



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

**ANA CLAUDIA CARVALHO XAVIER**

**AVALIAÇÃO DA NEUTRALIZAÇÃO DOS EFEITOS  
CITOTÓXICOS DO ÁCIDO LIPOTEICÓICO EM CANAIS  
RADICULARES**

2014

**ANA CLAUDIA CARVALHO XAVIER**

**AVALIAÇÃO DA NEUTRALIZAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DO  
ÁCIDO LIPOTEICÓICO EM CANAIS RADICULARES**

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

Orientador: Cláudio Antônio Talge Carvalho

São José dos Campos

2014

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:  
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para  
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos  
Campos: ICT/UNESP; 2016.

Xavier, Ana Claudia Carvalho

Avaliação da neutralização dos efeitos citotóxicos do ácido  
lipoteicóico em canais radiculares / Ana Claudia Carvalho Xavier. -  
São José dos Campos : [s.n.], 2014.  
100 f. : il.

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

1. Ácido lipoteicóico. 2. Citotoxicidade. 3. Hipoclorito de sódio.  
4. Clorexidina. 5. Própolis. I. Carvalho, Claudio Antonio Talge,  
orient. II. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos  
Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual  
Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. IV. UNESP - Univ Estadual  
Paulista. V. Título.

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

## AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 28 de julho de 2014  
E-mail: anaccx@gmail.com

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

## **BANCA EXAMINADORA**

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

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

**Profa. Dra. Alessandra Sverberi Carvalho**

**Prof. Dr. Renato Miotto Palo**

**Profa. Adj. Ana Paula Martins Gomes**

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

**Prof. Dr. Frederico Canato Martinho**

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

São José dos Campos, 28 de julho de 2014.

## *DEDICATÓRIA*

*Aos meu pais: Ana Mara Carvalho de Souza Xavier e  
Jaide dos Santos Xavier*

*Queridos pais, não há palavras suficientes para agradecer-  
lhes por todo amor, apoio, dedicação e suporte que vocês me  
deram, em todos os momentos de minha vida. Sem dúvida  
nenhuma, vocês fizeram o possível e o impossível para que eu  
e a Mari pudéssemos aproveitar todas as oportunidades de  
nossas vidas. Sempre se esforçaram para que tivéssemos uma  
boa educação, muitas vezes estudando com a gente matérias  
sobre as quais vocês nunca tinham ouvido falar, mas que  
faziam questão de entender para que pudessem nos explicar.*

*Obrigada pela dedicação e amor que sempre tiveram e  
demonstraram, tanto em pequenos atos como caronas em  
horários inusitados, quanto nos ajudando na realização de  
sonhos, como viagens à Disney e à Europa.*

*Obrigada por mesmo estando preocupados com minhas  
escolhas, me darem liberdade e apoio para fazê-las. Obrigada  
pela confiança.*

*Não tenham dúvidas de que só cheguei até aqui por que  
vocês me ajudaram. Vocês são pessoas muito especiais! Amo  
muito vocês!*

*À minha irmã: Mariana Carvalho Xavier*

*Minha eterna gatinha, nesses últimos anos tenho me impressionado com seu amadurecimento, sua determinação, personalidade e, até mesmo, independência. Sei que às vezes discutimos e que te dou conselhos sem você pedir, mas quero que saiba que faço isso porque te amo muito e quero o melhor pra você. Tenho muito orgulho da pessoa que esta se tornando.*

*Quero te agradecer por todo apoio que você me dá, em todas áreas da minha vida. Obrigada por me incluir em seus momentos de diversão, seja em cinemas, compras, shows de bandas adolescentes, e até mesmo em viagens. Obrigada por ter entendido quando não pude ir e obrigada por ter desistido de alguns desses momentos para me ajudar em trabalhos. Obrigada pelas críticas relacionadas a moda e maquiagem, acho que me fizeram evoluir um pouco. Obrigada também por cuidar com tanto carinho dos “meus babys”, em todas as vezes que não pude estar presente. Você é a melhor irmã que eu poderia ter. Te amo!!*

## *AGRADECIMENTO ESPECIAL*

*Ao Prof. Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho:*

*Agradeço ao meu orientador pela oportunidade de aprendizado. Obrigada por me mostrar que a dedicação ao trabalho é importante, mas que o que realmente faz a nossa vida especial é a nossa família e o tempo que passamos com ela.*

*Meu eterno carinho e gratidão por tê-lo como orientador.*

*À Profa. Dra. Luciane Dias Oliveira:*

*Lu, muito obrigada por toda ajuda que me deu nesse projeto. Obrigada por ter “me dado uma luz” todas as vezes que fui na sua sala em busca de ajuda. Obrigada por confiar que eu iria aprender toda a metodologia e realizar uma pesquisa tão grande em tão pouco tempo. Você é uma professora muito especial.*

## *AGRADECIMENTOS*

*“Amigos são anjos que nos deixam de pé quando nossas asas têm problemas em se lembrar como voar”*

*Cartecia*

*Agradeço...*

*À Deus, que sempre me deu forças para continuar lutando, e que colocou tantos anjos em minha vida para me ajudar...*

*Ao Instituto de Ciência e Tecnologia São José dos Campos - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”*

*À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.*

*Aos Professores da Disciplina de Endodontia pelo carinho e pelos ensinamentos. Agradeço ao Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo pela sua disposição em ensinar e pelo carinho. Ao Prof. Dr. Bruno das Neves*



*Cavalcanti por ter sempre estado a disposição para ajudar com minhas dúvidas sobre células e PCR, e por ter me divertido muitas e muitas vezes com histórias sobre suas viagens, além de ter me dado várias dicas.*

*À Profa Tit. Márcia Carneiro Valera pelo carinho sempre demonstrado nos ensinamentos. Obrigada por me receber sempre de braços abertos e me ajudar em todas as vezes que precisei. A senhora é um exemplo de dedicação e carinho aos alunos. Obrigada pela oportunidade de aprender tanto ao seu lado.*

*À Profa. Adj. Ana Paula Martins Gomes, obrigada por ter permitido que eu convivesse um pouco mais com você no doutorado. Você me mostrou vários exemplos de companheirismo, ética, dedicação ao trabalho, amor à família, carinho e respeito com os alunos. Você realmente é uma pessoa maravilhosa, sempre animada e disposta a nos incentivar. Você sempre vai ter um lugarzinho especial no meu coração.*

*Ao Prof Dr. Frederico Canato Martinho, muito obrigada, acima de tudo, pela amizade. Nem sei como te agradecer pela ajuda com os artigos, por me ajudar no laboratório ou por esclarecer todas as minhas dúvidas.*

*Obrigada por estar sempre disponível para ajudar em qualquer assunto, e por ter me ensinado tanto.*

*Ao meu amigo **Felipe Oliveira**, obrigada por toda sua paciência em me ensinar sobre células e sobre o teste de ELISA. Sem sua ajuda este projeto não seria possível. Não tenho como agradecer sua disponibilidade. Obrigada também pela amizade e pelo carinho.*

*Às minhas queridas amigas **Adriana Chung e Lílian Eiko Maekawa**, que mesmo longe sempre me apoiaram e ficaram felizes por minhas conquistas. Adoro vocês e sinto saudades.*

*Às minhas amigas de turma do doutorado: **Flávia, Ivany, Gleyce, Claudinha, Nádia**, sei que esses últimos meses foram corridos para todas nós e que, muitas vezes, nem conseguimos sentar para conversar sobre as novidades. Mesmo assim, durante esses 3 anos sempre estivemos dispostas a ajudar umas as outras, e agora, no final, a pesquisa de todas foi concluída. Obrigada a todas vocês pela ajuda, apoio, carinho, incentivo e paciência durante todo o curso. Obrigada pelos momentos de diversão, mesmo durante o trabalho, quando estávamos juntas em pesquisas ou na salinha da pós. Obrigada pela maravilhosa companhia nos congressos e viagens. Adorei fazer o doutorado ao lado de todas vocês.*

*Espero que cada uma, em seu caminho, consiga tudo o que deseja, e que continuemos sempre nos encontrando.*

*As minhas amigas e amigos do mestrado e doutorado: Rose, Emanuel, Flávia Leal, Monique, Flávia Teixeira, Camila, Tereza, Rafaela, Rafael, Luciana, obrigada pela convivência agradável de todos esses anos e pela ajuda nas clínicas e pesquisas que fizemos juntos. Desejo muita sorte a todos vocês, que continuam com suas pesquisas.*

*Obrigada aos meus amigos queridos Danilo Botelho, Cristina Usuí e Sarah Ceron, por estarem há tanto tempo ao meu lado. Mesmo longe nunca perdemos o contato e o carinho. Obrigada pela amizade de vocês!*

*Obrigada aos meus “amigos do vôlei”: Alessandra, Lucão, Lucas, Vivian, Eduardo, Daya, Pingo, Adriano, Luis Rogério, Larissa, Luis, João, Luana, Thabata e Vanessa, que permitiram, através do esporte e da amizade que eu não “surtasse”... Vocês são muito especiais*

*Aos meus padrinhos, Janete dos Santos Xavier de Abreu e Israel de Abreu, que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram incondicionalmente. Muito obrigada pelo carinho, amo vocês!*

*Aos meus avôs, Jaime Martins Xavier (in memorian), Rita Carvalho de Souza (in memorian) e Alfredo Quirino Filho. Obrigada pelos cuidados e pelos ensinamentos.*

*À minha avó Gilbertina dos Santos Xavier, obrigada por ser um exemplo de mulher guerreira, alegre, gentil, amorosa, independente, apaixonada pela vida e vaidosa. Muito obrigada por ter cuidado de mim quando criança e por continuar me defendendo e me apoiando agora que já cresci. Obrigada pelas histórias na rede, e pelos ensinamentos de vida. Obrigada pelos momentos maravilhosos que pude ter ao seu lado na nossa viagem, foi muito especial poder conhecer tantos lugares lindos com você e ver a sua animação e alegria. Obrigada por me mostrar que a vida é feita para ser aproveitada, não importando a idade que a gente tem... Você é uma pessoa muito especial! Te amo!!!*

*A todos os meus primos, em especial a Claudí, a Déia, a Gabi, o Thiago e o Juninho, que sempre se fizeram presentes em minha vida. Obrigada pelo carinho, pela ajuda, pela amizade e pelos bons momentos. Vocês têm um lugar especial no meu coração.*

*Aos meus tios e tias, em especial a Teté (Jane Xavier Muníz), que tanto torce por mim e me anima em todos os momentos. Obrigada por estar sempre ao meu lado.*

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

***Muito Obrigada!***

*“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho inicial”*

*Albert Einstein*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>15</b>
<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS .....</b>	<b>18</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>21</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>22</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Bactérias Gram-positivas e o ácido lipoteicóico (LTA) .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2 Hipoclorito de Sódio .....</b>	<b>31</b>
<b>2.3 Clorexidina .....</b>	<b>34</b>
<b>2.4 Própolis .....</b>	<b>37</b>
<b>2.5 Hidróxido de cálcio .....</b>	<b>41</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1 Preparo dos espécimes .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2 Inoculação do ácido lipoteicóico .....</b>	<b>47</b>
<b>4.3 Grupos Experimentais .....</b>	<b>48</b>
<b>4.4 Coletas do conteúdo do canal radicular .....</b>	<b>51</b>
<b>4.5 Cultura Celular .....</b>	<b>52</b>
<b>4.6 Ativação celular .....</b>	<b>54</b>
<b>4.7 Teste imunoenzimático (ELISA) .....</b>	<b>54</b>
<b>4.8 Análise estatística .....</b>	<b>57</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>58</b>
<b>5.1 TNF – <math>\alpha</math> .....</b>	<b>58</b>
<b>5.2 IL – 6 .....</b>	<b>61</b>
<b>5.3 IP – 10 .....</b>	<b>65</b>
<b>5.4 MIP - 1<math>\alpha</math> .....</b>	<b>68</b>
<b>5.5 G-CSF .....</b>	<b>71</b>

<b>5.6 IL - 1<math>\beta</math></b> .....	74
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	78
<b>6.1 Agentes Irrigantes</b> .....	80
<b>6.2 Protocolos de Tratamento Endodôntico</b> .....	83
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	86
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	87
<b>ANEXO</b> .....	98



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Motor VDW Silver e limas rotatórias do sistema BioRace...	44
Figura 2 - Ácido lipoteicóico (LTA) de <i>Enterococcus faecalis</i> .....	45
Figura 3 – Instrumentação dos canais radiculares com sistema rotatório .....	47
Figura 4 – Irrigação e aspiração dos canais radiculares .....	47
Figura 5 – Preenchimento dos canais radiculares com auxílio de broca tipo Lentulo .....	48
Figura 6 – Coleta dos canais radiculares .....	49
Figura 7 – Descolamento das células, com auxílio de varredor celular	51
Figura 8 – Células sedimentadas e sobrenadante após centrifugação.	51
Figura 9 – Plaqueamento das células em microplaca de 24 poços .....	51
Figura 10 – Placa de 96 poços com curva padrão e sobrenadante .....	54
Figura 11 – Placa de 96 poços com substrato cromogênico (ELISA) ..	54
Figura 12 – Placa de 96 poços com solução stop (ELISA) .....	55

Figura 13 – Gráfico em barras do nível médio de TNF- $\alpha$ (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com as coletas S1 e S2 de acordo com os agentes irrigantes avaliados .....	59
Figura 14 – Gráfico em barras do nível médio de TNF- $\alpha$ (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com a coleta S3 de acordo com os agentes irrigantes avaliados .....	60
Figura 15 – Gráfico em barras do nível médio de IL-6 (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com as coletas S1 e S2 de acordo com os agentes irrigantes avaliados .....	63
Figura 16 – Gráfico em barras do nível médio de IL-6 (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com a coleta S3 de acordo com os agentes irrigantes avaliados .....	63
Figura 17 – Gráfico em barras do nível médio de IP-10 (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com as coletas S1 e S2 de acordo com os agentes irrigantes avaliados .....	65
Figura 18 – Gráfico em barras do nível médio de IP-10 (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com a coleta S3 de acordo com os agentes irrigantes avaliados .....	66
Figura 19 – Gráfico em barras do nível médio de MIP-1 $\alpha$ (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com as coletas S1 e S2 de acordo com os agentes irrigantes avaliados .....	68
Figura 20 – Gráfico em barras do nível médio de MIP-1 $\alpha$ (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com a coleta S3 de acordo com os agentes irrigantes avaliados .....	69

Figura 21 – Gráfico em barras do nível médio de G-CSF (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com as coletas S1 e S2 de acordo com os agentes irrigantes avaliados .....	71
Figura 22 – Gráfico em barras do nível médio de MIP-1 $\alpha$ (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com a coleta S3 de acordo com os agentes irrigantes avaliados .....	72
Figura 23 – Gráfico em barras do nível médio de IL-1 $\beta$ (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com as coletas S1 e S2 de acordo com os agentes irrigantes avaliados .....	74
Figura 24 – Gráfico em barras do nível médio de IL-1 $\beta$ (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com a coleta S3 de acordo com os agentes irrigantes avaliados .....	75

## LISTA QUADROS E TABELAS

Quadro 1_Divisão dos subgrupos experimentais .....	50
Tabela 1 - Valores médios de TNF- $\alpha$ (pg/ml) $\pm$ desvio padrão (dp), obtidos com a 1 <sup>a</sup> coleta (S1) dos grupos experimentais (n=36) .....	58
Tabela 2 - Valores médios de TNF- $\alpha$ (pg/ml) $\pm$ desvio padrão (dp), obtidos com a 2 <sup>a</sup> coleta (S2) dos grupos experimentais (n=36) .....	59
Tabela 3 - Valores médios de TNF- $\alpha$ (pg/ml) $\pm$ desvio padrão (dp), obtidos com a 3 <sup>a</sup> coleta (S3) dos grupos experimentais (n=12) .....	60
Tabela 4 - Valores médios de IL - 6 (pg/ml) $\pm$ desvio padrão (dp), obtidos com a 1 <sup>a</sup> coleta (S1) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos .....	62
Tabela 5 - Valores médios de IL - 6 (pg/ml) $\pm$ desvio padrão (dp), obtidos com a 2 <sup>a</sup> coleta (S2) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos .....	62
Tabela 6 - Valores médios de IL - 6 (pg/ml) $\pm$ desvio padrão (dp), obtidos na 3 <sup>a</sup> coleta (S3) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos .....	63

Tabela 7 - Valores médios de IP-10 (pg/ml) $\pm$ desvio padrão (dp), obtidos com a 1ª coleta (S1) dos grupos experimentais (n=36), e formação de grupos homogêneos .....	65
Tabela 8 - Valores médios de IP - 10 (pg/ml) $\pm$ desvio padrão (dp), obtidos com a 2ª coleta (S2) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos .....	66
Tabela 9 - Valores médios de IP - 10 (pg/ml) $\pm$ desvio padrão (dp), obtidos com a 3ª coleta (S3) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos .....	67
Tabela 10 - Valores médios de MIP-1 $\alpha$ (pg/ml) $\pm$ desvio padrão (dp), obtidos com a 1ª coleta (S1) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos .....	68
Tabela 11 - Valores médios de MIP - 1 $\alpha$ (pg/ml) $\pm$ desvio padrão (dp), obtidos com a 2ª coleta (S2) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos .....	69
Tabela 12 - Valores médios de MIP - 1 $\alpha$ (pg/ml) $\pm$ desvio padrão (dp), obtidos na 3ª coleta (S3) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos .....	70
Tabela 13 - Valores médios de G-CSF (pg/ml) $\pm$ desvio padrão (dp), obtidos com a 1ª coleta (S1) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos .....	71
Tabela 14 - Valores médios de G-CSF (pg/ml) $\pm$ desvio padrão (dp), obtidos com a 2ª coleta (S2) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos .....	72

Tabela 15 - Valores médios de G-CSF (pg/ml) $\pm$ desvio padrão (dp), obtidos com a 3 <sup>a</sup> coleta (S3) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos .....	73
Tabela 16 - Valores médios de IL-1 $\beta$ (pg/ml) $\pm$ desvio padrão (dp), obtidos com a 1 <sup>a</sup> coleta (S1) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos .....	74
Tabela 17 - Valores médios de IL-1 $\beta$ (pg/ml) $\pm$ desvio padrão (dp), obtidos na 2 <sup>a</sup> coleta (S2) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos .....	75
Tabela 18 - Valores médios de IL-1 $\beta$ (pg/ml) $\pm$ desvio padrão (dp), obtidos com a 3 <sup>a</sup> coleta (S3) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos .....	76

Xavier ACC. Avaliação da neutralização dos efeitos citotóxicos do ácido lipoteicóico em canais radiculares. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

## RESUMO

O ácido lipoteicóico (LTA) é um importante fator de virulência das bactérias Gram-positivas. Assim, o objetivo desse estudo foi determinar a eficácia do preparo biomecânico realizado com diferentes agentes irrigantes e medicações intracanal na neutralização do LTA em canais radiculares. Foram seccionados e padronizados 108 raízes de dentes humanos uni-radiculares. Após esterilização, os canais foram inoculados com solução de LTA. Após esta contaminação, os mesmos foram submetidos a preparo biomecânico através de sistema rotatório (BioRace) e divididos em 9 grupos, variando-se as soluções irrigantes (hipoclorito de sódio 1%, clorexidina gel 2% e extrato glicólico de própolis 12%) e as medicações intracanal (hidróxido de cálcio + soro; hidróxido de cálcio + clorexidina gel 2%; clorexidina gel 2%). Foram realizadas 3 coletas dos canais radiculares: após o preparo biomecânico, após EDTA e após medicação intracanal por 14 dias. Realizou-se ativação de macrófagos com as amostras, os quais tiveram seu sobrenadante coletado após 24 horas. Este sobrenadante foi utilizado para verificação da produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IP-10, MIP-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e G-CSF através de teste imunoenzimático (ELISA). De acordo com os resultados de S1 e S2, houve diferença estatística entre os vários grupos, sendo que o hipoclorito de sódio gerou as menores médias de TNF- $\alpha$ , IL-6, IP-10, MIP-1 $\alpha$  e G-CSF a própolis as menores médias de IL-1 $\beta$ . Em relação aos resultados de S3, todos os grupos apresentaram baixos índices de citocinas. Concluiu-se que o hipoclorito de sódio 1% associado a instrumentação rotatória é o agente irrigante mais eficiente na neutralização dos efeitos citotóxicos do LTA, seguido pelo extrato glicólico de própolis 12%. Além disso, todos os protocolos de tratamento analisados foram efetivos na neutralização dos efeitos citotóxicos do LTA.

Palavras-chave: Ácido lipoteicóico. Instrumentação rotatória. Hipoclorito de Sódio. Clorexidina. Própolis. Hidróxido de cálcio. Citotoxicidade.

Xavier ACC. *Neutralizing evaluation of lipoteichoic acid cytotoxic effect.* São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

## **ABSTRACT**

*The lipoteichoic acid (LTA) is a Gram-positive bacteria's virulence factor, which should be neutralized on endodontic treatment. The objective of this study is determining the effectiveness of biomechanical preparation performed with different auxiliary solutions and different intracanal medications in the neutralization of LTA in root canals. For this, 108 human teeth were sectioned and standardizing. After sterilization, the canals were inoculated with known amount of LTA solution. After contamination of specimens, they were subjected to biomechanical preparation through rotary system (BioRace) and divided into 9 groups, according the irrigating solutions (1% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine gel and 12% propolis glycolic extract) and intracanal medications (calcium hydroxide + physiologic solution; calcium hydroxide + 2% chlorhexidine gel; chlorhexidine gel 2 %). There were performed 3 sample collections from the root canals: after biomechanical preparation, after EDTA (3 min) and after intracanal medication (14 days). Held macrophage activation with the samples, which had its supernatant collected after 24 hours. This supernatant was used to investigate the production (TNF- $\alpha$ , IL-6, IP-10, MIP-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) and G-CSF by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). According to the results, there was statistic difference between the groups. Sodium hypochlorite showed the best results on TNF- $\alpha$ , IL-6, IP-10, MIP-1 $\alpha$  e G-CSF and propolis on IL-1 $\beta$ . In S3, all groups showed low indices. The sodium hypochlorite is the best irrigant in neutralizing cytotoxicity effects of LTA, and all protocols are efficient on neutralizing LTA cytotoxic effect.*

*Keywords: Lipoteichoic acid. Rotary system. Sodium hypochlorite. Chlorhexidine. Propolis. Calcium Hydroxide. Cytotoxicity.*



## 1 INTRODUÇÃO

Uma vez que as infecções endodônticas e suas complicações periapicais são provenientes da interação entre a capacidade de defesa do hospedeiro, o número de microrganismos presente e a virulência apresentada por estes microrganismos (Siqueira, Rocas, 2008), a realização de um tratamento endodôntico de sucesso deve incluir tanto a eliminação dos microrganismos presentes (Martinho, Gomes, 2008; Rocas, Siqueira, 2011; Vera et al., 2012) quanto a neutralização/inativação dos fatores de virulência (Martinho, Gomes, 2008; Martinho et al., 2010). A eliminação dos microrganismos sem a inativação dos fatores de virulência poderiam contribuir para a perpetuação de processos inflamatórios periapicais (Xavier et al., 2013).

A microbiota presente em infecções primárias é considerada poli-microbiana com predominância de microrganismos Gram-negativos (Gomes et al., 2006; Mohammadi, 2008), cujo principal fator de virulência são as endotoxinas (LPS). Estas, apresentam importantes efeitos citotóxicos, podendo induzir e manter alterações pulpares e periapicais (Schein, Schilder, 1975; Dahlen et al., 1981; Martinho et al., 2010; Martinho et al., 2011; Mohammadi, 2011). Assim, estas toxinas foram amplamente estudadas e comprovou-se que o tratamento endodôntico é capaz de inativá-las, principalmente quando realizado em múltiplas sessões (Xavier et al., 2013).

Apesar da predominância de Gram-negativos em infecções primárias, a presença também de microrganismos Gram-positivos já foi demonstrada por diversos autores (Chung, 2011; Endo, 2011; Xavier, 2011). Além disso, estudos demonstram que em casos de infecções secundárias ou persistentes, as bactérias Gram-positivas são

predominantes (Narayanan, Vaishnavi, 2010).

Dessa forma, torna-se fundamental o estudo dos fatores de virulência destes microrganismos. Dentre estes fatores, pode-se destacar o ácido lipoteicóico (LTA), o qual é considerado o correspondente Gram-positivo das endotoxinas (Su et al., 2006), sendo semelhantes tanto na estrutura quanto nas respostas imunológicas geradas no hospedeiro (Baik et al., 2008).

Presente na parede celular das bactérias Gram-positivas, o LTA é formado pela ligação de poliglicerofosfatos e ácidos graxos. Sabe-se que esta substância está envolvida na resposta inflamatória (Baik et al., 2008), na formação do biofilme (Fabretti et al., 2006), além de possuir a capacidade de se aderir ao dente através de sua atividade adsorptiva à hidroxiapatita, o que permite sua penetração nos túbulos dentinários (Han et al., 2006; Lee et al., 2009).

Estudos demonstraram que o LTA é capaz de ativar as células de defesa do hospedeiro, como macrófagos, induzindo a liberação de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (Van Amersfoort et al., 2003; Wang et al., 2003; de Souza et al., 2008). Esta habilidade de influenciar a resposta imunológica é espécie-dependente, e a ativação é gerada através de sinalização via receptor TLR-2 (Van Amersfoort et al., 2003; Wang et al., 2003).

Apesar da comprovação de sua presença, de sua ação e de sua importância nas afecções endodônticas, ainda existem poucos estudos avaliando a neutralização do LTA durante o tratamento endodôntico.

Em relação a eliminação de microrganismos e toxinas, diversos estudos já foram realizados avaliando tanto o tipo de instrumentação quanto o agente irrigante utilizado (de Oliveira et al., 2007; Martinho, Gomes, 2008; Maekawa et al., 2011; Xavier et al., 2013).

Dentre os agentes irrigantes mais utilizados, podemos encontrar o hipoclorito de sódio, o qual tem sido utilizado em diversas

concentrações: 0,5%; 1%; 2,5%; 5,25%. Suas principais propriedades são: capacidade de dissolver matéria orgânica, ação lubrificante e capacidade de neutralização do conteúdo tóxico do canal radicular (Valera et al., 2001; Okino et al., 2004). Apesar destas ótimas propriedades, o hipoclorito de sódio não é capaz de eliminar totalmente as endotoxinas (de Oliveira et al., 2007; Martinho, Gomes, 2008; Maekawa et al., 2011; Xavier et al., 2013), e sua utilização em altas concentrações pode causar irritação nos tecidos periapicais (Oncag et al., 2003).

Outro importante agente irrigante utilizado na atualidade, é a clorexidina gel 2%, a qual é considerada biocompatível com os tecidos periapicais e possui efeito residual (Menezes et al., 2004; D'Arcangelo et al., 2007; Ferraz et al., 2007). Utilizada também como medicação intracanal, esta substância não é capaz de eliminar completamente as endotoxinas (de Oliveira et al., 2007; Martinho et al., 2010; Maekawa et al., 2011; Oliveira LD et al., 2012; Maekawa et al., 2013; Xavier et al., 2013).

Na busca de um agente irrigante mais biocompatível e que realizasse uma adequada eliminação/inativação de microrganismos e toxinas, estão sendo realizados diversos estudos com produtos naturais. Dentre os mais promissores, podemos destacar a própolis, uma substância utilizada pelas abelhas na preservação da temperatura da colmeia e no impedimento tanto da entrada de agentes estranhos quanto da propagação de agentes epidemiológicos (Burdock, 1998).

Dentre suas características desejáveis pode-se destacar que o extrato da própolis apresenta atividades anti-inflamatórias, analgésicas, antimicrobianas e cicatrizantes (Grange, Davey, 1990; Koo et al., 2000). Estudo *in vivo* realizado em 2011 (Xavier) demonstrou que quando utilizado como agente irrigante, o extrato glicólico de própolis 12% tem efeito antimicrobiano e antiendotóxico estatisticamente semelhante ao hipoclorito de sódio 1% e a clorexidina gel 2%.

Assim, foi comprovado que tanto o hipoclorito de sódio, quanto a clorexidina gel e o extrato glicólico de própolis são capazes de

promover eliminação de microrganismos, quando utilizados como agentes irrigantes (Xavier, 2011). Em alguns casos, essa eliminação microbiana pode chegar a 100% (Xavier et al., 2013).

Entretanto, apesar dos ótimos resultados de redução de microrganismos obtidos com diferentes agentes irrigantes, a redução de endotoxinas obtida é menos expressiva, sendo em torno de 50% através da instrumentação convencional (Martinho, Gomes, 2008; Martinho et al., 2010) e 98% através da instrumentação com sistemas rotatórios de NiTi (Martinho et al., 2010). Uma vez que os estudos relacionados a este tipo de redução do LTA são escassos, faz-se necessária a realização de estudos *in vitro* que determinem o potencial de redução desta toxina durante o tratamento endodôntico.

Uma vez que a redução de toxinas vem demonstrando-se inadequada quando do preparo biomecânico convencional, é interessante a utilização de medicação intracanal durante o tratamento endodôntico (Xavier et al., 2013).

Estudos comprovaram que o uso de uma medicação intracanal é importante para o maior índice de eliminação de microrganismos e toxinas, sendo que a medicação intracanal mais indicada para a neutralização de endotoxinas é o hidróxido de cálcio (Valera et al., 2001), o qual pode ser associado a diferentes substâncias, como o soro fisiológico, o propilenoglicol ou a clorexidina gel 2% (Valera et al., 2001; Chung, 2011; Xavier, 2011; Xavier et al., 2013). Dentre suas diversas propriedades, pode-se destacar: capacidade de indução de mineralização, propriedades antimicrobianas e efetiva ação sobre LPS (Nelson-Filho et al., 2002; Xavier, 2011).

Assim, diante de tantas opções de protocolos de tratamento endodôntico, com utilização de instrumentação mecanizada, diversas opções de agentes irrigantes e de medicações intracanal, faz-se necessária a avaliação da ação destas substâncias e protocolos de tratamentos, frente ao ácido lipoteicóico.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Bactérias Gram-positivas e o ácido lipoteicóico (LTA)

Apesar da predominância de bactérias Gram-negativas em infecções primárias (Sundqvist, 1992; Gomes et al., 2006a; Mohammadi, 2008), estudos demonstram a presença também de bactérias Gram-positivas (Chung, 2011; Xavier, 2011). Em relação as infecções secundárias ou persistentes, sabe-se que a predominância é de bactérias Gram-positivas (Sundqvist et al., 1998; Gomes et al., 2004; Narayanan, Vaishnavi, 2010), sendo *Enterococcus faecalis* um dos microrganismos Gram-positivo comumente encontrados (Sundqvist et al., 1998; Figdor et al., 2003; Siqueira, Rocas, 2004; Gomes et al., 2006b). Assim, sendo um componente da parede celular de bactérias Gram-positivas, o ácido lipoteicóico é considerado um importante fator de virulência envolvido em alterações pulpares e periapicais.

Estudo realizado por Gomes et al. (2006b) envolvendo 50 dentes com infecção endodôntica primária e 50 dentes com infecção endodôntica persistente demonstrou, através de cultura microbiológica a presença de *Enterococcus faecalis* em 4% e 42% dos casos, respectivamente.

Estudo realizado por Xavier (2011) avaliou a microbiota presente em canais radiculares com infecção primária e lesão periapical, além da ação de diferentes irrigantes. Através do teste de reação em cadeia polimerase foram detectados diferentes microrganismos Gram-positivos na coleta inicial: *Filifactor alocis*, *Parvimonas micra*,

*Enterococcus faecalis*. Os autores indicaram que cerca de 6.7% dos casos apresentam *Enterococcus faecalis*. Apesar de comprovar a presença de microrganismos Gram-positivos em infecções primárias o estudo demonstrou a baixa incidência de *Enterococcus faecalis*.

Em relação a incidência desse tipo de bactéria em infecções secundárias, estudo realizado por Endo (2011) avaliando a microbiota e a quantidade de endotoxinas presente em canais com insucesso endodôntico determinou, com testes bioquímicos e de reação em cadeia polimerase, a presença de *Enterococcus faecalis* em 57% dos casos e prevalência de bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas.

Autores sugerem que a elevada presença de *Enterococcus faecalis* nestas infecções endodônticas secundárias ou persistentes deve-se, entre outros fatores, a sua capacidade de penetração em túbulos dentinários e a sua capacidade de impedir a liberação de enzimas hidrolíticas pelas células polimorfonucleares do hospedeiro (Rocas et al., 2004; Zoletti et al., 2006).

Além disso, *E. faecalis* possui fatores de virulência que podem estar associados a diferentes estágios da infecção endodôntica e à inflamação periapical, como: produção de substância de agregação, adesinas de superfície, produção extracelular de superóxido, enzimas líticas gelatinase e hialuronidase, e o ácido lipoteicóico (Kayaoglu, Orstavik, 2004).

O estudo de Rocas et al. (2004) avaliou, através de testes moleculares a prevalência de *E. faecalis* em infecções endodônticas e sua associação as doenças perirradiculares. Os resultados deste estudo indicaram que *E. faecalis* é significativamente mais associado a casos assintomáticos de infecções endodônticas primárias do que com os sintomáticos. Além disso, a incidência de *E. faecalis* foi mais elevada em casos de insucesso do que em infecções primárias.

Nesse mesmo ano, Kayaoglu e Orstavik (2004) publicaram um estudo sobre *Enterococcus faecalis*, onde avaliaram seus

fatores de virulência que podem estar relacionados à infecção endodôntica e à resposta inflamatória perirradicular. Os autores destacam diversos fatores como produção de substância de agregação, adesinas de superfície, enzimas e o ácido lipoteicóico, sendo que cada um deles pode estar associado a diferentes fases de uma infecção endodôntica, bem como à inflamação periapical. Além disso os autores ressaltam que apesar de alguns produtos bacterianos gerarem dano tecidual direto, um grande parte dos danos podem ser mediados pela resposta do hospedeiro às bactérias e aos seus produtos.

Tendo sido indicado como um dos importantes fatores de virulência de *E.faecalis*, o ácido lipoteicóico (LTA) encontra-se presente na parede celular das bactérias Gram-positivas e possui estrutura anfipática (uma região hidrofílica e uma região hidrofóbica), sendo formado por ligação de poliglicerofosfatos e ácidos graxos e estando envolvido na resposta inflamatória, síndrome séptica, formação de biofilme e adesão ao dente (Fabretti et al., 2006; Han et al., 2006; Baik et al., 2008; Lee et al., 2009). Este polímero de glicerofosfato ou ribitolfosfato covalentemente ligado ao glicolípido na membrana citoplasmática e projetando-se através da camada de peptidoglicano (Siqueira, Rocas, 2007), é considerado essencial ao crescimento bacteriano (Van Amersfoort et al., 2003).

Além de ser capaz de auxiliar na ligação das bactérias aos linfócitos, o LTA é capaz de estimular a reabsorção óssea e as células polimorfonucleares que, assim, liberam mediadores inflamatórios que podem ampliar o dano tecidual (Kayaoglu, Orstavik, 2004).

Estudo realizado por Oliveira LA e Barbosa (2003) dos efeitos citotóxicos das endotoxinas (LPS) e do ácido lipoteicóico (LTA) na polpa dentária de cães determinou que tanto o LPS quanto o LTA geram intensa inflamação pulpar e áreas de necrose, sendo que o efeito citotóxico apresentado pelo LTA é menor.

Estudo realizado por Baik et al. (2008), com LTA puro proveniente de *E.faecalis*, avaliou a sua capacidade de estimulação de macrófagos (RAW 264.7), o qual produziu elevados níveis de fator de crescimento (TNF- $\alpha$ ) e de óxido nítrico. O estudo ainda relata que o LTA estimula o receptor TLR2, mas não o TLR4 (receptor estimulado pelas endotoxinas) e conclui que os resultados indicam que o LTA é parcialmente responsável pelas respostas inflamatórias geradas pelo *E.faecalis*.

De acordo com outro estudo (Lorne et al., 2010), existem evidências crescentes de que TLR4 e TLR2 atuam como receptores e podem realizar a transdução de sinais pró-inflamatórios, contribuindo para a ativação celular através de espécies reativas de oxigênio, podendo produzir padrões diferentes na liberação mediadores pró-inflamatórios.

Assim, podemos observar que o papel desenvolvido pelo LTA nas infecções endodônticas é determinado, entre outros fatores, pela sua capacidade de estimular as células do hospedeiro, gerando a liberação de citocinas, fatores de crescimento e óxido nítrico.

Van Amersfoort et al. (2003), realizaram uma revisão de literatura, onde descrevem a estrutura e atividade tanto do LTA quanto do LPS e a reação celular a estas substâncias. De acordo com os dados apresentados, sabe-se menos sobre a ação do LTA do que do LPS, devido ao número de pesquisas já realizadas. Apesar disso, sabe-se que o LTA é capaz de induzir a liberação de óxido nítrico, IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  por monócitos e macrófagos, sendo a potência de suas ações biológicas determinada pela sua espécie bacteriana.

Kayaoglu e Orstavik (2004) relataram diversos estudos que indicam que a estimulação de leucócitos com LTA libera diversos mediadores conhecidos por seu papel na resposta inflamatória: TNF- $\alpha$ , interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8). Além de haver liberação de prostaglandinas E2 (PGE2) e enzimas lisossomais por macrófagos de ratos. Assim, os efeitos gerados pelo LTA



de *E.faecalis* podem gerar apoptose de algumas células (osteoblastos, osteoclastos, fibroblastos, macrófagos e neutrófilos) influenciando o aparecimento e perpetuação de lesões perirradiculares.

Deste modo, sabendo-se que o LTA possui um papel importante nas afecções endodôntica, faz-se necessário o estudo de formas de eliminação/inativação desta substância, de forma a se elevar os índices de sucesso do tratamento endodôntico.

## **2.2 Hipoclorito de sódio**

Preconizado como agente irrigante no tratamento de canais radiculares desde a década de 30 (Walker, 1936), o hipoclorito de sódio é hoje uma substância química auxiliar amplamente conhecida, e que pode ser utilizada em diferentes concentrações (0,5%, 1%, 2,5% e 5,25%), de acordo com a indicação do caso.

Como principais características dessa substância pode-se citar: ação lubrificante, neutralização do conteúdo séptico-tóxico, capacidade de dissolução de matéria orgânica e ação antimicrobiana (Valera et al., 2001; Okino et al., 2004). Para que estas ações sejam possíveis, o hipoclorito de sódio (NaOCl sal) reage com uma molécula de água (H<sub>2</sub>O), gerando uma base forte denominada hidróxido de sódio (NaOH) e um ácido fraco denominado ácido hipocloroso (HOCl).

Assim, o hidróxido de sódio formado atua como um solvente orgânico de gordura, num fenômeno denominado saponificação. Enquanto isso, o ácido hipocloroso gera o efeito antimicrobiano do através da liberação de cloro, o qual se liga ao grupamento NH dos aminoácidos, interferindo no metabolismo celular (Vianna, 2002).

Em 1971 (Senia et al.) foi verificada a ação do hipoclorito de sódio (5,25%) como solvente tecidual de tecidos pulpaes de 61

molares. Após irrigação com hipoclorito e sódio e com solução salina (controle), a região apical foi analisada através de cortes visualizados em microscópio óptico. Concluiu-se que o hipoclorito de sódio (Clorox) gera maior dissolução de tecido pulpar do que a solução salina. Assim os autores questionam o efeito deste agente irrigante nos 3mm apicais de dentes com canais atrésicos.

Já na década de 90 (Ayhan et al., 1999) foi realizada a avaliação do efeito antimicrobiano de soluções irrigadoras (NaOCl 0,5% e 5,25%, clorexidina 2%, álcool 21% e paramonoclorofenol) contra diversos microrganismos, através de halos de inibição em ágar. Os resultados mostraram que o hipoclorito de sódio foi o mais efetivo contra todos os microrganismos testados, e que sua efetividade diminui proporcionalmente à sua concentração. O álcool e a clorexidina não apresentaram os menores halos de inibição, porém sem diferença estatística significativa.

Em 2004 (Naenni et al.), foi avaliada a capacidade de dissolução de tecido necrótico proporcionado por diferentes soluções irrigantes: NaOCl 1%, clorexidina 10%, peróxido de hidrogênio 3% e 30%, ácido peracético 10% e ácido cítrico 10%. Os resultados demonstraram que apenas o NaOCl apresentou capacidade de dissolução de tecido necrótico. Os autores concluíram que este fator pode ser determinante na escolha do agente irrigante a ser utilizado.

Em 2007, (de Oliveira et al.) foi avaliado o efeito do hipoclorito de sódio e outros agentes irrigantes sobre as endotoxinas. Os grupos avaliados foram: NaOCl 2,5%; NaOCl 5,25%; clorexidina 2%, hidróxido de cálcio 0,14% e polimexina B. As amostras foram coletadas após preparo biomecânico e 7 dias após este preparo. Os dados apresentaram diferença estatística entre os grupos avaliados e os autores concluíram que o hipoclorito de sódio e a clorexidina não são capazes de neutralizar endotoxinas. Enquanto isso, o hidróxido de cálcio e a polimexina B seriam capazes de neutralizá-las.

Em 2010 (Menezes et al.), foi avaliada a concentração fungicida mínima (CFM) do NaOCl 5,25% e da clorexidina 2% sobre 21 isolados clínicos e 1 cepa padrão de *C. Albicans*, uma vez que esta seria um tipo de levedura comumente associado a infecções endodônticas secundárias e/ou persistentes. Através do crescimento microbiano observado em ágar *Sabouraud dextrose*, os autores concluíram que ambas as substâncias apresentam efetiva atividade fungicida sobre *C.albicans*, sendo que a CFM da clorexidina foi menor que a do hipoclorito para todas as cepas avaliadas.

Estudo realizado em 2013 (Xavier et al.) avaliou *in vivo* a ação do hipoclorito de sódio e da clorexidina gel como agentes irrigantes sobre microrganismos e endotoxinas. Os resultados demonstraram que ambos os agentes irrigantes foram eficientes na eliminação de microrganismos, mas incapazes de inativar as endotoxinas adequadamente, necessitando do auxílio da ação de medicação intracanal.

Assim, apesar de suas ótimas propriedades, o hipoclorito de sódio não possui efetividade comprovada sobre as endotoxinas, pois apesar de diminuir sua quantidade, ele não é capaz de neutralizá-la completamente, necessitando do auxílio de uma medicação intracanal (de Oliveira et al., 2007; Maekawa, 2007; Xavier et al., 2013). Além disso, sua utilização em altas concentrações pode causar irritação nos tecidos periapicais (Oncag et al., 2003).

Em estudo de 2003, (Oncag et al.) foram comparadas as propriedades antimicrobianas e a toxicidade do NaOCl 5,25%, da clorexidina 2% e 0,2% e da clorexidina 0,2% associada ao cetrímide (Cetrexidin®). Canais radiculares foram instrumentados com auxílio dos irrigantes e permaneceram vazios por 48 horas. Os efeitos tóxicos foram avaliados através da injeção das substâncias no subcutâneo de ratos. Os resultados indicaram que o Cetrexidin® foi mais efetivo sobre *E.faecalis* e bactérias anaeróbias. Ao fim de 2 semanas, a toxicidade do NaOCl 5,25%

foi superior aos outros irrigantes. Os autores concluíram que o Cetrexidin® e a clorexidina 2% foram mais efetivos, tiveram maior efeito residual contra as bactérias e apresentaram menor citotoxicidade que o hipoclorito de sódio 5,25%.

Como uma opção mais biocompatível ao hipoclorito de sódio, a clorexidina começou a ganhar espaço como agente irrigante.

### **2.3 Clorexidina**

Sintetizada na década de 1940 e introduzida na área médica em 1954 como antisséptico para ferimentos na pele (Davies et al., 1954), a clorexidina ganhou espaço na endodontia, como opção ao hipoclorito de sódio, por ser considerada uma substância biocompatível (Tanomaru Filho et al., 2002; Semenoff et al., 2008).

Sendo uma substância de natureza catiônica capaz de promover aderência ao composto aniônico da superfície dos microrganismos, ela é capaz de alterar a integridade da membrana plasmática, modificando sua permeabilidade e alterando o balanço osmótico. Além disso, essa substância é capaz de alterar o metabolismo, o crescimento e a divisão celular dos microrganismos (Ferraz et al., 2001). Dessa forma, a clorexidina apresenta um amplo espectro de ação, atuando sobre bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, leveduras e vírus (Tortora et al., 2000; Ferraz et al., 2001; Ferreira et al., 2002; Gomes et al., 2009; Valera et al., 2009).

Uma das vantagens da clorexidina é que seu efeito antimicrobiano continua após o tempo de sua utilização, variando de 48 horas a 7 dias (Weber et al., 2003).

Utilizada primeiramente na Odontologia como solução de bochecho (Loe, Schiott, 1970) utilizada duas vezes ao dia, a solução de

gluconato de clorexidina 0,2% demonstrou-se eficaz na diminuição do crescimento do biofilme bacteriano e do desenvolvimento de gengivite.

Em 2001 (Ferraz et al.) foi avaliada a efetividade da clorexidina gel como substância química auxiliar, quando comparada ao hipoclorito de sódio e a clorexidina líquida. Foram avaliados a capacidade antimicrobiana das substâncias e imagens através de microscópio eletrônico de varredura. Os resultados indicaram que a clorexidina gel produz uma superfície de canal radicular com pouca formação de *smear layer* e possui capacidade antimicrobiana comparável as demais soluções avaliadas. Assim, a clorexidina gel teria potencial para uso como irrigante endodôntico.

Tanomaru Filho et al. (2002) estudaram a resposta inflamatória gerada por soluções irrigadoras (hipoclorito de sódio a 0,5% e clorexidina 2%) quando injetadas na cavidade peritoneal de ratos. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio foi capaz de induzir reações irritativas nos tecidos e respostas inflamatórias severas, enquanto que a clorexidina não induziu uma resposta inflamatória significativa, sendo relativamente biocompatível aos tecidos.

Vianna et al. (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana da clorexidina gel e líquida a 0,2%, 1% e 2% e do NaOCl 0,5%, 1%, 2,5%, 4% e 5,25%. De acordo com os resultados, tanto a CLX gel quanto a líquida a 2% foram eficazes contra *S. aureus* e *C. albicans*. Todos os irrigantes avaliados foram eficazes contra *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia*. O tempo necessário para a eliminação de microrganismos foi semelhante nos grupos: CLX líquida 1% e 2%, NaOCl 5,25%. Os autores concluíram que a ação antimicrobiana está relacionada ao tipo, concentração e forma de apresentação dos irrigantes.

Também em 2004 (Menezes et al.), a efetividade da irrigação com clorexidina ou com hipoclorito de sódio, e de diferentes medicações intracanal sobre *C. albicans* e *E. Faecalis* foi avaliada *in vitro* através da contaminação de 96 dentes humanos unirradiculares. Para a

avaliação, foram realizadas coletas com cones de papel em diferentes momentos. Os autores concluíram que a clorexidina foi mais eficiente sobre *E. Faecalis* do que o hipoclorito de sódio 2,5%.

Em 2008 (Semenoff et al.) a biocompatibilidade da clorexidina foi avaliada através de um estudo com 30 espécimes compostos por um tubo de polietileno contendo substância irrigante que foram implantados nos hemi-arcs superior e inferior dos ratos. As substâncias avaliadas foram: solução de clorexidina 2%; hidróxido de cálcio + clorexidina 2%; hidróxido de cálcio + água destilada; água destilada. Foram avaliados os tempos de 7, 15 e 30 dias (n=10), através de cortes histológicos analisados em microscópio óptico (x100, x200 e x400). Os resultados demonstraram ausência de diferença estatística significativa entre os grupos avaliados sendo que, todos os materiais apresentaram uma diminuição da reação inflamatória nos períodos mais longos.

Em 2009 (Valera et al.), foi avaliada a ação da clorexidina e de medicações intracanal sobre *E. coli* e sua endotoxina. Canais de 48 dentes foram contaminados com *E. coli*, instrumentados com solução de clorexidina 2% e divididos em grupos: pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$ , polimixina B,  $\text{Ca(OH)}_2$  + clorexidina gel 2%, solução fisiológica (grupo controle). A clorexidina apresentou melhores resultados que a solução fisiológica. Observou-se diferença estatística do  $\text{Ca(OH)}_2$  + clorexidina gel 2% em relação a pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  e a polimexina B. Os autores concluíram que somente as medicações intracanal são capazes de diminuir significativamente a quantidade de endotoxinas.

Também em 2009 (Lee et al.), foi realizado um estudo *in vitro* com o objetivo de determinar se a clorexidina é capaz de atuar na atividade inflamatória de *E. Faecalis* e de seu principal fator de virulência, o ácido lipoteicóico. Através de um ensaio imunoabsorvente, os autores demonstraram que as células de *E. Faecalis* que foram mortas através da utilização de clorexidina foram menos potentes na produção de TNF-alfa,

do que as células mortas por calor. De acordo com os autores, a clorexidina seria capaz de abolir a capacidade de LTA de estimular o receptor TLR 2, diminuindo a indução da expressão de TNF-alfa. Assim, os autores consideram que a clorexidina pode inativar o ácido lipoteicóico, levando a redução da resposta inflamatória.

Em 2013 (Xavier et al.), estudo *in vivo* demonstrou que a atividade antimicrobiana da clorexidina gel 2% sobre microrganismos de canais radiculares com necrose pulpar e lesão periapical é adequada, sendo esta substância capaz de eliminar elevada quantidade de microrganismos. No entanto sua ação sobre as endotoxinas foi baixa, sendo necessária a utilização de medicação intracanal com hidróxido de cálcio e propilenoglicol para sua adequada redução.

Embora apresente propriedades desejáveis aos agentes irrigantes, a clorexidina ainda possui algumas limitações. Assim, a busca por agentes irrigantes biocompatíveis aos tecidos periapicais e com propriedades adequadas à prática clínica continua. Dentre estes agentes é pode-se destacar as substâncias naturais.

## **2.4 Própolis**

Utilizada por abelhas na preservação da temperatura da colmeia e no impedimento da entrada e propagação de agentes estranhos e epidemiológicos (Marcucci, 1995), a própolis tem seu nome com origem grega, sendo a combinação de Pro (defesa) e polis (cidade), indicando algo que defende a cidade, ou seja, a colmeia (Burdock, 1998).

A composição da própolis depende da flora da região onde é produzida. Sua coloração pode variar de amarelo-esverdeado a marrom-escuro, sendo que, em geral, é composta por 50% de resina, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5%

de outras substâncias (Burdock, 1998). Sua composição química é complexa, sendo que mais de 200 constituintes já foram identificados. Dentre estes constituintes, são os flavonoides, os ácidos aromáticos e os ésteres que determinam a capacidade antimicrobiana apresentada pela própolis (Grange, Davey, 1990; Burdock, 1998; Bankova et al., 2000; Koo et al., 2000; Scazzocchio et al., 2006).

De acordo com pesquisas realizadas, o extrato de própolis apresenta atividade anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana (Grange, Davey, 1990; Burdock, 1998; Koo et al., 2000; Lotufo et al., 2005), sendo que o mecanismo de sua atividade antimicrobiana complexo e provavelmente encontra-se baseado na inibição da RNA-polimerase bacteriana (Bosio et al., 2000; Uzel et al., 2005).

Martin e Pileggi (2004) avaliaram o extrato de própolis a 50% e 100% como meio de armazenamento de dentes avulsionados e concluíram que estes extratos são melhores que HBSS (solução salina balanceada de Hanks), leite ou saliva, na manutenção da viabilidade das células do ligamento periodontal. Assim, esta substância seria considerada biocompatível.

Estudo *in vivo* (Santos et al., 2007), avaliou a eficácia da pomada de própolis sobre feridas crônicas. Os autores concluíram que esta substância pode ser amplamente utilizada uma vez que constatou a presença de ação terapêutica, baixo custo e estímulo à cicatrização.

Ferreira FB et al. (2007) avaliaram a ação antimicrobiana da própolis sobre bactérias anaeróbias comumente isoladas em canais radiculares com necessidade de tratamento endodôntico. Os resultados deste estudo indicaram eficiente atividade antimicrobiana sobre microrganismos como *Prevotella nigrescens* e *Fusobacterium nucleatum*. Os autores concluíram que a própolis é eficiente contra microrganismos encontrados em canais radiculares.

Da mesma forma, outros estudos *in vitro* (Maekawa, 2007; Molina, 2008) demonstraram grande efetividade, por parte do extrato



glicólico de própolis, sobre microrganismos presentes em canais radiculares necrosados.

Maekawa (2007) avaliou a efetividade da própolis e do gengibre como medicações intracanal em um estudo in vitro. Nele foram utilizados 96 dentes humanos, que foram inoculados com microrganismos normalmente presentes em canais radiculares. Todos os dentes foram instrumentados com solução salina e divididos em grupos conforme a medicação intracanal utilizada: hidróxido de cálcio  $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$  + solução salina; clorexidina gel 2% (CLX);  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + CLX; própolis (PRO); PRO +  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ; gengibre (GENG); GENG +  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ; solução salina. Os resultados demonstraram que todas as medicações foram capazes de diminuir a quantidade de microrganismos, sendo o  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  a menos efetiva. Já em relação a neutralização de endotoxinas, as medicações contendo  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  foram mais efetivas. A autora concluiu que todas as medicações avaliadas foram capazes de eliminar microrganismos dos canais radiculares e reduzir a quantidade de endotoxinas, entretanto, as medicações a base de hidróxido de cálcio são mais eficazes na neutralização de endotoxinas

De acordo com Swerts et al. (2005), a própolis teria a vantagem de ser um produto natural, o que reduziria a possibilidade de reações adversas aos tecidos bucais.

Com relação à citotoxicidade da própolis, foi verificado que a solução de própolis em propilenoglicol é biocompatível, não afetando ou impedindo o crescimento e a viabilidade celular dos fibroblastos da mucosa bucal humana (Lotufo, 2003).

Em 2004 (Al-Shaher et al.), autores compararam a citotoxicidade da própolis e do hidróxido de cálcio em fibroblastos do ligamento periodontal e da polpa. Os autores verificaram que, em concentrações similares, o hidróxido de cálcio foi extremamente tóxico, sendo 10 vezes mais citotóxico que a própolis. Assim, os autores

sugeriram que a própolis pode ser uma alternativa viável no tratamento endodôntico, por causa da sua baixa citotoxicidade.

Outro estudo comparando a biocompatibilidade da própolis com *Casearia sylvestris*, Otosporin e solução salina, em tecido subcutâneo de ratos machos da linhagem Wistar (Silva et al., 2004) verificou que a própolis foi a medicação que apresentou menor potencial irritativo e maior efetividade na redução do exsudato inflamatório agudo. Os autores sugerem ainda a aplicação destes produtos naturais como uma alternativa para o tratamento endodôntico.

Apesar de estudo in vivo (Xavier, 2011) demonstrar que a efetividade do extrato glicólico de própolis 12% contra microrganismos é estatisticamente semelhante a do hipoclorito de sódio 1% e da clorexidina gel 2%, esta substância não apresentou efetividade adequada sobre LPS, necessitando do complemento da ação de uma medicação intracanal.

Em 2014, a própolis foi avaliada com opção de agente irrigante em tratamentos endodônticos de dentes decíduos (Verma et al., 2014). Para isso foi utilizado extrato de própolis a 25% na irrigação de canais radiculares de crianças de 4 a 7 anos, o qual foi comparado a irrigação com solução salina. Foram realizadas coletas antes e após a irrigação e as amostras foram submetidas a cultura microbiológica. Os autores concluíram que o extrato de própolis possui eficácia antibacteriana e, considerando-se a necessidade de baixa toxicidade e elevada atividade antibacteriana nesse tipo de tratamento, é indicado como irrigante do canal radicular de dentes decíduos.

Outros autores (Ustun et al., 2013) avaliaram os efeitos do hidróxido de cálcio e da própolis, utilizados como medicação intracanal, na força de união de um cimento a base de resina. Para esta avaliação foi utilizado o teste de push-out. Os autores concluíram que a utilização combinada de cimento de AH Plus com medicação intracanal de própolis parece resultar em uma força de ligação à dentina favorável.

Em 2014, autores (Bufalo et al., 2014) avaliaram os mecanismos de ação da própolis sobre células humanas, através de marcadores celulares, citocinas e atividade fungicida de monócitos humanos. Os testes utilizados foram: citometro de fluxo, produção das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 através de ELISA e investigação da atividade de monócitos incubados com própolis sobre *Candida albicans*. Os autores concluíram que a própolis exerce ação imunomodulatória nos receptores celulares, afeta a produção de citocinas e a atividade fungicida, sem afetar a viabilidade celular. TLR-2 e TLR-4 podem estar envolvidos no seu mecanismo de ação.

Não foram encontrados artigos sobre a ação dessa substância na inativação do LTA.

## **2.5 Hidróxido de Cálcio**

Mesmo após a utilização de substâncias químicas auxiliares, com atividade antimicrobiana, durante o preparo biomecânico alguns microrganismos e toxinas podem permanecer no sistema de canais radiculares e túbulos dentinários, sendo interessante a utilização de medicação intracanal.

Introduzido na prática endodôntica no ano de 1838, quando foi utilizado no tratamento de patologia com presença de fístula (Fava, 1991), o hidróxido de cálcio vem ganhando espaço devido a sua capacidade de indução de mineralização, suas propriedades antimicrobianas e sua efetiva ação sobre endotoxinas (Nelson-Filho et al., 2002).

A capacidade antimicrobiana desta substância depende da liberação de seus íons hidroxila em meio aquoso (Siqueira, 2001). Estes íons são radicais livre extremamente oxidantes que apresentam

reatividade com biomoléculas (Siqueira, Lopes, 1999). Seus efeitos letais em células bacterianas seriam, provavelmente, devido a danos na membrana citoplasmática, desnaturação de proteínas e/ou danos ao DNA (Mohammadi et al., 2012). Apesar de não elevada, esta capacidade antimicrobiana é relatada na literatura.

Estudo recente (Jolly et al., 2013) realizado *in vivo* avaliou o hidróxido de cálcio como irrigante em casos de abscesso periapical em crianças. Após análise das amostras coletadas, os autores observam que todas as substâncias avaliadas (clorexidina 2%, hidróxido de cálcio 4% e própolis) apresentaram diminuição microbiana, sendo a clorexidina a mais efetiva.

Embora substâncias como a clorexidina e o hipoclorito de sódio apresentem maior efetividade antimicrobiana em casos endodônticos, o hidróxido de cálcio é fundamental para a neutralização das endotoxinas, substâncias não eliminadas por estes irrigantes.

Estudo realizado em 2005 (Oliveira LD et al.) avaliou o efeito do hidróxido de cálcio e da polimexina B sobre endotoxinas de canais radiculares. Para isso, 65 dentes humanos foram preparados, inoculados com endotoxinas e divididos em 5 grupos: hidróxido de cálcio, polimexina B, combinação de neomycin + polimexina B + hydrocortisone, controle positivo e controle negativo. Após análise estatística dos resultados, os autores concluíram que o hidróxido de cálcio e a polimexina B utilizados como medicação intracanal são capazes de neutralizar endotoxinas.

Estudo recente, realizado *in vivo* (Xavier et al., 2013) demonstrou, através de contagem microbiana e quantificação de endotoxinas presentes em amostras obtidas de 40 canais radiculares, que a o hidróxido de cálcio associado a propilenoglicol é efetivo na neutralização de endotoxinas e importante durante o tratamento endodôntico.

Uma vez que a ação do hidróxido de cálcio sobre endotoxinas é comprovada, e que as endotoxinas apresentam características semelhantes ao ácido lipoteicóico iniciaram-se estudos avaliando a possibilidade de utilização desta medicação também na neutralização deste tipo de toxina.

Estudo de 2011 (Baik et al.) avaliou a efetividade do hidróxido de cálcio sobre o ácido lipoteicóico presente na parede celular do *E.faecalis*. Através de um pré-tratamento do LTA com o hidróxido de cálcio foi possível anular a capacidade do LTA ativar a liberação de fator de necrose tumoral por parte dos macrófagos. Os autores sugerem que o hidróxido de cálcio pode inibir a toxicidade do LTA, promovendo uma diminuição da resposta inflamatória.

Assim, torna-se interessante a realização de estudos avaliando a ação do hidróxido de cálcio e de suas associações sobre o ácido lipoteicóico.

### 3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como proposta:

- a) Avaliar a ação de diferentes agentes irrigantes (hipoclorito de sódio 1%, clorexidina gel 2% e extrato glicólico de própolis 12%) associados a instrumentação rotatória, na neutralização dos efeitos citotóxicos do ácido lipoteicóico em canais radiculares, através da análise da produção de fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IP-10, TNF- $\alpha$  e MIP-1 $\alpha$ ) por macrófagos;
  
- b) Avaliar a ação de protocolos de tratamento com utilização de instrumentação rotatória, diferentes agentes irrigantes (hipoclorito de sódio 1%, clorexidina gel 2% e extrato glicólico de própolis 12%) e medicações intracanal (hidróxido de cálcio + soro; clorexidina; hidróxido de cálcio + clorexidina) na neutralização dos efeitos citotóxicos do ácido lipoteicóico em canais radiculares, através da análise da produção de fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IP-10, TNF- $\alpha$  e MIP-1 $\alpha$ ) por macrófagos.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP (ANEXO A).

### **4.1 Preparo dos espécimes**

Foram utilizados 108 dentes humanos unirradiculares, anteriores, extraídos por indicações clínicas diversas. Os dentes foram limpos, auto-clavados e imersos em solução fisiológica até o momento de seu uso. A seleção dos dentes foi feita com base nas dimensões e similaridades morfológicas da raiz, tendo sido os dentes radiografados para comprovação da presença de um único canal. As coroas foram seccionadas com disco de carborundum (Labordental LTDA – São Paulo – Brasil) , padronizando-se o tamanho dos espécimes em 16 mm.

Os canais radiculares foram instrumentados para padronização do espaço interno a ser trabalhado e do volume de LTA a ser inoculado. Para tanto, os mesmos foram explorados com uma lima K 10 ou 15 e preparados com instrumentos de níquel-titânio (NiTi) do sistema BioRaCe (FKG Dentaire – Swiss Dental Products – Switzerland) acoplados a um contra-ângulo de um motor elétrico VDW.Silver (VDW GmbH, Munique, Alemanha)(Figura 1), na seguinte sequência: BR0 (25/0.08), para o alargamento dos terços cervical e médio do preparo; BR1 (15/0.04) até o comprimento de trabalho (15 mm); BR2 (25/0.04) até

o comprimento de trabalho (15 mm), sempre utilizando 5 ml de solução salina fisiológica como irrigante, a cada troca de instrumento. Foi utilizada a velocidade de 500 rpm e o torque de 1 Ncm. Após, os canais foram preenchidos com EDTA a 17% (Biodinâmica – Ibioporã – Paraná – Brasil), o qual foi agitado com uma lima K15 durante 3 minutos. A irrigação final foi realizada com 10 mL de solução fisiológica. Em seguida, os canais radiculares foram secos com cones de papel nº 30 e foi realizado o vedamento da região apical com resina composta fotopolimerizável Z-100 (3M, Dental Products, St Paul, USA). As raízes foram então impermeabilizadas externamente com duas camadas de adesivo epóxi Araldite (Brascola – Joinvile – Brasil), exceto a região da abertura cervical (Maekawa et al., 2011).



Figura 1 – Motor VDW Silver e limas rotatórias do sistema BioRace.

Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em placas de cultura celular com 24 poços (TPP – Suíça), sendo 12 dentes



em cada uma das placas, fixados com resina acrílica quimicamente ativada JET (Clássico – São Paulo – Brasil). As placas e demais materiais/instrumentais a serem utilizados na pesquisa foram embalados e submetidos à esterilização por radiação gama cobalto 60 (EMBRARAD, Cotia, Brasil), para neutralização de toxinas pré-existentes.

#### 4.2 Inoculação do ácido lipoteicóico

Para contaminação dos espécimes, foi utilizado ácido lipoteicóico (LTA) de *Enterococcus faecalis* (L4015 – Sigma)(Figura 2), preparado na concentração de 250 µg/mL com água bidestilada e apirogênica. Para inoculação no interior dos canais radiculares foi utilizado 10 µL desta solução de LTA. As placas foram então mantidas em estufa a 37 °C, em umidade relativa, durante 24 horas. Este procedimento foi repetido mais duas vezes, totalizando 3 inoculações.



Figura 2 - Ácido lipoteicóico (LTA) de *Enterococcus faecalis*.

### 4.3 Grupos Experimentais

Após o período de 24 horas da última inoculação do LTA, deu-se início a instrumentação dos canais radiculares com 5 instrumentos rotatórios NiTi (sistema BioRaCe), na seguinte sequência: BR3 (25/0.06); BR4 (35/0.04); BR5 (40/0.04); BR6 (50/0.04) e BR7 (60/0.02). Para tanto, os instrumentos foram montados no contra-ângulo conectado ao motor elétrico VDW. Silver (Figura 3), de acordo com as especificações do fabricante, sendo a velocidade de 500 rpm e o torque de 1 Ncm. Foram realizados movimentos de penetração e remoção contínuos buscando alcançar o comprimento de trabalho (15 mm).

A cada troca de instrumento, os canais foram irrigados com 5 mL do agente irrigante (Quadro 1). Para irrigação foram utilizadas pontas do sistema NaviTip (Ultradent – Products – Inc - USA) acopladas a seringas apirogênicas de 5 mL (Injex) e para aspiração pontas White Mac Tips (Ultradent) acopladas a cânula da bomba à vácuo (Figura 4). Os espécimes foram divididos em 3 grupos experimentais (n=36), de acordo com o agente irrigante utilizado: HIPO – hipoclorito de sódio 1%; CLX – clorexidina gel 2%; PRO – extrato glicólico de própolis 12%.

Nos grupos irrigados com clorexidina gel 2% e extrato glicólico de própolis 12% o canal foi preenchido com a substância irrigante e, após ação do instrumento rotatório, foi realizada a irrigação e aspiração com 5 mL de solução fisiológica estéril e apirogênica, sendo este procedimento repetido a cada troca de instrumento. O grupo HIPO foi irrigado com 5 mL da solução irrigadora a cada troca de instrumento.

Imediatamente após o término da instrumentação, foi realizada a 1ª coleta do conteúdo dos canais radiculares (S1). Em seguida, os canais foram inundados com EDTA 17% (Biodinâmica), o qual foi agitado com lima K 30 por 3 minutos e removido com 5 mL de solução fisiológica estéril e apirogênica. Após, foi realizada a 2ª coleta do

canal radicular (S2). Os canais foram secos com cones de papel absorvente (estéril e apirogênico) e preenchidos com medicação intracanal através da utilização de Lentulo (Figura 5). O preenchimento foi realizado até o extravasamento da medicação. Neste momento foi realizada a subdivisão dos grupos em subgrupos, de acordo com a medicação intracanal (MIC) utilizada (Quadro 1).



Figura 3 – Instrumentação dos canais radiculares com sistema rotatório.



Figura 4 – Irrigação e aspiração dos canais radiculares.



Figura 5 – Preenchimento dos canais radiculares com auxílio de broca tipo Lentulo.

#### Quadro 1\_ Divisão dos subgrupos experimentais

<b>Subgrupos (n=12)</b>	<b>Substância química auxiliar</b>	<b>Medicação intracanal</b>
H + CA	Hipoclorito de sódio 1%	Ca(OH) <sub>2</sub> + soro
H + CLX		Clorexidina gel 2%
H + Ca + CLX		Ca(OH) <sub>2</sub> + CLX
CLX + CA	Clorexidina gel 2%	Ca(OH) <sub>2</sub> + soro
CLX + CLX		Clorexidina gel 2%
CLX + CA + CLX		Ca(OH) <sub>2</sub> + CLX
P + CA	Extrato glicólico de própolis 12%	Ca(OH) <sub>2</sub> + soro
P + CLX		Clorexidina gel 2%
P + CA + CLX		Ca(OH) <sub>2</sub> + CLX

Após 14 dias do preenchimento do canal radicular com a MIC, os canais foram irrigados com 10 mL de solução fisiológica apirogênica, para completa remoção da MIC e foi realizada a 3ª coleta. Durante o período da MIC, as placas contendo os espécimes foram mantidas em estufa a temperatura de  $37 \pm 1$  °C e umidade relativa 100%.

#### 4.4 Coletas do conteúdo do canal radicular

No total, foram realizadas três coletas do conteúdo do canal radicular: S1) imediatamente após a instrumentação; S2) após aplicação do EDTA; S3) após remoção da MIC. Todas as coletas foram realizadas da mesma forma: os canais foram inundados com solução fisiológica estéril e apirogênica, a qual foi agitada e aspirada com auxílio de seringa e agulha tipo insulina (Figura 6). Este procedimento foi repetido até completar o volume final da amostra de 100  $\mu$ L. Estas amostras foram utilizadas para verificar se os protocolos de tratamento acima descritos apresentam capacidade de neutralizar os efeitos citotóxicos do ácido lipoteicoico em cultura de macrófagos (RAW 264.7).



Figura 6 – Coleta dos canais radiculares.

## 4.5 Cultura Celular

Uma linhagem de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) obtida do banco de células da Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM, Rio de Janeiro, RJ).

As células foram cultivadas em frascos de cultivo celular com meio DMEM (LGCBio, São Paulo) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), e mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

O meio de cultura foi trocado a cada dois dias, sendo que cada frasco teve seu controle de cultivo celular realizado com auxílio de microscopia com luz invertida (Nikon). No momento da constatação de confluência celular, foram realizados sub-cultivos celulares. Para isso, o meio DMEM do frasco foi aspirado com pipeta aprotogênica e descartado. Foi então acrescentado 3 mL de meio novo, sendo realizadas 3 lavagens. Após, foram acrescentados mais 3 mL de meio novo, e as células foram liberadas do fundo das garrafas com auxílio de varredores celulares (Figura 7), e transferidas para tubo tipo Falcon (TPP, Suíça).

Estas células foram centrifugadas a 3300 xg durante 5 min a 25 °C (Figura 8). O sobrenadante foi então descartado, e as células ressuspendidas em meio DMEM e distribuídas em novos frascos de cultivo celular.

Para o plaqueamento das células, este mesmo procedimento foi repetido e a viabilidade celular foi avaliada utilizando-se azul de Trypan e contagem das células viáveis em câmara de Neubauer. Para realização dos testes, foram colocados  $5 \cdot 10^5$  células viáveis em cada poço da placa de poliestireno de 24 poços (TPP, Suíça) e foi acrescentado meio DMEM enriquecido com soro fetal bovino até obter volume final de 1 mL (Figura 9).

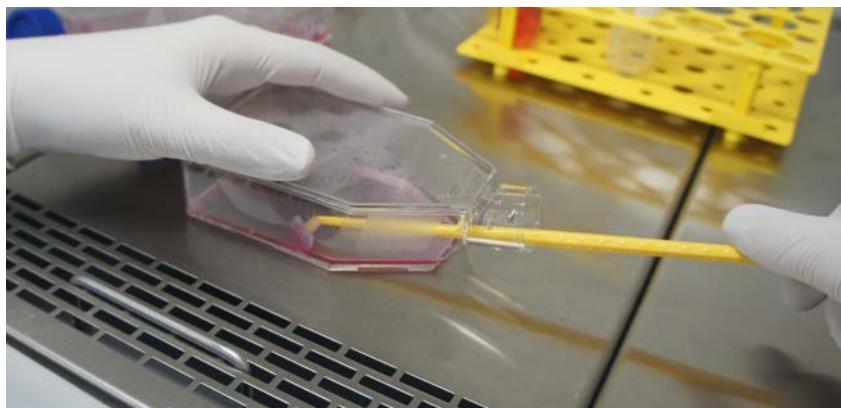


Figura 7 – Descolamento das células, com auxílio de varredor celular.



Figura 8 – Células sedimentadas e sobrenadante após centrifugação.

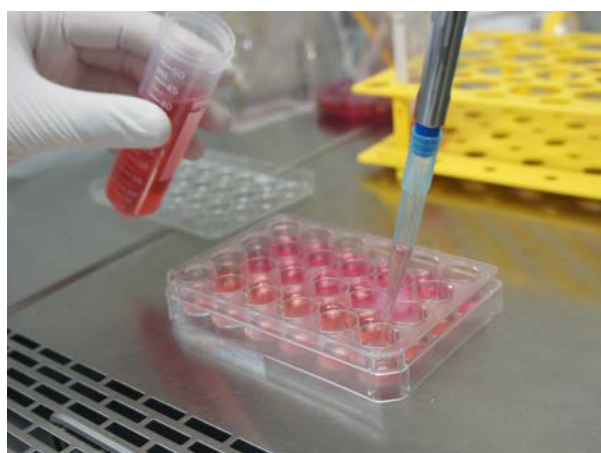


Figura 9 – Plaqueamento das células em microplaca de 24 poços.

#### 4.6 Ativação celular

Após distribuição das células nos poços, estas foram ativadas com 30 µL de cada amostra coletada dos canais radiculares (Oliveira LD et al., 2005; de Oliveira et al., 2007). As placas contendo as células ativadas foram mantidas a 37 °C (5% de CO<sub>2</sub>).

Além das células ativadas com as amostras, também ficaram sob as mesmas condições células acrescidas com 30 µL de solução salina estéril e apirogênica, para que houvesse um controle da produção normal de citocinas dessas células (controle celular).

Após 24 horas, os sobrenadantes foram removidos e submetidos à detecção e quantificação de fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e citocinas (IL-1β, IL-6, IP-10, TNF-α e MIP-1α) pelo teste imunoenzimático (ELISA).

#### 4.7 Teste imunoenzimático (ELISA)

Para realizar a detecção e quantificação de citocinas (IL-1β, IL-6, IP-10, TNF-α, MIP-1α) e de G-CSF, placas de microtitulação de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com anticorpos de captura específicos para cada citocina (anti-TNF-α, anti-IL-1β, anti-IL-6, anti-MIP-1α e anti G-CSF) de camundongo (100 µL/poço) (R & D Systems, NE).

As placas foram mantidas *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS com 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com 300 µL de tampão de bloqueio (PBS com 1% de soro albumina bovina, BSA) por 1 hora a temperatura ambiente. Após, foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e receberam 100 µL dos sobrenadantes da cultura de células



e 100  $\mu$ L dos padrões das citocinas com concentrações conhecidas (curva-padrão) (Figura 10). Os testes foram realizados em duplicata e as placas mantidas 2 horas a temperatura ambiente. Após, as placas foram novamente lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e foi acrescentado 100  $\mu$ L de anticorpo de detecção específico para cada citocina (anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-6, anti-MIP-1 $\alpha$  e anti G-CSF). As placas foram novamente mantidas por 2 horas em temperatura ambiente.

Após nova lavagem, foi acrescentada estreptavidina (100  $\mu$ L/poço) e as placas foram mantidas por 20 minutos cobertas com papel alumínio para evitar luz direta. Após lavagem, a reação foi revelada com 100  $\mu$ L/poço de solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio (Figura 11). As placas foram tampadas com papel alumínio para evitar a luz direta e mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados em cada poço da placa 50  $\mu$ L de solução stop (ácido sulfúrico 2 N) (Figura 12). As densidades ópticas (DO) foram lidas no leitor de microplacas (Biotek) com comprimento de onda de 450 nm. Após obtenção das densidades ópticas, os níveis de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IP-10, TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ ) e de G-CSF (pg/mL) presentes nos sobrenadantes das culturas de macrófagos foram determinados utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

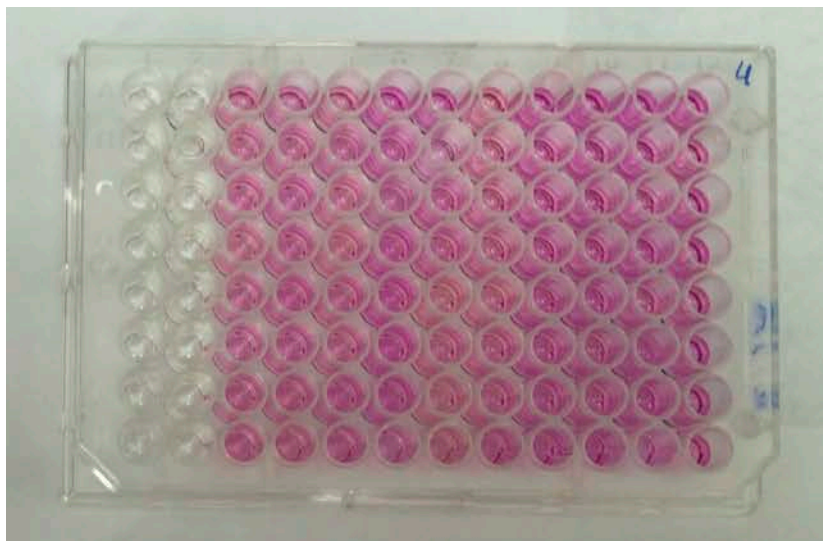


Figura 10 – Placa de 96 poços com curva padrão e sobrenadante.

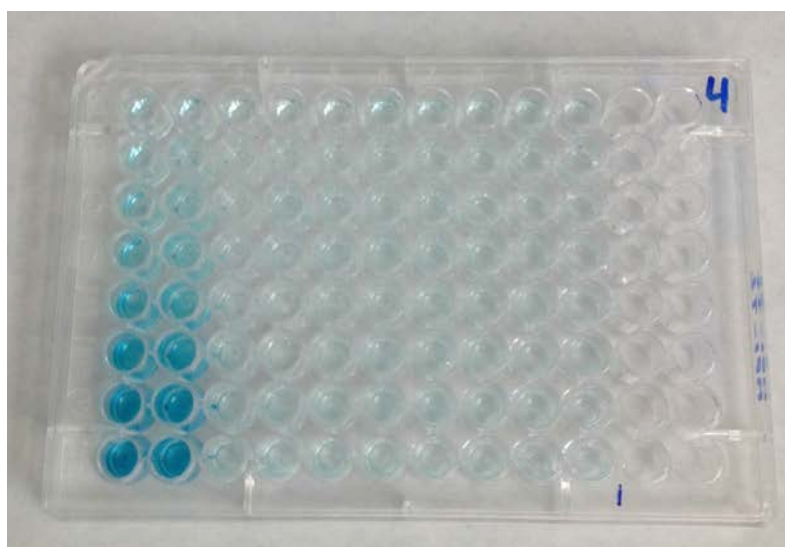


Figura 11 – Placa de 96 poços com substrato cromogênico (ELISA).

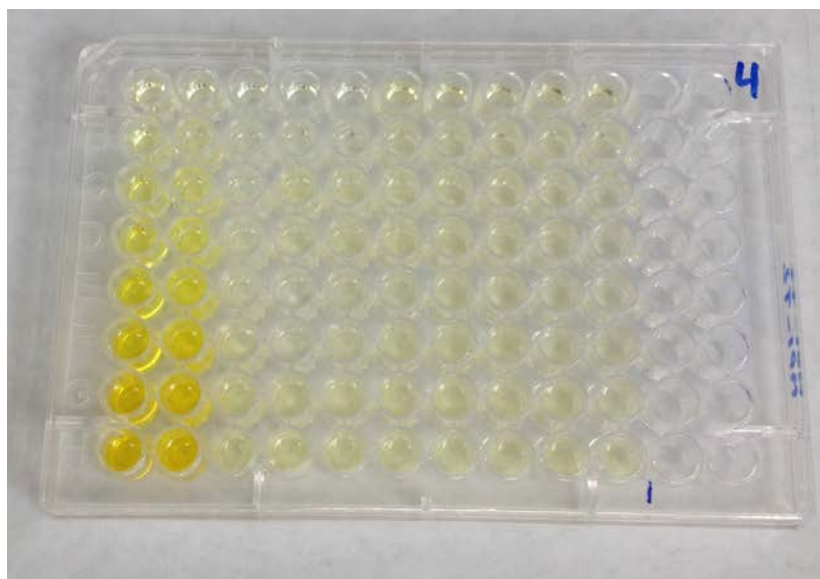


Figura 12 – Placa de 96 poços com solução stop (ELISA).

#### 4.8 Análise estatística

Todos os resultados obtidos através do teste Elisa foram convertidos para pg/ml através do programa GraphPad Prism 5. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente através dos testes de Anova e Tukey, com nível de significância 5%.

Para a análise estatística dos dados da primeira (S1) e segunda (S2) coleta foram considerados os grupos HIPO, CLX e PRO, sendo o n=36. Porém para a análise estatística dos dados da terceira coleta, foram considerados os subgrupos (n=12) obtidos através da combinação dos agentes irrigantes utilizados com as medicações intracanal avaliadas: H+CA, H+CLX, H+CA+CLX, CLX+CA, CLX+CLX, CLX+CA+CLX, P+CA, P+CLX, P+CA+CLX.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 TNF - $\alpha$

Os valores médios e desvios-padrão da produção de TNF- $\alpha$  (pg/mL) obtida pela cultura celular estimulada com as amostras obtidas na primeira coleta (S1) do canal radicular de cada grupo experimental (n=36) estão demonstrados na Tabela 1. O grupo HIPO apresentou valores significativamente menores da produção de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais grupos experimentais. O grupo PRO apresentou valores intermediários, sendo diferente dos demais grupos ( $p < 0,05$ ) e o grupo CLX apresentou a maior produção de TNF- $\alpha$ , sendo estatisticamente diferente dos demais ( $p < 0,05$ ). A produção média basal de TNF- $\alpha$  produzida pelas células que não foram estimuladas com conteúdo coletado do canal radicular (controle celular) foi de 165,6 pg/mL, sendo esta estatisticamente semelhante à produção apresentada no grupo HIPO.

Tabela 1 - Valores médios de TNF- $\alpha$  (pg/ml)  $\pm$  desvio padrão (dp), obtidos com a 1<sup>a</sup> coleta (S1) dos grupos experimentais (n=36)

<b>Irrigantes</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Grupos homogêneos*</b>
HIPO	185,9	172,5	A
CLX	1146	814,2	B
PRO	515,4	412,8	C

\*Letras diferentes indicam diferença estatística significante.

Os valores médios e desvios-padrão da produção de TNF- $\alpha$  (pg/mL) obtida pela cultura celular estimulada com as amostras obtidas na segunda coleta (S2) do canal radicular de cada grupo experimental estão demonstrados na Tabela 2. Os resultados apresentaram o mesmo comportamento, sendo que grupo HIPO apresentou valores significativamente menores da produção de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais grupos. O grupo PRO apresentou valores intermediários ( $p < 0,05$ ) e o grupo CLX apresentou a maior produção de TNF- $\alpha$ , sendo estatisticamente diferente dos demais ( $p < 0,05$ ).

A Figura 13 demonstra o gráfico com a produção média de TNF- $\alpha$  obtida em cada grupo experimental após estimulação com as coletas S1 e S2.

Tabela 2 - Valores médios de TNF- $\alpha$  (pg/ml)  $\pm$  desvio padrão (dp), obtidos com a 2<sup>a</sup> coleta (S2) dos grupos experimentais (n=36)

<b>Irrigantes</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Grupos homogêneos*</b>
HIPO	201,2	178	A
CLX	816,3	184,2	B
PRO	653,4	1072	C

\*Letras diferentes indicam diferença estatística significante.

Nas amostras estimuladas com a terceira coleta do canal radicular (S3), também foi verificada diferença estatística significativa ( $p = 0,0005$ ; Tabela 3) entre os grupos (n=12), sendo que as médias de TNF- $\alpha$  variaram de 24,15 pg/ml (protocolo: P+CLX) a 90,03 pg/ml (protocolo: CLX+CA). Todos os grupos apresentaram produção média de TNF- $\alpha$  inferior ao controle celular (165,6 pg/ml). O gráfico com a produção média de TNF- $\alpha$  (pg/mL) obtida em cada grupo experimental após estimulação com a coleta S3 está apresentado na Figura 14.

Tabela 3 - Valores médios de TNF- $\alpha$  (pg/ml)  $\pm$  desvio padrão (dp), obtidos com a 3ª coleta (S3) dos grupos experimentais (n=12)

Tratamentos	Média	Desvio-padrão	Grupos homogêneos*
H+CA	71,84	68,76	AB
H+CLX	39,46	13,98	AB
H+CA+CLX	74,68	39,71	AB
CLX+CA	90,03	38,8	A
CLX+CLX	73,32	54,49	AB
CLX+CA+CLX	53,41	46,33	AB
P+CA	46,69	47,69	AB
P+CLX	24,15	30,72	B
P+CA+CLX	57,3	33,25	AB

\*Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

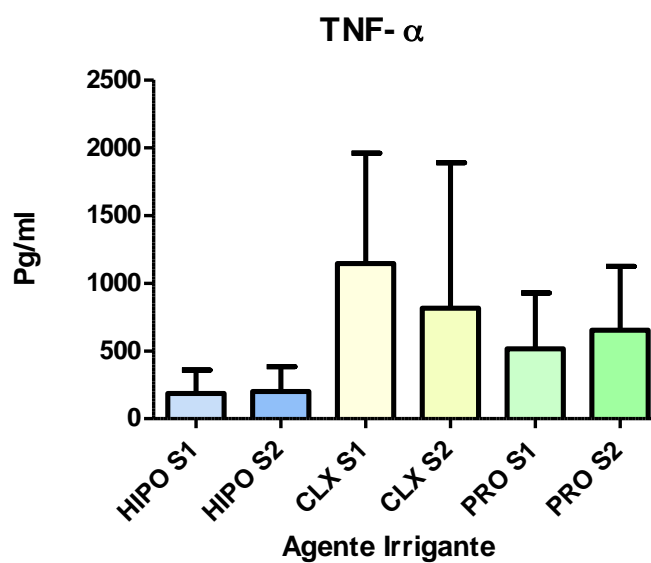


Figura 13 – Gráfico em barras do nível médio de TNF- $\alpha$  (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com as coletas S1 e S2 de acordo com os agentes irrigantes avaliados.

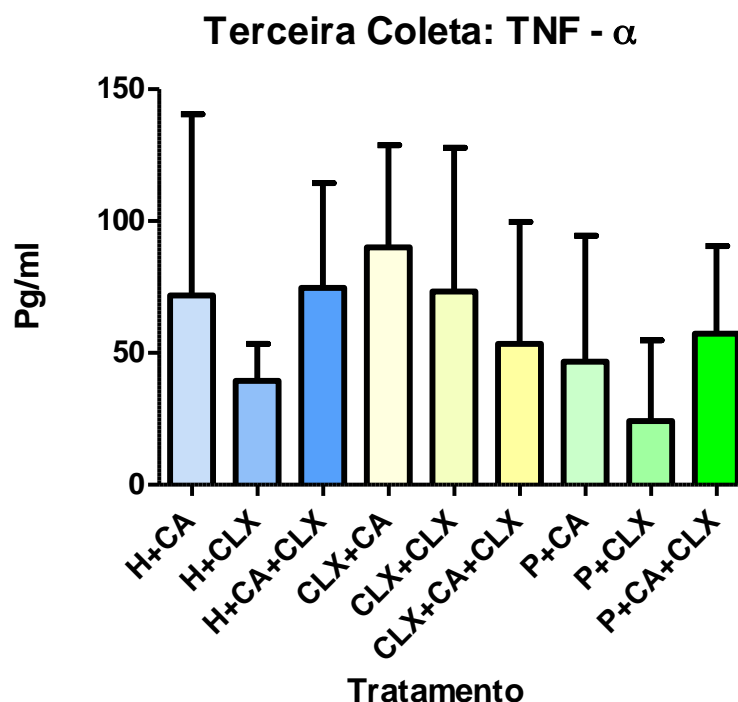


Figura 14 – Gráfico em barras do nível médio de TNF- $\alpha$  (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com a coleta S3 de acordo com os agentes irrigantes avaliados.

## 5.2 IL - 6

Os valores médios e desvios-padrão de IL-6 obtidos nas amostras estimuladas com a primeira coleta (S1) dos canais radiculares de cada grupo experimental (n=36) estão demonstrados na Tabela 4. Assim como TNF- $\alpha$ , o grupo HIPO apresentou o menor valor médio de IL-6, sendo estatisticamente diferente dos demais grupos ( $p < 0,05$ ). O grupo PRO apresentou valor intermediário ( $p < 0,05$ ) e o grupo CLX apresentou valores significativamente superiores ( $p < 0,5$ ). Estes dados estão demonstrados no gráfico da Figura 15. A produção basal média de IL-6 pelo controle da cultura celular foi 3,44 pg/ml.

Tabela 4 - Valores médios de IL - 6 (pg/ml)  $\pm$  desvio padrão (dp), obtidos com a 1ª coleta (S1) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos

<b>Irrigantes</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Grupos homogêneos*</b>
HIPO	1,1	1,6	A
CLX	47,0	41,7	B
PRO	22,1	13,1	C

\*Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

Em relação à estimulação celular com a segunda coleta do canal radicular (S2), pode-se verificar que o grupo HIPO apresentou menor valor médio da produção de IL-6, sendo semelhante ao grupo PRO ( $p>0,05$ ), que apresentou valor intermediário e diferente do grupo CLX ( $p<0,05$ ), que apresentou os maiores valores de IL-6. Estes dados estão apresentados na Tabela 5 e na Figura 16.

Tabela 5 - Valores médios de IL - 6 (pg/ml)  $\pm$  desvio padrão (dp), obtidos com a 2ª coleta (S2) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos

<b>Irrigantes</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Grupos homogêneos*</b>
HIPO	5,2	11,1	A
CLX	92,5	232,9	B
PRO	35,8	34,6	AB

\*Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

Na Tabela 6 pode-se verificar que com a terceira coleta do canal radicular (S3) também houve diferença estatística significativa entre os grupos ( $p<0.0001$ ), sendo que com os protocolos de tratamento



H+CA, H+CLX, H+CA+CLX houve menor produção de IL-6, diferente dos demais grupos (Figura 16)

Tabela 6 - Valores médios de IL - 6 (pg/ml)  $\pm$  desvio padrão (dp), obtidos na 3ª coleta (S3) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos

<b>Tratamento</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Grupos homogêneos</b>
<b>H+CA</b>	0,6	1,2	A
<b>H+CLX</b>	0,1	0,3	A
<b>H+CA+CLX</b>	0,8	1,7	A
<b>CLX+CA</b>	17,1	10,8	B
<b>CLX+CLX</b>	23,1	14,9	B
<b>CLX+CA+CLX</b>	14,9	16,4	B
<b>P+CA</b>	15,0	14,3	B
<b>P+CLX</b>	16,77	8,43	B
<b>P+CA+CLX</b>	25,13	9,52	B

\*Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

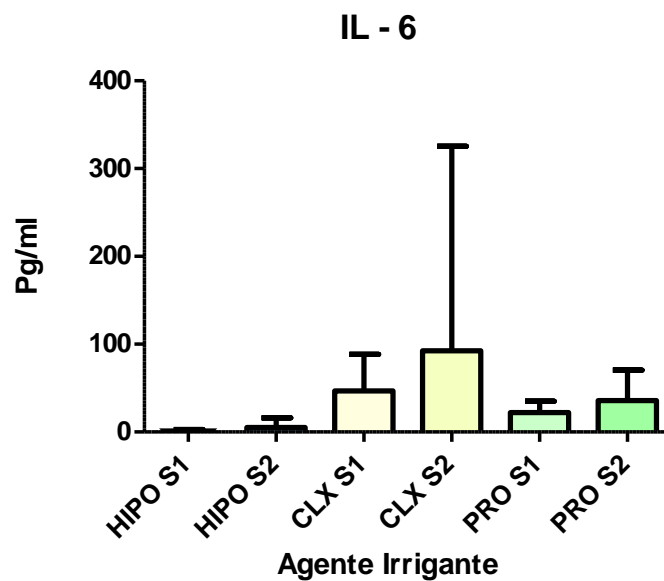


Figura 15 – Gráfico em barras do nível médio de IL-6 (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com as coletas S1 e S2 de acordo com os agentes irrigantes avaliados.

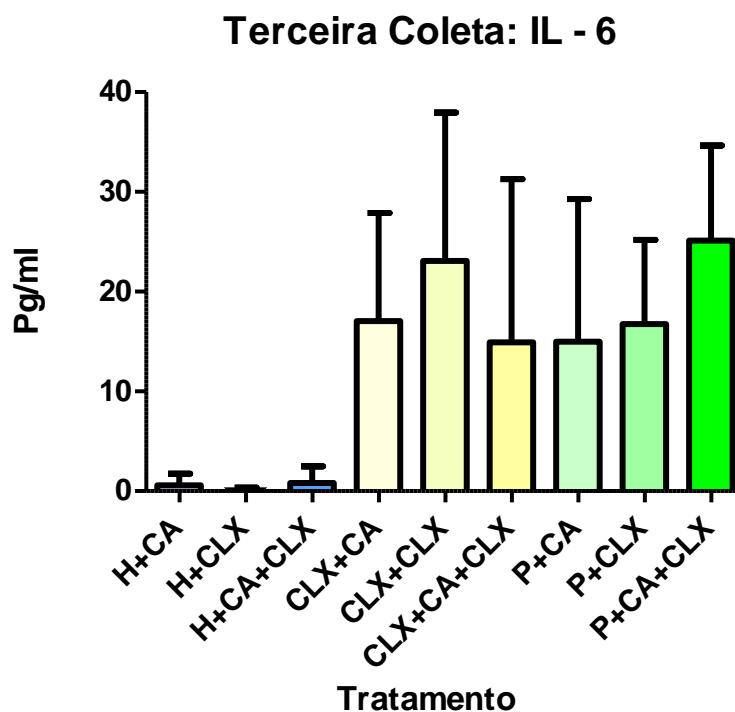


Figura 16 – Gráfico em barras do nível médio de IL-6 (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com a coleta S3 de acordo com os agentes irrigantes avaliados.

### 5.3 IP - 10

Em relação aos dados obtidos com a análise de IP-10, verificou-se que a estimulação com as amostras obtidas após a primeira coleta (S1) do canal radicular foi significativamente menor no grupo HIPO em relação aos demais ( $p < 0,05$ ). O grupo PRO apresentou valor intermediário, sendo diferente dos outros grupos ( $p < 0,05$ ) e o grupo CLX apresentou maior resposta celular na produção de IL-10 ( $p < 0,05$ ). Os valores médios, desvios-padrão e formação de grupos homogêneos estão demonstrados na Tabela 7 e Figura 17. O grupo controle da cultura celular apresentou produção média de IP-10 de 651 pg/ml.

Tabela 7 - Valores médios de IP-10 (pg/ml)  $\pm$  desvio padrão (dp), obtidos com a 1ª coleta (S1) dos grupos experimentais (n=36), e formação de grupos homogêneos

<b>Irrigantes</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Grupos homogêneos*</b>
HIPO	232,5	360,1	A
CLX	2440	1810	B
PRO	1451	1549	C

\*Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

Em relação à segunda coleta do canal radicular, a produção celular média de IP-10 variou de 462,5 pg/ml a 1594 pg/ml. O grupo HIPO apresentou valores estatisticamente menores de IP-10, sendo semelhante ao grupo PRO ( $p > 0,05$ ) e diferente do grupo CLX ( $p < 0,05$ ), que apresentou a maior produção. Os dados estão apresentados na Tabela 8 e Figura 17.

Tabela 8 - Valores médios de IP - 10 (pg/ml)  $\pm$  desvio padrão (dp), obtidos com a 2ª coleta (S2) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos

Irrigante	Média	Desvio-padrão	Grupos homogêneos*
HIPO	462,5	653,9	A
CLX	1594	1891	B
PRO	1149	1354	AB

\*Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

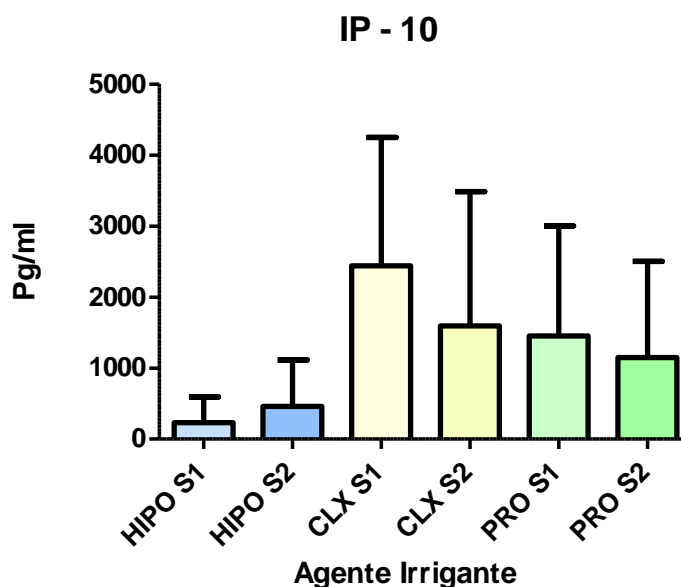


Figura 17 – Gráfico em barras do nível médio de IP-10 (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com as coletas S1 e S2 de acordo com os agentes irrigantes avaliados.

Os dados obtidos com a terceira coleta do canal radicular (Figura 18) indicaram médias de IP-10 variando de 20,6 pg/ml a 3697 pg/ml. Os testes estatísticos indicaram presença de diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) entre os tratamentos avaliados ( $n=12$ ), sendo que os protocolos CLX+CLX e P+CA apresentaram valores significativamente maiores de IP-10 que os demais grupos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores médios de IP - 10 (pg/ml)  $\pm$  desvio padrão (dp), obtidos com a 3ª coleta (S3) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos

Tratamento	Média	Desvio-padrão	Grupos homogêneos*
H+CA	20,6	14,9	A
H+CLX	393,1	330,1	A
H+CA+CLX	228,8	232,3	A
CLX+CA	42,1	53,97	A
CLX+CLX	3697	2030	B
CLX+CA+CLX	623,1	1172	A
P+CA	3380	2137	B
P+CLX	762,1	942,4	A
P+CA+CLX	338,4	434,5	A

\*Letras diferentes indicam diferença estatística significante.

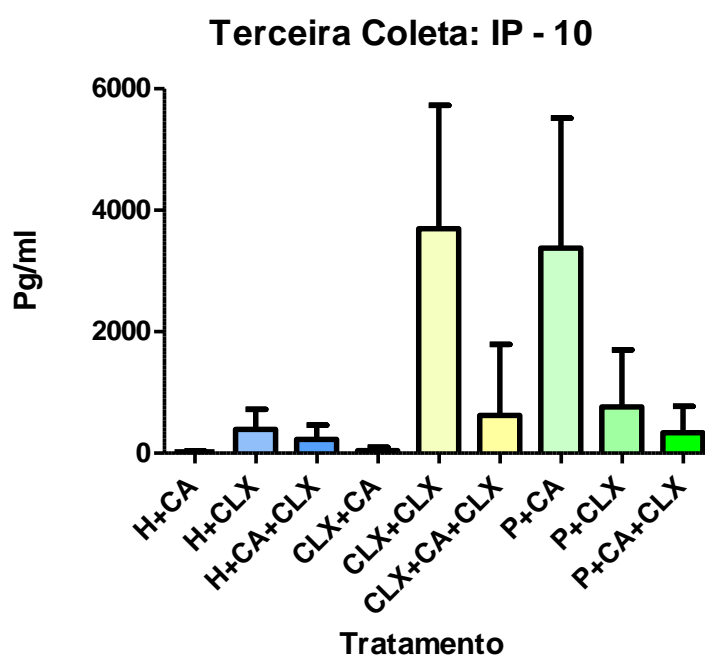


Figura 18 – Gráfico em barras do nível médio de IP-10 (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com a coleta S3 de acordo com os agentes irrigantes avaliados.

#### 5.4 MIP - 1 $\alpha$

Os valores médios e desvios-padrão da produção de MIP-1 $\alpha$  (pg/mL) obtida pela cultura celular estimulada com as amostras obtidas na primeira coleta (S1) do canal radicular de cada grupo experimental (n=36) estão demonstrados na Tabela 10 e Figura 19. O grupo HIPO também apresentou valores significativamente menores da produção de MIP-1 $\alpha$  que os demais grupos ( $p < 0,05$ ). Os grupos PRO e CLX apresentaram valores estatisticamente semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ) e diferente de HIPO ( $p < 0,05$ ). A produção média basal de MIP-1 $\alpha$  pelo controle da cultura celular foi 33,20 pg/ml.

Tabela 10 - Valores médios de MIP-1 $\alpha$  (pg/ml)  $\pm$  desvio padrão (dp), obtidos com a 1<sup>a</sup> coleta (S1) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos

<b>Irrigantes</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Grupos homogêneos*</b>
HIPO	189,2	106,4	A
CLX	286,2	52,7	B
PRO	262,8	34,3	B

\*Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

Em relação à segunda coleta do canal radicular (S2), a produção média de MIP-1 $\alpha$  variou entre 138,6 pg/ml e 272,7 pg/ml, sendo que o grupo HIPO apresentou os menores valores em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 11, Figura 19).

Tabela 11 - Valores médios de MIP - 1 $\alpha$  (pg/ml)  $\pm$  desvio padrão (dp), obtidos com a 2<sup>a</sup> coleta (S2) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos

Irrigante	Média	Desvio-padrão	Grupos homogêneos*
HIPO	138,6	88,4	A
CLX	201,4	90,9	B
PRO	272,7	50,4	C

\*Letras diferentes indicam diferença estatística significante.

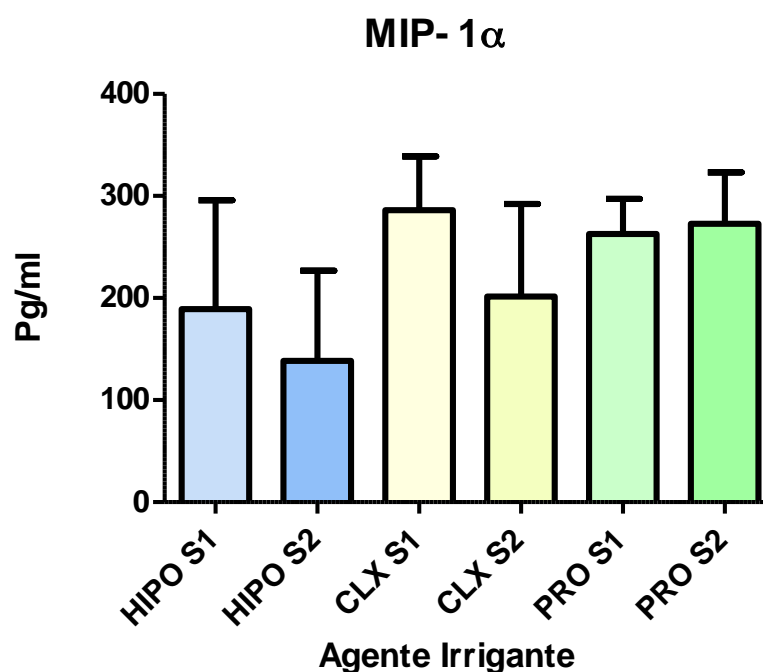


Figura 19 – Gráfico em barras do nível médio de MIP-1 $\alpha$  (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com as coletas S1 e S2 de acordo com os agentes irrigantes avaliados.

Os dados obtidos na terceira coleta do canal radicular (Tabela 12 e Figura 20) indicaram médias de MIP-1 $\alpha$  variando de 0 pg/ml a 166,1 pg/ml. Os protocolos de tratamento H+CA e H+CA+CLX promoveram produção celular de MIP-1 $\alpha$  significativamente maior que os demais grupos ( $p < 0,05$ ).

Tabela 12 - Valores médios de MIP - 1 $\alpha$  (pg/ml)  $\pm$  desvio padrão (dp), obtidos na 3<sup>a</sup> coleta (S3) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos

Tratamento	Média	Desvio-padrão	Grupos homogêneos*
H+CA	120,1	37,3	A
H+CLX	0,0	53,7	B
H+CA+CLX	166,1	0,0	A
CLX+CA	20,8	165,8	B
CLX+CLX	32,3	6,4	B
CLX+CA+CLX	8,1	11,9	B
P+CA	9,2	28,0	B
P+CLX	2,3	14,7	B
P+CA+CLX	4,3	1,9	B

\*Letras diferentes indicam diferença estatística significante.

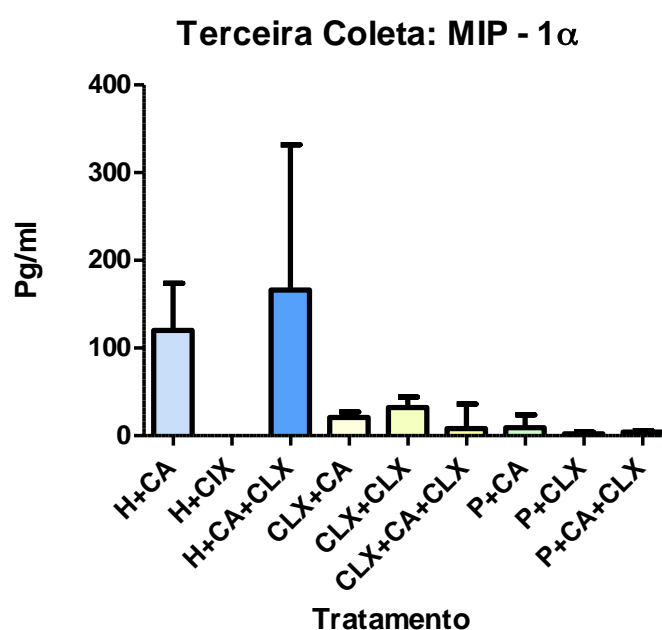


Figura 20 – Gráfico em barras do nível médio de MIP-1 $\alpha$  (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com a coleta S3 de acordo com os agentes irrigantes avaliados.



## 5.5 G-CSF

Em relação aos dados obtidos com a análise de G-CSF, verificou-se que as médias variaram de 843,3 pg/ml a 3121 pg/ml com a estimulação das amostras obtidas após a primeira coleta do canal radicular (Tabela 13, Figura 21). O grupo HIPO apresentou os menores valores, sendo diferente dos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Os grupos PRO e CLX apresentaram valores estatisticamente semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ) e maiores que o grupo HIPO ( $p < 0,05$ ). A produção média basal de G-CSF pelo controle celular foi 140,6 pg/ml.

Tabela 13 - Valores médios de G-CSF (pg/ml)  $\pm$  desvio padrão (dp), obtidos com a 1<sup>a</sup> coleta (S1) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos

<b>Irrigantes</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Grupos homogêneos*</b>
HIPO	843,3	936,5	A
CLX	2375,0	1946,0	B
PRO	3121,0	2064,0	B

\*Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

Em relação à estimulação celular com a segunda coleta do canal radicular, os valores médios de G-CSF variaram entre 790,9 pg/ml e 3954 pg/ml (Tabela 14 e Figura 21). Os grupos HIPO e CLX apresentaram valores semelhantes ( $p > 0,05$ ) e estatisticamente menores que o grupo PRO ( $p < 0,05$ ).

Tabela 14 - Valores médios de G-CSF (pg/ml)  $\pm$  desvio padrão (dp), obtidos com a 2ª coleta (S2) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos

Irrigante	Média	Desvio-padrão	Grupos homogêneos*
HIPO	790,9	818,8	A
CLX	1400	1561	A
PRO	3954	2806	B

\*Letras diferentes indicam diferença estatística significante.

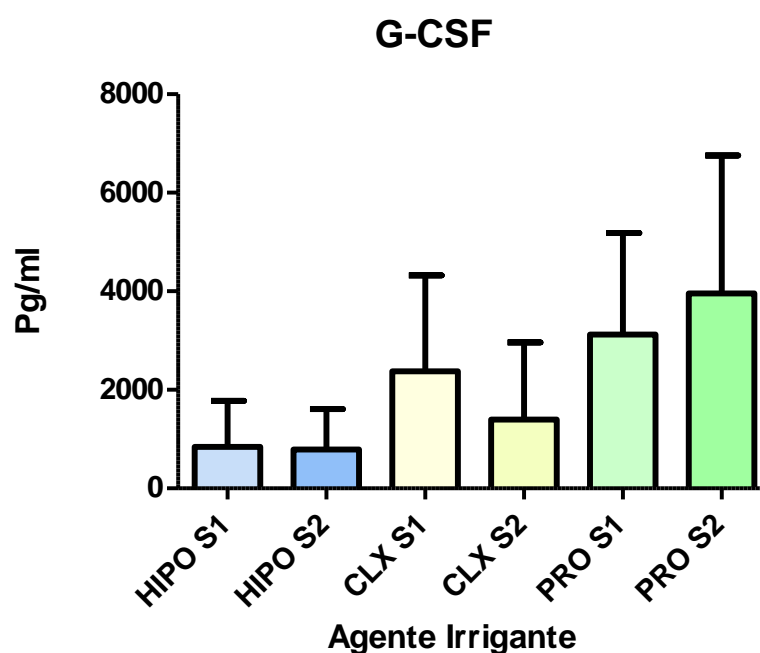


Figura 21 – Gráfico em barras do nível médio de G-CSF (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com as coletas S1 e S2 de acordo com os agentes irrigantes avaliados.

Os dados obtidos com a terceira coleta do canal radicular indicaram médias de G-CSF variando de 0 pg/ml a 870 pg/ml. Após análise, verificou-se que o protocolo de tratamento H+CLX foi o que promoveu maior produção de G-CSF em relação aos demais grupos

( $p < 0,05$ ). Os valores médios, desvios-padrão e formação de grupos homogêneos estão apresentados na Tabela 15 e Figura 22.

Tabela 15 - Valores médios de G-CSF (pg/ml)  $\pm$  desvio padrão (dp), obtidos com a 3ª coleta (S3) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos

Tratamento	Média	Desvio-padrão	Grupos homogêneos*
H+CA	77,2	196,4	A
H+CLX	870,0	541,6	B
H+CA+CLX	107,6	166,3	A
CLX+CA	8,7	7,9	A
CLX+CLX	11,3	17,8	A
CLX+CA+CLX	163,1	103,2	A
P+CA	2,0	6,5	A
P+CLX	0,0	0,0	A
P+CA+CLX	16,2	37,8	A

\*Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

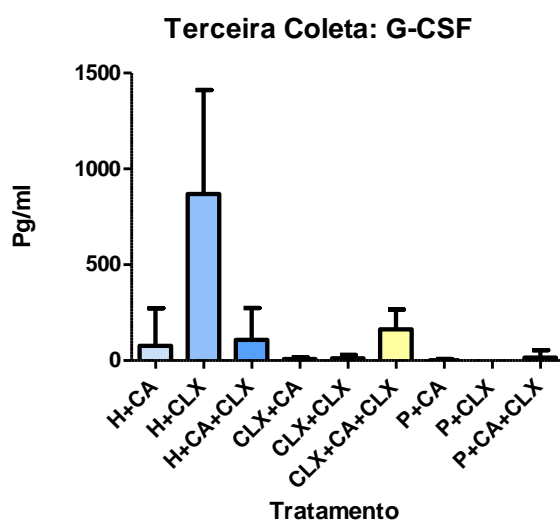


Figura 22 – Gráfico em barras do nível médio de MIP-1 $\alpha$  (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com a coleta S3 de acordo com os agentes irrigantes avaliados.

## 5.6 IL - 1 $\beta$

Os valores médios e desvios-padrão da produção de IL-1 $\beta$  (pg/mL) obtida pela cultura celular estimulada com as amostras obtidas na primeira coleta (S1) do canal radicular de cada grupo experimental (n=36) estão demonstrados na Tabela 16 e Figura 23. Após análise dos dados, verificou-se que o grupo HIPO apresentou a maior produção média de IL-1 $\beta$ , sendo estatisticamente diferente dos grupos PRO e CLX ( $p < 0,05$ ). A produção média basal de IL-1 $\beta$  pelo controle celular foi 22,2 pg/ml.

Tabela 16 - Valores médios de IL-1 $\beta$  (pg/ml)  $\pm$  desvio padrão (dp), obtidos com a 1<sup>a</sup> coleta (S1) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos

<b>Irrigantes</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Grupos homogêneos*</b>
HIPO	30,8	26,9	A
CLX	9,6	10,3	B
PRO	3,4	6,2	B

\*Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

Em relação à estimulação com segunda coleta do canal radicular, as médias de IL-1 $\beta$  variaram entre 4 pg/ml e 42,3 pg/ml (Tabela 17, Figura 23). O grupo HIPO apresentou a maior produção média de IL-1 $\beta$ , sendo estatisticamente diferente dos demais grupos ( $p < 0,05$ , Tabela 17).

Tabela 17 - Valores médios de IL-1 $\beta$  (pg/ml)  $\pm$  desvio padrão (dp), obtidos na 2<sup>a</sup> coleta (S2) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos

Irrigante	Média	Desvio-padrão	Grupos homogêneos*
HIPO	42,3	41,3	A
CLX	9,0	9,4	B
PRO	4,0	5,8	B

\*Letras diferentes indicam diferença estatística significante.

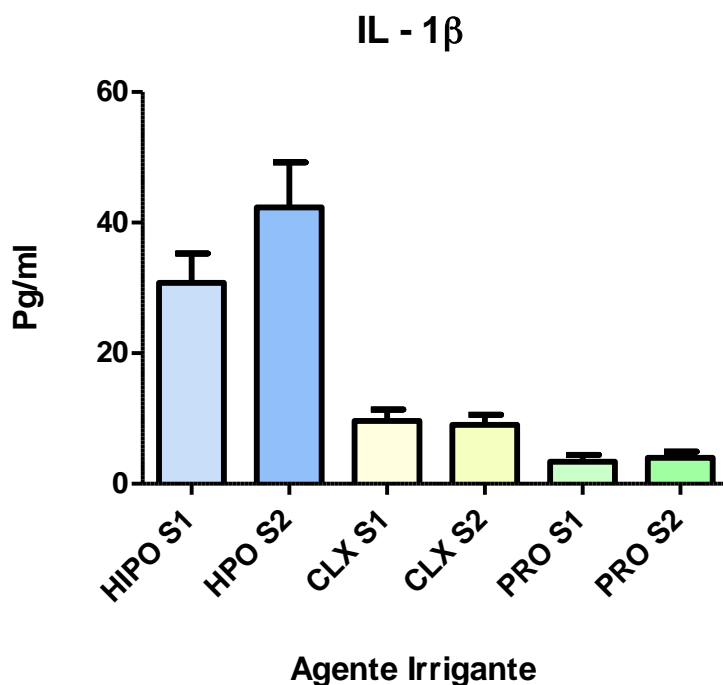


Figura 23 – Gráfico em barras do nível médio de IL-1 $\beta$  (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com as coletas S1 e S2 de acordo com os agentes irrigantes avaliados.

Os dados obtidos com a terceira coleta do canal radicular (Tabela 18, Figura 25) indicaram médias de IL-1 $\beta$  variando entre 0,2 pg/ml a 71,1 pg/ml. O protocolo de tratamento H+CLX foi o que apresentou produção de IL-1 $\beta$  significativamente superior aos demais grupos ( $p < 0,05$ , Tabela 18).

Tabela 18 - Valores médios de IL-1 $\beta$  (pg/ml)  $\pm$  desvio padrão (dp), obtidos com a 3<sup>a</sup> coleta (S3) dos grupos experimentais, e formação de grupos homogêneos

Tratamento	Média	Desvio-padrão	Grupos homogêneos*
H+CA	7,4	8,8	A
H+CLX	71,1	41,8	B
H+CA+CLX	9,2	11,0	A
CLX+CA	0,3	0,7	A
CLX+CLX	5,3	3,4	A
CLX+CA+CLX	0,2	0,7	A
P+CA	3,2	6,4	A
P+CLX	0,4	1,3	A
P+CA+CLX	0,2	0,8	A

\*Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

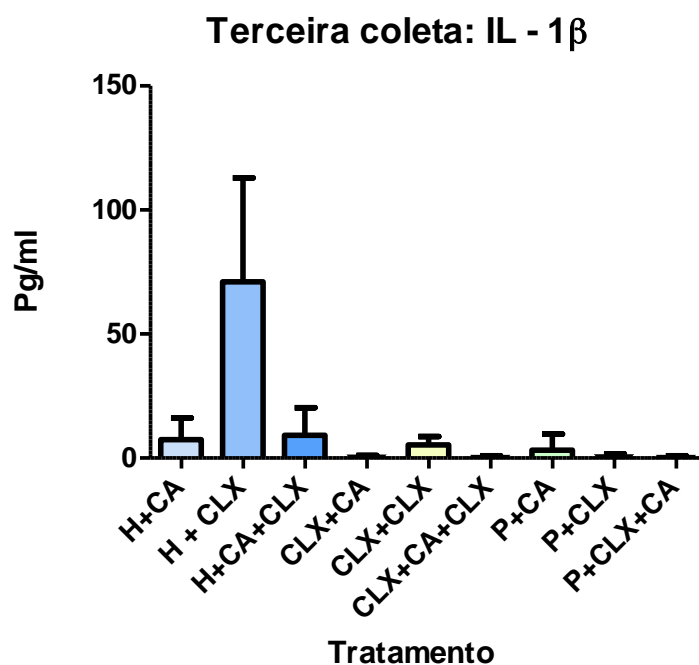


Figura 24 – Gráfico em barras do nível médio de IL-1 $\beta$  (pg/mL) obtido nas amostras estimuladas com a coleta S3 de acordo com os agentes irrigantes avaliados.

## 6 DISCUSSÃO

O ácido lipoteicoico encontra-se presente na parede celular de bactérias Gram-positivas, sendo um de seus principais fatores de virulência, uma vez que está envolvido na resposta inflamatória, síndrome séptica, formação de biofilme e adesão da bactéria ao dente (Fabretti et al., 2006; Han et al., 2006; Baik et al., 2008; Lee et al., 2009). Devido a sua importância no quadro das afecções endodônticas, torna-se fundamental o estudo de formas de neutralização dessa substância.

Foi utilizada a concentração de 250 µg/mL para contaminação dos espécimes, pois esta se mostrou adequada, em projeto piloto, para estimulação celular de produção de citocinas. Estudo anterior (Oliveira LA, Barbosa, 2003) utilizou a concentração de LTA de 150 µg/mL para promover reação inflamatória no tecido subcutâneo de ratos e destruição do tecido pulpar em cães, respectivamente. Entretanto, como não foram encontrados na literatura estudos que inocularam LTA em canais radiculares a fim de verificar a eficácia de diferentes protocolos de instrumentação e medicação intracanal, esta concentração foi aumentada para 250 µg/mL. Lembrando que esta concentração é da solução estoque e que o canal radicular recebeu no total 30 µL desta solução, equivalente a 7,5 µg de LTA. Em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa (Oliveira SACd, 2012), já foi utilizada a concentração inicial de 150 µg/mL nos canais radiculares e, com base nestes resultados prévios e como na atual pesquisa buscou também analisar a ação da medicação intracanal, houve interesse de aumentar a concentração com a hipótese de verificar o melhor protocolo para eliminar/neutralizar os efeitos citotóxicos de LTA.

Como não são verificados até o momento na literatura estudos que avaliam a eficácia da instrumentação rotatória sobre LTA

torna-se difícil sua discussão. Martinho et al. (2010) verificaram que instrumentação rotatória com instrumentos NiTi reduziu significativamente a quantidade de endotoxinas nos canais radiculares, com isso, os resultados obtidos no presente estudo são inovadores com relação aos efeitos de protocolos endodônticos, utilizando instrumentos rotatórios, em neutralizar/eliminar os efeitos citotóxicos de LTA em canais radiculares. Uma vez que não são comercializados kits para quantificação de LTA, assim como existem para endotoxinas (LPS) como o teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (Oliveira LD et al., 2012; Xavier et al., 2013), a forma encontrada para avaliar os efeitos de diferentes protocolos de tratamento na neutralização desta substância foi pelo método indireto de ativação celular e produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IP-10, MIP-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e de fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF). Diversos estudos demonstraram que o ácido lipoteicóico induz a produção destes fatores pró-inflamatórias em macrófagos (Van Amersfoort et al., 2003; Kayaoglu, Orstavik, 2004; Baik et al., 2008, 2011; de Souza et al., 2008; Chou, Lu, 2011; Cheng et al., 2013; Islam et al., 2013; Park et al., 2013).

O fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) é uma proteína característica da fase aguda do processo inflamatório, a qual inicia a produção de citocinas, aumenta a permeabilidade vascular e recruta macrófagos e neutrófilos (Castillo et al., 2011). Além disso, está presente no processo de regulação da reabsorção óssea (Stashenko et al., 1998), que ocorre na região periapical e é de grande importância nas afecções endodônticas. Estudos anteriores demonstraram que LTA é capaz de estimular a liberação de TNF- $\alpha$  (Van Amersfoort et al., 2003; Kayaoglu, Orstavik, 2004).

A interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) é uma potente citocina pró-inflamatória, responsável pela defesa do hospedeiro frente a uma infecção (Dinarello, 1996) e capaz de conduzir reações de destruição tecidual da polpa e do periápice (Lin et al., 2001). Foi verificado aumento



na produção desta citocina quando do estímulo com LTA (Kayaoglu, Orstavik, 2004)

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina multifuncional, importante tanto nas inflamações agudas quanto crônicas (Ishihara, Hirano, 2002), podendo ser sintetizada por: linfócitos, macrófagos, fibroblastos ou células endoteliais, entre outras. Agindo como parte da transição de imunidade inata para adquirida no início da resposta imune, ela atua através de diferentes controles de recrutamento de leucócitos (Hoebe et al., 2004; Jones, 2005), e sua produção pode ser estimulada pelo LTA (Van Amersfoort et al., 2003; Kayaoglu, Orstavik, 2004)

Enquanto isso, IP-10 é uma quimiocina que atua no local da infecção, realizando um papel importante no recrutamento e ativação dos leucócitos (Zlotnik, Yoshie, 2000). Já MIP-1 $\alpha$  é uma quimiocina que apresenta um papel importante no recrutamento de monócitos. Estudos indicam que ambas apresentam índices elevados em tecidos gengivais humanos inflamados (Kabashima et al., 2002), e que LTA é capaz de induzir a produção de uma maior quantidade dessas citocinas, por parte dos macrófagos (Park et al., 2013).

O fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) é uma importante citocina, uma vez que regula a proliferação e a diferenciação das células progenitoras de neutrófilos (Welte et al., 1996). As principais fontes de G-CSF são os monócitos e macrófagos, que podem ser estimulados por: IL-1b, IL-3, IL-4, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , LPS e por LTA (Demetri, Griffin, 1991; Hareng, Hartung, 2002; Chou, Lu, 2011).

Assim sendo, o LTA utilizado neste estudo é capaz de elevar os índices de todas as citocinas analisadas nesta pesquisa, e as mesmas podem ser utilizadas na avaliação da neutralização deste importante fator de virulência.

No presente estudo, foi possível verificar que mesmo após a realização do preparo biomecânico, com diferentes agentes irrigantes, grande parte dos índices avaliados foi diferente do controle

celular, havendo diferença entre os irrigantes avaliados. Após o uso da medicação intracanal, os índices de citocinas e de G-CSF foram mais próximos à produção do controle celular. Dados que nos sugerem a importância da utilização da medicação intracanal, como já indicado por outros autores (Valera et al., 2001; Oliveira LD et al., 2005; Xavier et al., 2013).

### **6.1 Agentes Irrigantes**

Nos resultados obtidos nesta pesquisa, verificou-se que as amostras da primeira coleta (S1) dos espécimes irrigados com hipoclorito de sódio 1%, induziram os menores índices de produção celular de TNF- $\alpha$ , IL-6, IP-10, MIP-1 $\alpha$  e G-CSF. Em relação a IL-1 $\beta$ , o hipoclorito de sódio 1% apresentou os maiores índices. No entanto, os índices apresentados por este agente irrigante foram estatisticamente semelhantes ao controle celular, em relação a todos os fatores avaliados com exceção de MIP-1 $\alpha$ . Assim, o hipoclorito de sódio, associado à instrumentação rotatória, foi mais eficiente na neutralização/eliminação dos efeitos citotóxicos do LTA, dentre os irrigantes avaliados.

Estudos anteriores já demonstraram que o hipoclorito de sódio 1% é eficiente na eliminação de microrganismos dos canais radiculares (Valera et al., 2001; Xavier et al., 2013), e que é capaz de diminuir a quantidade de endotoxinas, sem contudo eliminá-las completamente do canal radicular (de Oliveira et al., 2007; Xavier, 2011). A estrutura semelhante do LPS e do LTA parece indicar um comportamento semelhante por parte do hipoclorito de sódio na neutralização destas substâncias, uma vez que, mesmo diminuindo os níveis de citocinas apresentados, houve detecção de níveis maiores de

MIP-1 $\alpha$ , o que indica que, mesmo em menor quantidade, ainda há remanescente de LTA após o preparo biomecânico.

Logo após o hipoclorito de sódio 1%, os melhores índices verificados foram por parte do extrato glicólico de própolis 12%, que apresentou índices menores e estatisticamente diferentes que a clorexidina gel 2% em relação a 4 das 6 citocinas avaliadas, sendo elas: TNF- $\alpha$ , IL-6, IP-10 e IL-1 $\beta$ . Em relação a MIP-1 $\alpha$  e G-CSF os valores obtidos com o grupo do extrato glicólico de própolis 12% foram estatisticamente iguais aos da clorexidina gel 2%.

É importante ressaltar que os valores de IL-1 $\beta$  apresentados pelo extrato glicólico de própolis foram os menores obtidos em relação a todos os irrigantes, e também em relação ao controle celular. Assim, pode-se sugerir uma inibição da produção desta citocina quando da utilização deste irrigante, fato que pode ter relação com a atividade anti-inflamatória da própolis, relatada em estudos anteriores (Burdock, 1998; Lotufo et al., 2005).

Considerando-se que a eficácia do extrato glicólico de própolis contra microrganismos dos canais radiculares já foi comprovada, que sua atividade antiendotóxica é semelhante a do hipoclorito de sódio 1% (Xavier, 2011), e que sua capacidade de neutralização de LTA é inferior a do hipoclorito de sódio, mas superior a da clorexidina gel 2%, o mesmo é uma opção viável de agente irrigante a ser utilizado durante o tratamento endodôntico. Além disso, ele possui a vantagem, em relação aos demais irrigantes avaliados, de ser biocompatível (Al-Shaher et al., 2004; Silva et al., 2004).

Tendo apresentados os maiores índices referentes a todas as citocinas, com exceção de G-CSF e IL-1  $\beta$ , a clorexidina gel 2%, associada à instrumentação rotatória, demonstrou menor efetividade na neutralização/eliminação de LTA inoculado nos canais radiculares. Da mesma forma, a clorexidina gel 2% não foi capaz de neutralizar completamente LPS (Valera et al., 2009), que possui estrutura

semelhante ao LTA. Apesar disso, a clorexidina gel 2% possui efetividade contra microrganismos do canal radicular, e já é utilizada na clínica odontológica, tanto como irrigante quanto como medicação intracanal (Xavier, 2011). Lee et al. (2009) demonstraram que o pré-tratamento de LTA com clorexidina 2% por 6 horas ou com clorexidina 0,2% por 24 horas diminuiu significativamente a capacidade de induzir a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos (RAW 264.7), via receptor TLR-2. De acordo com Zorko e Jerala (2008), a clorexidina consegue se ligar tanto em LTA (por interações eletrostáticas) como em LPS (por interações hidrofóbicas), prevenindo ativação celular via receptor TLR2 e TLR4, respectivamente. Contudo, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se observar que a clorexidina, como substância química auxiliar, não foi capaz de neutralizar os efeitos citotóxicos de LTA em macrófagos, como o de induzir a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IP-10 e MIP-1 $\alpha$ , provavelmente devido ao pequeno período de tempo que permaneceu em contato com LTA durante a instrumentação dos canais radiculares. Assim, há necessidade de ampliar os estudos sobre o papel da clorexidina sobre LTA e as vias de sinalização intracelular envolvidas na produção de tais citocinas e mediadores químicos. Com isso, torna-se importante reforçar que os protocolos de instrumentação e medicação intracanal devem sempre ser revisados a fim de promover maiores índices de sucesso do tratamento endodôntico.

Após a utilização do EDTA trissódico foi realizada a segunda coleta dos canais radiculares (S2), onde os padrões dos índices de citocinas se mantiveram, sendo o hipoclorito de sódio 1% com os índices mais baixos, seguido pelo extrato glicólico de própolis 12% e, por último a clorexidina gel 2%.

## 6.2 Protocolos de Tratamento Endodôntico

A avaliação dos protocolos de tratamento endodôntico, onde é analisada a eficácia da ação conjunta do preparo biomecânico, do agente irrigante, do EDTA trissódico e da medicação intracanal, foi realizada através da análise dos resultados da terceira coleta do canal radicular (S3). No entanto, de acordo com o resultados obtidos, não houve consenso em relação a um protocolo que fosse pior ou melhor em todas as citocinas avaliadas. Pode-se observar que houve acentuada diminuição nos índices de todos os grupos em relação a maior parte das citocinas, assim, verifica-se que todos os protocolos de tratamento endodôntico avaliados foram capazes de diminuir/neutralizar os efeitos citotóxicos do ácido lipoteicóico.

Considerando-se que na avaliação em relação ao agente irrigante houve diferença estatística significativa entre os grupos e que esta diferença não foi detectada após a utilização da medicação intracanal, pode-se observar a importância de se utilizar medicação intracanal, fato já sugerido por outras pesquisas (Oliveira LD et al., 2005; Valera et al., 2009; Xavier et al., 2013).

Outro fato que pode ser comprovado é que, assim como relatado em pesquisa anterior (Baik et al., 2011), o hidróxido de cálcio, utilizado em duas das três medicações utilizadas neste estudo, foi capaz de inibir a toxicidade do ácido lipoteicóico, diminuindo sua resposta inflamatória. Baik et al. (2008) demonstraram que o pré-tratamento do LTA com hidróxido de cálcio inibiu sua habilidade de induzir liberação de TNF- $\alpha$ , via receptor TLR-2. Baik et al. (2011) verificaram que o tratamento de LTA com hidróxido de cálcio por 24 horas inibiu significativamente a produção de óxido nítrico, MIP-1 $\alpha$  e IP-10 em cultura de macrófagos (RAW 264.7). Sabendo que LTA é composto por poliglicerofosfato ligado a ácidos graxos, uma hipótese potencial para a inativação é a deacilação

do LTA, pois LTA deacilado não é capaz de estimular receptor TLR2 e, conseqüentemente, é incapaz de estimular a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Assim como ocorre sobre LPS, Baik et al. (2011) confirmaram a capacidade do hidróxido de cálcio em promover a deacilação de LTA de *E. faecalis*, resultando na liberação de ácidos graxos livres e na perda de sua atividade imunoestimuladora. Ryu et al. (2009) também verificaram que a capacidade do LTA de induzir produção de óxido nítrico e TNF- $\alpha$  foi abolida quando LTA foi tratado com hidróxido de sódio 0,2 N, demonstrando que o tratamento alcalino pode inativar LTA. Hong et al. (2014) sugeriram que LTA interage com receptor TLR2 através dos radicais lipídicos para induzir mediadores inflamatórios em macrófagos e relataram também que o tratamento alcalino do LTA inibe sua atividade imunoestimuladora devido à deacilação do LTA. Com isso, pode-se verificar que os protocolos que utilizaram hidróxido de cálcio como medicação intracanal por 14 dias foram efetivos em neutralizar os efeitos citotóxicos de LTA em macrófagos.

Como mencionado anteriormente, a clorexidina quando em contato com LTA por no mínimo 6 horas foi capaz de diminuir o potencial tóxico do LTA de induzir produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos (Lee et al., 2009). No presente estudo, protocolos que utilizaram CLX como medicação intracanal apresentaram baixos índices de inúmeras citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, MIP-1 $\alpha$ , G-CSF, IL-1 $\beta$ ). Possivelmente o período de tempo da medicação intracanal (14 dias) permitiu a ligação da clorexidina ao LTA, por interações eletrostáticas (Zorko, Jerala, 2008), diminuindo seu potencial de ativação celular e indução da produção de citocinas pró-inflamatórias.

Com relação à associação de clorexidina e hidróxido de cálcio como medicação intracanal, também pode-se verificar efetiva neutralização dos efeitos citotóxicos de LTA. Não são verificados estudos na literatura que avaliaram esta associação sobre LTA, entretanto, sobre LPS, já foi verificado *in vivo* que esta medicação (CLX+HC) promoveu

importante neutralização de endotoxinas, com redução nos canais radiculares de 99,2% a 100% e neutralização de seus efeitos citotóxicos (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) (Oliveira LD et al., 2012). Outros autores (Valera et al., 2010) também verificaram *in vitro* redução de LPS em canais radiculares que receberam HC ou CLX+HC como medicação intracanal. Assim, sabendo-se que LPS e LTA induzem liberação de diferentes citocinas pró-inflamatórias e mediadores químicos e que ativam diferentes receptores celulares (Zorko, Jerala, 2008; Finney et al., 2012), torna-se importante a utilização de medicações intracanal que sejam efetivas tanto sobre LPS como sobre LTA. De acordo com os resultados do presente estudo, todos os protocolos de tratamento promoveram efetiva neutralização dos efeitos citotóxicos de LTA em macrófagos, sendo estes resultados pioneiros na literatura endodôntica.

## **7 CONCLUSÃO**

Concluiu-se que, dentre os agentes irrigantes avaliados, o hipoclorito de sódio 1% associado à instrumentação rotatória foi o mais efetivo na neutralização dos efeitos citotóxicos do ácido lipoteicóico.

Concluiu-se também que todos os protocolos de tratamento analisados, com a utilização das medicações intracanal de clorexidina, hidróxido de cálcio + soro e clorexidina + hidróxido de cálcio, foram efetivos na neutralização dos efeitos citotóxicos do ácido lipoteicóico em induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias.



## 8 REFERÊNCIAS\*

Al-Shaher A, Wallace J, Agarwal S, Bretz W , Baugh D. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. J Endod. 2004;30(5):359-61.

Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi MZ , Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. Int Endod J. 1999;32(2):99-102.

Baik JE, Ryu YH, Han JY, Im J, Kum KY, Yun CH, et al. Lipoteichoic acid partially contributes to the inflammatory responses to *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2008;34(8):975-82.

Baik JE, Jang KS, Kang SS, Yun CH, Lee K, Kim BG, et al. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* through deacylation of the lipid moiety. J Endod. 2011;37(2):191-6.

Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie. 2000;31:3-15.

Bosio K, Avanzini C, D'Avolio A, Ozino O , Savoia D. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. Lett Appl Microbiol. 2000;31(2):174-47.

Bufalo MC, Bordon-Graciani AP, Conti BJ, de Assis Golim M , Sforcin JM. The immunomodulatory effect of propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. J Pharm Pharmacol. 2014.

Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food Chem Toxicol. 1998;36(4):347-63.

---

\* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Castillo NA, Perdigon G , de Moreno de Leblanc A. Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *BMC Microbiol.* 2011;11:177.

Cheng SF, Ho JW, Chan KY, Leung TY, Lam HS, Fong ON, et al. IL-15 and macrophage secretory factors facilitate immune activation of neonatal natural killer cells by lipoteichoic acid. *Cytokine.* 2013;61(2):499-505.

Chou YY , Lu SC. Inhibition by rapamycin of the lipoteichoic acid-induced granulocyte-colony stimulating factor expression in mouse macrophages. *Arch Biochem Biophys.* 2011;508(1):110-9.

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

D'Arcangelo C, Di Nardo Di Maio F, Stracci N, Spoto G, Malagnino VA , Caputi S. Pulp-dissolving ability of several endodontic irrigants: a spectrophotometric evaluation. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2007;20(2):381-6.

Dahlen G, Magnusson BC , Moller A. Histological and histochemical study of the influence of lipopolysaccharide extracted from *Fusobacterium nucleatum* on the periapical tissues in the monkey *Macaca fascicularis*. *Arch Oral Biol.* 1981;26(7):591-8.

Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose FL , Swain G. 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *Br J Pharmacol Chemother.* 1954;9(2):192-6.

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

de Souza LF, Jardim FR, Sauter IP, de Souza MM , Bernard EA. High glucose increases RAW 264.7 macrophages activation by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *Clin Chim Acta.* 2008;398(1-2):130-3.

Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood.* 1991;78(11):2791-808.

Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996;87(6):2095-147.

Endo MS. Identificação de microrganismos e quantificação de endotoxinas em canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical [dissertação]. Campinas (SP): Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas; 2011.

Fabretti F, Theilacker C, Baldassarri L, Kaczynski Z, Kropec A, Holst O, et al. Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun*. 2006;74(7):4164-71.

Fava LRG. Pastas de Hidróxido de Cálcio: considerações sobre seu emprego clínico em Endodontia. *Rev Paul Odontol*. 1991;13(5):36-43.

Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod*. 2001;27(7):452-5.

Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. *Braz Dent J*. 2007;18(4):294-8.

Ferreira CM, da Silva Rosa OP, Torres SA, Ferreira FB, Bernardinelli N. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. *Braz Dent J*. 2002;13(2):118-22.

Ferreira FB, Torres SA, Rosa OP, Ferreira CM, Garcia RB, Marcucci MC, et al. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;104(5):709-16.

Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(4):234-9.

Finney SJ, Leaver SK, Evans TW, Burke-Gaffney A. Differences in lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced cytokine/chemokine expression. *Intensive Care Med*. 2012;38(2):324-32.

Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod*. 2009;35(10):1350-353.

- Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod*. 2006a;32(10):937-40.
- Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006b;102(2):247-53.
- 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;19(2):71-6.
- Grange JM, Davey RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J R Soc Med*. 1990;83(3):159-60.
- Han SH, Kim JH, Seo HS, Martin MH, Chung GH, Michalek SM, et al. Lipoteichoic acid-induced nitric oxide production depends on the activation of platelet-activating factor receptor and Jak2. *J Immunol*. 2006;176(1):573-9.
- Hareng L, Hartung T. Induction and regulation of endogenous granulocyte colony-stimulating factor formation. *Biol Chem*. 2002;383(10):1501-17.
- Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2004;5(10):971-4.
- Hong SW, Baik JE, Kang SS, Yun CH, Seo DG, Han SH. Lipoteichoic acid of *Streptococcus mutans* interacts with Toll-like receptor 2 through the lipid moiety for induction of inflammatory mediators in murine macrophages. *Mol Immunol*. 2014;57(2):284-91.
- Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13(4-5):357-68.
- Islam MA, Proll M, Holker M, Tholen E, Tesfaye D, Looft C, et al. Alveolar macrophage phagocytic activity is enhanced with LPS priming, and combined stimulation of LPS and lipoteichoic acid synergistically induce pro-inflammatory cytokines in pigs. *Innate Immun*. 2013;19(6):631-43.
- Jolly M, Singh N, Rathore M, Tandon S, Banerjee M. Propolis and commonly used intracanal irrigants: comparative evaluation of antimicrobial potential. *J Clin Pediatr Dent*. 2013;37(3):243-9.
- Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*. 2005;175(6):3463-8.

Kabashima H, Yoneda M, Nagata K, Hirofuji T, Maeda K. The presence of chemokine (MCP-1, MIP-1alpha, MIP-1beta, IP-10, RANTES)-positive cells and chemokine receptor (CCR5, CXCR3)-positive cells in inflamed human gingival tissues. *Cytokine*. 2002;20(2):70-7.

Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(5):308-20.

Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Ambrosano GM, Murata RM, Yatsuda R, et al. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans *Streptococci*. *Curr Microbiol*. 2000;41(3):192-6.

Lee JK, Baik JE, Yun CH, Lee K, Han SH, Lee W, et al. Chlorhexidine gluconate attenuates the ability of lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* to stimulate toll-like receptor 2. *J Endod*. 2009;35(2):212-5.

Lin SK, Wang CC, Huang S, Lee JJ, Chiang CP, Lan WH, et al. Induction of dental pulp fibroblast matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene expression by interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha through a prostaglandin-dependent pathway. *J Endod*. 2001;27(3):185-9.

Loe H, Schiott CR. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res*. 1970;5(2):79-83.

Lorne E, Dupont H, Abraham E. Toll-like receptors 2 and 4: initiators of non-septic inflammation in critical care medicine? *Intensive Care Med*. 2010;36(11):1826-35.

Lotufo MA. Análise da citotoxicidade in vitro da solução de própolis em propilenoglicol [tese]. São Paulo (SP): Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo - USP; 2003.

Lotufo MA, Jr CAL, Shimizu MT, Cabral R, Birman G. Clinical evaluation of the topical use of própolis in recurrent minor aphtous ulceration. *Cienc Odontol Bras*. 2005;8(3):6-9.

Maekawa LE. Avaliação in vitro da ação de substâncias químicas auxiliares e medicações intracanaís sobre *Escherichia coli* e sua endotoxina em canais radiculares [dissertação]. São José dos Campos (SP): Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Universidade Estadual Paulista; 2007.

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

Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CA, Koga-Ito CY , Jorge AO. In vitro evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on Escherichia coli and its endotoxin in root canals. J Appl Oral Sci. 2011;19(2):106-12.

Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutical activity. Apidologie. 1995;26:83-99.

Martin MP , Pileggi R. A quantitative analysis of Propolis: a promising new storage media following avulsion. Dent Traumatol. 2004;20(2):85-9.

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. 2011;37(5):602-7.

Martinho FC, Chiesa WM, Marinho AC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, et al. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. J Endod. 2010;36(11):1766-9.

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;34(3):268-72.

Menezes MM, Oliveira LD, Koga-Ito CY , Jorge AOC. Concentração fungicida mínima das soluções de clorexidina e hipoclorito de sódio sobre Candida Albicans. Cienc Odontol Bras. 2010;11(2):23-32.

Menezes MM, Valera MC, Jorge AO, Koga-Ito CY, Camargo CH , Mancini MN. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. Int Endod J. 2004;37(5):311-9.

Mohammadi Z, Shalavi S , Yazdizadeh M. Antimicrobial activity of calcium hydroxide in endodontics: a review. Chonnam Med J. 2012;48(3):133-40.

Mohammadi Z. Endotoxin in endodontic infections: a review. J Calif Dent Assoc. 2011;39(3):152-5,58-61.

Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. Int Dent J. 2008;58(6):329-41.

Molina FP. Associação de *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Escherichia coli* em canais radiculares e avaliação dos efeitos de extratos naturais sobre os microrganismos e endotoxinas [dissertação]. São José dos Campos (SP): Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Universidade Estadual Paulista; 2008.

Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod.* 2004;30(11):785-7.

Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. *J Conserv Dent.* 2010;13(4):233-39.

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

Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J.* 2004;37(1):38-41.

Oliveira LA, Barbosa SV. The reaction of dental pulp to *Escherichia coli* lipopolysaccharide and *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid. *Braz J Microbiol.* 2003;34(2):179-81.

Oliveira LD, Leao MV, Carvalho CA, Camargo CH, Valera MC, Jorge AO, et al. In vitro effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. *J Dent.* 2005;33(2):107-14.

Oliveira LD, Carvalho CA, Carvalho AS, Alves Jde S, Valera MC, Jorge AO. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. *J Endod.* 2012;38(8):1053-7.

Oliveira SACd. Eficácia do preparo biomecânico utilizando hipoclorito de sódio 1%, clorexidina gel 2% e extrato glicólico de própolis 12%, como substâncias químicas auxiliares sobre o ácido lipoteicoico de *Enterococcus faecalis* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP-Universidade Estadual Paulista; 2012.

Oncag O, Hosgor M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J.* 2003;36(6):423-32.

Park OJ, Han JY, Baik JE, Jeon JH, Kang SS, Yun CH, et al. Lipoteichoic acid of *Enterococcus faecalis* induces the expression of chemokines via TLR2 and PAFR signaling pathways. *J Leukoc Biol.* 2013;94(6):1275-84.

Rocas IN, Siqueira JF Jr. In vivo antimicrobial effects of endodontic treatment procedures as assessed by molecular microbiologic techniques. *J Endod.* 2011;37(3):304-10.

Roças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004;30(5):315-20.

Ryu YH, Baik JE, Yang JS, Kang SS, Im J, Yun CH, et al. Differential immunostimulatory effects of Gram-positive bacteria due to their lipoteichoic acids. *Int Immunopharmacol.* 2009;9(1):127-33.

Santos MJ, Vianna LAC, Gamba MA. Avaliação da eficácia da pomada de própolis em portadores de feridas crônicas. *Acta Paul Enferm.* 2007;20(2):199-204.

Scazzocchio F, D'Auria FD, Alessandrini D, Pantanella F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol Res.* 2006;161(4):327-33.

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

Semenoff TA, Semenoff Segundo A, de Figueiredo JA. Biocompatibility of different intracanal medications in rat bucal submucosa tissue. *J Appl Oral Sci.* 2008;16(1):12-7.

Senia ES, Marshall FJ, Rosen S. The solvent action of sodium hypochlorite on pulp tissue of extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1971;31(1):96-103.

Silva FB, Almeida JM, Sousa SM. Natural medicaments in endodontics - a comparative study of the anti-inflammatory action. *Braz Oral Res.* 2004;18(2):174-79.

Siqueira JF Jr, Rocas IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* 2008;34(11):1291-1301.

Siqueira JF Jr, Rocas IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J.* 2007;18(4):267-80.

Siqueira JF Jr, Rocas IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(1):85-94.

Siqueira JF Jr. Strategies to treat infected root canals. *J Calif Dent Assoc.* 2001;29(12):825-37.



Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*. 1999;32(5):361-69.

Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(4):498-521.

Su SC, Hua KF, Lee H, Chao LK, Tan SK, Lee H, et al. LTA and LPS mediated activation of protein kinases in the regulation of inflammatory cytokines expression in macrophages. *Clin Chim Acta*. 2006;374(1-2):106-15.

Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol*. 1992;7(5):257-62.

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

Swerts MS, Costa AM, Firini JE. Associação de clorexidina e própolis atuando na inibição da aderência de *Streptococcus* spp. *Rev Int Period Clínica*. 2005;2:10-6.

Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LA, Anibal FF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *Int Endod J*. 2002;35(9):735-39.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Controle do crescimento microbiano. Porto Alegre: Artmed; 2000.

Ustun Y, Arslan S, Aslan T. Effects of calcium hydroxide and propolis intracanal medicaments on bond strength of resin-based endodontic sealer as assessed by push-out test. *Dent Mater J*. 2013;32(6):913-9.

Uzel A, Sorkun K, Oncag O, Cogulu D, Gencay O, Salih B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res*. 2005;160(2):189-95.

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

Valera MC, Maekawa LE, Oliveira LD, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, Jorge AO. Avaliação da solução de clorexidina 2% e medicamentos sobre *Escherichia coli* e sua endotoxina em canais radiculares. *Brazilian Dental Science*. 2009;12(3):38-43.

- Valera MC, de Moraes Rego J, Jorge AO. Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on *Candida albicans* in root canals. *J Endod.* 2001;27(6):401-3.
- Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(3):379-414.
- Vera J, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Loghin S, Fernandez N, Flores B, et al. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod.* 2012;38(8):1040-52.
- Verma MK, Pandey RK, Khanna R, Agarwal J. The antimicrobial effectiveness of 25% propolis extract in root canal irrigation of primary teeth. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2014;32(2):120-4.
- Vianna ME. Atividade antimicrobiana de alguns medicamentos utilizados como irrigantes e medicações intracanaís [dissertação]. Piracicaba (SP): Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP; 2002.
- Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(1):79-84.
- Walker A. A definitive and dependable therapy for pulpless teeth. *J Am Assoc.* 1936;23:1418-24.
- Wang JE, Dahle MK, McDonald M, Foster SJ, Aasen AO, Thiemermann C. Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. *Shock.* 2003;20(5):402-14.
- Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Diener-West M, Johnson JD. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. *J Endod.* 2003;29(9):562-64.
- Welte K, Gahrlove J, Bronchud MH, Platzer E, Morstyn G. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood.* 1996;88(6):1907-29.
- 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;39(8):959-64.
- Xavier ACC. Detecção de microrganismos, quantificação de endotoxinas e avaliação in vivo do extrato glicólico de própolis em dentes com necrose

pulpar e lesão periapical [dissertação]. São José dos Campos (SP): Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista - UNESP; 2011.

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000;12(2):121-7.

Zoletti GO, Siqueira JF Jr, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. *J Endod*. 2006;32(8):722-26.

Zorko M, Jerala R. Alexidine and chlorhexidine bind to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid and prevent cell activation by antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(4):730-7.

## ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE SÃO JOSÉ  
DOS CAMPOS-UNESP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Eficácia da instrumentação rotatória utilizando diferentes substâncias químicas auxiliares em neutralizar os efeitos citotóxicos do ácido lipoteicoico (LTA) de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares.

**Pesquisador:** Luciane Dias de Oliveira

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 08718112.8.0000.0077

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

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 149.301

**Data da Relatoria:** 13/11/2012

#### Apresentação do Projeto:

Este estudo visa avaliar a eficácia da instrumentação rotatória com instrumentos níquel-titânio associada a diferentes substâncias químicas auxiliares (hipoclorito de sódio 1%, clorexidina gel 2% e extrato glicólico de própolis 12%) e medicações intracanaís em neutralizar os efeitos citotóxicos do LTA de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares, analisando a produção de óxido nítrico, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e citocinas por macrófagos. Os canais radiculares de 144 dentes humanos serão inicialmente preparados até instrumento BR2 (25/0.04) e os espécimes serão distribuídos em microplacas (n=12). Serão realizadas 3 inoculações repetidas, a cada 24 hs, de 10 µL de solução de LTA de *E. faecalis* nos canais radiculares. Após, será realizada a instrumentação dos canais com 5 instrumentos rotatórios NiTi (sistema BioRaCe), segundo especificações do fabricante. De acordo com a substância química auxiliar utilizada, os espécimes serão divididos em 4 grupos experimentais (n=36): a) grupo 1: hipoclorito de sódio 1% b) grupo 2: clorexidina gel 2% + solução fisiológica; c) grupo 3: extrato glicólico de própolis 12%; d) grupo 4 (controle): solução fisiológica. Em seguida, será aplicado EDTA (3 min) e cada grupo será dividido em 3 subgrupos (n=12) de acordo com a medicação intracanal (MIC): A) hidróxido de cálcio com solução fisiológica; B) clorexidina gel 2% (CLX); C) CLX + hidróxido de cálcio. A MIC permanecerá por 14 dias. No total, serão realizadas três coletas do canal radicular: 1ª) imediatamente após a instrumentação;

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

FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE SÃO JOSÉ  
DOS CAMPOS-UNESP



2ª) após EDTA;3ª) após remoção da MIC. Macrófagos (RAW 264.7) serão ativados com as amostras coletadas e, após 24 hs, os sobrenadantes serão utilizados para verificar a produção de óxido nítrico (método de Griess), G-CSF e citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IP-10, TNF- $\zeta$  e MIP-1 $\zeta$ ) pelo teste imunoenzimático (ELISA). Os resultados serão analisados estatisticamente (ANOVA e teste de Tukey, 5%).

**Objetivo da Pesquisa:**

Os objetivos deste estudo serão:1) avaliar a eficácia da instrumentação rotatória com instrumentos níqueltitânio associada a diferentes substâncias químicas auxiliares (hipoclorito de sódio 1%, clorexidina gel 2% e extrato glicólico de própolis 12%) em neutralizar os efeitos citotóxicos do ácido lipoteicoico (LTA) de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares, analisando a produção de óxido nítrico, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IP-10, TNF- $\zeta$  e MIP-1 $\zeta$ ) por macrófagos (RAW 264.7);2) avaliar os efeitos de diferentes medicações intracanais (hidróxido de cálcio, clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio associado a clorexidina gel 2%) em neutralizar os efeitos citotóxicos do ácido lipoteicoico (LTA) de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Com este estudo busca-se métodos de tratamento que sejam mais eficazes na remoção ou neutralização dos efeitos citotóxicos do ácido lipoteicoico, a fim de aperfeiçoar cada vez mais a terapia endodôntica e, conseqüentemente, alcançar maiores índices de sucesso do tratamento.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A importância do trabalho, como coloca o pesquisador : sabendo que LTA é um importante fator de virulência das bactérias Gram-positivas nas infecções dos canais radiculares, a hipótese do estudo é obter métodos de tratamento que sejam eficazes na sua remoção ou neutralização de seus efeitos citotóxicos, a fim de aperfeiçoar cada vez mais a terapia endodôntica e, conseqüentemente, alcançar maiores índices de sucesso do tratamento.

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

Nd

**Recomendações:**

Nd

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

Foi adequado o TCLE e respondidas as pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

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

FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE SÃO JOSÉ  
DOS CAMPOS-UNESP



**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado acata o parecer da relatora, aprovando o projeto

SAO JOSE DOS CAMPOS, 20 de Novembro de 2012

---

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

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