

CELSO EMANUEL DE SOUZA QUEIROZ

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO SOBRE LPS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA POR MEIO DA LIBERAÇÃO DE ÓXIDO DE NÍTRICO E TNF- α EM CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS.

Tese Apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Nível de Doutorado, Área de Endodontia, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo

CoOrientadora: Prof^ª. Dr^ª. Iracilda Zeponi Carlos

Araraquara

2001

Sumário

INTRODUÇÃO	9
REVISÃO DA LITERATURA	19
- Do Hidróxido de Cálcio	19
- Dos Microrganismos (LPS).....	56
- Do TNF- α	77
- Do Óxido Nítrico	91
PROPOSIÇÃO.....	98
MATERIAL E MÉTODOS	99
- Ensaio do Óxido Nítrico	103
- Ensaio do TNF- α	106
- Metodologia da análise estatística.....	110
RESULTADOS.....	111
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	114
DISCUSSÃO.....	117
- Discussão da literatura específica.....	117
- Discussão da metodologia	125
- Discussão dos resultados.....	131
CONCLUSÃO	134
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135

Introdução

Em pleno ano 2001, apesar dos avanços tecnológicos, e a caminhada das nações em direção a globalização, a cárie dentária ainda é uma doença que leva muitas pessoas a perda de uma unidade dental. Para combater esta doença que acomete a maioria dos brasileiros é necessário a formulação de uma eficiente política de prevenção.¹⁴¹

Com a instalação da cavidade de cárie na unidade dental as bactérias presentes no meio bucal vão ter acesso franco e direto aos túbulos dentinários, e seus sub-produtos vão chegar até a polpa e promover agressão, e a depender do tempo e da capacidade reacional deste tecido, esta agressão pode levá-lo a necrose.⁶⁶

Após a morte pulpar as bactérias vão ganhar a intimidade dos canais radiculares, promovendo a colonização de todo o sistema de canais, e a medida que o tempo vai transcorrendo esta colonização vai estender-se pelos túbulos dentinários, (Berkiten et al., em 2000;¹⁹ Waltimo et al., em 2000)¹⁵¹ até atingir a superfície radicular, conforme demonstraram Nair (1987);⁸⁵ Nagoaka et al., (1995);⁸³ Ribeiro (1999);¹¹² Soares (1999).¹²⁹

Na tentativa de eliminar os microrganismos presentes no sistema de canais radiculares, ou reduzir o número a ponto que os remanescentes não possam causar irritação (Zavistoski et al., 1980),¹⁵⁹ após o acesso coronário, realiza-se o preparo biomecânico, que consiste na excisão da dentina infectada ou não, por meio dos instrumentos endodônticos. Para facilitar a ação dos instrumentos na limpeza e modelagem do canal radicular, e também ajudar na eliminação de microrganismos, utiliza-se associadamente substâncias químicas irrigadoras.^{94, 134} Dentre as mais variadas substâncias irrigadoras, destaca-se como a mais aceita, a solução de hipoclorito de sódio. Empregado em variadas concentrações, possui pH elevado, maior que 11, e capacidade de dissolução tecidual, favorecendo assim a eliminação de bactérias e restos necróticos.^{14, 48, 94, 128, 129, 133, 134}

A ação do instrumento sobre a parede dentinária formará uma camada residual conhecida como “smear layer”, que vai funcionar como uma barreira física para penetração de substâncias medicamentosas e de materiais obturadores nos túbulos dentinários.^{94, 122}

Para aumentar a permeabilidade dentinária favorecendo a ação da medicação de demora, e também a realização de uma obturação hermética, o EDTA, um quelante, também é bastante utilizado como solução irrigadora, cabendo a ele a função de remover o “smear layer” depositado nas paredes dentinárias.^{30, 129}

Somente o preparo bio-mecânico não é capaz de eliminar todas as bactérias como comprovaram Barnett et al., (1988);¹⁵ Assed et al., (1996);⁸ Vigil et al., (1997);¹⁴⁸ Abou-Rass & Bogen (1998),² Molander et al., (1998);⁸⁰ Soares (1999);¹²⁹ Sidney (1999);¹³³ daí lança-se mão de curativos de demora, que apresentam várias formulações. Atualmente os curativos de demora mais utilizados são as pastas à base de hidróxido de cálcio.^{4, 5, 6, 8, 13, 16, 17, 18, 22, 36, 39, 48, 51, 52, 57, 60, 67, 69, 70, 72, 87, 88, 89, 97, 111, 113, 125, 126, 130, 150, 156}

O hidróxido de cálcio apesar de ter seu uso na endodontia desde o início do século XX, somente a partir dos anos 80 é que suas propriedades biológicas e físico – químicas começaram a ser elucidadas.^{1, 4, 5, 6, 13, 16, 17, 18, 22, 30, 33, 34, 35, 44, 51, 52, 60, 67, 68, 72, 88, 111, 116, 121, 125, 126, 133, 150, 155.}

A escolha do hidróxido de cálcio como substância medicamentosa pela maioria dos endodontistas americanos foi comprovada por Itoh et al.,(1999).¹³³ O hidróxido de cálcio é uma base forte, capaz de desnaturar proteínas, dissolver material necrótico, liberar íons hidroxila alcalinizando o meio, causar hidrólise de lipopolissacarídeos bacterianos, competir com as bactérias anaeróbias na utilização do CO₂ ambiente, e induzir a mineralização dos tecidos apicais devido a liberação de íons de cálcio.^{13, 16, 25, 37, 44, 46, 48, 67, 68, 97, 116, 117, 155}

Em contato com os tecidos pulpare, apicais e periapicais, o hidróxido de cálcio causa inicialmente necrose

superficial do tecido.¹²⁰ No remanescente pulpar ou periapical vários produtos são sintetizados, destacando-se os derivados do ácido aracdônico, citocinas, H₂O₂, NO e outros.^{73, 105} Entre as citocinas encontram-se fatores de crescimento que interferem no processo de citodiferenciação, proliferação celular e a indução à síntese de matriz de tecidos mineralizados: osteóide, cementóide e dentinóide.⁷³ A fibronectina da matriz extra-celular local neste processo de síntese, exerce um papel determinante. Periféricamente às estruturas cristalizadas associados ao hidróxido de cálcio, há um favorecimento bioquímico para o aumento da deposição de fibronectina e de sais minerais, aumentando esse indutor de diferenciação mesenquimal dos odontoblastos.^{123, 143}

O hidróxido de cálcio para atuar sobre as bactérias, promovendo sua morte, precisa de ter contato, devido suas características físicas, um pó, a sua inserção no interior do canal torna-se difícil, daí a necessidade de adição de um veículo, que crie as condições para o preenchimento do canal, sem interferir nas propriedades físico químicas.^{17, 36, 41, 60, 69, 86} Este veículo deve favorecer a dissociação, para que haja a liberação de íons de Ca²⁺ e hidroxila.^{1, 4, 17, 30, 36, 67, 68} Possuir um bom escoamento, faz-se necessário para possibilitar o preenchimento do canal radicular em toda sua extensão (canais acessórios, recorrentes e colaterais).¹¹³

Vários veículos foram propostos, e dentre eles o óleo de oliva,³³ óleo de silicone,⁵¹ óleo de copaíba,¹² porém atualmente os mais aceitos são os veículos viscosos (glicerina e polietilenoglicol 400)^{4, 17, 18, 30, 33, 36, 52, 67, 68, 129} e aquosos.^{4, 13, 16, 30, 33, 34, 36, 37, 41, 48}

Dentre as várias propriedades do hidróxido de cálcio temos um elevado pH, em torno de 12. No que diz respeito ao pH, poucas espécies bacterianas sobrevivem em meio com pH menor que 2 e maior que 10, sendo que a maioria vive em meio neutro.(Zambon & Newman, 1997)¹⁵⁸ Existem bactérias que assumem forma inativa em pH desfavorável, porém com a normalização elas voltam às formas ativas.¹⁶

Na busca pelo controle da infecção do sistema de canais radiculares, além dos medicamentos a microbiota bacteriana tem sido alvo de exaustivos estudos, que tentam identificar qualquer aspecto que possa ser explorado visando a sua eliminação e neutralização de seus sub-produtos.^{5, 22, 53, 54, 64, 85, 86, 88, 90, 100, 102, 103, 104, 150, 156, 159}

Para Peters et al.,¹⁰² o insucesso depende do número de bactérias sobreviventes ao preparo biomecânico, por que não é possível a identificação de qual foi a extensão da remoção, e se as bactérias remanescentes possuem número suficiente para provocar alteração patológica.

Além da diversidade de microorganismos isolados dos canais infectados, para Horiba et al.,⁵³ a quantidade de

endotoxinas determina a sintomatologia, a presença ou não de áreas radiolúcidas, e sua presença foi constatada em 95% dos casos de presença de exsudato. Alencar⁵ encontrou em dentes de cães com necrose pulpar e lesão periapical crônica uma média de unidade formadora de colônias de $0,13 \times 10^5$ a $2,4 \times 10^5$. Para Nakane et al.,⁸⁶ $1 \mu\text{g/ml}$ de LPS (*Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Fusibacterium nucleatum*) não produz efeito sobre a síntese protéica e de DNA em células pulpares humanas, o que ocorre a partir de $10 \mu\text{g/ml}$. Nagoaka et al.,⁸⁴ constataram que $0,1 \mu\text{g/ml}$ de *Porphyromonas intermedia* foi suficiente para expressão de m-RNA para IL-8 em cultura de fibroblastos de polpa dental humana.

Dentre as bactérias isoladas nos canais radiculares quer preparados ou não, temos as *Pseudomonas aeruginosa*. As infecções por *Pseudomonas* também são associadas com remoção de molares inclusos, cirurgias orais em tecidos moles e ossos, sendo encontradas nos encanamentos dos centros cirúrgicos, consultórios odontológicos e instrumentais médicos.

Barnett et al.,¹⁵ relataram a presença de *P. aeruginosa* em um caso de insucesso no tratamento endodôntico. Para Siren et al.,¹²⁸ a presença de *P. aeruginosa* esta relacionada aos casos de canais radiculares que permanecem abertos durante o tratamento.

Vários autores tem comprovado a presença de *P. aeruginosa* nos casos de infecção do sistema de canais

radiculares, (Ranta et al., 1988;¹⁰⁹ Barbosa et al., 1997;¹³ Sidney)¹³³ mesmo nos casos onde já foi realizado o preparo biomecânico.

Por ser uma bactéria Gram-negativa, apresenta em sua constituição o LPS, que é responsável por sua virulência. O LPS consiste no lipídio A. Kumuda et al.,⁶⁴ analisaram a estrutura química do lipídio A de *P. gingivalis* e observaram que é composta por ácidos gráxos com 15 a 17 átomos de carbono, ligados a duas moléculas amino-açúcares (glicosaminas), à qual ligam-se dois radicais fosfatos, e a estes liga-se um resíduo de proteína. As posições dos radicais fosfato, assim como o número, tipo e sítio de ligações parecem determinar a patogenicidade dos diferentes lipopolissacarídeos.⁶⁴

As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa e outra interna, apresentando em sua composição química 20 a 25% de fosfolipídeos, 45 a 50% de proteínas e os 30% restantes de lipopolissacarídeos.^{11, 64}

As proteases produzidas pelas *P. aeruginosa*, são a elastina (protease neutra) e a protease alcalina, que desempenham papel importante na patogênese. A elastina cliva e inativa anticorpos de classe IgG e certos componentes do complemento, e a protease alcalina provoca necrose tecidual.¹⁵⁸

As *P. aeruginosa* produzem 2 hemolisinas e 3 potentes exotoxinas (A, B e C). Essas toxinas são letais quando injetadas em camundongos e cães e provocam choque

hipotensivo em macacos. A exotoxina A inibe granulócitos e células progenitoras de macrófagos na medula óssea.¹⁵⁸

Monoinfecções experimentais de canais radiculares mostram uma resposta periapical muito pequena e uma infecção de vida curta; somente *Pseudomonas* e *Enterococci* são capazes de viver como infecções de espécimes simples. (Ranta et al., 1988;¹⁰⁹ Stock et al., 1996)¹³²

Os sub-produtos oriundos do metabolismo bacteriano, ou o LPS proveniente das paredes de bactérias mortas vão difundir-se pela dentina e chegar a região periapical, promovendo além de destruição celular, estímulo às células de defesa. Devido aos estímulos, os macrófagos lançam ao meio produtos celulares pelo processo de regurgitação fagocitária.^{31, 142} Entre esses produtos têm-se a lisozima, citocinas (ex: IL-1, TNF- α), peroxidase, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e óxido nítrico (NO).^{65, 73, 105, 136}

É de suma importância a ação dos macrófagos na resposta imunológica, reação inflamatória e reparatória. O macrófago é considerado o principal responsável pela resposta imunológica devido a sua capacidade de síntese, de fagocitose e processamento antigênico. Devido a sua fácil obtenção, importância no processo inflamatório e de reparo, e elevada presença no peritônio, optamos pela escolha dos macrófagos peritoneais de camundongos como células alvo para análise da reação a estímulos.^{25, 65, 73, 105}

Para os macrófagos, desde que não comprometam a vitalidade celular, agressão / estímulo podem ser considerados sinônimos.^{31, 73, 123} Após estímulo / agressão os macrófagos liberam uma série de produtos, e dentre eles encontramos as citocinas, que também são produzidas por linfócitos, leucócitos células endoteliais e fibroblastos. Funcionam como reguladores das reações inflamatórias e imunes.(Rang et al., 1997)¹⁰⁷

As citocinas em geral são peptídeos ou glicoproteínas sintetizados e secretados, com peso molecular variando 6.000 a 60.000. São compostos extremamente potentes que atuam em concentrações de 10^{-10} a 10^{-5} mol/l na estimulação de células alvos, após interação específica entre ligante e receptor. Essa alta atividade específica tem facilitado a detecção de citocinas por bioensaios, mas sua produção em pouca quantidade tem impedido sua purificação. Todavia, a caracterização das citocinas tem progredido devido aos recentes avanços tecnológicos.(Agarwal et al., 1995)³

Dentre as citocinas o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), tem atividade quimiotática para macrófagos e neutrófilos, apresenta atividade citotóxica pela indução da produção de radicais de oxigênio e NO, ambos dotados de potente atividade antibacteriana, adjuvante na proliferação e diferenciação de células B humanas, atua em sinergia com a interleucina-1 (IL-1) na ativação osteoclastica, regulando o processo de reabsorção radicular (Rang et al., 1997)¹⁰⁷

O NO outro produto liberado pelos macrófagos, na atmosfera, é formado a partir do oxigênio e do nitrogênio durante tempestades e raios. Nos tecidos de espécies mamíferas como outras mais primitivas, ele é formado através de uma reação catalisada por enzimas entre o oxigênio molecular e a L-arginina.¹⁰⁷ O nitrogênio e o oxigênio são vizinhos da tabela periódica, e o NO tem várias propriedades em comum com o O₂.^{43, 107} Mais especificamente, ele se combina ao heme e a outros grupamentos de ferro-enxofre com grande afinidade. Isto é importante para muitas de suas propriedades biológicas, incluindo a ativação guanilato-ciclase e a inativação do NO pela hemoglobina. O NO possui um elétron não-pareado em sua órbita externa, isto é, ele é um radical livre.

O macrófago ao ser estimulado produz TNF- α que induz a produção de NO pelos próprios macrófagos. (Janeway & Traves⁵⁸ 1997, Rang et al., 1997)¹⁰⁷

Devido a agressão, estímulo ou stress causados por bactérias e seus sub-produtos, as células sofrem alterações morfológicas, degeneração ou morte celular, neste momento a liberação de mediadores químicos nos ajudará avaliar a citotoxicidade de componentes bacterianos (LPS), como também a efetividade de medicamentos na neutralização destes produtos tóxicos.

Revisão de Literatura

A revisão da literatura foi dividida em tópicos com a finalidade de abordar de forma dinâmica e objetiva, as substâncias, aspectos, mecanismos e fatores que possam interferir no tratamento endodôntico.

- Hidróxido de Cálcio
- Microorganismos (LPS)
- TNF- α
- Óxido Nítrico

Hidróxido de Cálcio

A presença da enzima adenosina trifosfatase relacionada ao íon de cálcio (ATPase Ca^{++}) em amostras de tecido obtidas de glândula submandibular, cérebro, fígado, baço, rín, músculo e polpa dentária de coelhos, foi avaliada por Abiko et al.,¹ em 1977. Após homogeneização e centrifugação de

frações mitocondriais, as frações microssomais foram avaliadas quanto a presença de ATPase Ca^{++} . Os autores verificaram alta atividade para a ATPase Ca^{++} nas amostras de baço e polpa dentária, em relação aos outros tecidos. Os dados sugerem que essa enzima tenha importante função no transporte de cálcio através das membranas, e tal função possa manter alguma correlação com a formação de tecido mineralizado.

O efeito do hidróxido de cálcio, óxido de zinco e eugenol e AH-26, sobre o afluxo de macrófagos e o índice de fusão destas células na formação de granulomas, foi estudado microscopicamente por Catanzaro-Guimarães & Percinoto²⁷ em 1984. Porções iguais dos cimentos foram introduzidos em tecido subcutâneo de ratos albinos pesando entre 200 e 250 gramas, que foram sacrificados após períodos de 4, 8, 12, 24, 30 e 40 dias. Após processamento histológico de rotina as peças foram coradas pelo método da Hematoxolína e Eosina (HE). Para macrófagos o óxido de zinco e eugenol foi bastante tóxico, reduzindo o índice de fusão, diminuindo assim a proporção de células multinucleares gigantes. O processo de fusão ou a capacidade de atrair fagócitos mononucleares não sofreu grande influência do hidróxido de cálcio, indicando que o mesmo tem pequeno efeito citotóxico para macrófagos.

Em 1985, Schröder¹²⁰ relatou que a resposta tecidual ao hidróxido de cálcio colocado sobre o tecido pulpar inicia-se por uma necrose superficial considerada leve, estimulando a

defesa, seguida da proliferação vascular e da migração de células inflamatórias, células mesenquimais e formação de colágeno. A seguir, ocorre a diferenciação dos odontoblastos e forma-se o tecido mineralizado com aparência de dentina, normalizando a função pulpar. A mineralização do colágeno inicia-se com calcificações distróficas tanto na zona de necrose, como pela degeneração das células dos tecidos adjacentes, levando a deposição de minerais no colágeno recentemente formado. A presença de íons de cálcio estimula a precipitação de carbonato de cálcio na área ferida, contribuindo possivelmente, para o processo de mineralização. A formação de tecido duro em contato com cimentos de hidróxido de cálcio indicou um menor grau de agressão química inicial, quando comparada àquela produzida pelo hidróxido de cálcio puro. As diferentes respostas dos tecidos aos vários cimentos de hidróxido de cálcio podem estar relacionadas com fatores como: diferença no pH e taxa de liberação de íons, cálcio e hidroxila. Outros componentes dos cimentos induzem diferentes reações químicas que podem inativar o hidróxido de cálcio ou serem nocivos aos tecidos.

A liberação de Ca^{++} e OH^- de materiais à base de hidróxido de cálcio pela extração de água foi investigada por Tagger et al.,¹³⁵ em 1988. Por meio do pH foi analisada a quantidade de OH^- , e a quantidade de Ca^{++} por um aparelho analisador de íons de cálcio. Os autores verificaram que o padrão de liberação de íons foi diferente e que as bases, Life e Dycal

continuam a alcalinizar o meio, mesmo depois que a liberação de íons de cálcio não podia ser mais detectada. A liberação de íons de cálcio pelo CRCS foi muito pequena, e discreta a alcalinização do meio durante todo o teste. O eugenol livre no CRCS pode capturar o cálcio, tornando-o pouco encontrado na forma iônica. Além de alcalinizar o meio o Sealapex continuou liberando grande quantidade de cálcio durante todo o período do teste.

Uma revisão abordando os propósitos pelos quais o hidróxido de cálcio tem sido utilizado na Odontologia desde o início do século XX, até os dias atuais, foi realizada por Foreman & Barnes⁴⁴ em 1990. Dentre as suas propriedades foram enfatizadas a capacidade de induzir mineralização, de destruir bactérias e dissolver material necrótico.

O efeito de soluções irrigadoras e de curativos de demora, em dentina bovina infectada experimentalmente com *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, foi avaliado por Ørstavik & Haapasalo⁹⁴ em 1990. Dos medicamentos testados o paramonoclorofenol canforado geralmente foi mais eficiente que o Calasept para todos os microorganismos, com exceção para a *Pseudomonas*, e entre os irrigantes testados o iodine potássio iodide foi mais eficiente que a clorexidina e o hipoclorito de sódio a 5,25 %, tendo o EDTA mostrado-se ineficaz. A presença smear layer diminuiu mas não eliminou o efeito dos medicamentos.

Em 1991, Seux et al.,¹²³ avaliaram a citodiferenciação em odontoblastóides das células de polpas dentárias humanas na presença de cimentos contendo hidróxido de cálcio. Os cimentos produziram microcristais de calcita pela reação com o meio de cultura suplementado com soro de bezerro. As células da polpa dentária aí presentes, aderiram-se e agregaram-se ao redor dos microcristais. A imunofluorescência e a marcação com ouro-imunomarcadores revelaram uma grande afinidade de moléculas de fibronectina presentes no soro pelos cristais de calcita. Após 4 semanas, as células apresentaram perfil típico de odontoblastos, como polarização nuclear, Complexo de Golgi tipicamente odontoblastóide, síntese de colágeno tipo I e acúmulo apical de actina e vimentina

Um estudo da liberação de íons de cálcio e do pH, de algumas pastas e cimentos à base de hidróxido de cálcio foi realizado por Leonardo et al.,⁶⁷ em 1992. Foram analisadas as pastas Calasept, Calen e Calen/PMCC e pasta aquosa de hidróxido de cálcio. Através de um pHmetro foram feitas leituras em períodos de 5 e 30 minutos, 1, 3, 24, 48 e 72 horas, 30 e 60 dias, e a determinação da liberação de íons de cálcio, foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica, em intervalos de 5 minutos, 72 horas, 7, 30 e 60 dias. As pastas Calen e Calen/PMCC apresentaram discreto aumento do pH médio até 24 horas, estabilizando-se a partir de então. A partir de 72 horas, o pH das pastas Calen, Calen/PMCC e Calasept se

eqüivaleram, evidenciando-se níveis elevados, quando comparados à pasta aquosa de hidróxido de cálcio. As pastas apresentaram valores de pH mais elevados em relação aos cimentos CRCS e Sealapex. Com relação ao nível de íons de cálcio, até o período de 30 dias, a pasta Calasept apresentou os níveis mais elevados de cálcio, que declinaram a partir de então, enquanto a pasta Calen apresentou valores ascendentes, por todo o período experimental, atingindo máxima liberação aos 60 dias. No grupo dos cimentos, o Sealapex apresentou melhor comportamento. Para os autores, a adição de substâncias ao hidróxido de cálcio, com a finalidade de facilitar sua aplicação clínica, podem alterar suas propriedades, contudo os veículos das pastas Calen e Calasept, que são o polietilenoglicol 400 e a água destilada, respectivamente, não comprometem a capacidade de ionização em solução aquosa.

Após a análise de treze diferentes formulações de pastas à base de hidróxido de cálcio, Leonardo et al.,⁷⁰ em 1993 chegou a seguinte formulação: 2,5 g de hidróxido de cálcio, 0,5 g de óxido de zinco, 0,005 g de colofônia e 1,75 ml de polietilenoglicol 400, que é uma substância viscosa, incolor e ligeiramente higroscópica.

Em 1993, Leonardo et al.,⁶⁸ avaliaram “in vitro”, a solubilidade, a dosagem de íons de Ca^{+2} e o pH do hidróxido de cálcio associado ao p-monoclorofenol canforado (PMCC) e p-monoclorofenol (PMC). A pasta Calen foi utilizada como fonte de

hidróxido de cálcio. A solubilidade, foi averiguada através do uso de espectrofotômetro no ultravioleta modelo DU-70 da Beckman Instruments. A análise da liberação de cálcio, foi feita utilizando-se método titulométrico-complexometria com sal etilenodiaminotetraacético de sódio (EDTA) e por espectrofotometria de absorção atômica. Para determinar o pH, utilizou-se o pHmetro da Metronal modelo E 120, acoplado a eletrodo combinado vidro-calomelano. Diante dos resultados os autores concluíram que: a) nas pastas à base de hidróxido de cálcio (Calen) associadas ao PMC, a adição de cânfora tornou-se desnecessária; b) a formação de p-monoclofenolato de cálcio tornou mais prolongada a ação bactericida da pasta Calen + PMC; c) a solubilidade do p-monoclorofenol em associação com a pasta Calen, não sofreu influência na ausência de cânfora; d) o pH foi semelhante nas três pastas analisadas, independente da presença do p-monoclorofenol; e) a liberação de íons de Ca^{+2} foi mais lenta nas pastas associadas ao p-monoclorofenol.

Um estudo da penetrabilidade de diferentes curativos de demora no sistema de canal radicular foi realizado por Leonardo et al.,⁶⁹ em 1993. Cinquenta incisivos centrais extraídos de humanos foram preparados, em seguida preenchidos com 5 diferentes curativos de demora, o PMCC, Calen, Calen com PMCC, Calen com PMC e pasta aquosa de hidróxido de cálcio, sendo que aos curativos foi adicionado um corante para possibilitar a leitura. Após o selamento das aberturas coronárias,

os dentes foram estocados sobre gases embebidas com água destilada em cubas de vidro, que após vedadas foram colocadas em uma estufa a 37°C. Após o período de sete dias os dentes foram seccionados longitudinalmente. Através de Projetor Profile Nikon, com um aumento de 20 vezes, realizou-se a mensuração da porção cervical e média, uma vez que a dentina na porção apical mostrou-se impermeável. Diante dos resultados os autores concluíram que o Calen com PMCC (média de 0,711 mm), Calen com PMC (média de 0,797 mm) e a pasta aquosa (média de 1,038 mm) foram os que apresentaram maior índice de difusão na massa dentinária, enquanto que o PMCC levado aos canais através de pontas de papel absorvente, foi o que apresentou os piores resultados (média de 0,148 mm).

Uma avaliação “*in vitro*” dos níveis de pH de diferentes regiões da raiz dentária foi realizada por Nerwich et al.,⁸⁹ em 1993. Doze dentes humanos foram preparados pela técnica “Step-back” e em seguida foram feitas cavidades nos terços cervical e apical, uma situada a uma distância de 1 mm do cemento e a outra a 0,5. Os dentes foram preenchidos com a pasta Calasept, selados, e armazenados cada um em 100 ml de solução salina isotônica não tamponada, para leituras em períodos de 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas, e aos 7, 21 e 28 dias. Os resultados mostraram que o pH da dentina na cavidade elevou-se rapidamente nas primeiras 6 horas, chegando 10,8 após as 24 horas. O pH da cavidade apical começou elevar-se no período de

6 a 12 horas, atingindo 9,5 após 2 semanas. O pH da dentina cervical começou elevar-se dos 3 aos 7 dias, atingindo valores superiores a 9 em duas semanas, alcançando estabilidade em torno de 9,3 em 3 semanas. No terço apical, o pH começou elevar-se após 24 horas, atingindo valores ligeiramente inferiores abaixo de 9 nas duas primeiras semanas, e permanecendo em torno de 9 na terceira semana. Os autores concluíram que os íons hidroxíla e cálcio difundem-se pela dentina, atingindo níveis diferentes dependendo da região e da espessura.

O efeito de hidróxido cálcio sobre o lipopolisacarídeo bacteriano (LPS) foi estudado por Safavi & Nichols¹¹⁶ em 1993, que teve como fonte de LPS a *Salmonella typhimurium*. A microbiota predominante nos casos de necrose pulpar é de bactérias Gram-negativas. Estas apresentam morfologicamente na sua parede celular os lipopolisacarídeos (LPS) responsáveis pela estimulação de síntese e liberação das principais citocinas ativadoras dos osteoclastos; desempenhando papel importante na reabsorção óssea periapical. Os LPS são liberados na lise e morte bacteriana. O tratamento do LPS com hidróxido de cálcio apresentou liberação de quantidades elevadas de ácidos graxos hidroxíde. Os resultados sugerem, segundo os autores, que a degradação do LPS mediada pelo hidróxido de cálcio é uma importante reação e um efeito benéfico obtido pelo seu uso na clínica endodôntica.

Estrela et al.,³⁵ em 1994, estudaram o efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. Para os autores, a tentativa de explicação do mecanismo de ação do pH no controle da atividade enzimática bacteriana, permitiu levantar a hipótese de uma inativação enzimática irreversível ou definitiva, em condições extremas de pH, em longos períodos de tempo. E também, uma inativação enzimática temporária, quando do retorno do pH ideal, à ação enzimática volta à sua atividade normal, ou seja, atuando de maneira reversível.

O preenchimento de canais radiculares simulados, com pastas de hidróxido de cálcio tendo como veículos água e glicerina, foi avaliado radiograficamente por Rivera & Williams¹¹³ em 1994. O preenchimento dos canais simulados com as pastas foi realizado com o auxílio de uma lentulo. Os resultados mostraram que o preenchimento tendo a glicerina como veículo foi superior nos terços cervical, médio e apical, sendo que no terço apical a densidade da água foi 0% enquanto a da glicerina foi de 50%.

A alteração da propriedade biológica do LPS bacteriano tratado com hidróxido de cálcio, em induzir a liberação de prostaglandina E2 em cultura de monócitos, foi avaliada por Safavi & Nichols¹¹⁷ em 1994. Culturas de monócitos foram estimuladas com LPS tratados com hidróxido de cálcio e não tratados, e em seguida o sobrenadante foi analisado através de espectrofotômetro. Os resultados mostraram que a PGE2 foi

identificada no sobrenadante das culturas de monócitos estimulados com LPS, enquanto que o LPS tratado com hidróxido de cálcio não estimulou a produção de PGE₂. Os autores concluíram que o hidróxido de cálcio altera as propriedades biológicas do LPS.

A presença de paramonoclorofenol e o efeito antibacteriano residual da associação Calen/paramonoclorofenol, em dentes de cães portadores de rações periapicais crônicas, foram avaliadas por Alencar⁵ em 1995. No início do experimento apresentavam uma média de unidade formadora de colônia de $0,13 \times 10^5$ a $2,4 \times 10^5$, e a incidência de bactérias anaeróbias de 64 a 96%. Nos períodos de 48 e 96 horas, 7 e 14 dias, a medicação intracanal foi removida e sua atividade antibacteriana testada, pela medição do halo de inibição do crescimento da cepa padrão *Micrococcus luteus* ATCC9341. Nos períodos de teste os valores médios dos halos de inibição foram 2,83; 10,0; 10,6 e 11,7 mm, respectivamente, demonstrando que o medicamento aplicado no canal radicular mantém por longo período a sua atividade antibacteriana.

Um estudo do efeito antimicrobiano de duas pastas de hidróxido de cálcio, uma associada ao soro fisiológico, e outra ao PMCC, sobre cultura de três bactérias aeróbias facultativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Streptococcus faecalis*, foi realizado por Estrela et al.,³⁷ em 1995. Os resultados demonstraram que as duas pastas de hidróxido de cálcio foram

efetivas sobre as bactérias analisadas, tanto em 24 como 48 horas, proporcionando diferentes halos de inibição de crescimento, sendo que a pasta de hidróxido de cálcio associada ao PMCC mostrou um maior halo de inibição do crescimento bacteriano, estatisticamente significativa.

A difusão dentinária de íons hidroxila de várias pastas de hidróxido de cálcio foi avaliada por Estrela et al.,³⁶ em 1995. Foram utilizados o polietilenoglicol 400, solução anestésica e a solução salina como veículos para a preparação das pastas. O pH da superfície de sessenta dentes foram avaliados em períodos de 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Diante dos resultados autores concluíram que o pH da superfície dos dentes onde as pastas tiveram como veículo solução salina e anestésica foi alterado aos 30 dias, enquanto que com o polietilenoglicol como veículo a alteração deu-se aos 45 dias, em todas as pastas o pH manteve-se estável até os 60 dias, e a presença ou ausência do cimento não influenciou no resultado.

A presença de fibronectina durante a resposta precoce da polpa dentária de cães à dentina desmineralizada ou cimento contendo hidróxido de cálcio foi analisada microscopicamente e sob imunofluorescência por Tziafas et al.,¹⁴³ em 1995. A adsorção de fibronectina foi verificada na dentina e no cimento, só que em menor quantidade no cimento. Os implantes de dentina e cimento apresentaram coloração positiva, a avaliação através da imunofluorescência. Os

resultados sugeriram que a fibronectina desempenha papel importante na dentinogênese após indução de células da polpa de dentina desmineralizada, somando-se a isso o envolvimento da fibronectina na resposta pulpar não específica frente a implantação de cimento à base de hidróxido de cálcio.

Os canais fechados possuem ambiente com baixo teor de oxigênio livre, favorecendo a presença de bactérias anaeróbias. Os debris e as bactérias presentes são difíceis de serem removidos. Yang et al.,¹⁵⁵ em 1995, avaliaram através da pesagem em uma balança de precisão, a ação dissolvente do hidróxido de cálcio, do hipoclorito de sódio e da água destilada sobre polpas bovinas, em condições de aerobiose e anaerobiose após um período de 7 dias. O hipoclorito reduziu (dissolveu) o tamanho do tecido na primeira e segunda hora, sendo que para o hidróxido de cálcio este efeito foi lento. Os autores concluíram que ambos os materiais independentemente da condição respiratória dissolvem parcialmente o tecido pulpar, atingindo níveis de dissolução em torno de 65 a 72%, enquanto a água destilada manteve-se num patamar de 29 a 37%.

A ação de antibióticos, hipoclorito de sódio a 1% e hidróxido de cálcio (água de cal) sobre duas linhagens de *Actinomyces israelii* (AH e L110B), foi estudada por Barnard et al.,¹⁴ em 1996. Este trabalho avaliou o controle microbiano intraradicular através do uso do hipoclorito de sódio a 1% ou o hidróxido de cálcio, e extraradicular por meio do emprego de

antibióticos (amoxicilina, ampicilina, clindamicina, eritromicina, kanamicina, metronidazol, estreptomicina e tetraciclina). Embora ambas linhagens bacterianas sobreviveram à 30 minutos de exposição ao hidróxido de cálcio, as mesmas não sobreviveram em 7 dias. Ambas foram mortas pela exposição por 1 minuto ao hipoclorito de sódio a 1%. Atestaram que as duas linhagens foram altamente susceptíveis à ação bactericida do hidróxido de cálcio e o hipoclorito de sódio 1%. Todas foram inibidas em baixas concentrações de antibióticos, contudo elevadas concentrações não foram bactericida por 1 semana, todavia, quando analisada a concentração sérica, em períodos de 2 a 6 semanas, estas mostraram-se letais.

Esberard et al.,³³ (1996) avaliaram a influência de diferentes tipos de pastas de hidróxido de cálcio na mudança do pH da superfície radicular. Cinquenta dentes humanos recém extraídos foram divididos em grupos diferentes, de acordo com a medicação intracanal utilizada. Foram testadas, pasta aquosa de hidróxido de cálcio, pasta viscosa de hidróxido de cálcio com e sem PMC, pasta oleosa de hidróxido de cálcio. O pH foi medido em cavidades dentinárias confeccionadas nos terços cervicais, médios e apicais, em períodos de 0 horas, 3, 7, 14, 21, 28, 45, 60, 90, 120 dias. Os resultados mostraram que a partir de 45 dias ocorre uma liberação constante de íons hidroxila em todas as pastas estudadas, e ao final de 120 dias a pasta aquosa apresentava um pH médio de 10.15, enquanto que as pastas

viscosas com e sem PMC indicaram índices de pH de 10.24 e 10.35 respectivamente, já a pasta oleosa mostrou um pH médio em torno 8.84 ao final de 120 dias.

A influência da exposição de seis pastas de hidróxido de cálcio ao gás carbônico foi estudada por Fuss et al.,⁴⁶ em 1996. Sessenta e dois dentes recém extraídos foram preparados até o diâmetro da lima 60. Após o preparo as superfícies vestibulares externas e as paredes dentinárias foram tratadas com ácido gel para desobstrução dos túbulos dentinários. Os dentes foram preenchidos com as pasta com auxílio de um condensador lateral e de uma broca lentulo, e estocados em frascos individuais contendo 10 ml de água destilada, por 30 dias, sendo um grupo exposto ao ar, à temperatura de 26⁰ C, e o outro condicionado em uma caixa com atmosfera de CO₂. As pastas também foram mantidas em contato com o ar e com o CO₂. Decorridos 30 dias o pH das pastas foi medido, junto com o líquido circundante. O pH inicial das pastas hidróxido de cálcio variou de 13 a 13,2. O pH das pastas deixadas nos canais expostos ao ar, mantiveram-se em torno de 13,1, enquanto aquelas expostas ao CO₂ mostraram significativa redução, em torno de 12,54. O pH do meio circundante exposto ao ar elevou-se de 7.4 para uma média de 8.47, enquanto que o meio exposto ao CO₂ reduziu de 7,4 para 6,65. O pH das pastas expostas ao ar e CO₂ foi de 12,93 e 7,53 respectivamente. Diante dos resultados

os autores concluíram que a alcalinidade do meio promovida pelo hidróxido de cálcio sofre grande influência da presença do CO₂.

Uma avaliação histopatológica dos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães após biopulpectomia e utilização de diferentes curativos de demora foi realizada por Leonardo et al.,⁷¹ em 1996. Foram avaliadas a pasta Calen, Calen+PMCC e Calen+PMC, tendo como controle negativo o Otosporin. Os resultados mostraram que a pasta Calen em todos os períodos e o Otosporin aos 7 dias apresentaram a melhor resposta tecidual, a adição do PMCC e PMC a pasta Calen propiciou uma maior capacidade de agressão aos tecidos em todos os períodos de tempo, sendo esta resposta mais acentuada na pasta contendo o PMC.

A resposta inflamatória induzida pela pasta à base de hidróxido de cálcio: Calen, Calen/PMC, Calen/PMCC e Calasept, foi avaliada por Nelson Filho⁸⁷ em 1996. Em tecido conjuntivo de 120 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, injetou-se 0,1 ml de suspensão das respectivas pastas, numa concentração de 10 mg/ml de PBS. Decorridos períodos de 6, 12, 24 horas e 2, 3, 5, 7 e 15 dias, obtiveram-se amostras histológicas que foram coradas pela hematoxilina/eosina e pela HE-like. No segundo experimento, foram utilizados 120 camundongos BALB/c, onde avaliou-se a migração de células para a cavidade peritoneal, após a injeção de 0,1 ml das referidas pastas, na concentração de 1 mg/ml de PBS. Verificou-se entre as pastas analisadas,

variabilidade na intensidade, duração e extensão dos eventos inflamatórios. A pasta Calen desencadeou intensa congestão vascular em 6 horas, com subsequente redução no período de 2 dias, à nível leve. Similarmente comportou o aspecto edematoso da reação. Os neutrófilos aumentaram em número no período de 6 a 12 horas, e diminuíram progressivamente nos períodos seguintes, não sendo mais observados aos 7 dias. As células mononucleares aumentaram em número no período de 6 a 12 horas, diminuindo posteriormente, principalmente, nos períodos de 7 e 15 dias. Aos 7 dias, notou-se formação de granuloma do tipo corpo estranho, o qual não foi mais visualizado aos 15 dias. Ocorreu necrose superficial extensa, que durou até as 24 horas, a qual não foi mais observada aos 2 dias. Para a pasta Calen/PMCC, a congestão vascular, o edema, e área de necrose, foram mais duradouros, comparativamente a pasta Calen, no entanto, o infiltrado mononuclear diminuiu gradativamente a partir das 12 horas. Para a pasta Calen/PMC registrou-se maior grau de irritabilidade em relação a pasta Calen/PMCC. No entanto, a resposta tecidual desenvolvida pela pasta Calasept, foi a mais agressiva, com processo de reparação menos evoluído. Todas as pastas induziram um aumento na migração de polimorfonucleares e mononucleares para a cavidade peritoneal, não sendo acusado diferença estatística significativa entre as mesmas. Todas as pastas analisadas, permitiram ao final do experimento o reparo, porém, em diferentes estágios de evolução.

O pH de pastas à base de hidróxido de cálcio, em diferentes veículos, foi avaliado por Peniche et al.,⁹⁷ em 1996. Meia grama de pó foi dissolvida em 0,4 ml de líquido para obtenção da pasta de hidróxido de cálcio na consistência semelhante a empregada na clínica. Em seguida as soluções foram diluídas em 30 ml de água destilada para o cálculo do pH através de um pHgâmetro Horiba Millivolt. Os veículos testados foram o cloridrato de prilocaína com felipressina, o cloridrato de lidocaína com fenilefrina, lauril sulfato de sódio, paramonoclorofenol canforado, propilenoglicol e soro fisiológico, em períodos de tempo de 1, 24 e 48 horas. Diante dos resultados os autores concluíram que embora os veículos possuíssem pH diferentes, uma vez associados ao hidróxido de cálcio, tiveram aumento da alcalinidade, mantendo-se em torno de 12 nos tempos do estudo.

Em 1996, Rehman et al.,¹¹¹ realizaram um estudo “in vitro” para determinar a duração da difusão de íons de cálcio contidos em cimentos obturadores. Oitenta e oito dentes foram divididos para o teste, em 4 grupos de 20, cada grupo foi preparado mantendo-se a patência apical, sendo que na metade foi confeccionado um defeito apical simulando uma reabsorção. Dois grupos foram obturados através da técnica da condensação lateral, e nos outros 2 grupos os canais foram preenchidos com os cimentos, os dentes foram armazenados a 37⁰C para avaliação da difusão em períodos de 1, 2 e 3 dias, e 1, 2, 3, 4 e

8 semanas. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística entre os cimentos, mas houve diferença entre os grupos onde foi feita a patência em comparação aos grupos onde foi confeccionada uma cavidade simulando uma reabsorção. Os autores concluíram que a liberação íons de cálcio aumentou até o último período do estudo, e os íons de cálcio difundiram-se pela dentina até a superfície do defeito apical, porém a difusão pelo ápice foi maior.

A atividade antibacteriana de medicamentos endodônticos sobre bactérias anaeróbias estritas foi avaliada por Siqueira et al.,¹²⁵ em 1996. Foram avaliados o paramonoclorofenol canforado (PMCC) na proporção 3,5:6,5, PMC aquoso a 2 %, PMC aquoso a 2 % associado ao Furacin, na proporção 5 g/28 ml, pasta de hidróxido de cálcio associada PMC aquoso a 2 % e pasta de hidróxido de cálcio em água destilada. As bactérias testadas foram *Porphyromonas endodontalis* (cepa BN1 1 a-f), *Porphyromonas gingivalis* (cepa W 50), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 10953), *Bacteróides fragilis* (ATCC 25285), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Propionibacterium acnes*, que foi isolado clinicamente. De acordo com os resultados os autores concluíram que:

a. O PMC canforado, o PMC associado ao furacin e a pasta de hidróxido de cálcio e PMC a 2 % apresentaram elevada atividade antibacteriana contra as bactérias anaeróbias estritas.

b. O PMC aquoso a 2 % apresentou baixa atividade antibacteriana, enquanto que a pasta de hidróxido de cálcio em água destilada foi ineficaz contra todas as espécies bacterianas testadas.

A atividade antimicrobiana de bases fortes e de pastas contendo diferentes proporções de hidróxido de cálcio, óxido de zinco e paramonoclorofenol canforado contra bactérias comumente associadas às infecções endodônticas, foi avaliada por Siqueira Jr. et al.,¹²⁶ em 1996. Como metodologia utilizou-se a difusão das medicações em culturas de bactérias em meio ágar. Os resultados mostraram que as bases solúveis utilizadas no estudo (NaOH e KOH), apresentaram efeito inibitório para todas as cepas, enquanto que o hidróxido de cálcio não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano. Das pastas testadas, quanto maior a adição de PMCC, maior o efeito antibacteriano. Com base nos resultados os autores concluíram que o hidróxido de cálcio serve como veículo para o PMCC, permitindo a lenta e gradual liberação de PMC suficiente para ter atividade antibacteriana e ser biocompatível.

Em 1997, Barbosa et al.,¹³ fizeram um estudo clínico e laboratorial da atividade antibacteriana, do hidróxido de cálcio, clorexidina e do paramonoclorofenol canforado. O estudo clínico foi realizado em 120 casos, através da cultura de microrganismos presentes após o preparo bio-mecânico. Constataram que após 7 dias o paramonoclorofenol canforado apresentou 69,2% de

culturas negativas contra 73,3% do hidróxido de cálcio, e 77,8% da clorexidina. Para o estudo laboratorial foi analisado o halo de inibição dos medicamentos, em culturas de bactérias isoladas dos canais radiculares e de bactérias comercializadas. As bactérias anaeróbias isoladas foram as *Propionibacterium acnes* e *Fusobacterium nucleatum*, e as *Porfiromonas endodontalis* (BN11a-f), *Porfiromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Actinomices israelii* (ATCC 12103) as adquiridas. Como bactérias aeróbias adquiridas foram utilizadas as *Actinomices naeslundii* (ATCC 19039), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Stafilococcus aureus* (ATCC 25923) e isoladas clinicamente os *Streptococcus mutans* e as *Pseudomonas aeruginosa*. A inibição provocada pelo paramonoclorofenol canforado foi a maior, sendo que o hidróxido de cálcio só apresentou halo de inibição contra as *A. israelii*, e *A. naeslundii*.

A liberação de íons hidroxíla de seis diferentes pastas à base de hidróxido de cálcio foi avaliada por Beltes et al.,¹⁷ em 1997. Alíquotas de 0,5 ml das pastas foram diluídos 20 ml de água destilada, para a mensuração do pH através de pHgâmetro (RE 357 Tx, EDT instruments), em períodos de ½, 1, 1½, 1¾, 2, 8, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Foram testadas as pastas Calasept, Calcicur, Calxyl blue, Calxyl red, Reogan rapid e Tempcanal. Os resultados mostraram que as pastas alcalinizavam o pH, a Reogan rapid, a Calxyl red e a Calcicur foram as pastas com maior poder de ionização, e que o pH final

tinha correlação com a quantidade de Ca(OH)_2 presente nas pastas.

Uma análise química da presença de carbonato de cálcio em vários tipos de hidróxido de cálcio comercializados, após 2 anos de estocados, foi realizada por Estrela et al.,³⁸ em 1997. A concentração de ions de carbonato foi determinada pela análise volumétrica de determinação feita visualmente usando metil laranja e fenolftaleína. Os resultados mostraram que houve uma transformação de hidróxido de cálcio em carbonato de cálcio em torno de $5 \pm 1 \%$ a $11 \pm 1\%$. A ordem crescente de transformação foi, Quimis $5 \pm 1\%$, JT Baker $6 \pm 1\%$, Calen $7 \pm 1\%$, Biodinâmica $9 \pm 1\%$, Inodon $11 \pm 1\%$.

Segura et al. (1997)¹²¹ estudaram o efeito do hidróxido de cálcio na capacidade de adesão dos macrófagos ao substrato na resposta inflamatória. Após estimulação os macrófagos eram recolhidos da cavidade abdominal de ratos Wistar e resuspensos em meio RPMI – 1640. A análise da capacidade de aderência ao substrato foi feita em tubos de Eppendorf após 15 minutos de incubação a 37°C , umidade atmosférica e 5% de CO_2 . Os resultados mostraram que o hidróxido de cálcio diminuiu a capacidade de aderência dos macrófagos ao substrato dependendo da dose e do tempo. Os autores concluíram que devido a influência do hidróxido de cálcio na adesão, último passo no processo de fagocitose, há uma redução da reação inflamatória dos tecidos periapicais, além

disso, este efeito é capaz de explicar a fase final da capacidade do hidróxido de cálcio em induzir a mineralização.

Um estudo visando avaliar o tempo de ação do curativo de demora à base de hidróxido de cálcio / PMCC, em dente de cães portadores de lesão periapical crônica induzida, foi realizado por Silveira (1997).¹²⁴ Foram utilizados 80 canais radiculares de 4 cães, para avaliação em períodos de 7, 15 e 30 dias. Após o processamento histológico, a análise dos resultados mostrou que aos 30 dias foram obtidos os melhores resultados da cultura microbiana, análise histopatológica e histomicrobiológica. Aos 7 dias, os resultados foram insatisfatórios e aos 15, intermediário, porém próximo do período de 30 dias.

A capacidade de difusão através da dentina humana de duas pastas a base de hidróxido de cálcio foi avaliada por Alaçam et al.,⁴ em 1998. Uma das pastas tinha como veículo água destilada, na proporção de 0,0536 g de hidróxido de cálcio por ml, e a outra glicerina na proporção de 0,0536 g por ml. A mensuração do pH foi feita em períodos de 1, 4, 7 e 12 dias. Os resultados mostraram que independentemente da espessura da dentina a associação de hidróxido cálcio + glicerina apresentou valores de pH mais elevados que o hidróxido de cálcio + água. Os autores de acordo com os resultados propuseram o uso do hidróxido de cálcio sempre associado à glicerina.

O efeito antimicrobiano residual da associação de hidróxido de cálcio (Calen) e paramonoclorofenol canforado, em

dentos humanos portadores de lesão periapical crônica, foi avaliado por Alencar⁶ em 1998. Os autores verificaram que todos os canais apresentaram bactérias anaeróbias facultativas, e que 7 dias após a remoção dos curativos de demora, utilizados em períodos de 7, 14 e 30 dias, apresentaram redução de ufc de bactérias da ordem de 97,8%; 98,5% e 99,75, respectivamente. Para os estreptococcus, os valores foram 98,8%; 99,5% e 99,5%. A Segunda amostra biológica nos grupos de 14 e 30 dias, forneceu 86,7% e 84,6% de anaeróbios facultativos. No final do experimento, apenas 52,3% dos canais apresentaram resultado negativo para anaeróbios obrigatórios. Com relação ao efeito antimicrobiano residual, não houve diferença significativa entre os períodos 7 e 14 dias, no entanto aos 30 dias observou-se maiores halos de inibição.

A influência das trocas de diferentes pastas à base de hidróxido de cálcio na alcalinização da superfície radicular de dentes humanos recém extraídos foi estudada por Costa³⁰ em 1998. Através de um pHgâmetro foram avaliados o pH de pastas com veículo aquoso (água bidestilada) ou viscoso (polietilenoglicol 400). As pastas com veículos viscosos, receberam como aditivo substâncias anti-sépticas: O paramonoclorofenol canforado ou tricresol formalina. As mensurações do pH foram feitas em períodos de 1 hora, 3, 7, 14, 21, 30, 60, 120 dias. Os resultados mostraram que os íons hidroxíla derivados das pastas de hidróxido de cálcio, difundem-

se através dos canalículos dentinários alcalinizando a superfície radicular. O autor concluiu que as pastas com hidróxido de cálcio p.a. + água e hidróxido de cálcio + veículo viscoso + paramonoclorofenol canforado (C+PMCC) apresentaram os melhores resultados.

Em 1998, Estrela et al.,³⁹ realizaram um estudo “in vitro” visando determinar o tempo requerido pelo hidróxido de cálcio quando em contato direto com os microrganismos, para expressar o efeito antimicrobiano. Os microrganismos utilizados foram: *Micrococcus luteus* (ATCC-9431), *Staphylococcus aureus* (ATCC-6538), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC-25586), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC- 27853), *Escherichia coli*, e *Streptococcus* sp. O efeito antimicrobiano foi avaliado isoladamente frente a cada microrganismo e quando associados. O estudo foi realizado em períodos de 0, 1, 2, 6, 12, 24, 48, 72 horas e 7 dias. Os resultados mostraram que após 12 horas o hidróxido de cálcio apresentou efeito antimicrobiano para *M. luteus* e *F. nucleatum*, no período de 24 horas foi efetivo contra *Streptococcus* sp. e *E. coli*, e em 72 horas para *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A associação II (*M. luteus* + *Streptococcus* sp + *S. aureus*) foi inativada após 48 horas, as associações I (*M. luteus* + *E. coli* + *P. aeruginosa*), III (*E. coli* + *P. aeruginosa*) e IV (*S. aureus* + *P. aeruginosa*) foram inativadas após 72 horas de exposição ao hidróxido de cálcio.

Uma revisão de literatura do efeito enzimático do hidróxido de cálcio sobre microrganismos e tecidos do hospedeiro, foi realizada por Estrela & Bammann³⁴ em 1999.

Diante da literatura presente os autores concluíram que:

1- É necessário avaliar melhor os métodos experimentais para que seja estudado o efeito antimicrobiano de substâncias com diferentes capacidades de dissociação e difusão.

2- O veículo acrescido às pastas de hidróxido de cálcio assume um papel coadjuvante, decorrente de suas características químicas, como a capacidade e velocidade de dissociação, difusão e preenchimento.

3- Baseado nas propriedades químicas, a melhor opção, como veículo a ser acrescido ao hidróxido de cálcio, é aquele com características hidrossolúveis, como a solução fisiológica ou a água destilada.

4- O hidróxido de cálcio apresenta duas expressivas propriedades, decorrentes do elevado pH, que são a inibição de enzimas microbianas, levando ao efeito antimicrobiano, e a de ativação de enzimas teciduais, gerando o efeito mineralizador.

A atividade antibacteriana do óleo essencial e da resina da *copaifera multijuga* (óleo de copaíba), associados ao óxido de zinco e ao hidróxido de cálcio foi avaliada por Bandeira et al.,¹² em 1999. As pastas foram testadas através do método de difusão em ágar, contendo *P. aeruginosa* e *S. mutans*. Diante dos

resultados, os autores concluíram que o óleo apresentou atividade bacteriostática e bactericida frente ao *S. mutans*, enquanto que a resina foi bactericida frente a este microorganismo. O hidróxido de cálcio, o óxido de zinco e o polietileno glicol 400 não apresentaram isoladamente atividade antibacteriana.

Berbert¹⁷ em 1999, realizou uma análise histopatológica do reparo apical e periapical pós-tratamento endodôntico de 78 dentes de 6 cães com reação periapical crônica induzida, em função do curativo de demora com Calen/PMCC ou Calasept, e da obturação do canal radicular com 2 cimentos, um à base de hidróxido de cálcio (Sealapex) e outro não. Após o preparo biomecânico os canais radiculares receberam as pastas de hidróxido de cálcio como curativo de demora por 30 dias. Decorridos 360 após a obturação dos canais radiculares os animais foram sacrificados e as peças submetidas ao processamento histopatológico. Os resultados mostraram que o Sealapex mostrou melhores resultados que o AH Plus. A pasta Calen/PMCC comportou-se ecleticamente bem com ambos cimentos obturadores, e pasta Calasept mostrou sugestivamente sinergismo com o Sealapex e antagonismo com o AH Plus.

Um estudo para de avaliar a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio em túbulos dentinários infectados por *Streptococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e *Pseudomonas*

aeruginosas (ATCC 27853), foi realizado por Estrela et al.,⁴⁰ em 1999. Sessenta e três dentes foram divididos em cinco grupos, preparados biomecânicamente, esterilizados, em seguida contaminados, e após 28 dias preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio, para avaliação em períodos de 0, 48 e 72 horas, e 7 dias. Os resultados mostraram a manutenção da viabilidade bacteriana em todos os períodos do estudo. Os autores concluíram que o hidróxido de cálcio não apresentou atividade antimicrobiana nos túbulos dentinários infectados, para as bactérias utilizadas no estudo *Streptococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e *Pseudomonas aeruginosas* (ATCC 27853), quer isoladamente ou quando associadas.

O efeito de diferentes veículos na propriedade antimicrobiana das pastas de hidróxido de cálcio, foi avaliado por Estrela et al.,⁴¹ em 1999. Para os autores os veículos hidrosolúveis (água destilada e solução salina) associados ao hidróxido de cálcio são a causa da característica química de dissociação. A capacidade de difusão e uma obturação compatível são decisivas para a ação biológica, antimicrobiana e a indução de tecido de reparação.

A citocompatibilidade do hidróxido de cálcio e dois cimentos, um à base de óxido de cálcio e outro à base de óxido de zinco e eugenol, foi avaliada por Guigand et al., (1999).⁵⁰ Culturas de fibroblastos de ratos (NIHT3T3) nas concentrações

de 8×10^4 , 2×10^4 e $0,5 \times 10^4$ foram avaliadas em períodos de 24, 48 e 168 horas através de 3 técnicas complementares: o teste colorimétrico de citotoxicidade, a microscopia eletrônica de varredura e a proliferação celular (flow cytometry). Os resultados obtidos no teste colorimétrico de citotoxicidade em leitor de ELISA contra filtro 570 nm, confirmaram a inicial ação citotóxica do cimento à base de óxido de zinco e eugenol, reduzindo em 90% a viabilidade celular após 72 horas, e promovendo a morte de todas as células após 168 horas. Em contato com o cimento à base de óxido de cálcio, os fibroblastos apresentaram 90% de viabilidade após 24 horas, 76% em 72 horas e 115% após 168 horas. O hidróxido de cálcio mostrou-se relativamente citocompatível, com manutenção da viabilidade celular em 97% após 24 horas, 83% em 72 horas e 108% ao final das 168 horas. Sob a luz da microscopia eletrônica de varredura, as células em contato com o cimento à base de óxido de zinco e eugenol mostraram-se menos densas, em comparação com o grupo controle e os outros materiais após 24 horas. Após 72 horas além da morfologia atípica, em contato com o cimento à base de óxido de zinco e eugenol as células apresentavam menor densidade, quando comparadas aos outros materiais e o grupo controle. Após 168 horas o pequeno número de células remanescentes, em contato com o cimento à base de óxido de zinco e eugenol apresentavam morfologia atípica, enquanto que nos outros grupos houve um aumento da densidade. Quanto ao teste da

Flow cytometry, as células em contato com o cimento à base de óxido de zinco e eugenol apresentaram-se em número insuficiente para avaliação, em comparação com o grupo controle e os outros materiais, em todos os períodos do experimento. Para os autores os testes “in vitro” apresentam as vantagens de podermos testar vários materiais ao mesmo tempo além da rigorosidade na reprodução dos mesmos, e considerando os resultados a utilização de compostos à base de hidróxido de cálcio na endodontia esta amplamente justificada.

Um estudo histomorfológico da reparação dos tecidos periapicais em dentes de cães após o emprego de 3 diferentes formulações de Ca(OH)_2 (Calen, Calen+Paramonoclorofenol canforado e Ca(OH)_2 + anestésico) como curativo de demora a curto prazo, 3 dias, foi realizado por Holland et al.,⁵² em 1999. Setenta raízes foram utilizadas neste estudo. Após o acesso coronário os dentes ficaram expostos ao meio bucal por 6 meses, para que houvesse contaminação e instalação de lesões periapicais. Em sessenta raízes foram realizados os preparos biomecânicos tendo como solução irrigadora o hipoclorito de sódio a 1%. Após a inundação com EDTA os canais foram novamente irrigados com hipoclorito de sódio, secos, preenchidos com os medicamentos e selados. Em 10 raízes não foram realizados tratamentos para servirem como o grupo de controle. Decorridos 3 dias, os curativos foram removidos e os canais obturados com cimento Sealapex e cones de guta-percha pela

técnica da condensação lateral. As aberturas coronárias foram seladas e após 180 dias os animais sacrificados, sendo então as peças removidas e encaminhadas para processamento histopatológico. Os resultados mostraram que para o grupo do Calen PMCC, 8 das 20 raízes exibiam reparo completo, caracterizado pela presença de cimento neoformado recobrimdo aquele preexistente, promovendo o selamento biológico dos forames apicais, os demais 12 espécimes exibiam características histomorfológicas compatíveis com a condição considerada em reparo, o ligamento periodontal exibia-se espessado, contudo, com dimensão bem menor que a do grupo controle, que foi considerado como insucesso. O grupo Calen apresentou 12 casos considerados de reparo, e em 8 o reparo foi considerado parcial, havendo a presença de infiltrado inflamatório do tipo crônico, o ligamento estava reconstituído em apenas alguns locais, tendo sido também parcial a reparação das áreas de reabsorção do cimento apical. Para o grupo Ca(OH)_2 + anestésido, 10 das 20 espécimes exibiam reparo completo, 8 exibiam reparo parcial, com presença de infiltrado inflamatório do tipo crônico de intensidade e extensão variadas, e em 2 devido as suas características histomorfológicas foram considerados reparo. Os autores concluíram que:

- 1- Não houve diferenças apreciáveis nos três grupos;

2- O acréscimo de PMCC ao Calen não determinou melhora nos resultados do tratamento;

3- O emprego do anestésico como veículo de hidróxido de cálcio não determinou melhores resultados do que os obtidos com o polietileno (Calen);

4- A média de reparo completo nos 3 grupos experimentais foi de 50%, enquanto, dos casos restantes, 46% exibiam sinais evidentes de estarem em reparação.

Em 1999, Itoh et al.,⁵⁷ apresentaram um questionário a 300 endodontistas membros da American Association of Endodontists, sobre o emprego de hidróxido de cálcio como curativo de demora, e obteve resposta de 85. Dos profissionais que responderam ao questionário, 91,7% confirmaram a utilização do hidróxido de cálcio, em 80% dos casos. O Formocresol foi utilizado por 28.2%, em 41% dos casos. Cinco profissionais informaram a utilização do Paramonoclorofenol canforado. Para a maioria dos endodontistas que participaram da pesquisa o preparo biomecânico é mais importante que o curativo de demora.

Um estudo *in vitro*, foi realizado por Leonardo et al.,⁷² em 1999, para verificação da atividade antimicrobiana de pastas empregadas na Endodontia, frente a sete cepas bacterianas relatadas na literatura como resistentes ao curativo de demora. Através da técnica de difusão em ágar pelo método de poço e cone de papel absorvente, foram avaliadas após um período de

24 horas as pastas, Calen, Calasept e Óxido de zinco e água frente a *M. luteus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *S. mutans*. Diante dos resultados, os autores concluíram que todas as pastas apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* sobre todas as cepas bacterianas utilizadas, sendo os menores halos de inibição observados sobre os microorganismos *E. faecalis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A pré-incubação do meio de cultura por um período de duas horas possivelmente permitiu a difusão das pastas pelo meio ágar, possibilitando a atividade antimicrobiana dos mesmos. A observação dos halos de inibição foi facilitada pela otimização do meio de cultura com gel ATT a 1%, qual permitiu a diferenciação entre o halo de difusão dos materiais e o de inibição do crescimento bacteriano.

Uma revisão da literatura sobre a ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio foi realizada por Siqueira Júnior & Lopes¹²⁷ em 1999. Para os autores as propriedades físico-químicas impõem limites para desinfecção em todo o sistema de canais radiculares, e a adição do mesmo não é efetiva contra as bactérias presentes. A adição de outros medicamentos aumenta a eficiência, elimina as bactérias que tenham permanecido após o preparo químico-mecânico.

Em 1999, Soares¹²⁹ realizou um estudo microbiológico dos canais radiculares, histológico e histomicrobiológico dos tecidos apicais e periapicais, em função do preparo bio-mecânico

e de dois curativos de demora à base de hidróxido de cálcio, utilizados em dois períodos de avaliação, no tratamento endodôntico de dentes de cães, com reação periapical crônica. A eficiência de 2 curativos de demora, o Calasept e o Calen/PMCC foi avaliada em 64 raízes de dentes pré-molares de cães em períodos de 15 e 30 dias. Não foi verificada diferença estatística significativa, entre a ação antimicrobiana dos curativos de demora. Sob o aspecto histopatológico, a pasta Calen/PMCC no período de 30 dias resultou em melhor quadro de reparação periapical, contudo, nos quatro grupos não observou-se significativa diferença no padrão de desinfecção do sistema de canais radiculares e região periapical.

A suscetibilidade da *Candida albicans* a quatro desinfetantes, e entre eles o hidróxido de cálcio, foi avaliada por Waltimo et al.,¹⁴⁹ em 1999. Os resultados mostraram que a *Candida albicans* foi altamente resistente ao hidróxido de cálcio, minutos. A combinação dos desinfetantes mostrou menor ou igual efetividade que o uso isolado. Os autores concluíram que o hidróxido de cálcio tem efetividade contra *C. albicans* em comparação ao hipoclorito de sódio, ao iodine, ao iodide potássio, e ao acetato de clorexidina, porém a associação do hidróxido ao hipoclorito de sódio e a clorexidina aumenta o espectro de ação antimicrobiana e com ação duradora.

Um estudo da ação do hidróxido de cálcio sobre várias espécies de *Candida* em comparação com *Enterococcus*

faecalis (ATCC 29212) foi realizado Waltimo et al.,¹⁵⁰ em 1999. Os resultados mostraram que a sensibilidade da cepa *C. albicans* é geralmente baixo, são requeridas 16 horas de incubação para matar 99.9% da formação de colônias. Não há diferença da cepa de *C. albicans* isolada do canal radicular da isolada do periodonto, e em comparação com *E. faecalis* a espécie *Candida* apresentou igual resistência frente ao hidróxido de cálcio. O estudo concluiu que a *Candida* sp são resistentes ao hidróxido de cálcio, in vitro, e isto explica o isolamento destas em casos de periodontites apicais persistentes.

Uma avaliação radiológica, histológica e histomicrobiológica do efeito da colocação ou não de três curativos à base de hidróxido de cálcio associados a anti-sépticos (Calen + Formocresol, Calen + PMCC + Formocresol e Calen + PMCC) em dentes de cães, com lesão periapical crônica induzida, por um período de preservação de 180 dias, foi realizado por Bonetti Filho²² em 2000. Após o processamento histopatológico os cortes foram corados por HE, tricrômico de Mallory e Brown & Brenn. Os resultados mostraram que os três curativos de demora, empregados nesse estudo, mostraram estatisticamente resultados histopatológicos semelhantes entre si. Na variável infiltrado inflamatório, ocorreu uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo sem curativo, o qual foi de grau intenso, e os demais grupos que receberam o curativo de demora, que foram predominantemente de grau suave. A

ordem decrescente da freqüência de microorganismos encontrados no sistema de canais radiculares e região periapical foram: lacunas cementárias, canais do delta apical, túbulos dentinários, interior do canal radicular, paredes dos canais radiculares e região periapical. O grupo sem curativo foi o único que apresentou microorganismos na região periapical, a intensidade da infecção nos túbulos dentinários ocorreu da seguinte forma: suave no grupo Calen + PMCC + Formocresol, suave / moderada no grupo Calen + PMCC, moderada no grupo Calen + Formocresol e severa no grupo sem curativo. A maior freqüência de microorganismos no sistema de canal radicular foi de cocos e bacilos Gram-positivos, seguida pelos filamentosos e bacilos e cocos Gram-negativos.

Uma avaliação histopatológica do efeito da endotoxina (LPS) tratada ou não com hidróxido de cálcio, sobre tecidos apicais e periapicais de dentes de cães, foi realizada por Nelson Filho⁸⁸ em 2000. Após abertura coronária e biopulpectomia, os cães tiveram 19 raízes preenchidas por LPS, 20 por LPS / hidróxido de cálcio, 10 por soro fisiológico, e em 10 foram induzidas lesões periapicais. Os resultados mostraram que a intensidade do infiltrado inflamatório, a espessura do ligamento periodontal e a presença de reabsorções cementárias, dentinárias e ósseas no grupo I (LPS) foram semelhantes ao grupo IV (lesão induzida experimentalmente), enquanto que no grupo II (LPS/hidróxido de cálcio) foram semelhantes ao grupo III

(soro fisiológico). O autor concluiu que a endotoxina bacteriana (LPS) ocasionou o desenvolvimento de reação periapical, e que o hidróxido de cálcio foi capaz de inativar os efeitos tóxicos da mesma, “in vivo”.

Em 2001, Han et al.,⁵¹ avaliaram “*in vitro*” a efetividade do hidróxido de cálcio em dois diferentes veículos (aquoso e óleo de silicone) sobre *Enterococcus faecalis*. Após um período de incubação de 3 semanas, sessenta e oito dentes humanos foram divididos em 4 grupos: a) grupo sem smear layer e com pasta de hidróxido de cálcio+água b) sem smear layer e pasta de hidróxido de cálcio+óleo de silicone, c) com smear layer e pasta de hidróxido de cálcio+água, d) com smear layer e pasta de hidróxido de cálcio+óleo de silicone. Os curativos foram colocados por 7 dias, e após a remoção dos curativos, fatias de dentinas foram coletadas e incubadas. A quantidade de bactérias presentes foi avaliada. Diante dos resultados os autores concluíram que apenas o grupo da pasta de hidróxido de cálcio+silicone sem a remoção do smear layer a medicação não foi efetiva sobre as bactérias.

Dos Microrganismos (LPS)

A quantidade de bactérias presentes canais radiculares de dentes desvitalizados, foi avaliada por Zavistoski et al.,¹⁵⁹ em 1980. Das amostras colhidas, em 10 canais radiculares houve crescimento bacteriano, o peso verificado foi de 0,10 a 8,69 mg. A média do número total de bactérias foi $10^{7.7 \pm 0.6}$ UFC/ml. Todas as amostras apresentavam várias espécies bacterianas, sendo encontrada uma média de 6 espécies. As bactérias anaeróbias representavam 63%, e 64% das espécies isoladas apresentavam concentração excedendo 10^5 UFC/ml.

O efeito de endotoxinas sobre a síntese de componentes de matriz de tecido conjuntivo por fibroblastos pulparem foi estudado por Pinero et al.,¹⁰³ em 1983. Fibroblastos pulparem bovinos e de humanos foram tratados com diversas concentrações de endotoxinas de *Escherichia coli*. Isótopos foram utilizados para medir a síntese de DNA, colágeno e glicosaminoglicanas sulfatadas ou não. Para os autores os resultados sugeriram que fibroblastos pulparem são capazes de responder ao estímulo promovido por baixos níveis de endotoxinas, com o aumento da divisão celular e o aumento da síntese da matriz de tecido conjuntivo.

Um estudo através de microscopia eletrônica e de luz, da microbiota presente no canal radicular e das lesões periapicais, foi realizado por Nair⁸⁵ em 1987. A análise foi realizada em 31 amostras colhidas em humanos, onde foram observadas a presença de cocos, bastonetes (gram-negativos), espiroquetas e formas filamentosas, e menos frequentemente observaram denso agregado de bactérias aderidas à parede do canal radicular, ou livres ao meio de vasto número de PMNs na luz dos canais radiculares. Esses agregados eram colônias monotípicas, apresentando um material amorfo intercelular. A microbiota endodôntica esta frequentemente justaposta a uma densa parede de PMNs, e menos frequentemente a uma barreira de tecido epitelial invaginado, densamente infiltrado por neutrófilos.

Em 1987, Matsumoto et al.,⁷⁸ avaliaram as causas que afetam o prognóstico e o sucesso do tratamento endodôntico. Foram avaliados clínica, radiográfica e microbiologicamente 85 dentes humanos. Para os autores a ausência de sinais e sintomas, e a redução da radiolucidez apical ou a completa reparação foi considerado como sucesso. Estatisticamente não houve diferença entre os dentes com cultura bacteriológica positiva (76,4%) e os com cultura negativa (73,3%). A ausência ou presença rarefação apical, bem como sua extensão, mostrou influenciar no reparo de acordo com os percentuais de sucesso encontrados: ausência – 87,9%; lesão igual ou menor que 5 mm –

76,9%; Lesão maior que 5 mm – 38,5%. Outros fatores também apresentaram influência sobre o reparo, como a presença de bolsa periodontal, o nível da obturação, oclusão traumática, o fato do dente ser pilar de prótese, e até mesmo a ausência de dente antagônico para que ocorra uma oclusão.

A monoinfecção do canal radicular por *Pseudomonas aeruginosa* foi estudada por Ranta et al.,¹⁰⁹ em 1987. O tratamento do canal radicular humano incluiu irrigação com etanol e curativo de demora, com o hidróxido de cálcio por um longo período além do preparo mecânico. Os resultados mostraram que a *Pseudomonas* resistiu a um pH de 10 por 7 dias, com pH 12 a sobrevivência foi de 5 minutos e com 12,5 o tempo foi menor que 5 minutos. Os autores concluíram que o sucesso para o tratamento da infecção com *Pseudomonas* vem um adequado preparo biomecânico e a utilização de medicação intra-canal.

Barnett et al.,¹⁵ em 1988, relataram um caso clínico de um paciente que apresentava lesão periapical refratária após tratamento endodôntico. Um estudo microbilógico da lesão e da fístula para identificação de microorganismos, revelou a presença de *Pseudomonas aeruginosa*. Testes mostraram que penicilina, tetraciclina e eritromicina foram ineficazes contra esta bactéria, sendo assim foi utilizada a terapia à base de ciprofloxacina. Diante do resultado os autores concluíram que o ciprofloxacina é um valioso agente no tratamento de periodontites apicais, e

provavelmente de outras infecções odontogênicas causadas por microorganismos aeróbios Gram-negativos.

A presença e os tipos de bactérias encontradas na dentina de oito dentes humanos infectados, foi avaliada por Ando & Hoshiro⁷ em 1990. Após a extração das unidades dentais, amostras de dentina foram colhidas e incubadas para possibilitar o cultivo e posterior identificação das bactérias. Os dentes forneceram mais que 10^2 ufc/mg de amostra, sob condições de anaerobiose (média de 1.2×10^2 a 4.1×10^7). Em sete casos, os microorganismos predominantes foram os anaeróbios, variando de 31 a 100%, com média de 88%. A presença de microorganismos anaeróbios obrigatórios foi de 80%, e anaeróbios facultativos de 20%. As bactérias predominantes foram os bacilos Gram-positivos (68%), cocos Gram-positivos (27%) e os Gram-negativos em menor grau. Os microorganismos anaeróbios obrigatórios predominantes foram os *Lactobacillus* (30%), *Streptococcus* (13%) e *Propionibacterium* (9%). Nenhuma espécie de bacilo Gram-negativo anaeróbio foi identificada.

A toxicidade do extrato de "*Bacteroides gingivalis*" frente a cultura de células L929 e de polpa humana, foi avaliada por Pissiotis & Spangberg¹⁰⁴ em 1991. As células foram tratadas com extrato sonificado de duas cepas de *Bacteroides*, a W83 e ATCC33277. As reações celulares foram avaliadas quanto ao crescimento, a síntese de DNA, e o crescimento celular avaliado através de microscopia ótica e eletrônica. Os resultados

mostraram que os extratos tiveram efeito inibitório sobre o crescimento celular. As células da polpa, foram mais sensíveis que as L929. O extrato ATCC33277 foi mais citotóxico que o W83, para ambas as células. Ao microscópio eletrônico os fibroblastos pulpaes mostraram - se marcadamente afilados, exibindo formas irregulares e numerosas fendas na superfície e entre as células. Para os autores a difusão de produtos bacterianos através da dentina pode atingir as células pulpaes e contribuir para a instalação de patologias pulpaes.

Blake et al.,²⁰ em 1992, fizeram avaliação bacteriológica e histológica de 58 lesões periapicais de dentes humanos. Dos 58 casos 51 apresentaram cultura positiva, sendo que em apenas 8 pode-se observar histologicamente a presença de bactérias. Dos 133 microorganismos isolados, 87 eram anaeróbios estritos, 37 eram facultativos e 9 aeróbios. As bactérias foram encontradas em granulomas periapicais, cistos radiculares e abscessos periapicais.

A velocidade de ativação do fator C3T do sistema complemento, frente aos lipopolissacarídeos de bactérias isoladas de canais radiculares humanos infectados, foi avaliada por Horiba et al.,⁵³ em 1992. Neste estudo foram utilizados eritrócitos humanos numa concentração de $1,5 \times 10^8$ células/ml. Aliquotas de 0,1 ml de solução contendo 1.000, 500, 100 e 10 μ g de extrato de lipopolissacarídico obtido de *Porphyromonas gingivalis*, *Veillonella parvulla* e *Fusobacterium nucleatum* foram

adicionados a 0,4 ml de soro humano leofilizado, numa concentração final de 100, 50, 1 μg de LPS. A endotoxina *Escherichia coli* foi usada como padrão e a solução salina serviu como controle negativo. De acordo com os resultados, a ativação do fator C3T foi maior que 60% e 70% quando 50 ou 100 μg de LPS das espécies bacterianas foram adicionados ao soro humano, não havendo diferença entre os vários lipopolisacarídeos. Esse comportamento dos diferentes LPS à luz dos conhecimentos atuais foi algo surpreendente, visto que essas substâncias não são idênticas, havendo relatos na literatura de que as respostas biológicas diferem em relação aos diferentes tipos de LPS. Consideram que essa similaridade de resposta observada deva-se a ativação do fator C3T pela porção antígeno-O do LPS de cada bactéria.

A correlação entre sinais e sintomas clínicos, como dor espontânea, dor à percussão, presença de exsudato e áreas radiolúcidas periapicais, foi avaliada Horiba et al.,⁵⁴ em 1992. Observou-se que as endotoxinas estavam presentes em todos os dentes sintomáticos e em 28,6% dos dentes assintomáticos, com diferença altamente significativa, uma vez que nos dentes com sintomatologia, a concentração de endotoxina foi de $8,7 \pm 4,7$ $\mu\text{g}/\text{ml}$, enquanto que nos dentes assintomáticos foi de $0,7 \pm 1,6$ $\mu\text{g}/\text{ml}$. Endotoxina foi detectada em 86,4% dos dentes com áreas radiolúcidas e somente em 12,5% dos dentes sem radiolucidez periapical, com diferença estatisticamente significativa. Em 95 %

dos dentes com presença de exsudato, detectou-se altos níveis de endotoxina, em comparação aos dentes sem exsudato.

A migração de *Streptococcus sanguis* através dos túbulos dentinários foi estudada por Perez et al.,¹⁰⁰ em 1993. *S. sanguis* (NCTC 7863) foram incubados por períodos de 10, 20 e 28 dias, em blocos de dentina bovina, tratados com EDTA a 17% por 10 minutos, e hipoclorito de sódio a 2,5%, também por 10 minutos. A avaliação foi feita através das microscopia ótica após a coloração pelo método Brow e Brenn, e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostraram que o *S. sanguis* penetrou nos túbulos dentinários (até 792 μm , aos 20 dias), e que a maturidade dos túbulos dentinários teve influência, e isto pode ser comprovado devido ao fato que nos túbulos maduros a penetração foi menor.

Em 1994, Yoshinuma et al.,¹⁵⁶ avaliaram a ação de endotoxinas obtidas de bolsas periodontais por meio de irrigação com solução salina e de endotoxinas adquiridas comercialmente, sobre células de carcinoma bucal (Ca9-22) e fibroblastos gengivais. Foram obtidas concentrações celulares de $5 \times 10^3/\text{ml}$, as quais adicionaram-se 5, 50 e 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de endotoxina. A contagem das células viáveis foi realizada 24 horas após a incubação, e constatou-se que as endotoxinas obtidas comercialmente numa concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ causaram uma diminuição significativa do número de células viáveis, porém numa concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a citotoxicidade das endotoxinas

obtidas das bolsas periodontais foi superior. Para os autores ambas endotoxinas apresentam citotoxicidade, e em graus diferentes, o que vem confirmar que o potencial tóxico do LPS é particular a cada tipo de bactéria.

Em 1995, Kumada et al.,⁶⁴ isolaram o lipídeo A do lipopolissacarídeo de *Porphyromonas gingivalis*, e sua estrutura química foi analisada através de análise composicional, espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear. Verificaram que esta parte da molécula é composta por ácidos graxos com 15 a 17 átomos de carbono, ligados a duas moléculas de amino-açúcares (glicosaminas), à qual se ligam dois radicais fosfato. Nesse último, liga-se um resíduo de proteína. Consideraram os autores que as posições dos radicais fosfato, assim como o número, tipo e sítio de ligação parecem determinar a patogenicidade dos diferentes lipopolissacarídeos.

O efeito do tratamento de células pulpares humanas com LPS de bactérias encontradas no canal radicular, foi estudado por Nakane et al.,⁸⁶ em 1995. Foram utilizados LPS de *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Fusobacterium nucleatum* sendo que o controle positivo foi feito com LPS de *Escherichia coli*. Foram avaliadas as sínteses, protéica, de DNA, e a produção de fosfatase alcalina, após o contato das células de dentes humanos com concentrações de 1, 10 e 100 µg/ml de LPS. Os resultados mostraram que na concentração de 1µg/ml os LPS não produziram efeito. O LPS de

E. coli na concentração 10 µg/ml aumentou a produção de DNA, aos 10 e 14 dias de teste, já a concentração de 100 µg/ml inibiu a síntese de DNA, as *P. gingivalis* na concentração de 10 µg/ml aumentou nos períodos de 3, 7 e 10 dias, na concentração de 100 µg/ml a ação foi inibitória aos 3 e 7 dias, as *P. endodontalis* na concentração de 100 µg/ml produziu inibição aos 3 e 7 dias, a *F. nucleatum* aos 3 e 7 dias apresentou acréscimo na concentração de 10 µg/ml, e decréscimo aos 3, 7 e 10 dias na concentração de 100 µg/ml. A *E. coli* inibiu a produção de proteína na concentração 10 µg/ml aos 3 e 7 dias, na concentração de 100 µg/ml ocorreu total inibição, a *P. gingivalis* promoveu o bloqueio aos 3, 7 e 10 dias na concentração de 100 µg/ml, *P. endodontalis* na concentração de 100 µg/ml promoveu o bloqueio em todos os períodos e o *F. nucleatum* inibiu a produção protéica aos 3, 7 e 10 dias na concentração de 100 µg/ml. A atividade da fosfatase alcalina não foi afetada nestas concentrações.

A capacidade de difusão de endotoxina bacteriana através da dentina humana foi estudada por Nissan et al.,⁹⁰ em 1995. Em cinco terceiros molares humanos foram preparadas cavidades (oclusal e pulpar) separadas por 0,5 mm de dentina. Após a remoção da camada residual e lavagem, aplicou-se 0,1 ml de solução contendo 100 µg/ml de endotoxina, extraída de *Actinobacillus actinomycetencomitans*. Nos períodos de 15 a 30

minutos e posteriormente a cada 30 minutos até completar 5 e 24 horas de difusão, o conteúdo era colhido na cavidade pulpar e, avaliado com relação à presença de endotoxina. Em uma amostra não detectou-se endotoxina na cavidade pulpar, durante 24 horas. Nas amostras restantes, o conteúdo de endotoxina continuou a difundir-se de forma variável para a cavidade pulpar, durante o experimento. Assim, em 2 amostras, observou-se um nível constante de fluxo, a partir de 4:30 e 5 horas, enquanto nas duas amostras restantes a concentração de endotoxina aumentou progressivamente. Os fatores responsáveis pela variação na permeabilidade foram o peso molecular da endotoxina, bem como sua capacidade de ligação à dentina, além dos fatores relacionados à dentina, como comprimento, diâmetro, densidade, direção, presença de depósitos nos túbulos dentinários, e a presença ou ausência de esclerose dentinária e dentina reparadora.

Um estudo da diferença da resistência a penetração bacteriana nos túbulos dentinários entre dentes com vitalidade e sem vitalidade foi realizado por Nagaoka et al.,⁸³ em 1995. Em 19 pacientes adultos do sexo masculino, que apresentavam terceiros molares bilateralmente, em um grupo foi realizada pulpectomia e no outro não. Em todos os dentes foram feitas cavidades classe V e deixadas abertas, sendo que em 8 pacientes foi feita avaliação após 30 dias e em 11 após 150 dias. Após a extração os dentes foram analisados histologicamente. Os resultados

mostraram que aos 30 dias houve uma maior invasão bacteriana no grupo de dentes onde não foi realizada a pulpectomia, porém não significativa estatisticamente, já no período de 150 dias a invasão bacteriana foi maior para o grupo de dentes pulpectomizados, sendo estatisticamente significativa esta diferença. Os autores concluíram que os dentes com vitalidade pulpar são muito mais resistentes a invasão dos túbulos pelas bactérias, e a polpa tem um papel importante neste processo.

Um questionamento da relevância e das conseqüências da presença de bactérias remanescentes ao preparo biomecânico, foi feito por Peters et al.,¹⁰² em 1995. Para os autores o insucesso depende do número de bactérias remanescentes ao preparo biomecânico, por que não é possível a identificação de qual foi a extensão da remoção, e se as bactérias remanescentes possuem número para provocar alteração patológica.

Um estudo com o objetivo de detectar através da técnica de imunofluorescência indireta e cultura, microorganismos anaeróbios, em canais radiculares de dentes humanos com lesão periapical crônica, e o efeito do curativo de demora com pasta à base de hidróxido de cálcio associado ao PMCC foi realizado por Assed et al.,⁸ em 1996. Os resultados apresentaram uma prevalência de 56% de *Actinomyces viscosus*, 48% para *Prevotella intermédia*, 40% para *Fusobacterium nucleatum* e 16 % para *Porphyromonas gingivalis*. O preparo

biomecânico resultou em 29,2% de culturas negativas, e o curativo de demora em 43,8% de culturas negativas para anaeróbios. A ação acumulativa do preparo biomecânico dos canais radiculares e o curativo de demora resultou em 57,1% de culturas negativas.

Uma avaliação da ação dos lipopolissacarídeos de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e do lípide A sintético de *Escherichia coli*, em promover a diferenciação osteoclástica *in vitro*, de células da medula óssea de camundongos C3HH-H e N reagentes e C3H/H e J não reagentes, foi realizado por Ito et al.,⁵⁶ em 1996. Os autores observaram que o LPS de *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *A. actinomycetemcomitans* estimularam as células C3H-He N, enquanto somente os LPS de *P. gingivalis* e *P. intermedia* induziram a proliferação de células C3H-H e J. O LPS de *A. actinomycetemcomitans* mostrou apenas efeito leve. As células C3H-H e N contendo 1,25 diidrovitamina D3 associada a Dexametasona, às quais foram adicionadas várias doses de LPS de todas as bactérias testadas, evidenciaram formação de grandes números de células multinucleadas, enquanto que nenhum LPS foi capaz de estimular células C3H-H e J a transformarem-se em osteoclastos. Verificaram ainda que a adição de polimixina B em doses de 5 a 10 µg/ml à cultura de células C3H-H e N, eliminou completamente o efeito promotor da diferenciação, sem causar qualquer efeito citotóxico.

Consideraram os autores que a capacidade de estimular a diferenciação osteoclástica pelos lipopolissacarídeos, possa ocorrer de forma direta sobre as células progenitoras dos osteoclastos ou através de mediadores solúveis, como as citocinas, e que esta propriedade do LPS seja mediada por uma estrutura comum na porção do lípide A, a qual pode apresentar componentes adicionais, conferindo-lhe efeito um particular.

A expressão de m-RNA para IL-8 por cultura de fibroblastos de polpa dental humana após a exposição a LPS de *Prevotella intermedia*, foi avaliada por Nagaoka et al.,⁸⁴ em 1996. A concentração de 0.1µg/ml de LPS de *P. intermedia* foi suficiente para expressão de m-RNA para IL-8 em cultura de fibroblastos pulpaes humanos. Os níveis de m-RNA IL-8 aumentaram após 2 horas, atingindo os níveis máximos entre 4 e 8 horas, declinando após 48 horas, permanecendo até 60 horas sem necessidade de uma nova estimulação. A produção de IL-8 por fibroblastos pulpaes ocorreu após a exposição a 10µg/ml de LPS de *P. intermedia*. Contrastando, a LPS de *Salmonella* e a lípide A sintética não aumentou a concentração de m-RNA para IL-8 em cultura de fibroblastos pulpaes humanos. Para os autores, os resultados sugeriram que os fibroblastos pulpaes são células imunoresponsáveis pela produção de IL-8 após a estimulação com LPS de *P. intermedia*.

Sydney¹³³ em 1996, realizou um estudo visando a identificação da presença de bactérias anaeróbias em canais

radiculares de dentes portadores de polpa necrótica e lesão periapical, sem comunicação com a cavidade oral, após o emprego ou não de medicação intracanal com pasta de hidróxido de cálcio em diferentes tempos. Os resultados mostraram que o hidróxido de cálcio promoveu redução de 77,8% na população microbiana após uma semana, e após o período de 6 semanas em apenas um caso, uma bactéria pode ser identificada, o *Enterococcus faecalis*. O autor concluiu ainda que para que ocorra a inativação total das bactérias é necessário a manutenção do curativo intra-canal por um período maior de que uma semana.

Em 1996, Sydney & Estrela¹³⁴ avaliaram ação de duas substâncias irrigadoras quanto a capacidade de eliminação de bactérias do interior de canais com necrose e lesão periapical. Após a colheita inicial, os canais foram alargados 4 limas acima da lima inicial, tendo como soluções irrigadoras o hipoclorito de sódio a 1% e a solução salina. Após o preparo do terceiro e do quarto instrumento era realizada nova colheita para verificação da presença ou não de bactérias. A utilização da solução salina como solução irrigadora reduziu em 50% o número de bactérias após o emprego do quarto instrumento. O emprego do hipoclorito a 1% apresentou redução significativa da presença bacteriana após o emprego do terceiro instrumento, porém não significativa em comparação ao quarto. As bactérias anaeróbias foram mais sensíveis ao preparo que anaeróbias, com maior incidência de

Peptostreptococcus prevoti e *Clostridium histolyticum*. Os autores concluíram que o preparo biomecânico não é capaz de eliminar todas as bactérias.

A relação entre os procedimentos clínicos no tratamento endodôntico e os achados bacteriológicos foi investigada por Siren et al., (1997).¹²⁸ O estudo foi dividido em grupos. No grupo 1 *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas sp* e outras bactérias entéricas facultativas foram identificadas, isoladamente ou associadas à outras bactérias, numa amostra de 40 dentes. O grupo 2, também composto por 40 dentes, apresentavam os canais radiculares livres de bactérias entéricas. No grupo das bactérias entéricas, *Enterococcus faecalis* apresentou maior prevalência, com percentual de 33% dos casos. As bactérias entéricas estão relacionadas aos canais radiculares que ficam expostos ao meio bucal durante o tratamento. Diante dos resultados os autores enfatizaram a importância do controle asséptico durante o tratamento endodôntico.

A identificação da sensibilidade de bactérias isoladas de lesões periapicais a antibióticos foi avaliada por Vigil et al., (1997).¹⁴⁸ Tecidos periapicais de 28 lesões refratárias foram submetidos a análise histológica e cultura microbiológica. Os resultados mostraram que os tecidos periapicais de 22 das 28 lesões continham microorganismos. Dentre as 55 diferentes espécies de bactérias 29 eram anaeróbios, 19 aeróbios facultativos e 5 aeróbios. Dentre os antibióticos testados a

Penicilina mostrou-se ineficaz contra as espécies de *Staphylococcus*, *Fusobacterium* e a *Klybisela pneumonie* e *Pseudomonas aeruginosas*. *Enterococcus* espécie, *Staphylococcus epidermidis* e *P. aeruginosas* foram resistentes a Cefoxitin (segunda geração de Cefalosporina), sendo que os dois últimos também foram resistentes a Cefotaxime (terceira geração das Cefalosporinas). Ao Metronidazol apresentaram resistência o *Peptostreptococcus micros*, *Propionibacterium acnes* e *Wolinella recta*. Foram resistentes a Tetraciclina o *Clostridium butyricum*, *Pseudomonas aeruginosas* e *Streptococcus viridans*. *Klybisele pneumoniae* e a espécie *Enterococcus* foram resistentes a Clindamicina. *Klybisela pneumoniae* e a *Pseudomonas aeruginosa* foram resistentes a Eritromicina.

Um estudo para a investigação de microorganismos de lesões periapicais fechadas previamente selecionadas e associadas com lesões refratárias e calcificações pulpares foi realizado por Abou-Rass & Bogen² em 1998. Foram selecionados 13 casos de pacientes que possuíam indicação cirúrgica, após estabelecimento de um critério para assegurar um completo isolamento clínico das lesões periapicais do meio oral e periodontal. Em todos os casos a amostra colhida do ápice mostrou 63,6% de anaeróbios estritos e 36,4% de anaeróbios facultativos. A prevalência de espécies isoladas foi de 31,8% de *Actinomyces sp.*, 22,7% de *Propionibacterium sp.*, 18,2% *Streptococcus sp.*, 13,6% *Staphylococcus sp.*, 4,6% *Porfiromonas*

gingivalis, 4,6% *Peptostreptococcus micros* e 4,6% de Gram-negativos entéricos. O resultado desta pesquisa mostrou que as lesões periapicais fechadas associadas dentes calcificados e lesões refratárias acolhem bactérias. Para os autores a inabilidade de erradicar os microorganismos durante o tratamento do canal radicular, juntamente com fatores anatômicos pode permitir a colonização de bactérias no ápice e tecidos periapicais e conseqüentemente promover a doença.

Em 1998, Molander et al.,⁸⁰ avaliaram microbiologicamente 120 dentes tratados endodonticamente, dos quais, 100 apresentavam sinais clínicos ou radiográficos de lesão periapical refratária, enquanto que, vinte dentes foram retratados por razões técnicas, como a má qualidade da obturação. Os dentes foram desobstruídos com brocas e limas, e em 21 casos utilizou-se também como solvente o clorofórmio. Após a colheita e análise microbilógica pode-se constatar a presença de microorganismos em 68% dos casos. Observaram que o emprego do clorofórmio reduziu significativamente a recuperação de microorganismos dos canais radiculares. Uma ou duas linhagens foram isoladas em 85% dos dentes com radiolucidez periapical, demonstrando claramente que, a microbiota dos canais radiculares dos dentes obturados, difere em quantidade e qualidade daquela encontrada nos dentes com necrose pulpar.

O efeito de estratos bacterianos sonicados (SBEs), extraídos de bactérias anaeróbias Gram-negativas, sobre cultura

de fibroblastos obtidos da região apical do ligamento periodontal de dentes humanos, foi investigado por Yamasaki et al.,¹⁵⁴ em 1998. O estudo foi realizado com diferentes concentrações de SBEs de *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *F. nucleatum*, em períodos de 3, 5 e 7 dias. Os resultados mostraram que o *F. nucleatum* inibiu significativamente o crescimento dos fibroblastos em todos os períodos de estudo, a *P. intermedia* não inibiu o crescimento dos fibroblastos em nenhum período de estudo, a *P. gingivalis* causou significativa inibição do crescimento nos períodos de 3 e 5 dias, e aos 7 dias promoveu uma ligeira inibição do crescimento. A *P. endodontalis* inibiu ligeiramente o crescimento em todos os períodos do estudo. O estudo concluiu que os extratos de *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *F. nucleatum* inibiram a proliferação de fibroblastos periapicais. O extrato de *P. intermedia* não inibiu o crescimento, e os das *P. gingivalis* e *F. nucleatum* inibiram o crescimento de fibroblastos mais que o da *P. endodontalis*. Para os autores os resultados sugeriram que *P. endodontalis*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum* possam ter papel importante na indução de lesões periapicais.

O efeito antimicrobiano do cimento obturador Endo-Fill foi avaliado por Görduysus⁴⁹ em 1999. O método de difusão em ágar foi utilizado como teste, tendo como bactérias alvo os *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Pseudomonas*

aeruginosa. Os resultados mostraram que o Endo-Fill não apresentou zonas de inibição de crescimento bacteriano. O autor concluiu que o cimento não possui ação bactericida e esta pode ser uma das causas de alguns insucessos.

Ribeiro¹¹⁴ em 1999, avaliou os aspectos morfológicos dos biofilmes microbianos na osteomielite crônica supurativa e correlações endodôntica e paraendodôntica. Após processamento histológico os cortes foram corados pelas técnicas da H.E. e de Brown e Brenn. Os resultados evidenciaram bactérias Gram-positivas e Gram-negativas nas superfícies ósseas, nos osteoplastos, nos canais de Havers e de Volkmann e nos tecidos moles adjacentes. O autor concluiu que nas osteomielites crônicas supurativas as bactérias envolvem todas as estruturas ósseas comprometidas organizando-se em colônias e em biofilmes microbianos, como estratégia de sobrevivência frente aos mecanismos de defesa do hospedeiro.

O efeito fungicida do hipoclorito de sódio e da clorexidina como soluções irrigadoras de canais radiculares, foi avaliado por Sen et al.,¹²² em 1999. Foram avaliadas a clorexidina a 0,12%, NaOCl a 1 e 5%. Secções radiculares foram preparadas e inoculadas com *Candida albicans*. Após 10 dias as secções radiculares foram tratadas com 3 ml de cada solução por 1, 5 e 30 minutos, e por 1 hora. Em seguida a secções radiculares foram incubadas a 37⁰ C por 24 horas. Os resultados mostraram que na presença de smear layer o efeito antifungicida

só ocorreu após 1 hora para todas as soluções, mas quando o smear layer foi removido o NaOCl apresentou atividade antifúngica após 30 minutos. Os autores concluíram que a efetividade antimicrobiana das soluções irrigantes devem ser reavaliadas, principalmente em pacientes com predisposição a candidíase.

Através da microscopia eletrônica foi realizado por Berkiten et al.,¹⁹ em 2000, um estudo da capacidade de penetração do *Streptococcus sanguis* e da *Prevotella intermedia* em túbulos de dentina humana. Foram incubadas por 20 dias o *S. sanguis* (NCTC 7853) e a *P. intermedia* (NCTC 93336). Os resultados mostraram que *S. sanguis* penetraram nos túbulos 382.3µm enquanto que a *P. intermedia* apenas 25.9µm. Para os autores a *P. intermedia* não penetrou nos túbulos dentinários e quando ocorreu a penetração foi de forma completamente limitada.

A persistência de exsudato intracanal foi usado como amostra para detecção de bactéria através do método da pré-cultura por Noda et al.,⁹¹ em 2000. Os autores também avaliaram a susceptibilidade das bactérias detectadas a antibióticos. As espécies comumente detectadas foram α -*Streptococcus* e *Enterococcus*. Os resultados para sensibilidade a antibióticos mostraram que o *Enterococcus* foi resistente especialmente às cefalosporinas. Para os autores nos casos tratamento

endodôntico prolongado, a prescrição de antibióticos específicos é muito importante para eficácia do tratamento.

Um modelo experimental para investigar a penetração de *Candida albicans* nos túbulos dentinários humanos, foi desenvolvido por Waltimo et al., (2000).¹⁵¹ O modelo consistia na inserção de um disco de dentina entre 2 cadinhos. Foram inoculados *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, na face do disco de dentina correspondente a pulpar, e em seguida processados histologicamente e corados pelo método de Brown & Brenn. Os resultados mostraram grande variação para a *C. albicans*, considerando que o *E. faecalis* penetrou na dentina após 1 a 5 dias de incubado. Para os autores o estudo demonstrou que a penetração pela dentina é um caminho para a infecção por *C. albicans*, sendo que em comparação com o *E. faecalis* mostrou-se limitada.

Em 2001, Peters et al.,¹⁰¹ avaliaram a viabilidade bacteriana em túbulos de dentina de dentes portadores de periodontite apical de pacientes oriundos de duas regiões diferentes (1-Amsterdã e 2-Glasgow). Dentina radicular de 20 dentes foi cultivada em 3 regiões diferentes entre a polpa e o cimento (A, B e C), enquanto 8 dentes foram examinados histologicamente. Utilizando técnicas de cultura, bactérias foram encontradas em 77% das amostras de dentina do grupo Amsterdã e em 87,5% do grupo de Glasgow. Numa distância maior na camada C, bactérias originadas da polpa foram encontradas em

62% das amostras de dentina. Vinte e três por cento do grupo e 25% do grupo 2 contendo ufc/mg menor que 50.000 da camada de dentina C. Em camadas próximas a polpa foram encontradas bactérias anaeróbias e bastonetes Gram⁺, assim como um maior número de espécies bacterianas. Cortes histológicos demonstraram a penetração de bactérias nos túbulos dentinários em 5 dos 8 dentes. Em outros 3 dentes, onde o aproveitamento de ufc/mg foi menor que 10.000, nenhum sinal histológico de penetração no túbulo foi vista. Para os autores ficou claro que em mais da metade dos canais infectados, bactérias estão presentes na profundidade da dentina próximo ao cimento e que culturas de anaeróbios na dentina é mais sensível que o estudo histológico para detectar essas bactérias.

Do TNF- α

A importância das citocinas na patogênese das lesões periapicais foi estudada em 1990 por Stashenko.¹³¹ Componentes bacterianos como LPS, induzem a produção de muitos mediadores polipeptídeos, ou citocinas, pelas células inflamatórias. Estas citocinas, que incluem interleucina-1 beta

(IL- β), interleucina-1 alfa (IL- α) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), derivados de macrófagos ativados, e uma linfotóxina (TNF- β), derivada de linfócitos T, têm se mostrado potentes estimuladores da reabsorção óssea e inibidores da reparação óssea *in vitro* e *in vivo*. A reabsorção óssea nas doenças inflamatórias tem sido atribuída a ação do fator ativador de osteoclasto (OAF). A maioria dos componentes do OAF foram purificados e verificou-se ser a IL-1 β responsável por 60% da atividade clástica na reabsorção óssea. A IL-1 α , TNF- α , TNF- β e interações sinérgicas entre esses mediadores, foram responsáveis pelos 40% restantes da reabsorção óssea.

Para Willicome et al.,¹⁵² em 1990, as alterações da superfície das células endoteliais em resposta às citocinas é de grande importância na regulação da migração celular e no desenvolvimento do processo inflamatório.

O impedimento da apoptose de monócitos humanos causada por LPS, TNF- α e IL-1 β , foi estudado por Mangan et al.,⁷⁷ em 1991. Os resultados deste trabalho indicam claramente que os monócitos morrem por apoptose quando cultivados sem estimulação. Quando adicionaram LPS de *E. coli*, que é um potente ativador de monócitos, mesmo em concentrações baixas causaram um aumento na sobrevivência dos monócitos. O mesmo foi observado para IL-1 β e TNF- α , sugerindo que a apoptose é regulada por certas citocinas. A regulação da apoptose pode ser

um importante mecanismo homeostático para controlar o número de monócitos capazes de responder à infecção, cura da ferida e crescimento tumoral.

A presença de células imunocompetentes (B, Th/i, Ts/c e macrófagos) na população celular de lesões periapicais, foi demonstrada imunohistologicamente usando cortes em parafina e a cryo-secção por Tani et al.,¹³⁷ em 1992. Foram avaliadas microscopicamente, trinta e quatro lesões periapicais de dentes humanos, que foram diagnosticados como granuloma radiculares (15), cistos radiculares (12) e reabsorções apicais (7). As produções de células T/B nos cistos radiculares, eram significativamente maior nos granulomas e reabsorções apicais. Nos granulomas radiculares, o número de células Th/i encontradas era maior que o de células Ts/c, porém não houve diferença significativa entre cisto radicular e a reabsorção apical. O número de macrófagos encontrados nos granulomas radiculares, era significativamente maior que nas outras lesões. Segundo os autores, os achados sugerem que o desenvolvimento da lesão periapical resulta da resposta imunológica celular imediata e humoral, e que as proporções de células imunocompetentes são diferentes nos distintos tipos de lesões periapicais.

Ao rever a literatura sobre o TNF, Vassalli¹⁴⁶ em 1992, observou que ele pode agir em células como um agente

protetor ou prejudicial, dependendo do sinergismo com outras citocinas, da quantidade liberada e do tempo de exposição.

O efeito da apoptose em monócitos humanos relacionado à doenças inflamatórias crônicas foi observado por Mangan et al.,⁷⁶ em 1993. Apoptose ou morte celular programada é uma forma fisiológica de suicídio celular que é profundamente influenciada pelo meio extracelular. A capacidade de induzir a apoptose seletivamente em leucócitos, parece ser um importante mecanismo fisiológico para controlar o acúmulo dessas células nas lesões inflamatórias. Monócitos humanos contribuem tanto para a persistência quanto para a resolução da inflamação crônica. Portanto ela pode ser inibida pela presença de produtos microbianos como o LPS, ou por certas citocinas pré-inflamatórias como IL-1 e TNF- α . A capacidade de regular terapêuticamente a apoptose dos monócitos parece ter alto valor na promoção da cura rápida ou redução da imunopatogênese da inflamação crônica.

Agarwal et al.,³ em 1995, avaliaram a liberação de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8 em cultura de monócitos humanos tratados com LPS de *Escherichia coli*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*. Os resultados mostraram que liberação de citocinas pelos monócitos ocorrem em doses diferentes a depender da origem e da quantidade de LPS.

A capacidade de células do ligamento periodontal em sintetizar citocinas em resposta ao LPS de microorganismos gram-negativos, foi observada por Quintero et al.,¹⁰⁶ em 1995. O tratamento das células do ligamento periodontal com TNF- α inibiram a expressão de células com características de osteoblastos. Em consequência desta mudança fenotípica induzida pelo TNF- α , as células do ligamento periodontal, tornaram-se LPS receptivas e, em resposta, sintetizaram várias citocinas pré-inflamatórias. Esta mudança de fenótipo ocorreu em concentrações de TNF- α que são freqüentemente observadas em exsudatos durante a inflamação periodontal. Portanto a TNF- α induziu mudanças fenotípicas que ocorrem com as células transitórias do ligamento periodontal, participando assim diretamente do processo da doença periodontal.

Tani-Ishii et al.,¹³⁸ em 1995 verificaram a relação entre citocinas responsáveis pela reabsorção óssea e a presença das possíveis células que as expressam. Citocinas relacionadas à reabsorção óssea, IL-1 e TNF, tem sido relacionadas na patogênese de muitas doenças inflamatórias crônicas, incluindo pulpites e periodontites apicais. Os autores identificaram células que expressam IL-1 α e TNF- α em polpas expostas infectadas e durante o desenvolvimento de lesões periapicais em ratos. Detectaram por imunohistoquímica, IL-1 α e TNF- α presentes no segundo dia tanto na exposição pulpar quanto na região periapical. O número destas citocinas aumentou no quarto dia na

polpa e depois do trigésimo no periápice. As células que expressam IL-1 α e TNF- α foram identificadas como macrófagos e fibroblastos com ocasionais marcadores para os leucócitos polimorfonucleares. Portanto, os achados demonstraram que as células que expressam essas citocinas (IL-1 α e TNF- α) estão presentes imediatamente após a exposição pulpar neste modelo de estudo, com forte hipótese delas serem os mediadores chave da patogênese pulpar e periapical, incluindo a destruição óssea.

Um estudo sobre a produção de IL-1 β e TNF- α por culturas monócitos tratados com L-Tiroxina(T4) e Tirocalcitonina(TCA), relacionados com a reabsorção radicular, foi realizado por Rossi et al.,¹¹⁵ em 1996. O objetivo deste estudo foi determinar se a T4 e a TCA influenciavam os monócitos na produção de IL-1 β e TNF- α , utilizando monócitos de um grupo de pacientes que estavam em tratamento ortodôntico e com severa reabsorção radicular. Nenhum hormônio induziu significativamente a liberação de TNF- α , ao contrário, o TCA teve um efeito inibitório não estimulando a liberação de TNF- α por monócitos. Esses dados sugerem que pacientes com reabsorção não diferem do controle em atenção aos parâmetros de citocina, e portanto, in vitro, os níveis de IL-1 β e TNF- α podem não distinguir as reabsorções.

Em 1997, Barthel et al.,¹⁶ avaliaram a liberação de TNF- α por monócitos após a exposição ao LPS de *Escherichia*

coli tratado previamente com hidróxido de cálcio. Os monócitos foram colhidos e centrifugados para obtenção de diferentes gradientes e com densidades específicas. Foram utilizadas quatro concentrações diferentes de LPS, em duplicata, sendo que em um grupo as quatro concentrações de LPS foram tratadas com 25 mg de hidróxido de cálcio. Os resultados mostraram que o LPS tratado com hidróxido de cálcio apresentou uma estimulação para produção de TNF- α em níveis basais, semelhantes ao grupo controle. Diante dos resultados os autores concluíram que os monócitos expostos a LPS de *E. coli* tratados com hidróxido de cálcio produzem TNF- α em níveis basais, e que o hidróxido de cálcio é capaz de neutralizar o LPS nos níveis utilizados no estudo.

Um estudo com a finalidade de verificar os níveis de citocinas IL-1 β , IL-1 α e TNF- α em polpas dentárias humanas inflamadas e lesões periapicais, para determinar a relação entre cada citocina e a patogênese pulpar e periapical foi realizado por Ko & Lim⁶¹ em 1997. As polpas utilizadas neste experimento foram obtidas na rotina de tratamento endodôntico, e as lesões periapicais nas cirurgias pararendodônticas. As polpas foram divididas em 4 grupos: polpa normal, pulpíte aguda, pulpíte crônica e lesão periapical. As amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido. As citocinas foram mensuradas pelo leitor de ELISA. As concentrações de IL-1 α foram maiores no grupo das lesões periapicais do que no grupo da pulpíte aguda, sendo neste

grupo maior do que o da pulpíte crônica. As concentrações de IL-1 β foram similares em todos os grupos, porém todas foram maiores estatisticamente que o grupo controle. As concentrações de TNF- α nos grupos controle da pulpíte aguda e crônica foram maiores do que no grupo das lesões periapicais, porém todas foram estatisticamente significativas para o grupo controle. Estes resultados sugerem que a concentração de cada citocina aumenta com o avanço da doença pulpar, e a IL-1 α pode exercer a mais importante função na progressão das doenças periapicais do que nas doenças pulpares, e o TNF- α nas doenças pulpares do que nas doenças periapicais.

Perala et al.,⁹⁸ em 1997 realizaram estudo com a finalidade de avaliar os implantes dentários, quanto a estimulação de células mononucleares a produzirem IL-1 β e TNF- α , uma vez que a produção destas citocinas pode levar a perda óssea. Implantes foram incubados em culturas de macrófagos e a liberação de citocinas medida por técnica de radioimunoensaio. Todos os tipos de implantes induziram a liberação IL-1 β e TNF- α , porém sem diferenças estatisticamente significante. Segundo os autores a IL-1 é uma citocina produzida também por monócitos e macrófagos, a qual provavelmente atua mediando alterações imunológicas, endócrinas, associadas à infecção microbiana, agressão tecidual, processos inflamatórios e reabsorções ósseas. Os estímulos para a produção de IL-1 incluem microorganismos,

LPS, complexo antígeno-anticorpo, corpos estranhos e outras citocinas.

A secreção de IL-1 β , TNF α , IL-8 e IL-1 por leucócitos humanos em resposta ao LPS de bactérias da doença periodontal foi estudado por Yoshimura et al.,¹⁵⁷ em 1997. Os leucócitos são as primeiras células de defesa a migrarem para o tecido periodontal em resposta aos patógenos. Foi recentemente demonstrado que leucócitos PMN possuem a habilidade de sintetizar e liberar citocinas seguindo uma apropriada estimulação. No momento, não é claro se esta capacidade está diretamente relacionada ao processo de destruição periodontal, foi então estudada a quantidade de citocinas (IL-1 β , TNF α , IL-8 e IL-1), receptor antagonista (IL-1ra) secretados por PMN sadios e seguidos a estimulação com LPS por 4 bactérias que causam a Periodontite: *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga ochracea* e *Fusobacterium nucleatum*, e bactéria não oral *Escherichia coli*. Os diferentes níveis de secreção destas citocinas e suas atividades biológicas induzidas por vários tipos de LPS podem ser importantes no início e na progressão da doença periodontal.

Em 1998, Assuma et al.,⁹ verificaram a inibição da resposta inflamatória e da perda óssea na periodontite experimental através dos antagonistas da IL-1 e do TNF. Sabe-se que a doença periodontal é a maior causa da perda dos dentes em humanos e, na maioria das vezes, associada com perda

óssea, incluindo a osteoporose. A destruição periodontal é iniciada pela colonização bacteriana na superfície dentária, iniciando a inflamação e a reabsorção óssea. Para avaliar o papel da IL-1 e do TNF neste processo, estudos foram conduzidos em macacos para desenvolver a periodontite experimental. Receptores solúveis que bloqueiam a função para IL-1 e TNF foram aplicados por meio de injeção local nos sítios da doença periodontal induzida para comparar com outros sítios onde injetaram apenas o veículo. Os resultados indicaram que a injeção de receptores solúveis para IL-1 e TNF inibiram em aproximadamente 80% o recrutamento de células inflamatórias nas proximidades do osso. A formação de osteoclasto foi reduzida em 67% comparada ao grupo controle. E a perda óssea reduzida em 60%. Estes achados indicam que o componente significativo do processo patológico da periodontite é devido a atividade da IL-1 e TNF.

Em 1998, Galbraith et al.,⁴⁷ verificaram que o TNF α uma citocina pré-inflamatória que parece participar do desenvolvimento e da patogenia da doença periodontal. A produção de TNF α é regulada por alguns fatores, incluindo certamente o fator genético. No presente estudo, os autores sugeriram, frente aos resultados obtidos entre os genótipos testados, que o genótipo do TNF é um fator de risco para a severidade da doença periodontal em adultos.

O papel das citocinas na produção da matriz metaloproteinase por células da polpa humana foi estudado por O'boskey & Panagakos⁹³ em 1998. Elevados níveis destas proteínas tem sido encontrados em conhecidas área com resposta inflamatória devido a infecção bacteriana ou pela presença de patógenos, como os encontrados no espaço do sulco gengival na doença periodontal. IL-1 e TNF α tem estimulado a síntese e secreção de enzimas proteolíticas - especialmente plasminigênio e matriz metaloproteinase (MMP) destruindo a matriz extracelular (ME) – assim a regulação da síntese de proteínas que são essenciais para a formação da ME, como o colágeno e a foosfatase alcalina. Células tratadas com essas citocinas mostraram alterações do ritmo de proliferação, diferenciação e síntese e secreção de proteínas formadoras de matriz. Este estudo mostrou estas citocinas estimulam a produção de elevados níveis de MMP pelas células da polpa humana em cultura de longa duração e que estas MMP podem desempenhar uma função crítica na patogênese da inflamação pulpar. Durante os estágios crônicos da inflamação pulpar, elevados níveis de citocinas tem o potencial de estimular a secreção pelas células da polpa da MMP, a qual pode destruir a ME presente na cavidade pulpar. Esta MMP tem também o potencial de degradar síntese da pré-dentina, impedindo sua mineralização e inibindo o processo de formação de dentina reacional.

Ransjö et al.,¹⁰⁸ em 1998, realizaram um estudo sobre a bradicinina e trombina que sinergisticamente potencializaram a IL-1 e o TNF na biossíntese prostanóide induzida em fibroblastos pulpare de dentes humanos.

Em 1999, Kobayashi et al.,⁶² estudando a produção intracelular de IL-1 α de fibroblastos gengivais humanos em resposta a várias citocinas, verificaram que citocinas pré-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α , podem induzir bioatividade intracelular da produção de IL-1 α em fibroblastos gengivais humanos, e que esta produção pode ser modulada diferentemente pelas citocinas derivadas de linfócitos T, como o interferon gama (IFN- γ) ou IL-4.

Tani-Ishii et al.,¹³⁹ em 1999 estudaram *in vitro* o papel da IL-1 α e TNF- α em cultura de osso medular de ratos e colônias de osteoclastos formados, e observaram a estimulação osteoclástica e reabsorção óssea mediadas por estas citocinas. São mediadores da resposta inflamatória sistêmica e local e podem agir na indução local de osteólise como foi observado adjacente à sítios inflamados.

A liberação de TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos na presença de cimentos endodônticos em diferentes concentrações, 25 mg/ml, 50 mg/ml e 100 mg/ml foi avaliada por Perasi,⁹⁹ em 2000. Foram testados o Sealapex, Endomethasone e seus respectivos componentes. Os resultados mostraram que o hidróxido de cálcio não liberou ou

liberou baixas unidades de TNF- α , já o óxido de zinco e eugenol estimulou a liberação de altas quantidades.

O efeito de um componente muramyl dipeptídeo (MDP) da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas sobre liberação de citocinas por monócitos, foi avaliado por Safavi et al.,¹¹⁸ em 2000. Culturas de monócitos humanos foram tratados com MDP ou LPS de *Salmonella typhimurium*, e os níveis de interleucina 1 β e TNF α colhido do sobrenadante foram estimados. Os resultados mostraram que o MDP e o LPS estimularam a liberação de citocinas, porém o efeito do MDP foi significativamente menor que o do LPS.

Um estudo para identificar o mecanismo molecular pelo qual a TNF- α inibe a formação óssea usando um sistema de células pré-odontoblásticas, caracterizadas como MC3T3-E1 foi realizado por Ouyang et al.,⁹⁵ em 2001. Quando induzido pelo ácido ascórbico (AA) as células MC3T3-E1 se diferenciam em odontoblastos e expressam vários marcadores de gene odontoblasto específicos, incluindo osteocalcin (OCN) e sialoproteína óssea (BPS). Para determinar se o TNF inibe a formação óssea, células MC3T3-E1 foram pré-induzidas com AA e subsequentemente tratadas com e sem TNF por 0,4,8 e 24 horas. A expressão do gene OCN e BSP foi dramaticamente reprimida pelo TNF como revelado pela análise de northern blot. O TNF também induziu a formação de nódulos minerais pelas células MC3T3-E1 como detectado pela coloração de Van Korsa.

Além disso o TNF inibiu a expressão do gene e síntese de proteína em fator de transcrição específica de osteoblasto 2 (Osf2) um grande regulador da formação óssea. Esses resultados demonstraram que o mecanismo molecular pelo qual TNF inibe a formação do osso periapical, incluindo a regulação negativa da expressão de Osf2 assim como outras proteínas específicas, tais como BSP e OCN.

Em 2001, Ueda & Matsushima¹⁴⁴ examinaram o efeito do TNF- α sobre ativador de plasminogênio e sobre células da polpa dental humana. O tratamento com TNF- α induziu a um nível significativamente alto de atividade de ativador de plasminogênio em meio de células da polpa dental humana, em um método dependente da dose e do tempo, quando comparado com células controle sem tratamento. Análise com Western-blot revelaram que o tipo de tecido proteína em meio condicionada foi aumentado pelo TNF- α quando comparado com meio controle. Além disso o nível de tecido ativador de plasminogênio RNA mensageiro aumentou em células da polpa humana tratadas com TNF- α . O efeito do TNF- α contra matriz de metaloproteinase foi avaliado através de um zimográfico. O TNF- α estimulou a atividade da metaloproteinase 9 em meio limitado e estimulou a atividade de metaloproteinase com adição de plasminogênio. Os resultados sugeriram segundo os autores, que o TNF- α estimula atividade de ativador de plasminogênio pelo aumento da

expressão do gene de tecido proteína em células da polpa dental e a atividade da metaloproteinase 2, e favoreceu que o tecido proteína ativado pelo TNF- α estimulou a metaloproteinase-9.

Do Óxido Nítrico

A liberação de óxido nítrico (NO) ocorrida pela atividade biológica, e a ação do fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), foi estudada por Palmer et al.,⁹⁶ em 1987. O relaxamento produzido pelo EDRF é indistinguível do produzido pelo NO. De acordo com os autores os resultados sugeriram que o EDRF e o NO são semelhantes.

Em 1991, Moncada et al.,⁸¹ fizeram uma revisão sobre o óxido nítrico abordando seus aspectos fisiológicos, patofisiológicos e farmacológicos. A liberação fisiológica de NO depende da estimulação de uma enzima cálcio dependente a L-arginina. A enzima responsável pela catalização da conversão do NO é a NO-sintetase (NOS). Sua liberação pode ser inibida pela L-canavanino, L-NMMA (L-N monometil-argenina), L-NIO (N-iminoetil-ornitina), L-NAMME (L-N monometil-argenina). N^G-amino-L-argenina. Tem ações farmacológicas como relaxante vascular, inibidor da agregação plaquetária e citoprotetor. Pode

ser liberado por macrófagos como parte do metabolismo antimicrobiano. A ativação macrofágica frente a L-arginina produz síntese de L-citrulina e NO_2^- e a presença de L-NMMA previne a síntese destes produtos que têm expressão citotóxica. O LPS em combinação com o $\text{IFN-}\gamma$ são ativadores macrofágicos. A produção de NO, que é um gás solúvel de radical livre, ocorre também nos neutrófilos, células endoteliais e neurônios centrais específicos. L-NAME um potente inibidor da síntese endotelial do NO não tem ação neutrofílica, e a estimulação para a síntese ocorra frente aos leucotrienos B4 e FMLP.

Em 1993, Teixeira et al.,¹⁴⁰ estudaram o papel das prostaglandinas e do óxido nítrico (NO) na reação inflamatória aguda em tecido intradérmico de porcos da Índia. A administração de um inibidor da síntese de NO, N^G -nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME) dependendo da dose, inibiu a formação de edema, que foi induzido em resposta a injeção intradérmica de bradicinina. A inibição através da L-NAME da indução da formação de edema pela bradicinina, é o efeito oposto, ao nitroprusside de sódio (SNP) ou prostaglandina E1 (PGE1). Os resultados mostraram que a liberação de NO inibe o acúmulo de leucócitos e a formação de edema, e é induzida através de diferentes mediadores da inflamação. A administração de L-NAME também causou diminuição local do aporte sangüíneo, os autores sugeriram que este é o mecanismo que exerce efeito antiinflamatório neste modelo.

Um estudo para determinar o papel dos compostos intermediários do Nitrogênio nas infecções por *Trypanossoma cruzi* foi realizado por Vespa et al.,¹⁴⁷ em 1994. Foram utilizados ratos de linhagem C57BL/6 e BALB/c. Os resultados mostraram que no tratamento dos C57BL/6 quando a síntese de NO foi inibida houve aumento da parasitemia e mortalidade. Finalmente concluiu-se que o S-nitroso-acetyl-penicillamine é capaz de matar o *Trypanossoma* “in vitro” na presença de outras células, sugerindo que o mediador NO mata *T. cruzi*.

Um estudo para determinar se a produção de NO pela ativação de culturas de macrófagos em níveis fisiológicos de arginina, ou através do aumento na disponibilidade de arginina como substrato para síntese de NO foi realizado por Norris et al.,⁹² em 1995. A geração de NO pelos macrófagos é largamente responsável pela morte do *Trypanossoma cruzi*. O aumento exógeno de arginina ou citrullina resultou em significativo aumento da produção de NO e da sua completa liberação nos parasitas através da atividade macrofágica. A citrulina foi substituída totalmente pela arginina no suporte de produção de NO e na atividade de destruição do *Trypanossoma*. Estes resultados demonstraram que na expressão e ativação do ciclo da citrullina, NO são liberados pelos macrófagos. Os níveis de arginina no plasma são limitados em respeito a produção de NO no sangue e da atividade de destruição do *Trypanossoma* nestas células. Segundo os autores o aumento dos níveis de substrato

no plasma em vez arginina no sangue e biosíntese de NO pode representar um meio de aumentar a atividade antimicrobiana “in vivo”.

Em 1997, Burney et al.,²⁴ investigaram a citotoxicidade do óxido nítrico sobre células de ovário de hamster chinês (CHO-AA8) e lifoblastoides (TK6). Após a aplicação de doses com variação de 0 a 9 mM de NO por duas horas, os autores constataram que a indução de toxicidade é um extremamente complexo, envolvendo caminhos diversos, geralmente a morte celular. Os resultados demonstraram que as células TK6 são muito mais susceptíveis a indução da toxicidade que as células CHO AA8. O primeiro efeito da exposição ao NO foi a inibição da síntese de DNA, devido a quebra de uma das cadeias (tiras) paralisando o ciclo celular.

Em 1997, Lara⁶⁵ estudou a participação dos constituintes dentários na manutenção do processo de reabsorção dentinária inflamatória. Foram utilizados neste estudo camundongos isogênicos BALB/c e C57B1/6 para avaliação da cinemática de migração celular induzida após injeção intraperitoneal de suspensões de esmalte e dentina, a resposta inflamatória tecidual após implantação de lamínulas de vidro tratadas com as suspensões de esmalte e dentina, e a atividade funcional de macrófagos peritoneais normais tratados com as suspensões de esmalte e dentina. De acordo com os resultados obtidos o autor concluiu que, os constituintes dentários, esmalte

e dentina, são capazes de induzir uma resposta inflamatória caracterizada pela migração de neutrófilos e células mononucleares com diferenciações morfológicas para células epitelióides e CGMN e funcional com produção de citocinas, como IL-1 e o $\text{TNF}\alpha$ e de NO_2^- e de H_2O_2 , além da expressão enzimática de iNOS relacionada à ativação macrofágica. Visto que o NO, H_2O_2 , IL-1 e o $\text{TNF}\alpha$ estão diretamente relacionados com ativação osteoclástica e com sua inibição (NO em altas concentrações), uma relação entre o potencial inflamatório dos constituintes dentários e a reabsorção dentária pode ser feita. Os constituintes poderiam influenciar na ativação e na modulação do processo de reabsorção.

Uma avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos quanto a liberação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos foi feita por Queiroz¹⁰⁵ em 1997. Foram testados os cimentos, Sealapex, Sealer 26, Fill Canal e Top Seal, que foram fracionados após a tomada de presa, e em seguida adicionado polietilenoglicol 400 para obtenção de soluções de 9 e 18 mg/ml. As soluções dos cimentos foram colocadas em contato com culturas de macrófagos peritoneais de camundongos e feita a leitura em leitor de ELISA. O autor constatou que houve liberação tanto do peróxido de hidrogênio como do óxido nítrico, e que as diferentes concentrações produziram resultados diferentes entre si, porém não estatisticamente significante.

A produção de óxido nítrico em cistos radiculares foi estudada por Takeichi et al.,¹³⁶ em 1998, através da identificação da produção da enzima NO sintetase. Tecidos periapicais de dentes tratados endodonticamente foram removidos, e após processamento histopatológico as lâminas foram coradas pela hematoxilina. Extraordinariamente as células iNOS positivas estavam significativamente presentes em torno dos vasos sanguíneos, e células encontradas a distância dos vasos sanguíneos demonstraram fraca ou nenhuma produção de iNOS, sugerindo que somente as células em volta dos vasos sanguíneos podem ser estimuladas para a síntese de iNOS. Essas informações demonstraram a possibilidade que algumas células, porém não todas, podem ser estimuladas para a síntese de iNOS em tecidos inflamados. Na presença de iNOS, o óxido nítrico pode ser produzido espontaneamente em lesões periapicais e pode representar um papel importante na regulação da infecção crônica.

Para Flora Filho & Zuilberstein⁴² em 2000, a ação de imuno-regulação óxido nítrico esta presente na inflamação e nos mecanismos de auto-imunidade. O NO faz parte do arsenal de primeira defesa do organismo com poder microbicida, e neste caso atua em concentrações maiores do que as de mensageiro, sendo tóxico aos microorganismos invasores.

Leonardo et al.,⁷⁴ em 2000, avaliou a citotoxicidade de quatro cimentos endodônticos à base de hidróxido de cálcio

em comparação com um cimento á base de óxido de zinco e eugenol. Na cultura de macrófagos peritoneais de camundongos, em contato com os cimentos foram avaliadas a densidade citoplasmática, a rutura da membrana celular, a fragmentação do núcleo e irregularidade do citoplasma. Diante dos resultados os autores concluíram que o Fill Canal apresentou a menor citotoxicidade, e que o aumento da citotoxicidade foi na seguinte ordem: CRCS, Sealaer 26, Apexit e Sealapex.

Rasquin¹¹⁰ em 2000, avaliou a citotoxicidade dos cimentos endodônticos, Sealapex, Sealer 26, Top Seal, Pro Canal e Endomethasone. Sob um leitor de ELISA foram avaliadas as liberações de Óxido Nítrico e Peróxido de Hidrogênio, por cultura de macrófagos peritonais de camundongos em contato com soluções de cimentos, nas concentrações de 9 e 18 mg/ml. Para o autor, os resultados permitiram observar maiores liberações de NO com os cimentos Top Seal, Sealer 26 e Endomethasone, em qualquer uma das concentrações. Entre os cimentos Sealapex e Pro Canal, com as menores liberações de NO, parece não haver qualquer diferença significativa dentro das concentrações. Entretanto, na concentração 9 mg/ml todos os cimentos apresentaram liberações bem menores do que na concentração de 18 mg/ml.

Proposição

Diante dos dados apresentados na introdução, a existência de trabalhos com resultados adversos com relação a efetividade do hidróxido de cálcio, como curativo de demora, e a importância da ação e interação deste medicamento com o sistema imunológico propusemo-nos avaliar:

1. a citotoxicidade do LPS de *Pseudomonas aeruginosa* para macrófagos peritoneais de camundongos através da liberação de NO e TNF α ;
2. a efetividade do hidróxido de cálcio sobre LPS bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* por meio da liberação de NO e TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos;
3. a viabilidade de aplicação dos dois testes em conjunto.

Material e Métodos

1. Preparo e obtenção dos animais

Nas duas metodologias (liberação de NO e TNF- α) foram utilizados camundongos Swiss, machos, de 6 a 8 semanas de idade, pesando entre 25 e 30 gramas, provenientes do bitério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Unesp que durante os testes foram mantidos em gaiolas, recebendo ração balanceada e água “ad libitum”. Dos animais utilizados nos testes somente 18 serviram de amostras.

Cada camundongo serviu de fonte de macrófagos peritoneais para cada cultura. Para estimulação/ativação dos macrófagos, foram injetados 3,0 ml de solução de Tioglicolato de sódio na cavidade abdominal de cada animal.

A morte dos animais foi realizada separadamente, para todos os experimentos, por asfixia, em cuba de vidro contendo algodão embebido em éter sulfúrico.

2. Coleta da células

Após a morte, em uma câmara de fluxo laminar (Veco, Campinas-SP) foi feita a anti-sepsia do abdômen com álcool iodado a 0,3%, e realizada a exposição do peritônio com o auxílio de duas pinças. Com seringa e agulha descartáveis, estéreis, introduziu-se na cavidade abdominal do animal 5,0 ml de solução salina tamponada de fosfatos, pH 7,2 (PBS). Após a massagem digital da cavidade abdominal o conteúdo foi sugado com auxílio da mesma seringa e agulha. Após remoção da agulha, o conteúdo foi despejado vagarosamente em um tubo de centrífuga de plástico estéril de 15 ml.

O lavado peritoneal de cada animal, foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. Em câmara de fluxo laminar o sobrenadante foi desprezado, 1,0 ml de PBS foi adicionado às células e feita nova homogeneização e centrifugação, procedimentos que ainda foram repetidas por mais duas vezes.

O sobrenadante foi desprezado e as células resuspensas em 1,0 ml de meio RPMI-1640 (Sigma), contendo 100 U/ml de penicilina (Sigma), 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma), 2 µM de L glutamina (Sigma) e 5 % de soro fetal bovino (Cutilab*).

* Cutilab Materiais para Cultura de Células Ltda., Campinas/SP

3. Preparo das soluções contendo LPS

Numa balança de precisão (METTLER AJ 150), foram pesados 11 mg de LPS de *Pseudomonas aeruginosa* (SIGMA, L7018), aos quais foi adicionada solução salina (GLICOLABOR – NaOCl a 0,9%) até a obtenção de um volume de 11 ml e uma concentração de 1 mg/ml. Em seguida, a 1 ml da solução mãe, acrescentou-se 19 ml de solução salina para obtenção de uma concentração de 50 µg / ml. A solução foi então filtrada através de um filtro de membrana acetato celulose, para remoção de bactérias na forma ativa.

A solução foi então filtrada através de um filtro de membrana acetato celulose, para remoção de bactérias na forma ativa, promovendo a esterilização, já que o filtro só permitia a passagem de partículas menores que 0,22 µm, e não existem bactérias com esta medida.

As demais soluções foram obtidas através do fracionamento das duas soluções mães.

4. Preparo da solução de hidróxido de cálcio

Tomou-se 2,5 g de pó de hidróxido de cálcio, aos quais foram adicionados solução salina até obtenção de um volume

total de 100 ml, determinando assim uma concentração de hidróxido de cálcio 25 mg/ml.

A solução foi então filtrada através de um filtro de membrana acetato celulose, para remoção de bactérias na forma ativa.

5. Preparo da solução contendo LPS/hidróxido de cálcio

Em um tubo de centrífuga foram tomados 5 ml da solução final de LPS numa concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$ aos quais foram acrescentados 5 ml da solução final de hidróxido de cálcio numa concentração de 50 mg/ml, obtendo-se uma proporção de LPS/hidróxido de cálcio de 50 μg por 25 mg por ml.

Em outro tubo de centrífuga foram tomados 2,5 ml da solução final de LPS numa concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$ aos quais foram acrescentados 5 ml da solução final de hidróxido de cálcio numa concentração de 50 mg/ml, obtendo-se uma proporção de LPS/hidróxido de cálcio de 25 μg por 25 mg em 1 ml.

Ensaio do Óxido Nítrico (NO)

1. Quantificação e preparo das células para reação do NO

Foram removidos 10 μ l da suspensão contendo as células e acrescentado 90 μ l de líquido de Lázarus (2 ml de violeta de genciana 1%, 3 ml de ácido acético glacial e 100 ml de água destilada) em recipiente a parte e homogeneizado. Removeu-se 10 μ l e introduziu-se em uma câmara de Neubauer (Boeco, Germany) para a contagem das células, sob um microscópio óptico (Zeiss, modelo Jeneval) utilizando-se uma objetiva de 40x de aumento, sendo que as concentrações obtidas em todos os camundongos foram ajustadas a $5,0 \times 10^6$ células/ml, variando-se apenas o volume da suspensão.

2. Divisão dos grupos

Em placa de 96 poços tomamos 3 poços para teste de cada solução, tendo 3 poços para o controle positivo, onde colocamos só as células no meio de cultura, e 3 para o controle negativo onde foram colocados só o meio de cultura, de acordo com o esquema demonstrativo abaixo.

Amostra 1	
LPS 25 µg	○ ○ ○
LPS 50 µg	○ ○ ○
LPS 25 µg/ Ca(OH) ₂ 25 mg	○ ○ ○
LPS 50 µg/ Ca(OH) ₂ 25 mg	○ ○ ○
Só células	○ ○ ○
Controle negativo	○ ○ ○

3. Preparo das culturas e adição das soluções contendo LPS e das soluções de LPS tratada com hidróxido de cálcio

Nesta fase foram utilizadas placas para culturas de tecidos estéreis (Corning), de 96 poços (96 Well) Foram feitas leituras simultâneas de células provenientes de dois animais, em cada teste experimental. Cada solução foi testada nas respectivas concentrações, em triplicata. Alíquotas de 100 µl contendo as células foram transferidas para placas de culturas de tecidos (Corning), aos quais foram acrescentadas 100 µl das soluções de LPS/hidróxido de cálcio e LPS nas respectivas concentrações.

Em seguida foi feita a incubação por 48 horas a 37⁰ C em uma estufa contendo uma tensão de 5,2% de CO₂.

4. *Análise da absorbância*

Na fase final, 50 µl do sobrenadante das culturas celulares foram removidos e colocados em outra placa. Acrescentou-se 50 µl do reagente de Griess e após um repouso de dez minutos à temperatura ambiente, foi feita a leitura em leitor de ELISA automático (ORGANON, Reader 2001^{*}) com um filtro 540 nm.

Os resultados foram expressos em micromoles a partir de uma curva padrão estabelecida em cada ensaio, constituída

* Organon, Reader 2001 - USA

de concentrações micromolares conhecidas de NO.

Ensaio do TNF- α .

1. Preparo da solução contendo LPS

O preparo da solução de LPS foi igual a reação anterior, porém somente em uma concentração de 25 μ g/ml.

2. Preparo da solução de LPS e hidróxido de cálcio

O preparo da solução de LPS de *P. aeruginosa* e hidróxido de cálcio foi igual a reação anterior, porém somente uma concentração foi testada, a de 25 μ g de LPS por 25 mg de hidróxido de cálcio em 1 ml.

1. Quantificação dos macrófagos

Nesta reação o volume das células obtidas de cada animal foi ajustado a uma concentração de 5×10^6 células/ml de RPMI-1640-C.

2. Obtenção dos sobrenadantes

Dessa suspensão celular foram adicionados 1,5 ml em placas de Petri plásticas de cultura de tecidos (SIGMA) e incubadas em estufa à 37⁰ C, com tensão de 5,2% de CO₂ durante uma hora (Forma Scientific, Model3159, da Forma Scientific, Inc., USA). Após esse período, desprezado o sobrenadante, as células foram incubadas com meio RPMI-1640-C e adicionados 50 µl de uma solução lipopolissacarídeo (*E. coli* O111.B, Difco) a 10 µg/ml de meio RPMI-1640-C para controle positivo. Em outras placas adicionamos 50 µl da solução de LPS de *Pseudomonas aeruginosa* numa concentração de 25 µg/ml com RPMI-1640-C. Em um terceiro grupo de placas, adicionamos 50 µl da solução de LPS e hidróxido de cálcio aos quais foram acrescentados 50 µl de RPMI-1640-C. As placas foram incubadas em uma estufa por 24 horas à 37⁰C em atmosfera de 5,2% de CO₂. Após este período, os sobrenadantes das culturas foram obtidos por centrifugação a 1000xG por 5 minutos em centrífuga refrigerada a 4⁰C, e estocados em tubos eppendorf (Corning) à 20⁰C negativos para posterior quantificação do TNF- α .

3. Ensaio da verificação da liberação de TNF- α

A medida de TNF- α liberado nos sobrenadantes de cultura de células *in vitro* foi baseada na propriedade que tem o TNF de lisar certas linhagens de células tumorais (Carswell et al.,²⁵ 1975). As células tumorais da linhagem L929 (células fibroblásticas de adenocarcinoma murino, obtidas no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo), sensíveis ao TNF- α , foram repicadas e, após 30 horas na estufa a 37⁰ C em atmosfera e tensão de 5,2% de CO₂, foram assepticamente, em fluxo laminar, despreendidas do tapete celular com 2 ml de tripsina (solução de ATV, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo). Após agitação, removeu-se todas as células e procedeu-se a lavagem das mesmas com o meio básico de Eagle (SIGMA) através da centrifugação a 250xG por 5 minutos. Essa suspensão celular foi reconstituída com 1 ml de RPMI-1640 contendo 5% de soro fetal bovino, e procedeu-se a contagem celular de forma igual a contagem dos macrófagos. As células foram ajustadas a uma concentração de 4x10⁵ cel./ml. Foram adicionados 100 μ l dessa suspensão celular em placas de microtitulação (Corning) de 96 poços, incubadas por 18 horas à 37⁰ C em atmosfera de 5,2% de CO₂. Decorrido as 18 horas, o meio de cultura foi trocado por outro contendo Actinomicina D (SIGMA) na concentração de 1 μ g/ml e realizadas diluições das

amostras a serem analisadas quanto à presença de TNF- α , ou seja, dos sobrenadantes obtidos de cultura de células aderentes estimuladas com LPS e LPS associado ao hidróxido de cálcio. As diluições foram feitas com meio RPMI-1640 contendo soro fetal bovino inativado. Foram adicionados 100 μ l de cada diluição das amostras por orifício em triplicata. Após 24 horas de incubação nas condições anteriores, as células foram fixadas e coradas com violeta cristal (Merck) por 30 minutos à temperatura ambiente, em seguida, o excesso de corante foi retirado por lavagem em água corrente, e 100 μ l de lauril sulfato de sódio a 1% (SIGMA) foi adicionado em cada orifício para solubilizar as células coradas. A absorbância de cada orifício foi lida contra um filtro 490 nm em leitor de ELISA (Genetic Systems, Microplate Reader, USA).

Para comprovar a presença de TNF- α nos sobrenadantes das culturas, estas preparações foram previamente incubadas com soro imune de coelho anti-TNF- α (SIGMA) e, em seguida realizado o teste de citotoxicidade em células L929. O cálculo das unidades de TNF- α foi realizado utilizando-se uma reta padrão previamente feita com TNF- α recombinante (SIGMA). Adotou-se o critério de que 50% de lise das células tumorais correspondem a uma unidade de TNF- α , ou seja, à aproximadamente a um picograma de TNF- α recombinante.⁸²

Metodologia da análise estatística

O método estatístico empregado neste trabalho para a comparação de médias foi o teste t de Student, ao nível de 5% de significância. Por este critério, entende-se como significativa uma diferença entre médias somente se o valor de probabilidade (valor-p) correspondente à estatística t de Student for menor do que 0,05. Considerou-se o teste t para dados pareados, pois as liberações de óxido nítrico, nas diferentes concentrações de LPS e LPS/hidróxido de cálcio, foram avaliadas em um mesmo animal.

Para auxiliar na comparação e quantificar os resultados obtidos, foram construídos intervalos de 95% de confiança para as médias de liberação de óxido nítrico ou de TNF- α .

Resultados

Na Tabela 1 estão representados os valores de liberações de óxido nítrico (NO), medidas em micromoles, em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos, estimulados por soluções de LPS de *Pseudomonas aeruginosa* nas concentrações de 50 µg/ml e 25 µg/ml, como controle e combinadas com soluções de LPS em concentrações de 50 µg/ml e 25 µg/ml, tratadas com solução hidróxido de cálcio numa concentração de 25 mg/ml. Esta tabela contém também os valores médios dessas liberações de NO, juntamente com os limites inferior e superior dos intervalos de 95% de confiança para as médias.

Tabela 1. Liberações de óxido nítrico, medidas em micromoles, em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos.

Espécime	LPS		LPS/Ca(OH) ₂	
	50 µg	25 µg	50µg/25 mg	25µg/25 mg
1	21,05	24,56	7,81	7,18
2	24,64	20,97	7,17	7,38
3	30,01	29,51	7,84	7,41
4	19,75	20,98	7,21	7,46
5	19,44	17,22	7,81	7,18
6	22,05	23,97	7,18	7,09
7	23,05	22,87	7,31	7,67
8	23,34	22,51	7,21	7,19
9	24,34	22,31	7,49	7,11
Média	23,07	22,76	7,45	7,30
Desvio Padrão	3,20	3,31	0,29	0,19
Intervalo de 95% de confiança				
Limite inferior	20,62	20,22	7,22	7,15
Limite superior	25,53	25,31	7,67	7,44

Na Tabela 2 estão representados os valores de liberações de TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos, estimulados por LPS de *Pseudomonas aeruginosa* na concentração 25 µg de como controle, e tratamento da solução de LPS com solução de hidróxido de cálcio numa concentração 25 mg/ml. Nesta tabela são apresentados também as médias, desvios padrão e limites dos intervalos de 95% de confiança para a média.

Tabela 2. Liberações TNF- α , em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos medidas por unidade de TNF- α liberada por ml.

Espécime	LPS 25 μ g	
	LPS 25 μ g	LPS 25 μ g/ 25mg HC
1	276,76	3,03
2	209,52	4,76
3	226,44	0,00
4	246,55	0,00
5	289,47	14,91
6	166,00	2,20
7	281,21	0,00
8	221,37	0,00
9	212,21	2,40
Média	229,32	5,53
Desvio Padrão	41,40	7,01
Intervalo de 95% de confiança		
Limite inferior	201,51	0,82
Limite superior	257,14	10,24

Análise estatística

Observando-se as liberações de NO e as médias, dadas na Tabela 1, é evidente que a liberação é bem menor na presença do hidróxido de cálcio, nas duas concentrações. Levando-se em consideração os intervalos de 95% confiança para as médias da tabela 1, verifica-se que a liberação de NO é pelo menos três vezes menor com o emprego do hidróxido de cálcio, nos dois gradientes de concentração empregados.

Os intervalos de confiança da tabela 1 evidenciam, também, que não há diferença significativa entre as médias de liberações de NO quando se muda a concentração LPS de 50 μ g para 25 μ g. Este resultado pode ser confirmado pelo teste t de Student, considerando os pares de valores de liberação de NO em um mesmo animal. Assim, para a comparação das médias de liberação de NO do LPS (controle) nas concentrações 50 μ g para 25 μ g, obteve-se $t=0,42$, ao qual corresponde um valor de probabilidade igual a 0,689, muito maior do que o nível de significância adotado ($p>0,05$). Também as médias de liberação de NO relativas ao LPS/HC, nas duas concentrações, não são significativamente diferentes, pois $t=1,19$, ao qual corresponde um valor de probabilidade igual 0,269, maior do que 0,05.

Portanto, a presença do hidróxido de cálcio diminuiu significativamente a liberação de óxido nítrico e os resultados são equivalentes nas duas concentrações estudadas.

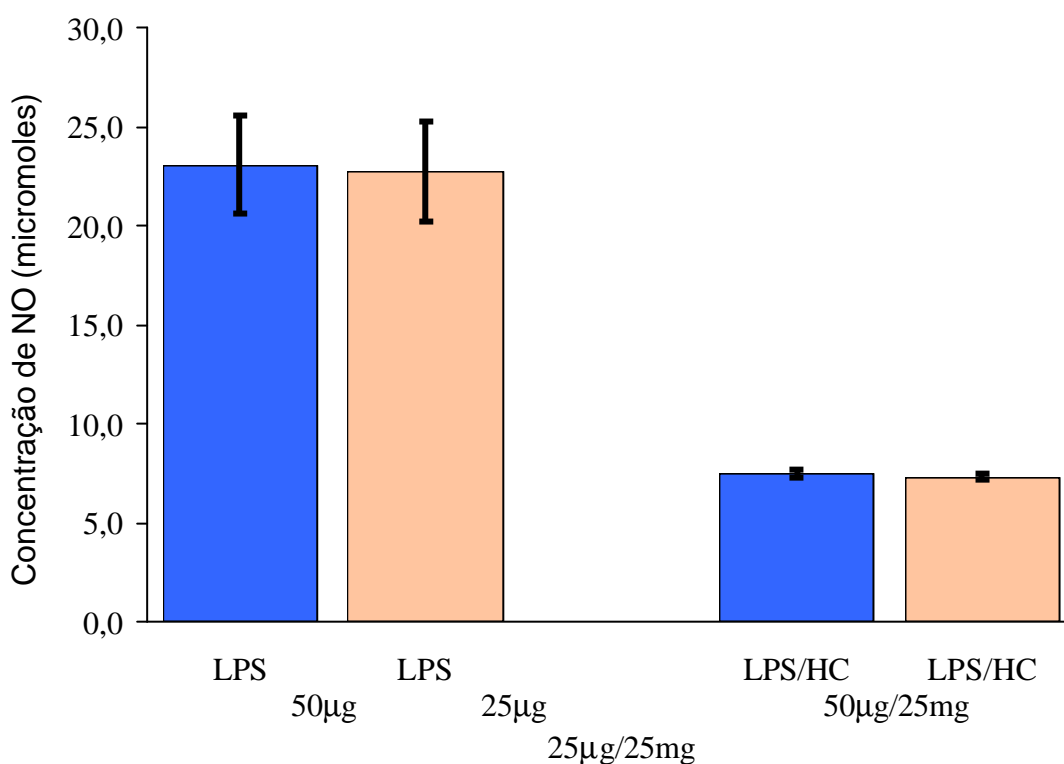
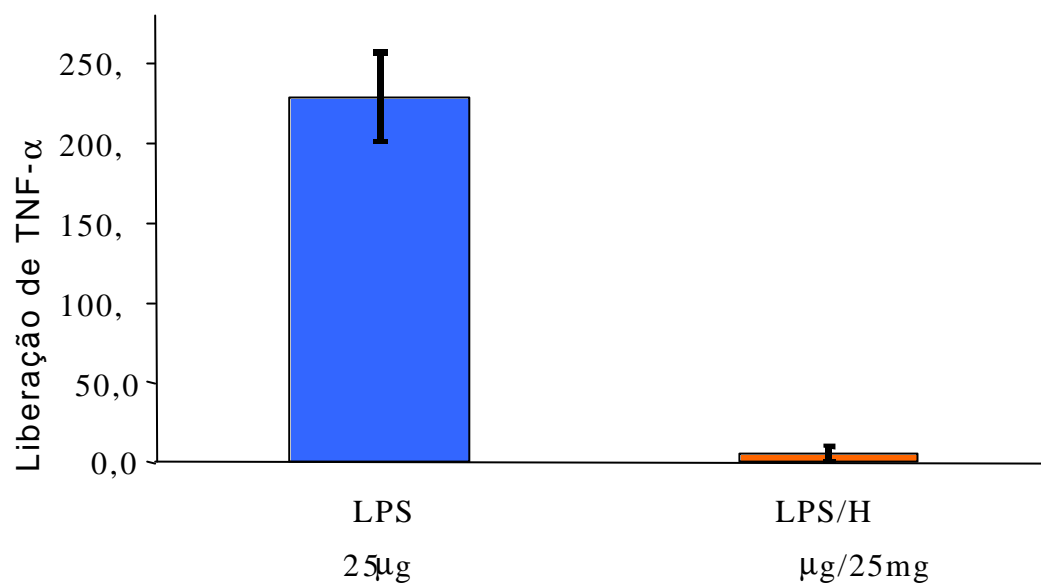


Gráfico 1. Representação gráfica de médias de liberação de óxido nítrico e os respectivos intervalos de confiança.

O tratamento do LPS de *Pseudomonas aeruginosa* com hidróxido de cálcio diminuiu significativamente a liberação de TNF- α . Os valores médios de liberação de TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos, e seus intervalos de confiança é apresentada no Gráfico 2.

Gráfico 2. Representação gráfica de médias de liberação de TNF- α e os respectivos intervalos de confiança.



Discussão

Discussão da Literatura Específica

A exposição pulpar direta como consequência de traumatismos ou principalmente pela cárie dentária pode, causar a contaminação do tecido pulpar, e contribuir para instalação de patologias.(Pisiotis & Spangberg)¹⁰⁴

Diante da exposição à microbiota bucal, a dentina circunjacente e a superfície da polpa podem abrigar bactérias e seus sub-produtos. Dependendo da virulência das bactérias, da idade e resistência do hospedeiro, do suprimento sanguíneo e do grau de drenagem, o tecido pulpar pode permanecer inflamado por um longo período de tempo ou pode necrosar rapidamente. Concomitantemente a necrose pulpar, todo o sistema de canais radiculares é invadido por várias espécies de bactérias,^{8, 15, 19 51 101} as quais podem difundir-se para o ligamento periodontal através do forame apical resultando, usualmente, no desenvolvimento de lesões periapicais e, algumas vezes, através de ramificações dos canais em lesões laterais. Essas lesões periapicais, quando detectadas radiograficamente, caracterizam um processo infeccioso de longa duração.⁶⁶ Nesses casos, a

microbiota é predominantemente constituída por bactérias, anaeróbias facultativas e anaeróbias estritas, além dos aeróbios em menor proporção.^{2, 13, 14, 15, 20, 85, 100, 101, 102, 112, 128, 129, 133}

Mesmo apresentando baixa frequência, dentre as bactérias isoladas de canais radiculares em dentes com necrose pulpar, quer com lesão periapical visível radiograficamente ou não, quer tenham sido preparados biomecanicamente ou não, encontramos as *Pseudomonas aeruginosa*.^{11, 109, 128,} As *Pseudomonas* são bactérias que pertencem a uma família das mais diversificadas, as Pseudomonadaceae. São bastonetes Gram-negativos levemente encurvados, de 0,5 a 1 µm de diâmetro por 3 a 4 µm de comprimento, móveis através de flagelo polar, estritamente aeróbios, mas podendo crescer anaerobiamente se for fornecido um aceptor alternativo de elétrons (nitrato ou argenina), crescem em temperatura de 2°C a 45°C, são capazes de utilizar diversos compostos orgânicos como fonte de carbono e energia.(Zambon & Newman)¹⁵⁸

Além dos humanos, as *Pseudomonas* podem ser isoladas em vários ambientes, como instrumentos médicos, encanamentos e mangueiras dos consultórios odontológicos. Este microorganismo destaca-se por sua resistência aos antibióticos e desinfetantes, particularmente os que contêm compostos fenólicos.^{130, 158}

Dentre as estruturas que compõem as bactérias, a parede celular pode representar de 10 a 40% do peso seco da

célula. O método utilizado para o estudo da parede celular bacteriana é o de Gram. De acordo a diferença da parede celular, as bactérias são classificadas em dois grupos: Gram-positiva e Gram-negativa.¹⁵⁸

As bactérias Gram-negativas além de possuírem diferentes fatores de virulência e gerarem produtos tóxicos para a região periapical, contém a endotoxina em sua parede celular. Essa característica da camada externa da bactéria Gram-negativa, é particularmente importante na constituição uma vez que a endotoxina é constituída de lipopolissacarídios (LPS). O LPS é composto por três segmentos covalentemente ligados: o Lipídio A, o "Core" (núcleo) e o Antígeno O. O Lipídio A está embebido na membrana externa e compreende um lipídio composto, constituído por unidades dissacarídicas, ácidos gráxos saturados e grupos fosfato.¹¹

O Lipídeo A é a endotoxina das bactérias Gram-negativas, é liberado durante o crescimento e multiplicação celular ou na sua morte, sendo ele o responsável pelo potencial tóxico.(Wellicome 1990;¹⁵² Safavi & Nichols 1994;¹¹⁷ Kumuda et al., 1995;⁶⁴ Nagaoka et al., 1996;⁸⁴ Yoshimura et al., 1997;¹⁵⁷ Nelson Filho 2000;⁸⁸ Safavi & Nichols 2000)¹¹⁸

Após a degeneração do tecido pulpar e colonização de todo o sistema de canais radiculares, as bactérias vão promover agressão ao tecido periapical, é neste momento que as células de defesa desempenharão papel fundamental na defesa

do organismo, e dentre elas destacamos os macrófagos, células que possuem um período de vida longo e não são terminais. Sua sobrevivência no local da inflamação pode ser caracterizada além de outros fatores pela agregação e fusão às células recém-chegadas, ocorrendo assim a formação das células gigantes multinucleadas inflamatórias.^{25, 31}

Ao fagocitar os produtos tóxicos provenientes do metabolismo bacteriano, os macrófagos lançam ao meio produtos celulares pelo processo de regurgitação fagocitária. Entre esses produtos têm-se a lisozima, peroxidase, H_2O_2 e NO .^{31, 81} Dependendo do grau de virulência de algumas bactérias, esta é a primeira linha de defesa do organismo.¹⁴²

A fagocitose estimula um surto de consumo de oxigênio, a glicogenólise, o aumento da oxigenação da glicose do desvio da hexose-monofosfato e a produção de metabólitos reativos do oxigênio. A geração de metabólitos do oxigênio deve-se à rápida ativação de uma oxidase (oxidase NADPH) que oxida a NADPH, e neste processo reduz o oxigênio em íon superóxido (O_2^-). O superóxido em seguida é convertido em H_2O_2 , principalmente por dismutação espontânea ($O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$). A ativação da oxidase exige a translocação de componentes citossólicos no sentido de interagir com os citocromos fixos na membrana ou, quando a membrana é invaginada, no fagolisossomo. Assim é produzido o peróxido de hidrogênio dentro do lisossoma.³¹

O óxido nítrico outro importante produto do sistema microbicida é sintetizado a partir da L-argenina, do oxigênio molecular e do NADPH pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). O NO produzido pelos macrófagos, atua como radical livre, é citotóxico para determinados micróbios e células tumorais. Reage com ânion superóxido e forma o poderoso oxidante dióxido de nitrogênio e o radical hidroxíla.^{31, 42, 81}

As agressões sofridas pelas células presentes nos tecidos podem alterar o comportamento de forma reversível ou irreversível, dependendo do grau de magnitude da agressão. Agressões fugazes e de pequena intensidade levam a alterações celulares reversíveis, já agressões de grande intensidade e por períodos longos causam alterações irreversíveis.^{31, 73, 110}

Como parâmetro para avaliação da citotoxicidade e manutenção da integridade celular, a liberação de óxido nítrico em cultura de macrófagos foi utilizada.^{73, 106, 110} As endotoxinas ao serem fagocitadas causam estímulo na membrana celular que responde com uma explosão oxidativa no interior da célula. Tal explosão é caracterizada por aumento sensível do superóxido, que através da via bioquímica inicia a redução do oxigênio para um ânion superóxido, usando um doador NADPH e NADH.^{73, 105} O óxido nítrico macrofágico é induzido quando os macrófagos são ativados por citocinas (ex., TNF- α , IFN - γ) ou por outros agentes (LPS bacteriano).^{81, 92} Quanto maior o estímulo maior será a produção de NO e H₂O₂.^{65, 73, 103, 110}

Após estímulo, dentre as diversas substâncias secretadas pelos macrófagos estão as citocinas. (Mangan et al., 1991;⁷⁷ Perala et al., 1992;⁹⁸ Agarwal et al., 1995;³ Quintero 1995;¹⁰⁶ Ito et al., 1996;⁵⁷ Barthel et al., 1997;¹⁶ Fouad 1997;⁴⁵ Yoshimura et al., 1997;¹⁵⁶ Bleuter & Cerami 1998;²⁰ Galbraith et al., 1998;⁴⁷ Ransjö et al., 1998;¹⁰⁸ Assuma et al., 1999;⁹ Perasi 2000;⁹⁹ Lin et al., 2001;⁷⁵ Ouyang et al., 2001;⁹⁶ Ueda & Matsushima 2001).¹⁴⁴

As citocinas agem de maneira autócrina (na própria célula produtora da citocina)⁷⁶ ou paracrina (nas células vizinhas).^{61, 106, 157} Aproximadamente mais de 100 diferentes citocinas foram descritas, e os indícios apontam para mais e mais novas descrições.

Dentre as citocinas, o TNF- α apresenta diversas funções que estão intimamente ligadas com a terapia endodôntica, devido ao papel desempenhado nos processos de reabsorção óssea e radicular (Assuma et al., 1998;⁹ Tani - Ishii et al., 1999)¹³⁹ assim como na proliferação fibroblástica (Kobayashi et al., 1999),⁶² ativação macrofágica (Tani – Ishii et al., 1995)¹³⁸ e síntese colagênica (O'boskey & Panagakos).⁹³

Além da presença de variações anatômicas (curvaturas e achatamentos) e calcificações radiculares, a presença de bactérias no interior do canal radicular é a principal causas de fracasso da terapia endodôntica.^{2, 14, 20, 70, 72, 83, 129, 134}

Nem sempre o sistema de defesa do organismo consegue neutralizar o ataque bacteriano, por este motivo, na tentativa de combater a infecção do sistema de canais radiculares, por um longo período foram utilizadas várias substâncias cáusticas com a finalidade somente de eliminar microorganismos.^{27, 66}

Posteriormente, com publicação de novos estudos, passou-se a valorizar quase que exclusivamente o preparo bio-mecânico, e muitas vezes em detrimento de outras etapas, como a única forma de promover a desinfecção do sistema de canais radiculares. Porém, só o preparo bio-mecânico não é capaz de eliminar todos os microrganismos presentes, como comprovaram Assed et al., 1996;⁸ Silveira, 1997;¹²⁴ Soares, 1999;¹²⁹ e Leonardo et al., 1999⁷² por isso lança-se mão de curativos de demora entre as seções. Como curativo de demora, atualmente a substância mais utilizada é o hidróxido de cálcio.^{4, 14, 17, 18, 22, 30, 35, 37, 39, 51, 69, 71, 87, 89, 94, 116}

O hidróxido de cálcio é um pó branco, de peso molecular 70,08, que apresenta uma percentagem de íons hidroxila de 45,89%, contra 54,11% de íons de cálcio. Possui pH alcalino, em torno de 12,8, é pouco solúvel em água (1,2 g / l, à temperatura de 25⁰ C), com um grau de dissociação de 90%, é uma base forte, obtida a partir da calcinação do carbonato de cálcio, até sua transformação em óxido de cálcio, que ao ser hidratado transforma-se em hidróxido de cálcio. A reação com o

CO₂, um gás indispensável na respiração de bactérias anaeróbias, transforma-o em carbonato de cálcio.^{34, 43}

Ao entrar em contato com o LPS bacteriano, o hidróxido de cálcio promove sua hidrólise, transformando-o em ácido graxo hidrossolúvel.⁶⁷ O elevado pH (em torno de 12) é outra característica que o credencia como bactericida, já que a maioria das bactérias não sobrevivem em pH muito elevado, além de 11.^{7, 44, 158}

Devido a uma de suas características físicas, ser um pó, para introduzi-lo no interior dos canais radiculares é necessária a adição de um veículo, assumindo o aspecto de uma pasta hidrossolúvel. Dentre os veículos utilizados encontramos o polietilenoglicol 400, uma substância hidrossolúvel, de alto peso molecular, obtida pela polimerização do etileno ligado a um radical glicose.⁴³

Apesar da utilização clínica em larga escala e da gama de trabalhos encontrados na literatura, os mecanismos de ação do hidróxido de cálcio, não estão totalmente esclarecidos, principalmente no que tange sua ação e interação com o sistema imunológico, visando destruição ou neutralização bacteriana e de seus sub-produtos. (Leonardo et al., 1993;⁷⁰ Estrela et al., 1994;³⁵ Alencar 1995;⁵ Siqueira JR. et al., 1996;¹²⁸ Estrela et al., 1998;³⁹ Guigand et al., 1998)⁵⁰

Discussão da Metodologia

Após a destruição pulpar, as bactérias vão promover uma colonização do sistema de canais chegando até a superfície radicular, fato comprovado Soares¹²⁹ em 1999, e até mesmo ganhar a intimidade dos tecidos periapicais, como foi demonstrado por Ribeiro¹¹² em 1999, promovendo uma constante irritação.

Como constituintes da região apical e periapical podemos encontrar várias células, entre elas, cementoblastos, osteoblastos, linfócitos, macrófagos, células mesenquimais indiferenciadas e fibroblastos.¹³⁷

A ação dos macrófagos na resposta imunológica, reação inflamatória e reparatória é de suma importância, sendo considerado o principal responsável pela resposta imunológica devido a sua capacidade de síntese, de fagocitose e de processamento antigênico.^{58, 59, 74}

Devido a sua fácil obtenção, importância no processo inflamatório e de reparo, e elevada presença no peritônio, optamos pela escolha dos macrófagos peritoneais de camundongos como células alvo para análise da reação ao LPS de *Pseudomonas aeruginosa* tratados ou não com pastas hidróxido de cálcio.^{3, 54, 65, 73, 86, 105, 116, 147}

Por serem unidades complexas nas quais os processos vitais ocorrem continuamente, a normalidade nos macrófagos depende da integração de numerosas reações metabólicas intra e extracelulares. Desde que não comprometam a vitalidade celular a agressão / estímulo podem ser considerados sinônimos.^{31, 73, 105, 142}

A presença de elementos físicos, químicos ou biológicos no meio apical podem causar agressão, levando as células a perder a capacidade de gerar energia, mediar o transporte de pequenas moléculas de importância biológica tais como eletrólitos, glucose aminoácidos e finalmente de sintetizar macromoléculas e membranas celulares.^{25, 31, 73}

A homeostasia celular, requer um contínuo trabalho de controle dos gradientes químicos, acarretando gasto de energia, sendo o controle do sistema celular de vital importância para ótima função e sobrevivência das células. Pontos de controle do metabolismo celular existem por vários compartimentos da célula e em diferentes níveis de organização.³¹

Certos sistemas são vitais e particularmente vulneráveis nas agressões: a) manutenção da integridade das membranas celulares-equilíbrio iônico; b) respiração aeróbia e produção de ATP; c) síntese de enzimas e proteínas estruturais; d) preservação da integridade do aparelho genético-proliferação celular.³¹

Os efeitos da agressão sobre as células dependem do tipo, duração e severidade dos agentes agressores, bem como o estado de adaptabilidade da célula atingida. Quatro referenciais bioquímicos são importantes para medir o nível de agressão celular:

1. radicais livres derivados do oxigênio, produzidos em muitas condições patológicas, com efeitos deletérios na estrutura e função celular;
2. perda do cálcio homeostático e aumento do cálcio intracelular. Isquemia e certas toxinas causam influxo do Ca^{++} através da membrana plasmática e liberam Ca^{++} da mitocôndria e retículo endoplasmático. O cálcio citosólico aumentado ativa as fosfolipases que degradam fosfolipídeos de membrana; proteases que quebram as proteínas da membrana e o citoesqueleto, ATPases que aceleram a depleção do ATP, e endonucleases que estão associadas à fragmentação cromática;
3. depleção de ATP, uma vez que é necessário no processo de transporte de membrana, síntese proteica e renovação fosfolipídica;
4. alteração na permeabilidade de membrana, danificadas diretamente por toxinas, ou agentes químicos.^{31, 58, 59}

A depender do grau de severidade da agressão, o comportamento celular pode ser alterado de forma reversível ou irreversível. Pequenas agressões e de curta duração levam a

alterações celulares reversíveis, já agressões de grande intensidade e por períodos longos causam alterações irreversíveis nas células.^{31, 73} A liberação de peróxido de hidrogênio em cultura de macrófagos, foi utilizada como parâmetro para avaliação da citotoxicidade e manutenção da integridade celular.^{65, 73, 105, 110} O LPS bacteriano ao ser fagocitado causa estímulo na membrana celular que responde com uma explosão oxidativa no interior da célula. Os produtos da explosão respiratória são o superóxido e H₂O₂. Ambos são considerados medidas de resposta frente a estímulos por bactérias ou produtos provenientes do seu metabolismo, e uma variedade de solutos de moléculas quimiotáticas.^{59, 73} Outro importante componente do sistema microbicida, o NO liberado pelos macrófagos, também pode ser utilizado para avaliação do grau de agressão / estímulo. (Lara 1997;⁶⁵ Queiroz 1997;¹⁰⁵ Rasquin 2000).¹¹⁰ O óxido nítrico é um gás solúvel de radical livre conhecido até bem pouco tempo como poluente da atmosfera, além dos macrófagos também é produzido por células endoteliais e neurônios centrais específicos. É sintetizado a partir da L-argenina, uma enzima cálcio dependente, do oxigênio molecular e do NADPH pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). Existem dois tipos de NO. Nas células endoteliais e nos neurônios, o NO está presente constitutivamente e pode ser rapidamente ativado por aumento de íons de cálcio citoplasmáticos na presença de calmodulina. A entrada de cálcio nestas células induz a uma rápida produção de

NO.^{81, 107} Em contraste, o NO macrófágico é induzido quando os macrófagos são ativados por citocinas (ex., TNF- α , IFN - γ) ou por outros agentes (ex., LPS bacteriano), não sendo necessário haver o aumento de cálcio intracelular. Uma vez que a meia vida do NO “*in vivo*” é muito curta, o gás só atua em células muito próximas do local onde é produzido. Esta atividade explica a especificidade de suas ações.^{58, 60, 65, 81, 92, 96, 104, 105, 110, 136, 140, 147, 153} Além de promover o relaxamento da musculatura, Rang et al.¹⁰⁷ destacam outras importantes funções do NO, como:

- a- reduz a agregação plaquetária;¹⁴⁰
- b- o NO produzido pelos macrófagos, atua como radical livre, sendo citotóxico para determinados micróbios e células tumorais;^{81, 92, 147}
- c- oxida grupamentos sulfidríla nas proteínas e causa a depleção de glutatião citossólico;⁸¹
- d- reage com o ânion superóxido e forma o poderoso oxidante dióxido de nitrogênio e o radical hidroxila.³¹

O TNF- α um mediador particularmente importante, liberado pelos macrófagos em resposta a componentes microbianos (Stashenko 1990;¹³¹ Yoshimura et al., 1997)¹⁵⁷ atua em sinergia com outros mediadores, possui efeito protetor de ação imediata, aumentando rapidamente a atividade antimicrobiana inespecífica:

- a- aumenta a capacidade microbicida de macrófagos e neutrófilos;

b-induzem a liberação de $\text{INF}\gamma$ pelas células NK, aumentando ainda mais a atividade microbicida dos macrófagos;

c-provoca alterações nas células endoteliais e em fagócitos, resultando em maior adesão dos fagócitos às paredes de vasos sanguíneos.

O $\text{TNF-}\alpha$ é certamente responsável por muitos dos exemplos de destruição de células tumorais pelos macrófagos e, em conjunto com $\text{INF}\gamma$ é poderosamente sinérgico na destruição de tumores, sendo assim um ensaio biológico típico para determinação do TNF, está baseado na lise de células murinas L929 tratadas com actinomicina D, como comprovado por Agarwal et al.,³ em 1995.

Um estudo das diversas metodologias para quantificação do TNF, levaram Kossodo et al.,⁶³ em 1995 a acreditar que o nível de sensibilidade foi maior com o teste de ELISA e o ensaio biológico. No entanto, o ensaio biológico discrimina a $\text{TNF-}\alpha$ produzido endógenamente do exógeno. Outro dado importante é que nos testes biológicos detecta-se o TNF no estado integral, sem sofrer desnaturação ou alteração de sua molécula, o que o teste imunoenzimático não detecta.

Diante do exposto, optamos pelo desenvolvimento do teste biológico com células fibroblásticas de adenocarcinoma murino, L929.

Através de uma metodologia adequada pode-se obter

em um leitor de ELISA, um nível comparativo de agressão / estímulo sofrido por macrófagos em contato com LPS bacteriano, avaliando-se o grau de liberação de NO^{65, 73, 92, 105, 147} e TNF- α .^{9, 16, 65, 99}

Discussão dos Resultados

No primeiro experimento ficou constatado que o LPS de *Pseudomonas aeruginosa*, estimula a liberação de NO. A liberação de NO também foi constatada por Queiroz¹⁰⁵ em 1997 e Rasquin¹¹⁰ em 2000, que utilizaram para estimulação dos macrófagos, cimentos obturadores de canais radiculares, já Lara (1997)⁶⁵, utilizou os constituintes dentários (esmalte e dentina). A liberação de NO frente outros estimulantes foi confirmada por outros autores.^{24, 81, 82, 92, 96, 136, 140}

O tratamento do LPS de *Pseudomonas aeruginosa* com hidróxido de cálcio, promoveu a sua neutralização, fato este confirmado neste experimento, pela produção de NO em níveis fisiológicos. Uma visualização interessante deste fato pode ser obtida na Tabela 1, onde estão representados as médias de liberação de NO e os respectivos intervalos de 95% de confiança. Para Rasquin (2000)¹¹⁰ produção de NO em baixos níveis ou níveis fisiológicos demonstra o grau de agressão sofrido pela célula. O hidróxido de cálcio mostrou que é capaz de neutralizar a

citotoxicidade do LPS de *Pseudomonas*, quando em contato com a cultura de macrófagos, neste experimento, e em 1997, Queiroz¹⁰⁵ constatou que um cimento endodôntico à base de hidróxido de cálcio foi menos citotóxico que outros cimentos que tinham resinas como componentes.

O LPS de *Pseudomonas aeruginosa* mostrou ser um potente estimulador da produção de TNF- α por macrófagos, fato este constatado neste trabalho. O processo de reabsorção óssea e radicular após estímulo com LPS bacteriano está intimamente ligado a liberação de IL-1 β e TNF- α como foi comprovado por Assuma et al., 1998;⁹ Ouyang et al., 2001;⁹⁵ Quintero et al., 1995;¹⁰⁶ Ransjö et al., 1998.¹⁰⁸ A produção destas duas citocinas por macrófagos, também ocorreu quando estimulados com constituintes dentários, o esmalte e a dentina, como foi comprovada por Lara (1997)⁶⁵, mostrando assim que não apenas o LPS bacteriano pode desencadear o processo de reabsorção radicular.

Perasi (2000)⁹⁹ observou que um cimento endodôntico à base de hidróxido de cálcio não estimulou a liberação de TNF- α , ou o fez em níveis fisiológicos. Neste experimento a adição do hidróxido de cálcio ao LPS, fez com que não ocorresse a liberação de TNF- α , ou ocorresse em níveis fisiológicos.

Diante dos resultados pode-se observar, pelos intervalos de confiança, uma diminuição de pelo menos vinte vezes da liberação de TNF- α na presença de hidróxido de cálcio.

Neste caso, a variabilidade dos resultados, dada pelo desvio padrão, é razoavelmente grande.

Conclusão

Considerando as particularidades das metodologias empregadas, concluimos que:

1- em contato com macrófagos peritoneais de camundongos, o LPS de *Pseudomonas aeruginos* foi citotóxico, estimulando a liberação de NO e TNF- α

2- de acordo com os resultados o LPS bacteriano tratado com hidróxido de cálcio não estimula a liberação de NO e TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos, e se o faz, a liberação ocorre em níveis baixos ou fisiológicos.

2- as metodologias de avaliação da liberação de NO e TNF- α , podem ser utilizadas em conjunto para verificar a citotoxicidade de componentes bacterianos, no caso especificamente o LPS de *Pseudomonas aeruginosa*.

Referências Bibliográficas*

- 1 ABIKO, Y. et al. Ca^{2+} stimulated adenosine triphosphatase in dental pulp of albino rabbit. *J. Dent. Res.*, v.56, p.91, 1977.
- 2 ABOU-RASS, M., BOGEN, G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int. Endod. J.*, v.31, p.39-47, 1998.
- 3 AGARWAL, S. et al. Differential expression of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides different microbes. *J. Dent. Res.*, v.74, p.1057-65, 1995.
- 4 ALAÇAM, T. et al. Dentin penetration of 2 calcium hydroxide combinations. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* v.86, p.469-72, 1998.
- 5 ALENCAR, A.H.G. *Avaliação da presença do p-monoclorofenol e do efeito antimicrobiano residual da associação de hidróxido de cálcio (Calen) + p-monoclorofenol utilizada como medicação intracanal em dentes de cães despolpados e de reação periapical crônica induzida.* Araraquara, 1995. 105p. Dissertação (Mestrado em Endodontia) Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas, Editora UNESP. *Normas para publicações da UNESP.* São Paulo: Editora UNESP, 1004. 4v., v.2 Referências bibliográficas

- 6 ALENCAR, A.H.G. *Determinação do efeito antibacteriano residual da associação Calen (hidróxido de cálcio) + paramonoclorofenol canforado quando utilizada como medicação intracanal em dentes humanos com necrose pulpar e reação periapical crônica e dos microorganismos no canal radicular antes do preparo biomecânico e após a utilização da medicação intracanal.* Araraquara, 1998, 196p. Tese (Doutorado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
- 7 ANDO, N., HOSHIRO, E. Predominant obligate anaerobies invading the deep layers of root canal dentine. *Int. Endod. J.*, v.23, p.20-7, 1990.
- 8 ASSED, S., et al. Prevalência de microorganismos em canais radiculares de dentes com necrose pulpar e reação periapical crônica – imunofluorescência indireta – efeito do preparo biomecânico e do curativo de demora pela cultura. *Rev. Bras. Odonto.*, v.8, p.24-8, 1996.
- 9 ASSUMA, R. et al. IL-1 and TNF-antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J. Immunol.*, v.160, n.1, p.403-9, 1998.
- 10 AZUMA, Y., OZASA, N., TAKAGI, N. Pharmacological studies on the anti-inflammatory action of phenolic compounds. *J. Dent. Res.*, v.65, p.53-6, 1986.
- 11 BAMMANN, L.L., ESTRELA, C. Aspectos microbiológicos em endodontia. In: ESTRELA, C., FIGUEIREDO, J.A.P. *Endodontia: princípios biológicos e mecânicos.* São Paulo: Ed. Artes Médicas Ltda, 1999. cap.6 , p. 168-189.

- 12 BANDEIRA, M.F.C.L., et al. Estudo preliminar da atividade antibacteriana do óleo essencial e da resina da *copaifera multijuga* (óleo de copaíba), associados ao óxido de zinco e ao hidróxido de cálcio. *Jornal Brasileiro Clínica Estética Odontologia*, v.3, p.46-52, 1997.
- 13 BARBOSA, C.A.M., et al. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. *J. Endod.*, v.23, p.297-9, 1997.
- 14 BARNARD, D., DAVIES, J., FIGDOR, D. Susceptibility of *Actinomyces israelii* to antibiotics, sodium hypochlorite and calcium hydroxide. *Int. Endod. J.*, v.29, p.320-6, 1996.
- 15 BARNETT, F. et al. Ciprofloxacin treatment of periapical *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.4, p.132-7, 1988.
- 16 BARTHEL, C.R. et al. TNF- α release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int. Endod. J.*, v.30, p.155-9, 1997.
- 17 BELTES, P.G. et al. In vitro of hydroxyl ions from six types of calcium hydroxide nonsetting pastes. *J. Endod.*, v.23, p.413-5, 1997.
- 18 BERBERT, F.L.C.V. *Análise histológica da reparação apical e periapical pós-tratamento endodôntico de dentes de cães com reação periapical crônica induzida, em função do curativo de demora com Calen/PMCC ou Calasept, e da obturação do canal radicular com Sealapex ou AH Plus*. Bauru, 1999. 305p. Tese (Doutorado – Endodontia) – Faculdade do Odontologia, USP.

- 19 BERKITTEN, M., OKAR, I., BERKITTEN, R. In vitro study of the penetration of *Streptococcus sanguis* and *Prevotella intermédia* strain into human dentinal tubules. *J. Endod.*, v.26, p.236-9, 2000.
- 20 BLAKE, E. et al. A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. *J. Endod.*, v.18, p.152-4, 1992.
- 21 BLEUTER, B., CERAMI, A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Ann. Rev. Biochem.*, v.57, p.505-18, 1998.
- 22 BONETTI FILHO, I. *Tratamento de canal radicular de dentes de cães com necrose pulpar e lesão periapical crônica induzida, realizado em sessão única e duas sessões, utilizando três diferentes curativos de demora – avaliação radiográfica, histopatológica e histomicrobiológica.* Araraquara, 2000. 336p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
- 23 BUCK, R.A., et al. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. *J. Endod.*, v.27, p.325-27, 2001.
- 24 BURNEY. S., TAMIR, S., GAL, A., TENNENBAUM, S.R. A mechanistic análisis of nitric oxide induced cellular toxicity. *Biol. And Chemistry.*, v.1, n.2, p.130-44. 1997.
- 25 CAMARGO, W.R. *Interação dos cimentos Sealapex e CRCS com os macrófagos – estudo morfológico dos efeitos citotóxicos.* Bauru, 1993. 93p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.

- 26 CARSWELL, E.A., et al. An endotoxin-induced serum factor which causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.72, p. 3666-70, 1975.
- 27 CATANZARO-GUIMARÃES, S.A., PERCINOTO, C. Effect of some endodontic material on the influx of macrophages and multinucleated giant cell development in experimental granulomas. *J. Endod.*, v.10, p.101-4, 1984.
- 28 CHANG, Y-C., et al. Effects of camphorated parachlorophenol on human periodontal ligament cells in vitro. *J. Endod.*, v.25, p.779-81, 1999.
- 29 CHANG, Y-C., CHOU, M-Y. Cytotoxicity of halothane on human gingival fibroblast cultures in vitro. *J. Endod.*, v.27, p.82-84, 2001.
- 30 COSTA, P.M.C. *Influência das trocas de diferentes pastas à base de hidróxido de cálcio na alcalinização da superfície radicular de dentes humanos recém extraídos*. Araraquara, 1998. 163p. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
- 31 COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. Inflamação e reparação. In: COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. *Patología estrutural e funcional*. 5. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1996. cap.3, p.45-83.
- 32 DISTEL, J.W., HATTON, J.F., HUBBLE, T.S., GILLESPIE, M.J. *Enterococcus faecalis* biofilm formation as a mechanism for persistence in medicated root canals. *J. Endod.*, v.27, p.238, 2001.(Abstract)

- 33 ESBERARD, R.M., CAMES JR, L.D., DEL RIO, C.E. Reabsorção radicular – Influência de diferentes tipos de pastas de hidróxido de cálcio na mudança do pH da superfície radicular. *RGO*, v.44, p.267-70, 1996.
- 34 ESTRELA, C., BAMMANN, L.L. Efeito enzimático do hidróxido de cálcio. *Rev. Assoc. Bras. Odontol.*, v.7, p.32-42, 1999.
- 35 ESTRELA, C. Et al. Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. *Rev. Fac. Odontol. Bauru.*, v.2, p.31-8, 1994.
- 36 ESTRELA, C. et al. Dentinal diffusion of hydroxyl ions of various calcium hydroxide pastes. *Braz. Dent. J.*, v.6, p.5-9, 1995.
- 37 ESTRELA, C. et al. Efeito antibacteriano de pastas de hidróxido de cálcio sobre bactérias aeróbias facultativas. *Rev. Fac. Odontol. Bauru*, v.3, p.109-14, 1995.
- 38 ESTRELA, C. et al. Chemical analysis of calcium carbonate present in various calcium hydroxide samples. *Braz. Endod. J.*, v.2, p.7-9, 1997.
- 39 ESTRELA, C. et al. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. *J. Endod.*, v.24, n.1, p.15-7, 1998.
- 40 ESTRELA, C. et al. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. *J. Endod.*, v.25, p.416-8, 1999.
- 42 FLORA FILHO, R. ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Rev. Ass. Med Brasil*, v.46, n.3, p.265-71, 2000.

- 43 FONSECA, M.R.M. *Química integral*. São Paulo: Ed. FTD S. A., 1993.
- 44 FOREMAN, P.C., BARNES, I. E. A review of calcium hydroxide. *Int. Endod. J.*, v.23, p.283-97, 1990.
- 45 FOUAD, A.F. IL-1 alpha and TNF-alpha expression in early periapical lesions of normal and immunodeficient mice. *J. Dent. Res.*, v.76, p.1548-54, 1997.
- 46 FUSS, Z. et al. Intracanal pH changes of calcium hydroxide pastes exposed to carbon dioxide in vitro. *J. Endod.*, v.22, p.362-4, 1996.
- 47 GALBRAITH, G.M. et al. Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: influence of tumor necrosis factor genotype. *J. Periodontol.*, v.69, p.428- 33, 1998.
- 48 GALLEGOS, C.G. et al. Estudo comparativo da ação de medicamentos à base de P-monoclorofenol utilizados topicamente no tratamento de canal radicular de dentes despulpados e infectados. Estudo bactericida e bacteriostático. *Rev. Bras. Odontol.*, v.5, p.9-16, 1978.
- 49 GÖRDÜYSUS, Ö. An evaluation of antimicrobial efficiency of endo-fill root canal sealant and filling material. *J. Endod.*, v.25, p.652, 1999.
- 50 GUIGAND, M. et al. Evaluation of the cytocompatibility of three endodontic materials. *J. Endod.*, v.25, p.419-23, 1999.

- 51 HAN, G.Y., PARK, S.H., YOON, T.C. Antimicrobial activity of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ containing pastes with *Enterococcus faecalis* in vitro. *J. Endod.*, v.27, p.328-32, 2001
- 52 HOLLAND, R. et al. Reparação dos tecidos periapicais com diferentes formulações de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ – Estudo em cães. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.*, v.53, p.327-31, 1999.
- 53 HORIBA, N. et al. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.71, p.492-5, 1992.
- 54 HORIBA, N. et al. Complement activation by lipopolysaccharides purified from gram - negative bacteria isolated from infected root canals. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.74, p.648-51, 1992
- 55 HOSOYA, N., TAKAHASHI, G., ARAI, T., NAKAMURA, J. Calcium concentration and pH of the periapical environment after applying calcium hydroxide into root canals in vitro. *J. Endod.*, v.27, p.343-46, 2001.
- 56 ITO, H.O. et al. Lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* promote osteoclastic differentiation in vitro. *Arch. Oral Biol.*, v.41, p.439-44, 1996.
- 57 ITOH, A. et al. A survey of filling methods, intracanal medications, and instrument breakage. *J. Endod.*, v.25, p.823-4, 1999.

- 58 JANEWAY JR., C.A., TRAVES, P. Imunidade mediada por células T. In: JANEWAY JR., C.A., TRAVES, P. *Imunologia: sistema imunológico na saúde e na doença*. 2. ed. Porto Alegre: Ed. Artes Médicas, 1997. cap.7, p.1-41.
- 59 JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. bases moleculares da constituição celular. In: JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1997. cap.3, p.40-62.
- 60 KIM, S.K., KARABUCAK, B., WELSCH, H., SIMCHON, S., KIM, S. Intracellular mechanism of substance P-induced vasodilatation in bovine dental pulps. *J. Endod.*, v.27, p.231, 2001. (Abstract)
- 61 KO, H.J., LIM, S.S. Tissue levels of cytokines and pulpal e periapical pathosis. *J. Endod.*, v.23, p.269, 1997. (Abstract)
- 62 KOBAYASHI, M., et al. Intracellular interleukin-1 alpha production in human gingival fibroblasts is differentially regulated by various cytokines. *J. Dent. Res.*, v.78, p.840-49, 1999.
- 63 KOSSODO. S., HOUBA,V., GRAU, G.E. Assaying tumor necrosis factor concentrations in human serum. *J. immunol. Methods*, v.182, p.107-14, 1995.
- 64 KUMUDA, H. et al. Structural study on the free lipide A isolated from lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.*, v.177, p.2098-106, 1995.

- 65 LARA, V.S. *O papel inflamatório dos constituintes dentários humanos: esmalte e dentina*. Ribeirão Preto, 1997. 143p. Tese (Doutorado em Biologia e Morfologia Celular) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- 66 LEONARDO, M.R., SILVA, L.A.B. Medicação tópica entre “sessões, “curativo de demora” em biopulpectomia e necropulpectomia I e II. In: LEONARDO, M.R., LEAL, J.M. *Endodontia: tratamento de canais radiculares*. 3. ed. São Paulo: Ed. Panamericana, 1998. cap.24, p.491-534.
- 67 LEONARDO, M.R. et al. Hidróxido de cálcio em endodontia: avaliação da alteração do pH e da liberação de íons de cálcio em produtos endodônticos à base de hidróxido de cálcio. *RGO*, v.40, p.69-72, 1992.
- 68 LEONARDO, M. R. et al. Determinação de íons de Ca^{+2} , pH e solubilidade de pastas à base de hidróxido de cálcio contendo PMC e PMCC. *Rev. Bras. Odontol.*, v.50, p.5-10, 1993.
- 69 LEONARDO, M.R. et al. Penetrabilidade do “curativo de demora” no sistema de canal radicular. Avaliação de diferentes produtos. *RGO*, v.41, p.199-203, 1993.
- 70 LEONARDO, M.R. et al. Safe an easy way to use calcium hydroxide as a temporary dressing. *J. Endod.*, v.19, p.319-20, 1993.
- 71 LEONARDO, M.R., et al. Avaliação histopatológica dos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães após biopulpectomia e utilização diferentes curativos de demora. *Rev. Bras. Odontol.*, v.32, p.14-19, 1996.

- 72 LEONARDO, M.R. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de pastas utilizadas em endodontia. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.*, v. 53, p. 367-70, 1999.
- 73 LEONARDO, R.T. *Avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos, quanto à alteração morfológica e a liberação de peróxido de hidrogênio, em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos.* Bauru, 1997. 158p. Tese (Doutorado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
- 74 LEONARDO, R.T., et al. Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. *J. Endod.*, v.26, p.328-30, 1999
- 75 LIN, S.-K., et al. Induction of dental pulp fibroblast matrix metalloproteinase-1 gene expression by interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α through a prostaglandin-dependent pathway. *J. Endod.*, v.27, p.185-89, 2001
- 76 MANGAN, D.F., MERGENHAGEM, S.E., WAHL, S.M. Apoptosis in human monocytes possible role in chronic inflammatory diseases. *J. Periodontol.*, v.64, p.461-66, 1993.
- 77 MANGAN, D.F., WELCH, G.R., WAHL, S.M. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and IL-1 beta prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.*, v.146, p.1541-6, 1991.
- 78 MATSUMOTO, T. et al. Factors affecting successful prognosis of root canal treatment. *J. Endod.*, v.13, p.239-42, 1987.

- 79 MIÑANA, M., CARNES, D.L., WALKER III, W. A. pH changes at the surface of root dentin after intracanal dressing with calcium oxide and calcium hydroxide. *J. Endod.*, v.27, n.1, p.43-45, 2001.
- 80 MOLANDER, A., REIT, C., DAHLÉN, G., KVIST, T. Microbiological status of root – filled teeth with apical periodontitis. *Inter. Endod. J.*, v.31, p.1-7, 1998.
- 81 MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, v.43, p.109-42, 1991.
- 82 MORENO, C., et al. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* induces the production of tumor necrosis factor from human and murine macrophages. *Clin. Exp. Immunol.*, v.76, p.240-5, 1989.
- 83 NAGAOKA, S. et al. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. *J. Endod.*, v.21, p.70-3, 1995.
- 84 NAGAOKA, S. et al. Interleukin-8 gene expression by human dental pulp fibroblast in cultures stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide. *J. Endod.*, v.22, n.1, p.9-12, 1996.
- 85 NAIR, P.N.R. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J. Endod.*, v.13, p.29, 1987.
- 86 NAKANE, A. et al. Effects of lipopolysaccharides on human dental pulp cells. *J. Endod.*, v.21, p.128-30, 1995.

- 87 NELSON FILHO, P. *Avaliação da resposta inflamatória, após injeção de diferentes pastas à base de hidróxido de cálcio, no tecido conjuntivo subcutâneo e na cavidade peritoneal de camundongos isogênicos.* Araraquara, 1996. 144p. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
- 88 NELSON FILHO, P. *Efeito da endotoxina (LPS), associada ou não ao hidróxido de cálcio, sobre os tecidos apicais e periapicais de dentes de cães. Avaliação histopatológica.* Araraquara, 2000. 107p. Tese (Doutorado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
- 89 NERWICH, A. et al. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J. Endod.*, v.19, p.302-6, 1993.
- 90 NISSAN, R. et al. Ability of bacterial endotoxin to diffuse through human dentin. *J. Endod.*, v.21, p.62-4, 1995.
- 91 NODA, M. et al. Antibiotic susceptibility of bacteria detected from the root canal exsudate of persistent apical periodontitis. *J. Endod.*, v.26, p.221-4, 2000.
- 92 NORRIS, K.A. Enhancement of macrophage microbicidal activity: supplemental arginine and citrulline augment nitric oxide production in murine peritoneal macrophages and promote intracellular killing of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immunol.*, v.63, p.2793-6, 1995.

- 93 O'BOSKEY Jr., F.J., PANAGAKOS, F.S. Cytokines stimulate matrix metalloproteinase production by human pulp cells during long-term culture. *J. Endod.*, v.24, n.1, p.7-10, 1998.
- 94 ØRSTAVIK, D., HAAPASALO, H. Desinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.6, p.142-9, 1990.
- 95 OUYANG, H.J., CHEN, S.Q., SOMERMAN, M.J., WANG, C-Y. The molecular mechanism of TNF inhibition of periapical bone formation. *J. Endod.*, v.27, p.222, 2001.(Abstract)
- 96 PALMER, R.M.J., FERRIGE, A.G., MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for biological activity of endothelium – derived, relaxing factor. *Nature*, v.327, p.524-6, 1987.
- 97 PENICHE, C.E.C., SAMPAIO, J.M.P., COLLESI, R.R. Verificação do pH de diversas soluções à base de hidróxido de cálcio. *Rev. Odont. UNISA*, v.1, p.5-8, 1996.
- 98 PERALA, D.G. et al. Relative production of IL-1 beta and TNF alpha by mononuclear cells after exposure to dental implants. *J. Periodontol.*, v.63, p.462-30, 1992.
- 99 PERASI, F.T. *Liberção de fator de necrose tumoral alfa (TNFa) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos na presença de cimentos endodônticos*. Araraquara 2000, 141p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
- 100 PEREZ, F. et al. Migration of a *Streptococcus sanguis* strain through the root dentinal tubules. *J. Endod.*, v.19, p.297-301, 1993.

- 101 PETERS, L.B., WESSELINK, P.R., BUIJS, J.F., VAN WINKELHOFF, A.J. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J. Endod.*, v.27, p.76-81, 2001.
- 102 PETERS, L.B., WESSELINK, P.R., MOORER, W.R. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. *Int. Endod. J.*, v.28, p.95-9, 1995.
- 103 PINERO, G.J. et al. The effect of endotoxin on the synthesis of connective tissue matrix components by pulp fibroblasts in vitro. *J. Endod.*, v.3, p.2-7, 1983.
- 104 PISSIOTIS, E., SPANBERG, L.S.W. Toxicity of sonicated extracts of *Bacterioides gingivalis* on human pulpal cells and L929 cells in vitro. *J. Endod.*, v.17, p.553-60, 1991.
- 105 QUEIROZ, C.E.S. *Avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos quanto a liberação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos.* Araraquara, 1997. 133p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
- 106 QUINTERO, J.C. LPS responsiveness in periodontal ligament cells is regulated by tumor necrosis factor-alfa. *J. Dent, Res.*, v.74, p. 1802-11, 1995.
- 107 RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M. Óxido Nítrico. In: RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M. *Farmacologia.* 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1997. cap.10, p.160-168.

- 108 RANSJÖ, M. et al. Synergistic interactions of bradykinin, thrombin, Interleukin-1 and tumor necrosis factor on prostanoid biosynthesis in human periodontal-ligament cells. *Arch. Oral Biol.*, v.43, p.253-60, 1998.
- 109 RANTA, K., HAAPASALO, M., RANTA, H. Monoinfecção of root canal with *Pseudomonas aeruginosa*. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.4, p.269, 1988.
- 110 RASQUIN, O.M. *Citotoxicidade dos cimentos endodônticos frente aos macrófagos*. Rio de Janeiro, 2000. 127p. Tese (Livre Docência em Endodontia) – Faculdade de Odontologia do Rio de Janeiro, Universidade Gama Filho.
- 111 REHMAN, K. et al. Calcium ion diffusion from calcium hydroxide-containing materials in endodontically-treated teeth: An *in vitro* study. *Int. Endod. J.*, v.29, p.271-9, 1996.
- 112 RIBEIRO, F.C. *Aspectos morfológicos dos biofilmes microbianos na osteomielite crônica supurativa e correlações endodôntica e paraendodôntica*. Bauru 1999. 128p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
- 113 RIVERA, E.M., WILLIAMS, K. Placement of calcium hydroxide in simulated canals: Comparison of glycerin versus water. *J. Endod.*, v.20, p.445-8, 1994.
- 114 ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. *Imunologia*. 5.ed. São Paulo: ed. Manole Ltda, 1999, 423p.

- 115 ROSSI, M., WHITCOMB, S., LINDEMANN, R. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α production by human monocytes cultured with L-thyroxine and thyrocalcitonin: relation to severe root shortening. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, v.110, p.399-404, 1996.
- 116 SAFAVI, K.E., NICHOLS, F.C. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J. Endod.*, v.19, p.76-8, 1993.
- 117 SAFAVI, K.E., NICHOLS, F.C. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J. Endod.*, v.20, p.127-8, 1994.
- 118 SAFAVI, K.E., NICHOLS, F.C. Effects of a bacterial cell wall fragment on monocyte inflammatory function. *J. Endod.*, v.26, p.153-5. 2000.
- 119 SCHAFFER, E., BOSSMANN, K. Antimicrobial effect of camphorated chloroxylenol (ED 84) in the treatment of infected root canals. *J. Endod.*, v.25, p.547-51, 1999.
- 120 SCHRÖDER, U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J. Dent. Res.*, v.64, sp. iss., p.541-8, 1985.
- 121 SEGURA, J.J. et al. Calcium hydroxide inhibits substrate adherence capacity of macrophages. *J. Endod.*, v.23, p.444-7, 1997.
- 122 SEN, B.H., SAFAVI, K.E., SPANGBERG, L.S.W. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. *J. Endod.*, v.25, p.235-8, 1999.

- 123 SEUX, D. et al. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells *in vitro* in the presence of calcium hydroxide – containing cement. *Arch. Oral Biol.*, v.36, p.117-28, 1991.
- 124 SILVEIRA, F.F. *Efeito do tempo de ação do curativo de demora à base de hidróxido de cálcio, utilizado em canais radiculares de dentes de cães com lesão periapical crônica induzida. Análise histopatológica e microbiológica.* Araraquara, 1997. 218p. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
- 125 SIQUEIRA JR, J.F., LOPES, H.P., UZEDA, M. Atividade antibacteriana de medicamentos endodônticos sobre bactérias anaeróbias estritas. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.*, v.50, p.326-31, 1996.
- 126 SIQUEIRA JR, J. F., MAGALHÃES, F.A.C., UZEDA, M. Avaliação da atividade antibacteriana de medicação intracanal. *RGO*, v.44, p.271-74, 1996.
- 127 SIQUEIRA JÚNIOR, J.F., LOPES, H.P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int. Endod. J.*, v.32, p.361-9, 1999.
- 128 SIREN, E.K., et al. Microbiological findings and clinical treatment producers in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int. Endod. J.*, v.30, p.91-5, 1997.

- 129 SOARES, J. A. *Estudo microbiológico dos canais radiculares, histopatológico e histomicrobiológico dos tecidos apicais e periapicais, em função do preparo biomecânico e de dois curativo de demora à base de hidróxido de cálcio, utilizados em dois períodos de avaliação, no tratamento endodôntico de dentes de cães, com reação periapical crônica.* Araraquara, 1999. 455p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
- 130 SOEKANTO, A. et al. Toxicity of camphorated phenol and camphorated parachlorophenol in dental pulp cell culture. *J. Endod.*, v.22, p.284-6, 1996.
- 131 STASHENKO, P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endon. Dent. Traumatol.* v.6, p.89-96, 1990
- 132 STOCK, C.J. et al. Bases biológicas para endodontia In: STOCK, C.J. et al. *Atlas e texto de endodontia.* 2. ed. São Paulo: Ed. Artes Médicas, 1997. cap. 1, p.1-38.
- 133 SYDNEY, G. B. *Identificação de bactérias anaeróbias após o preparo do canal radicular com emprego de medicação de Hidróxido de Cálcio em diferentes tempos.* São Paulo, 1996. 149p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
- 134 SYDNEY, G.B., ESTRELA, C. Influence of root canal preparation on anaerobic bacteria in teeth with asymptomatic apical periodontitis. *Braz. Endod. J.*, v.1, p.7-10, 1996.
- 135 TAGGER, M., TAGGER, E., KAFIR, A. Release of calcium hydroxyl ion from set endodontic sealer containing calcium hydroxide. *J. Endod.*, v.14, p.878-82, 1988.

- 136 TAKEICHI, O. et al. Production of human - inducible nitric oxide synthase radicular cysts. *J. Endod.*, v.24, p.157-60, 1998.
- 137 TANI, N., et al. Comparative immunohistochemical identification and relative distribution of immunocompetent cells in sections of frozen or formalin-fixed tissue from human periapical inflammatory lesions. *Endodon. Dent. Traumatol.*, v.8, p.163-9, 1992.
- 138 TANI-ISHII, N., WANG, C.Y., STASHENKO, P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.10, p.213-9, 1995.
- 139 TANI-ISHII, N., et al. Autocrine regulation of osteoclast formation and bone resorption by IL-1 α . *J. Dent. Res.*, v.78, p.1617-23, 1999.
- 140 TEIXEIRA, M.M., WILLIAMS, T.J., HELLEWELL, P.G. Role of prostaglandins and nitric oxide in acute inflammatory reactions in guinea-pig skin. *Br. J. Pharmacol.*, v.110, p.1515-21, 1993.
- 141 THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O. Atividade metabólica das bactérias orais. In: THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O. *Cariologia clínica*. 2. ed. São Paulo: Livraria e Editora Santos, 1995. cap.4, p.71-88.
- 142 TROWBRIDGE, H.O., EMLING, R.C. Os leucócitos do sangue. In: TROWBRIDGE, H.O., EMLING, R.C. *Inflamação: uma revisão do processo*. 4. ed. São Paulo: Ed. Quintessence, 1996. Cap.3, p.43-47.

- 143 TZIAFAS, D., PANAGIOTAKOPOULOS, N, KOMNENOU, A.
Immunolocalization of fibronectin during the early response of dog dental pulp to demineralized dentine on calcium hydroxide – containing cement. *Arch. Oral Biol.*, v.49, p.23-31, 1995.
- 144 UEDA, I., MATSUSHIMA, K. Stimulation of plasminogen activator activity and matrix metalloproteinases of human dental pulp-derived cells tumor necrosis factor- α . *J. Endod.*, v.27, p.175-79, 2001.
- 145 VAN NEROM, A.E.F., DUCATELLE, R., HAESEBROUCK, F.
Oxygen radicals and nitric oxide production by turkey respiratory macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*, v.22, n.4, p.407-16, 1998.
- 146 VASSALLI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.*, v.10, p.411-52, 1992.
- 147 VESPA, G.N.R., CUNHA, F.Q., SILVA, J.S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vivo. *Infect. Immunol.*, v.62, p.5177-82, 1994.
- 148 VIGIL, G.V. et al. Identification and antibiotic sensitivity of bacteria isolated from periapical lesions. *J. Endod.*, v.23, p.110-4, 1997.
- 149 WALTIMO, T.M. et al. In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int. Endod. J.*, v.32, p.421-9, 1999.

- 150 WALTIMO, T.M. et al. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro. *Int. Endod. J.*, v.32, p.94-8, 1999.
- 151 WALTIMO, T.M. et al. In vitro yeast infection of human dentin. *J. Endod.*, v.26, p.207-9, 2000.
- 152 WELLICOME, S.M. A monoclonal antibody that detects a novel antigen on endothelial cells that is induced by tumor necrosis factor, IL-1, or lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, v.144, p. 2558-65, 1990.
- 153 WINK, D.A., MITCHELL, J.B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 25, n.4/5, p.434-56, 1998.
- 154 YAMASAKI, M. et al. Cytotoxic effect of endodontic bacteria on periapical fibroblasts. *J. Endod.*, v.24, p.534-9, 1998.
- 155 YANG, S-F. et al. Anaerobic tissue-dissolving abilities of calcium hydroxide and sodium hypochlorite. *J. Endod.*, v.21, p.613-6, 1995.
- 156 YOSHINUMA, N. et al. The inhibitory effect of endotoxins on growth of human cell lines. *J. Nihon Univ. Sch. Dent.*, v.36, p.139-44, 1994.
- 157 YOSHIMURA, A. et al. Secretion of IL-1 β , TNF- α , IL-8 and IL-1 α by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. *J. Periodontal Res.*, v.32, p.279-86, 1997.

- 158 ZAMBON, J.J., NISSENGARG R.N. Pseudomonadaceae In: NISENGARD, R.J. & NEWMAN, M.G. *Microbiologia oral e imunologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1997. cap.13 p.166-169.
- 159 ZAVISTOSKI, J. et al. Quantitative bacteriology of endodontic infections. *Oral Surg.*, v.49, p.171-4, 1980.
- 160 ZMENER, O., CABRINI, R.L. Effects of three calcium hydroxide based materials on human blood monocytes and lymphocytes. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.3, n.1, p.28-32, 1987.

QUEIROZ, C.E.S. *Avaliação da ação do hidróxido de cálcio sobre LPS de Pseudomonas aeruginosa por meio da liberação de óxido nítrico e TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos*. Araraquara, 2001. 159p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Câmpus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Resumo

O autor avaliou a capacidade do hidróxido de cálcio em neutralizar o LPS de *Pseudomonas aeruginosa*, através de duas metodologias, a liberação de óxido nítrico e Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos. O autor concluiu que o LPS bacteriano é um potente estimulador da produção de NO e TNF- α e que o tratamento deste LPS com hidróxido de cálcio causa sua inativação.

Palavras-chaves: Macrófago; óxido nítrico; canais radiculares; fator de necrose tumoral-TNF-alfa.

QUEIROZ, C.E.S. *Avaliação da ação do hidróxido de cálcio sobre LPS de Pseudomonas aeruginosa por meio da liberação de óxido nítrico e TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos*. Araraquara, 2001. 162p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Câmpus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Abstract

It was evaluated the calcium hydroxide in neutralising “*Pseudomonas aeruginosa*”’s LPS. Two methodologies were used; NO and TNF- α liberation in macrophage’s rat culture. It was concluded that Ca(OH)₂ inhibited TNF- α and NO liberation.

Palavras-chaves: Macrophage; Nitric oxide; Root canal; Tumor necrosis factor-alfa (TNF- α)