville, MD, EUA) no intuito de se obter resultados mais fidedignos. Os processos de diluição seriadas das amostras foram feitas para diminuir a quantidade de interferências, já que o teste é muito sensível. Para transferir os dados em Eu/ml, esse

estudo considerou também a diluição do cone de papel(amostra) em 1000 micro litros(1 ml), sendo necessária a multiplicação dos resultados por 10, esse processo foi realizado sem contar com a diluição seriada para remoção de interferências das amostras. Foi observado que alguns estudos com a mesma metodologia, não consideram essa primeira diluição (Martinho, Gomes, 2008; Endo et al., 2012; Xavier et al., 2013; Martinho et al., 2014), tornando-se necessário as considerações desse fato durante a interpretação dos resultados com alguns estudos

Na endodontia, vários estudos utilizaram o teste LAL a fim de quantificar endotoxinas presentes no canal radicular, no entanto, o ensaio também é usado para testar vários tipos de tratamento e sua correlação com microrganismos (Endo et al., 2012; Xavier et al., 2013; Martinho et al., 2014). Em periodontia não há estudos que avaliaram as endotoxinas presentes na bolsa periodontal, entretanto existem vários estudos que avaliaram endotoxemia (endotoxinas presentes no sangue), após tratamentos periodontais (Lee et al., 2008), e também estudos que avaliaram quantidades de endotoxinas em dentes extraídos por razões periodontais ( Maidwell-Smith et al., 1987; Cadosch et al., 2003).

## **6.2 Dos Resultados**

A literatura sobre lesões endo-periodontais é muito escassa, sabe-se que a maioria dos microrganismos patógenos periodontais também são patógenos endodônticos, entretanto, poucos estudos foram feitos relacionando-os a casos que envolvam ambas as doenças em um único elemento dentário, ou seja, em dentes com lesão endo-periodontal. Sendo assim, este trabalho procurou investigar e identificar um perfil microbiológico deste tipo de lesão pelo método checkerboard DNA-DNA hybridization, como outro objetivo também

quantificar e correlacionar a quantidade de endotoxinas presentes pelo ensaio de LAL.

Lesões endo-periodontais são de difícil diagnóstico e tendem a ter um prognóstico desfavorável (Solomon et al., 1995). A literatura mostra estudos em que autores evidenciaram a capacidade de microrganismos do tecido endodôntico causarem alterações nos tecidos periodontais, e vice-versa. Essa capacidade se dá pela íntima relação destes dois tecidos, desde a formação embriológica até a formação do dente, onde esses tecidos permanecem interligados pelo forame apical, canais laterais, canais acessórios ou túbulos dentinários (Seltzer et al. 1967).

Sendo a etiologia principal das lesões endo-perio o biofilme (Solomon et al., 1995), essas lesões têm como característica uma grande perda óssea, o que nos leva a relacioná-la com microrganismos gram negativos. Na literatura, há inúmeros estudos correlacionando bactérias gram negativas com doenças periodontais e lesões endodônticas (Martinho et al., 2010; Xavier et al., 2013b; Shaddox et al., 2013). As endotoxinas ou LPS são substâncias presentes na membrana de bactérias gram negativas e correspondem a um dos mais potentes fatores de virulência, essa substância age elevando a resposta imune do hospedeiro, causando reabsorção óssea (Petsch, Anspach, 2000).

Neste estudo todas as amostras, sendo 10 periodontais e 10 endodônticas, marcaram positivo para endotoxinas. A contagem em Eu/ml na bolsa periodontal foi significativamente maior em comparação com o canal radicular ( $p = 0,002$ ). Essa diferença pode ser explicada pela carga microbiana em lesões endo-perio ser maior no periodonto em comparação com o canal radicular (Didilescu et al., 2012; Rupf et al., 2000).

Na literatura, vários estudos correlacionaram altos níveis de endotoxinas no canal radicular, com sintomatologia dolorosa (Jacinto et al., 2005; Martinho, Gomes, 2008; Xavier et al., 2013). No presente

estudo, altos níveis de endotoxinas no canal radicular também foram correlacionados com alguma sintomatologia, entretanto, altos níveis de endotoxinas na bolsa periodontal não tiveram nenhuma correlação sintomatológica. As doenças periodontais não são conhecidas por manifestações dolorosas. Com exceção das manifestações agudas como as doenças periodontais necrosantes e abscessos periodontais e gengivais, infecções periodontais são manifestações crônicas e por isso geralmente não apresentam algum sinal ou sintoma (Lindhe et al., 2008). Talvez por esse motivo, mesmo com uma carga microbiana maior e maiores níveis de endotoxinas, não foi possível correlacionar os altos níveis de endotoxinas nas amostras periodontais com sintomatologia dolorosa.

No presente estudo, foram observados altos níveis de endotoxinas nos canais radiculares, com média de 3240 Eu/ml, entretanto, para compararmos com outros estudos devemos dividir por 10 a média, por diferença de abordagem dos resultados. Sendo assim, a média de 324 Eu/ml encontrada neste estudo ainda é um pouco superior a outros estudos que avaliaram níveis de endotoxinas em canais radiculares com infecções endodônticas primárias, nesses estudos foi encontrado em média níveis entre 150-250 Eu/ml (Martinho et al., 2011a, 2014; Xavier et al., 2013). Valores maiores obtidos nesse estudo podem ser explicados pelo fato de que, em alguns casos, a bolsa periodontal já estava em comunicação com o forame apical, podendo levar a um aumento no número de microrganismos e seus fatores de virulência, como por exemplo, o LPS. Na literatura não há nenhum estudo que avalia a quantidade de endotoxinas no canal radicular em lesões endopriodontais.

Os casos com sintomatologia dolorosa obtiveram maiores níveis de endotoxinas, em comparação com casos sem sintomatologia. Essa afirmação está de acordo com outros estudos (Martinho et al., 2011a, 2014; Xavier et al., 2013).

Os valores de endotoxinas encontradas nas amostras periodontais foram significativamente maiores que as encontradas no canal radicular, com média de 39096 Eu/ml, 3909 Eu/ml se considerarmos a abordagem de resultados de outros estudos, correspondendo cerca de 10 vezes o valor encontrado nas amostras do canal radicular.

Na literatura não há outros estudos que avaliaram a quantidade de endotoxinas na bolsa periodontal. Maidwell-Smith et al. (1987) verificaram a quantidade de LPS em dentes extraídos devido a periodontite, os valores encontrados no estudo variaram de 19-394 ng/dente, esse valor não pode ser comparado com o encontrado neste estudo, uma vez que a metodologia foi totalmente diferente. No entanto, ao contrário do que é encontrado na literatura sobre o canal radicular (Martinho et al., 2011; Xavier et al., 2013; Martinho et al., 2014), o autor não achou correlação sobre a quantidade de LPS e perda óssea ou profundidade de sondagem, concordando assim com os achados do presente estudo.

Cadosch et al. (2003), avaliaram a remoção de endotoxinas em vinte e quatro dentes extraídos devido a periodontite após sessões de raspagem. Os valores obtidos de LPS pelo método LAL na superfície radicular foram de 0,03-2,62 EU/ml. Os valores encontrados por esses autores foram muito menores em comparação com o presente estudo. Devemos considerar que os dentes foram extraídos, preparados e tratados e com uma metodologia muito diferente da atual pesquisa.

Através do método *chckerboard dna-dna hybridization*, este estudo realizou um delineamento do perfil microbiano envolvido nas infecções endodônticas e periodontais de um mesmo elemento dentário (lesões endo-perio) e correlacionou com sinais e sintomas clínicos. É bem estabelecido na literatura que o fator etiológico principal das doenças periodontais e lesões endodônticas são os microrganismos do biofilme dental, entretanto é necessário definir o papel específico desempenhado por esses patógenos neste tipo de lesão e assim, determinar as melhores



medidas terapêuticas para a erradicação destes patógenos (Didilescu et al., 2012).

Em grande parte das infecções que envolvem o complexo endodôntico-periodontal, os microrganismos possuem grande influência nos aspectos clínicos da lesão e conseqüentemente no plano de tratamento (Zendher et al., 2002).

Apesar das infecções endodônticas e periodontais serem multi espécies, a literatura mostra que alguns microrganismos parecem estar mais relacionados com aspectos de doença. Socransky et al., (1998) dividiu essa comunidade microbiana em complexos, sendo os complexos vermelho e laranja conhecidos como os de maior patogenicidade.

Uma seqüência de colonização microbiana pode ser observada no biofilme dental. Espécies como *Streptococcus* (complexo amarelo), compostos em sua maioria de cocos, gram positivos e aeróbios, são consideradas primeiros colonizadores, seguido por espécies de *Capnocytophaga* e *E. corrodens* (complexo verde). *A. odontolyticus* e *V. parvula* (complexo roxo) formam uma ponte de adesão para o complexo laranja e finalmente ao complexo vermelho, essas espécies não têm a capacidade de adesão a superfície dental, sendo necessária a adesão mutua com outros complexos (Socransky et al., 1998).

O complexo vermelho é composto por *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia*. Esses microrganismos são conhecidos por sua alta patogenicidade, sendo sua presença fortemente relacionada com os aspectos de doença como, sangramento a sondagem, profundidade de sondagem e perda óssea, e por isso frequentemente encontradas em casos de periodontites avançadas (Socransky et al., 1998). Essas espécies além da sua virulência individual, quando associadas, *P. gingivalis* e *T. denticola* permitem o crescimento mutuo (Grenier, 1992). Em acordo com a literatura, os casos com maiores perdas de inserção

deste estudo, foram relacionados com maiores níveis de microrganismos deste complexo, especialmente *P. gingivalis* e *T. denticola*.

Neste estudo, as espécies mais prevalentes nas amostras periodontais foram *P. nigrescens*(70%), *P. intermedia* (50%), *V. parvula*(50%), *F. nucleatum sp. vicentii* (50%), *P. gingivalis*(40%), *P. endodontalis*(40%), *F. nucleatum* (40%) e *E. nadatum* (40%). Foi observado uma alta prevalência de microrganismos do complexo laranja, entretanto, além de sua relação como patógeno periodontal, altas incidências desse complexo também já foram associadas a infecções endodônticas (Baumgartner, Falkler, 1991, Lana et al., 2001, Siqueira et al. 2004).

As espécies mais prevalentes nas amostras do canal radicular foram, *P. endodontalis* (80%), *L. bucallis* (80%), *C. sputigena* (70%), *E. faecium* (70%), *A. oris* (70%), *V. parvula* (70%), *P. micra* (70%), *P. intermedia* (60%), *G. morbillorum* (60%) e *E. nadatum* (60%). Outros estudos também encontraram grande prevalência das espécies *V. parvula*, *E. faecium*, e *P. micra* em infecções endodônticas primárias (Siqueira et al., 2002; Sassone et al., 2008, 2012; Rôças et al., 2011).

Neste estudo, os microrganismos *P. intermedia*, *P. endodontalis* e *V. parvula* foram os mais relacionados com as infecções endo-periodontais, mesmo assim ao teste de fisher o mesmo não houve significância. Estudos já tentaram correlacionar os microrganismos em ambos os tecidos (Kipioti et al., 1984; Kerekes, Olsen, 1990; Kobayashi et al., 1990; Kurihara et al., 1995; Rupf et al., 2000; Didilescu et al., 2012)

Rupf et al., 2000 verificaram que supostos patógenos periodontais também residem o canal radicular. Em acordo com seu estudo, na presente pesquisa foi possível encontrar microrganismos comuns em ambos o tecidos.

Didilescu et al., 2012 analisaram 6 espécies em infecções endo-periodontais, 4 do complexo laranja (*Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*)

e 2 do complexo verde (*Eikenella corrodens* e *Capnocytophaga sputigena*). Porém, em seu estudo foi analisado tanto infecções primárias, quanto secundárias. Em infecções secundárias, a microbiota é composta por microrganismos gram positivos em sua maioria, como *E. faecalis* (Murad et al., 2014). No entanto Didilescu et al., 2012, encontraram uma correlação das infecções endo-perio para as espécies *P. micra*, *F. nucleatum* e *C. sputigena*. No presente estudo, esses microrganismos também foram encontrados em ambos os tecidos, especialmente *P. micra*, no entanto está correlação não foi estatisticamente significativa.

Com os dados do presente estudo, observou-se grande prevalência de espécies do complexo laranja, sugerindo sua correlação com infecções endo-periodontais.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- a) Os valores de endotoxinas encontradas na bolsa periodontal foram maiores em comparação com o canal radicular;
- b) Houve associação moderada com o número de endotoxinas e a origem da lesão;
- c) Valores menores de endotoxinas foram encontrados em casos sem sintomatologia;
- d) Houve associação das amostras periodontais com a espécie *P. nigrescens*;
- e) Houve associação das amostras do canal radicular com as espécies *P. endodontalis*, *L. bucallis*, *C. sputigena*, *E. faecium*, *A. oris*, *V. parvula*, *P. micra*, *P. intermedia*, *G. morbillorum* e *E. nadatum*;
- f) As espécies *P. intermedia*, *P. endodontalis* e *V. parvula* foram as mais prevalentes. Espécies do complexo laranja foram as mais prevalentes em lesões endo-periodontais.

## 8 REFERÊNCIAS\*

Ali RW, Bancescu G, Nielsen O, Skaug N. Viability of four putative periodontal pathogens and enteric rods in the anaerobic transport medium VMGA III. *Oral Microbiol Immunol*. 1995 Dec;10(6):365-71.

Al-Fouzan KS. A new classification of endodontic-periodontal lesions. *Int J Dent*. 2014 Apr 14;919173.

Baumgartner JC, Falkler WA Jr. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod*. 1991 Aug;17(8):380-3.

Bender IB, Seltzer S. The effect of periodontal disease on the pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972;33(3):458-74.

Bergenholtz G, Lindhe J. Effect of experimentally induced marginal periodontitis and periodontal scaling on the dental pulp. *J Clin Periodontol*. 1978 Feb;5(1):59-73.

Brännström M, Garberoglio R. The dentinal tubules and the odontoblast processes. A scanning electron microscopic study. *Acta Odontol Scand*. 1972 Sep;30(3):291-311.

Cadosch J, Zimmermann U, Ruppert M, Guindy J, Case D, Zappa U. Root surface debridement and endotoxin removal. *J Periodont Res*. 2003 Jun;38(3):229-36.

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 20 ago 2013; acesso em 25 out 2014]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Cahn LR. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1954 Dec;7(12):1258-66.

Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature 2002; 420, 885–891.

Colyer F. Dental disease in animals. Br Dent J. 1947 Jan 17;82(2):31-5.

Colyer, F. Bacteriological infection in pulps of pyorrhetic teeth. Br Dent J. 1972 Mar;33(3):458-74.

[No authors listed]. Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. Ann Periodontol. 1996 Nov;1(1):926-32.

Czarnecki RT, Schilder H. A histological evaluation of the human pulp in teeth with varying degrees of periodontal disease. J Endod. 1979 Aug;5(8):242-53.

Dahlén G, Pipattanagovit P, Rosling B, Möller AJ. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. Oral Microbiol Immunol. 1993 Dec;8(6):375-82.

Darveau RP. Oral innate host defense responses: interactions with microbial communities and their role in the development of disease. In Karamitsu HK, Ellen RP. Oral bacterial ecology: the molecular basis. Norfolk, England: Horizon Scientific; 2000. p.169-218.

De Deus QD. Frequency, location, and direction of the lateral, secondary, and accessory canals. J Endod. 1975 Nov;1(11):361-6.

Didilescu AC, Rusu D, Anghel A, Nica L, Iliescu A, Greabu M, et al. Investigation of six selected bacterial species in endo-periodontal lesions. *Int Endod J.* 2012 Mar;45(3):282-93.

Ehnevid H, Jansson L, Lindskog S, Blomlöf L. Periodontal healing in teeth with periapical lesions. A clinical retrospective study. *J Clin Periodontol.* 1993 Apr;20(4):254-8.

Endo MS, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Oct;31(10):2575-83.

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

Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 1983 Jul 1;132(1):6-13.

Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther.* 2003 Nov;100(2):171-94.

Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J.* 1994 Nov;27(6):291-8.

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, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod.* 2012 Aug;38(8):1082-6.

Grenier D. Nutritional interactions between two suspected periodontopathogens, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 1992 Dec;60(12):5298-301.

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. *J Clin Periodontol.* 1997 Oct;24(10):767-76.

Harrán Ponce E, Canalda Sahli C, Vilar Fernandez JA. Study of dentinal tubule architecture of permanent upper premolars: evaluation by SEM. *Aust Endod J.* 2001 Aug;27(2):66-72.

Harrington GW. The perio-endo question: differential diagnosis. *Dent Clin North Am.* 1979 Oct;23(4):673-90.

Harrington GW, Steiner DR, Ammons WF. The periodontal-endodontic controversy. *Periodontol* 2000;30:123-30.

Haznedaroğlu F, Ersev H, Odabaşı H, Yetkin G, Batur B, Aşçi S, et al. Incidence of patent furcal accessory canals in permanent molars of a Turkish population. *Int Endod J.* 2003 Aug;36(8):515-9.



Holt SC, Ebersole JL. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol* 2000. 2005;38:72-122.

Hoppe WF, Stiiben J. Über die Messung des Volumens der Dentinkanilchen und fiber das Verhiltnis des Kanalvumens zum Gesamtdentinvolumen. *Stoma*. 1965 Dec;18:38-45.

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.

Jansson L, Ehnevid H, Lindskog S, Blomlöf L. Relationship between periapical and periodontal status: A clinical retrospective study. *J Clin Periodontol*. 1993 Feb;20(2):117-23.

Jung IY, Choi BK, Kum KY, Roh BD, Lee SJ, Lee CY, et al. *J Endod*. 2000 Oct;26(10):599-604.

Kerekes K, Olsen I. Similarities in the microfloras of root canals and deep periodontal pockets. *Endodontics & Dental Traumatology*. 1990 6(1):1-5.

Kipioti A, Nakou M, Legakis N, Mitsis F. Microbiological findings of infected root canals and adjacent periodontal pockets in teeth with advanced periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1984 Aug;58(2):213-20.

Kobayashi T, Hayashi A, Yoshikawa R, Okuda K, Hara K. The microbial flora from root canals and periodontal pockets of non-vital teeth associated with advanced periodontitis. *Int Endod J*. 1990 Mar;23(2):100-6.

Kontakiotis EG, Tsatsoulis IN, Filippatos CG, Agrafioti A. A quantitative and diametral analysis of human dentinal tubules at pulp chamber ceiling and floor under scanning electron microscopy. *Aust Endod J.* 2014 Jun 16.

Kurihara H, Kobayashi Y, Francisco IA, Isoshima O, Nagai A, Murayama Y. A microbiological and immunological study of endodontic-periodontic lesions. *J Endod.* 1995 Dec;21(12):617-21.

Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BK, Hamdan JS, et al. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* 2001 Apr;16(2):100-5.

Lang N, Soskolne WA, Greenstein G. Consensus report: periodontic-endodontic lesions. *Ann Periodontol.* 1999;4(1):90.

Langeland K, Rodrigues H, Dowden W. Periodontal disease, bacteria, and pulpal histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1974 Feb;37(2):257-70.

Lee MK, Ide M, Coward PY, Wilson RF. Effect of ultrasonic debridement using a chlorhexidine irrigant on circulating levels of lipopolysaccharides and interleukin-6. *J Clin Periodontol.* 2008 May;35(5):415-9.

Lindhe J, Karring T, Lang NP, editores. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral.* 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Maidwell-Smith M, Wilson M, Kieser JB. Lipopolysaccharide (endotoxin, from individual periodontally involved teeth. *J Clin Periodontol.* 1987 Sep;14(8):453-6.

Mandel E, Machtou P, Torabinejad M. Clinical diagnosis and treatment of endodontic and periodontal lesions. *Quintessence Int.* 1993 Feb;24(2):135-9.

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

Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Antigenicity of primary endodontic infection against macrophages by the levels of PGE(2) production. *J Endod.* 2011b May;37(5):602-7.

Martinho FC, Gomes AP, Fernandes AM, Ferreira NS, Endo MS, Freitas LF, et al. Clinical comparison of the effectiveness of single-file reciprocating systems and rotary systems for removal of endotoxins and cultivable bacteria from primarily infected root canals. *J Endod.* 2014 May;40(5):625-9.

Mohammadi Z, Palazzi F, Giardino L, Shalavi S. Microbial biofilms in endodontic infections: an update review. *Biomed J.* 2013 Mar-Apr;36(2):59-70.

Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr.* 1966 Dec 20;74(5):Suppl:1-380.

Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, Gomes BP. *Treponema* species detected in infected root canals and acute apical abscess exudates. *J Endod.* 2010 Nov;36(11):1796-9.

Murad CF, Sassone LM, Faveri M, Hirata R Jr, Figueiredo L, Feres M. Microbial Diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Endod.* 2014 Jul;40(7):899-906.

Nattermann J, Du X, Wei Y, Shevchenko D, Beutler B. Endotoxin-mimetic effect of antibodies against Toll-like receptor 4. *J Endotoxin Res.* 2000;6(3):257-64.

Petsch D, Anspach FB. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol.* 2000;76(2-3):97-119.

Preetinder S. Endo-perio dilemma: a brief review. *Dent Res J* 2011;8(1): 39-47.

Rietschel ET, Zähringer U, Wollenweber HW, Miragliotta G, Musehold J, Lüderitz T, et al. Bacterial endotoxins: chemical structure and biologic activity. *Am J Emerg Med.* 1984 Jan;2(1):60-9.

Raetz CR. Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 1990;59:129-70.

Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR, Coelho AM. "Red complex" (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema*

denticola) in endodontic infections: a molecular approach. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001 Apr;91(4):468-71.

Rupf S, Kannengiesser S, Merte K, Pfister W, Sigusch B, Eschrich K. Comparison of profiles of key periodontal pathogens in periodontium and endodontium. *Endod Dent Traumatol.* 2000 Dec;16(6):269-75.

Sassone LM, Fidel R, Faveri M, Fidel S, Figueiredo L, Feres M. Microbiological evaluation of primary endodontic infections in teeth with and without sinus tract. *International Endodontic Journal.* 2008 Jun;41(6):508-15.

Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, Figueiredo L, Fidel SR, Feres M. A microbiological profile of unexposed and exposed pulp space of primary 100 endodontic infections by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Endod.* 2012 Jul;38(7):889-93.

Seltzer S, Bender IB, Nazimov H, Sinai I. Pulpitis-induced inter-radicular periodontal changes in experimental animals. *J Periodontol.* 1967; 38:124-9.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000 Jun;89(6):744-8.

Siqueira Jr JF, Rôças IN, Oliveira JCM, Santos KRN. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod.* 2001 Sep;27(9):563-6.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. *Actinomyces* species, streptococci, and *Enterococcus faecalis* in primary

root canal infections. *J Endod.* 2002 Mar;28(3):168-72.

Siqueira JF, Rôças IN, Alves FR, Santos KR. Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: a molecular investigation. *J Endod.* 2004 Sep;30(9):638-43.

Shaddox LM, Gonçalves PF, Vovk A, Allin N, Huang H, Hou W, et al. LPS-induced inflammatory response after therapy of aggressive periodontitis. *J Dent Res.* 2013 Aug;92(8):702-8.

Simon JHS, Glick DH, Frank AL. The relationship of endodontic-periodontic lesions. *J Periodont.* 1972;43(4):202-8.

Simring M, Goldberg M. The pulpal pocket approach: retrograde periodontitis. *J Periodontol* 1964;35:22-48.

Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques.* 1994 Oct;17(4):788-92.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998 Feb;25(2):134-44.

Solomon C, Chalfin H, Kellert M, Weseley P. The endodontic-periodontal lesion: a rational approach to treatment. *J Am Dent Assoc.* 1995 Apr;126(4):473-9.

Tang HM, Torabinejad M, Kettering JD. Leakage evaluation of root end filling materials using endotoxin. *J Endod.* 2002 Jan;28(1):5-7.

Teles FR, Teles RP, Uzel NG, Song XQ, Torresyap G, Socransky SS, et al. Early microbial succession in redeveloping dental biofilms in periodontal health and disease. *J Periodont Res*. 2012 Feb;47(1):95-104.

Ten Cate AR. *Oral histology: development, structure and function*. St. Louis: Mosby Year Book, 2013.

Torabinejad M e Trope M. "Endodontic and periodontal interrelationships," in *Principles and Practice of Endodontics*, R. E.Walton and M. Torabinejad, Eds., 1996.

Vaara M, Nikaido H. Outer membrane organization. In: Rietschel ET. (Ed.). *Handbook of Endotoxin*. vol. 1. Amsterdam: Elsevier;1984. p.1–45.

Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemomechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J*. 2006 Jun;39(6):484-92.

Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BP. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Aug;23(4):282-90.

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

Zehnder M, Gold SI, Hasselgren G .Pathologic interactions in pulpal and periodontal tissues. *J Clin Periodontol*. 2002 Aug;29(8):663-71.





**APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido****Termo de consentimento livre e esclarecido**

VOLUNTÁRIO: \_\_\_\_\_

As informações contidas neste prontuário foram fornecidas pelo aluno de mestrado Emanuel da Silva Rovai, objetivando formar acordo, por escrito, mediante o qual o indivíduo, parte integrante da pesquisa, autoriza sua participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

**I. TÍTULO DA PESQUISA**

**"Estudo da diversidade microbiana e níveis de endotoxinas em pacientes com doenças endo-periodontais".**

**II. PROPOSIÇÃO**

- 1) Entender a diversidade microbiológica através da técnica Multiplex Checkboard DNA-DNA em pacientes com lesões endoperiodontais.
- 2) Correlacionar o perfil microbiano presente na bolsa periodontal e no canal radicular através da técnica multiplex checkboard dna-dna.
- 3) Investigar e quantificar endotoxinas nos canais radiculares e bolsas periodontais em pacientes com lesões endo-periodontais relacionando com sinais e sintomas clínicos.
- 4) Correlacionar os níveis de endotoxinas presentes nos canais radiculares e bolsas periodontais.

**III. JUSTIFICATIVA**

Estudos microbiológicos e testes de endotoxinas fazem parte da linha de pesquisa no ICT\_UNESP. Até o momento nenhum

estudo relacionou microrganismos e endotoxinas nos processos da infecção em lesões endoperiodontais. Estudos mostrando uma correlação qualitativa e quantitativa desses patógenos e sua inter-relação com endotoxinas e sinais e sintomas clínicos em dentes com lesão endoperiodontal poderão oferecer novas perspectivas para o diagnóstico microbiológico, voltado para tratamento e melhorando o prognóstico dos dentes afetados. Dessa forma, o presente estudo terá o objetivo de identificar os microrganismos presentes em lesões endo-periodontais pelo método do DNA-DNA checkboard e avaliar e correlacionar os níveis de endotoxinas em pacientes com lesões endoperiodontais.

#### **IV. Grupos e Procedimentos**

No Instituto de Ciências e Tecnologia (ICT) – UNESP serão selecionados 10 pacientes que serão tratados nas clínicas de graduação da faculdade. Amostras de endotoxinas e das bactérias que habitam as bolsas periodontais e canais radiculares dos pacientes selecionados serão feitas com auxílio de cones de papel absorvente o que não afetará em nada a saúde dos mesmos já que é um procedimento corriqueiro no tratamento endodôntico (secagem do canal radicular antes da colocação de medicação no interior dos canais radiculares e obturação se faz da mesma maneira).

#### **V. DESCONFORTO OU RISCOS ESPERADOS**

O processo é indolor mas caso ocorra, esta não será devido à coleta de amostra e sim apersistência da infecção nos canais radiculares e/ ou nos tecidos periapicais. Se a manifestação dolorosa ocorrer fora dos dias marcados para a execução do tratamento, o paciente poderá entrar em contato com os pesquisadores para uma assistência imediata através do telefone 992077741 celular do pesquisador.

O paciente tem toda a liberdade de pedir esclarecimentos sobre a metodologia antes e durante a pesquisa, podendo ou não

concordar em participar da mesma. Caso recuse, não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

Apesar dos resultados clínicos e microbiológicos serem divulgados publicamente para fins acadêmicos e científicos, será preservado a privacidade do indivíduo quanto aos dados confidenciais que possam ser envolvidos na pesquisa.

## **VI. BENEFÍCIOS DO EXPERIMENTO**

Os voluntários terão o tratamento endodôntico e periodontal do dente envolvido com todo o cuidado que se deve tomar.

## **VII. INFORMAÇÕES**

O voluntário tem a garantia de que receberá respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa. Também, os pesquisadores supracitados assumem o compromisso de proporcionar informações atualizadas obtidas durante o estudo, ainda que esta possa afetar a participação do indivíduo no experimento.

Os materiais e, ou dados coletados, ficarão à disposição dos sujeitos de pesquisa, sendo preservada a identidade dos voluntários.

Os pesquisadores assumem a responsabilidade de entregar uma cópia deste documento

(TCLE) ao voluntário.

## **VIII. RETIRADA DO CONSENTIMENTO**

O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo e assim do grupo de amostra, este não será penalizado e não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

## **IX. PREVISÃO DE RESSARCIMENTO OU INDENIZAÇÃO**

A pesquisa não acarretará nenhum ônus ao paciente. Se por acaso houver necessidade de deslocamentos ou procedimentos adicionais para coleta de amostra, além das necessárias para o tratamento endodôntico convencional, os gastos com este deslocamento

serão ressarcidos. Para quaisquer outros problemas não há previsão de indenização já que não acarreta riscos previsíveis ao paciente.

Caso ocorra falha no tratamento endodôntico que não está relacionada com a pesquisa em si, o paciente deverá entrar em contato com o pesquisador.

#### **X. CONSENTIMENTO INFORMADO**

Eu, \_\_\_\_\_

certifico que tenho lido as informações acima e suficientemente esclarecido(a) de todos os itens pelo CD Emanuel da Silva Rovai, estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, eu autorizo a execução da pesquisa, exposta acima, em mim.

São José dos Campos, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

Nome \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

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

**ATENÇÃO:** A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da ICT-UNESP, endereçado a Av. Francisco José Longo, n 777 Bairro: Jardim São Dimas 12245-000 - São José dos Campos, SP Telefone: (12) 3947-9000

## APÊNDICE B – Realização da curva padrão

1. Ver certificado para conferência do número do lote e quantidade de volume para endotoxina.
2. 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 3).

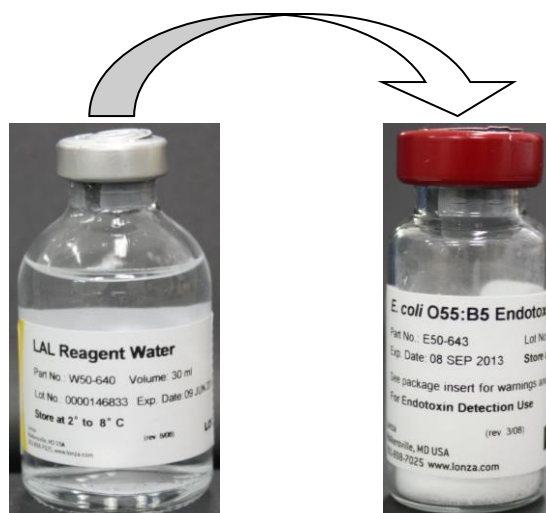


Figura 3 – Esquema para suspender endotoxina de *E. coli* utilizando água apirogênica.

3. Agitar a suspensão durante 15 minutos.
4. 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 0,9 mL de água apirogênica em cada tubo de vidro (Figura 4).



Figura 4 – Tubos de vidro apirgênicos necessários para diluição da endotoxina.

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

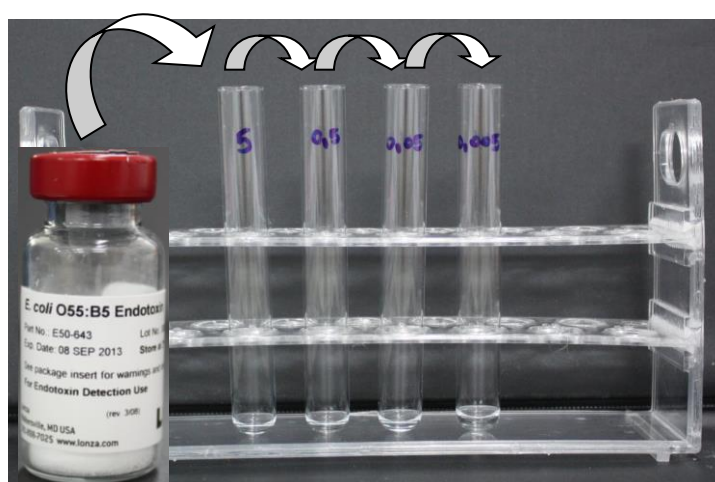


Figura 5 – Esquema de diluições da endotoxina para realização da curva padrão.

## ANEXO A - Certificado do comitê de ética em pesquisa

INSTITUTO DE CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO  
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo da diversidade microbiana, níveis de endotoxinas e de citocinas inflamatórias em pacientes com doenças endo-periodontais

**Pesquisador:** emanuel da silva roval

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 30936714.8.0000.0077

**Instituição Proponente:** Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA EDUCACAO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 698.107

**Data da Relatoria:** 23/06/2014

#### Apresentação do Projeto:

A lesão endo-periodontal é caracterizada pela associação da doença endodôntica e periodontal no mesmo elemento dentário. A evolução dessa lesão ocorre pela infecção por microrganismos, na sua grande maioria gram-negativas anaeróbias. As Endotoxinas provenientes dos microrganismos e as citocinas presentes na inflamação dos tecidos são de grande importância para a progressão deste tipo de lesão

#### Objetivo da Pesquisa:

O objetivo de identificar os microrganismos presentes em lesões endo-periodontais pelo método do DNA-DNA checkboard e avaliar e correlacionar os níveis de endotoxinas e citocinas inflamatórias em pacientes com lesões endoperiodontais.

#### avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá riscos para os pacientes, o benefício será que o tratamento será feito na clínica em que foi selecionado após a coleta.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

12 voluntários com lesão endo-periodontal e que cumpram os critérios de inclusão serão selecionados nas clínicas integradas do ICT-UNESP, serão avaliados as bolsas periodontais e o

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: cep@fosjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO  
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 050.107

canal radicular quanto aos microrganismos presentes pelo método de DNA-DNA checkboard,

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

O termo de Consentimento Livre e esclarecido foi reformulado, atendendo solicitação efetuada no primeiro parecer

**Recomendações:**

Nd.

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

O pesquisador atendeu satisfatoriamente a pendência apontada anteriormente.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado confirma o parecer da relatora.

SAO JOSE DOS CAMPOS, 25 de Junho de 2014

---

Assinado por:  
JANETE DIAS ALMEIDA  
(Coordenador)