



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

ESTEBAN ISAI FLORES OROZCO

**EFEITO DO ULTRASSOM NA ELIMINAÇÃO DE MICRO-
ORGANISMOS E ENDOTOXINAS EM DENTES COM INFECÇÃO
ENDODÔNTICA PRIMÁRIA**

2016

ESTEBAN ISAI FLORES OROZCO

**EFEITO DO ULTRASSOM NA ELIMINAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS E
ENDOTOXINAS EM DENTES COM INFECÇÃO ENDODÔNTICA PRIMÁRIA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Área de Endodontia.

Orientadora: Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2016

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2016]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Orozco, Esteban Isai Flores

Efeito do ultrassom na eliminação de micro-organismos e endotoxinas em dentes com infecção endodôntica primária / Esteban Isai Flores Orozco. - São José dos Campos : [s.n.], 2016.

99 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2016.

Orientador: Marcia Carneiro Valera.

1. Infecção endodôntica primária. 2. Lesão periapical. 3. Micro-organismos. 4. Endotoxinas. 5. Ultrassom. I. Valera, Marcia Carneiro, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Titular Márcia Carneiro Valera (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Professor Adjunto Carlos Henrique Ribeiro Camargo

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Professor Dr. Renato Miotto Palo

Universidade Paulista (UNIP)

Campus Campinas

São José dos Campos, 07 de Dezembro de 2016.

Dedico este trabalho aos meus pais
Ignacio e Amalia, por serem um exemplo
de luta e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de superar-me a cada dia, por me dar uma família tão maravilhosa e por fazer que meu caminho esteja sempre cheio de luz.

Agradeço à minha orientadora, Professora Titular Marcia Carneiro Valera, por acreditar em mim e por me dar a oportunidade de crescer tanto profissionalmente quanto pessoalmente, além de me brindar com toda sua paciência e sua grande sabedoria. Pelo resto da minha vida estarei inteiramente agradecido por saber que foi ela que me incentivou o grande espírito da ciência.

Agradeço ao Diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista campus São José dos Campos Estevão Tomomitsu Kimpara, ao Diretor do Departamento de Odontologia Restauradora Alexandre Borges e à própria instituição, por me receber como mais um aluno. Por fazer do campus um espaço confortável de conhecimento e convivência.

A todos os professores da Endodontia da Unesp, pelo apoio que todos me proporcionaram na minha formação institucional. Ao Professor Claudio Antonio Talge Carvalho, Professor Carlos Henrique Ribeiro Camargo, Professor Frederico Canato Martinho, Professora Ana Paula Martins Gomes, Professora Simone Helena Gonçalves de Oliveira.

Agradeço ao professor Eduardo Bresciani pelo apoio incondicional nesta pesquisa, e pela amizade criada durante o processo.

Professora Flavia Goulart da Rosa Cardoso, agradeço toda a ajuda que você me prestou durante o curso, lembrando sempre da sua competência e alegria características.

Agradeço ao professor Renato Miotto Palo por ter me mostrado o caminho para realizar meus sonhos. Por acreditar em mim sem me conhecer e me dar uma oportunidade pra continuar em frente.

Agradeço a meus tres irmãos Erik Ismael Flores Orozco, Elan Ignacio Flores Orozco e Edgar Ivan Flores Orozco, por serem os pilares mais importantes da minha vida.

Agradeço a minha alma mater, a Universidad Autonoma de Nayarit, e seus lideres, por acreditarem em mim e na minha formação acadêmica. A aquela que um dia foi meu segundo lar, à Federación de Estudiantes de la UAN casa formadora de lideres e ao Presidente da mesma Angel Aldrete Lamas.

Agradeço a minhas amigas incondicionais que incansavelmente me apoiaram em momentos de dificuldade e alegria durante minha formação como Mestre, obrigado Cassia Cestaria Toia, obrigado Daiana Cavalli, obrigado Rayana Duarte Khoury. Por sempre ficarei muito agradecido por serem parte da minha vida.

Aos meus colegas e amigos do curso de Odontologia Restauradora na área de Endodontia Alessandra Manchini, Amjad Nafez Abu Hasna, Claudia Ferreira, Carlos Ferrari, Diego Rabello, Felipe Matos, Fernanda Carvalho, Monique Costa Moreira França, Renata Falchete do Padro, Tatiana Cristiano Bittencourt, a todos vocês, obrigado.

Agradeço à secretaria da Pós-graduação, Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka, Ivan Oliveira Damasceno, Rosemary De Fátima Salgado e Sandra Mara Cordeiro pela grande ajuda e amizade que me proporcionaram durante todo o tempo na instituição.

Aos meus amigos Andre Wood, Evandro Utrini, Julio Ferraz, Pedro Alburquerque, Pedro Murillo Xavier, Rafael Ribeiro, Shun Maeda, Tiago Borges, por todos nós juntos termos formado um lar, a República Saudosa Maloca.

Agradeço a Ana Carolina Marques por me brindar todo seu apoio e carinho, por ter sua companhia e seu respaldo sempre em toda decisão que eu tomasse.

Aos meus amigos do Departamento da Prótese, Eliseo Pablo Chun, Júlio Nogueira Luz e Rodrigo Diniz por compartilharem uma grande amizade e convivência, cheia de experiências e aprendizagens.

A todos os envolvidos nesta grande luta, por me encontrar fora de casa, por terem me apoiado no meu crescimento pessoal, obrigado por me permitirem fazer parte da suas vidas e conseqüentemente, vocês parte da minha.

Muito obrigado.

“De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando,
a certeza de que é preciso continuar,
a certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar.
Façamos da interrupção um caminho novo,
da queda, um passo de dança,
do medo, uma escada,
do sonho, uma ponte,
da procura, um encontro!”

Fernando Sabino

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Ultrassom na limpeza do sistema de canais radiculares.....	21
2.2 Infecção endodôntica.....	26
2.3 Comparativa entre radiografia periapical e tomografia computadorizada de feixe cônico nas lesões periapicais.....	30
3 PROPOSIÇÃO	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Seleção de pacientes.....	34
4.2 Seleção dos casos.....	34
4.3 Divisão dos grupos.....	36
4.4 Intervenção Odontológica.....	37
4.5 Coletas do canal radicular.....	39
4.6 Preparo Biomecânico.....	40
4.7 Medicação Intracanal.....	41
4.8 Obturação dos canais radiculares.....	42
4.9 Atividade antimicrobiana.....	43
4.10 Quantificação de Endotoxinas.....	45
4.11 Análise por <i>checkerboard</i>	47
4.11.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento.....	47
4.11.2 Isolamento do DNA e preparo das sondas.....	49
4.11.3 <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	50
4.12 Análise volumétrica da destruição óssea periapical.....	52
4.13 Análise volumétrica dos canais radiculares.....	54
4.14 Análise estatístico.....	55

5 RESULTADOS	57
5.1 Monitoramento do perfil microbiológico.....	57
5.1.1 Método de cultivo microbiológico.....	57
5.1.2 Monitoramento por <i>checkerboard</i> do perfil durante as diferentes fases do tratamento endodôntico.....	61
5.2 Associação de sinais e sintomas com microbiota presente e complexos.	68
5.3 Quantificação de endotoxinas	69
6 DISCUSSÃO	72
6.1 Da metodologia.....	72
6.2 Dos resultados.....	74
7 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICES	89
ANEXOS	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Radiografias digitais dos dentes com presença de necrose pulpar e lesão periapical selecionados para tratamento endodôntico.....	35
Figura 2 - Descrição dos critérios de inclusão e exclusão.....	35
Figura 3 - Intervenção odontológica.....	38
Figura 4 - Coletas do conteúdo do canal radicular.....	39
Figura 5 - Sequência do tratamento e divisão dos grupos experimentais.....	41
Figura 6 - Diluições seriadas a partir da amostra matriz.....	43
Figura 7 - Análise da presença de micro-organismos e contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).....	45
Figura 8 - Quantificação de endotoxinas.....	46
Figura 9 - Teste checkerboard DNA-DNA hybridization	52
Figura 10 - Placas <i>petri</i> para cultura microbiológica, evidenciando o crescimento de colônias bacterianas.....	57
Figura 11 - Gráfico referente a frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano em amostras de canais radiculares na primeira coleta.....	62
Figura 12 - Gráfico referente a frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano em amostras de canais radiculares na segunda Coleta.....	63

Figura 13 - Gráfico referente a frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano em amostras de canais radiculares na terceira Coleta.....	64
Figura 14 - Gráfico de linhas mostrando a diferença entre o valor médio da carga bacteriana balanceado pelo número de pacientes para todas as espécies pesquisadas nas diferentes fases do tratamento endodontico.....	67
Figura 15 - Esquema para suspender endotoxina de <i>E. coli</i> utilizando água apirogênica.....	93
Figura 16 - Tubos de vidro apirogênicos necessários para diluição da endotoxina.....	94
Figura 17 - Esquema de diluições da endotoxina para realização da curva padrão.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de micro-organismos aeróbios (UFC/mL) encontrado antes e após cada etapa do tratamento endodôntico.....	58
Tabela 2 - Média do número de micro-organismos aeróbios encontradas em cada grupo inicialmente e após o tratamento.....	59
Tabela 3 - Número de micro-organismos anaeróbios (UFC/mL) encontrado antes e após cada etapa do tratamento endodôntico.....	60
Tabela 4 - Média do número de micro-organismos anaeróbios encontradas em cada grupo inicialmente e após o tratamento.....	61
Tabela 5 - Sinais e sintomas nos diferentes grupos experimentais.....	68
Tabela 6 - Distribuição porcentual dos sinais e sintomas nos diferentes grupos experimentais.....	68
Tabela 7 - Quantificação de endotoxinas (EU/mL) antes e durante o tratamento endodôntico.....	70
Tabela 8 - Média do número de endotoxinas encontradas em cada grupo inicialmente e após o tratamento	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Duas Dimensões
3D	Três dimensões
CLX	Clorexidina
CT	Comprimento de Trabalho
EU/mL	Unidades de Endotoxina por mL
HC+SS	Hidróxido de Cálcio + Solução Salina Fisiológica
LPS	Lipopolissacarídeos
MIC	Medicação Intracanal
NaOCl	Hipoclorito de Sódio
PBM	Preparo Biomecânico
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
PMNs	Polimorfonucleares
PUI	Irrigação Ultrassônica Passiva
RP	Radiografia Periapical
SCR	Sistema da canais radiculares
TC	Tomografia Computadorizada
TCFC	Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFC/mL	Unidades formadoras de Colônia por mL

Orozco EIF. Efeito do ultrassom na eliminação de micro-organismos e endotoxinas em dentes com infecção endodôntica primária [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2016.

RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram: a) Verificar a carga microbiana e quantificar endotoxinas presentes nos canais radiculares de dentes com infecção endodôntica primária; b) Comparar a efetividade antibacteriana e sobre endotoxinas do preparo biomecânico com dois métodos de irrigação final: com ou sem irrigação ultrassônica passiva; c) Correlacionar sinais e sintomas com a microbiota presente e complexos bacterianos; d) Relacionar níveis de endotoxinas e carga microbiana com sinais e sintomas clínicos. Foram selecionados para o estudo 20 dentes uniradiculares, que apresentavam infecção endodôntica primária e lesão periapical, sendo estes submetidos a TCFC. Os canais foram preparados com sistema recíprocante e irrigação com NaOCl 2.5%, seguido de dois protocolos de irrigação final: com e sem uso de ultrassom. Todos os canais foram preenchidos com MIC com hidróxido de cálcio + soro fisiológico e após 14 dias foram obturados com cones de guta-percha e cimento AH Plus. Foram realizadas coletas do conteúdo do canal, logo após a abertura coronária (1ª Coleta); após PBM (2ª Coleta) e após limpeza final dos canais com NaOCl seguido de EDTA por 5 min (grupo sem PUI); ou irrigação com NaOCl + PUI e EDTA + PUI (3ª Coleta) (grupo com PUI). Foram avaliados sinais/sintomas clínicos prévios ao tratamento. O conteúdo das coletas foi analisado a partir de sondas de DNA pelo método de hibridização DNA-DNA checkerboard e foi realizado teste de avaliação da atividade antimicrobiana por cultura microbiológica. Além disso foi realizada quantificação de endotoxinas pelo Lisado de Amebócitos de *Limulus* (LAL). E a volumetria dos canais foi feita através da TCFC utilizando o *software* Nemotec®. Os resultados foram submetidos a análise estatística pelos testes Mann Whitney e teste ANOVA a dois fatores de medidas repetidas (5%). Valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. Houve associação entre dor à percussão e complexos laranja principal e laranja periférico. Fístula foi associada ao complexo laranja principal e laranja periférico. Foi observada redução de bactérias após o tratamento endodôntico. Ao utilizar o método de hibridização DNA-DNA checkerboard, as bactérias mais prevalentes foram *S. constellatus*, *E. faecalis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. melaninogenica* e *S. intermedius* na primeira coleta. Os métodos de irrigação diminuíram número de espécies bacterianas comparado à coleta inicial. A irrigação ultrassônica passiva apresentou diferença estatística significativa sobre bactérias anaeróbias. PUI não apresentou diferença significativa sobre bactérias aeróbias nem endotoxinas comparado com irrigação convencional. Concluiu-se que todos os canais apresentaram micro-organismos sendo que anaeróbios estiveram presentes em grande quantidade. Após preparo biomecânico do canal radicular e irrigação com PUI, houve redução significativa da carga de micro-organismos anaeróbios. Os micro-organismos mais resistentes ao preparo biomecânico com e sem PUI foram *S. constellatus*, *E. faecalis*, *S. intermedius* e *L.*

bucalis. Houve associação positiva entre sinais e sintomas clínicos com complexo laranja e com micro-organismos. Os níveis de endotoxinas diminuíram após o preparo biomecânico não foram inferenciados por PUI a irrigação convencional.

Palavras-chave: Infecção endodôntica primária. Lesão periapical. Micro-organismos. Endotoxinas. Ultrassom.

Orozco EIF. *Ultrasound effect in eliminating microorganisms and endotoxins in teeth with primary endodontic infection [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2016.*

ABSTRACT

The objective of this study were: a) to check the microbial load and to quantify endotoxin present in the root canals of teeth with primary endodontic infection; b) to compare the effectiveness of bacteria and endotoxin reduction of the biomechanical preparation with final irrigation methods: with or without passive ultrasonic irrigation (PUI); c) to correlate signs and symptoms with the present microbiota and bacterial complexes; d) to relate endotoxin and microbial load levels with signs and symptoms before biomechanical preparation. Twenty single-root teeth were selected for the study, presenting primary endodontic infections and periapical lesion, which underwent CBCT. The canals were prepared with reciprocating system and irrigation with 2.5% NaOCl, followed by two final irrigation protocols: with and without ultrasound. All canals were filled with MIC with calcium hydroxide + saline and after 14 days were filled with gutta percha and AH Plus. Samples from the content of canal were harvested, after coronal opening (1st Sample); after PBM (2nd Sample) and after final cleaning of the canals with NaOCl followed by EDTA for 5 min (group without PUI); or irrigation with NaOCl + PUI and EDTA + PUI (3rd Sample) (group with PUI). The contents of the samples were analyzed from DNA probes by the DNA-DNA checkerboard hybridization method and a test was performed to evaluate the antimicrobial activity by microbiological culture. In addition, quantification of endotoxins by *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) was performed. The canal volumetry was assessed through the CBCT using Nemotec® software. The results were submitted to statistical analysis by Mann Whitney and repeated measures two-way ANOVA (5%). Value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. There was an association between pain at percussion and main orange and peripheral orange complexes. Fistula was associated with the main orange and peripheral orange complex. A reduction of bacteria was observed after endodontic treatment. When using the DNA-DNA checkerboard hybridization method, the most prevalent bacterias were *S. constellatus*, *E. faecalis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. melaninogenica* and *S. intermedius* in the first collection. Irrigation methods decreased number of bacterial species compared to initial collection. The passive ultrasonic irrigation presents statistically significant difference on anaerobic bacteria. PUI did not present significant difference on aerobic bacteria or endotoxins compared to conventional irrigation. In conclusion, all canals had microorganisms, and anaerobes were present in large quantities. The most frequent microorganisms were *S. constellatus*, *E. faecalis*, *F. nucleatum* SP, *P. gingivalis* e *S. intermedius*. After biomechanical preparation of root canal and irrigation with PUI, there was a significant reduction of the anaerobic microorganism load. The microorganisms most resistant to biomechanical preparation with and without PUI were *S. constellatus*, *E. faecalis*, *S. intermedius* e *L. bucalis*. There was a positive association between clinical signs and symptoms with orange complex and with microorganisms. Endotoxin

levels decreased after biomechanical preparation, while not influenced by PUI in comparison to conventional irrigation.

Keywords: Primary endodontic infection. Periapical lesion. Microorganisms. Endotoxins. Ultrasound.

1 INTRODUÇÃO

O sistema de canais radiculares é formado por uma complexa rede de ramificações, delta apical, presença de irregularidades e istmos que permitem a colonização e proliferação dos micro-organismos no seu interior (Tennert *et al.*, 2014). Os objetivos do tratamento endodôntico são a limpeza e modelagem do sistema de canal radicular a fim de eliminar a infecção presente em todas as áreas de propagação microbiana e posteriormente preencher adequadamente este espaço com um material biologicamente inerte e fisicamente estável (Hülsmann *et al.*, 2005). Para se obter a limpeza do canal, a etapa mais significativa é o preparo biomecânico que elimina o tecido pulpar necrótico e grande parte dos micro-organismos a fim de obter-se o sucesso desta terapia. Entretanto, devido à complexa anatomia do sistema de canais é difícil eliminar completamente a infecção, sendo que a persistência de micro-organismos é a maior causa de insucessos do tratamento endodôntico (Tennert *et al.*, 2014).

As infecções endodônticas primárias são polimicrobianas, com presença de micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, com predominância de bactérias anaeróbias (Sundqvist, 1992). Algumas bactérias anaeróbias especialmente as Gram-negativas, estão envolvidas com sintomas clínicos e exercem um importante papel na patogênese das infecções periapicais (Gomes *et al.*, 2007). Estas bactérias produzem resíduos metabólicos e possuem produtos próprios, como os lipopolissacarídeos (LPS) que é uma endotoxina. O LPS é liberado durante a multiplicação das bactérias ou a partir da fagocitose das bactérias por macrófagos e têm uma elevada toxicidade. LPS atua sobre macrófagos, neutrófilos e fibroblastos levando a liberação de vários mediadores bioativos e citocinas inflamatórias como prostaglandinas, leucotrienos, fatores de ativação de plaquetas, complemento 3 e 5 e interleucina I (Mohammadi, Dummer, 2011).

Devido a presença de micro-organismos e seus produtos, durante o tratamento endodôntico deve-se utilizar substâncias químicas durante o preparo dos e como medicação intracanal que atuem sobre a infecção e sobre os produtos destes micro-organismos. Soluções como o hipoclorito de sódio (NaOCl), possui este efeito, uma vez que possui efetiva ação solvente e excelente ação

antimicrobiana (Kuruvilla, Kamath, 1998; Valera *et al.*, 2013), sendo indicado como irrigante em diferentes concentrações durante o tratamento endodôntico. No entanto, o NaOCl é incapaz de remover a camada de *smear layer* (Chang *et al.*, 2001; Menezes AC *et al.*, 2003; Asna Ashari *et al.*, 2009; Valera *et al.*, 2010), uma vez que não atua sobre a parte inorgânica da camada residual; assim, para a melhor remoção desta camada torna-se necessário o uso de uma solução que tenha propriedades desmineralizantes (Hülsmann *et al.*, 2003). Para essa finalidade, agentes quelantes têm sido indicados, sendo o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a substância química mais utilizada, com eficiência comprovada na dissolução de *smear layer* (Carvalho *et al.*, 2008; Haapasalo M *et al.*, 2010; Valera *et al.*, 2010; Martins Justo *et al.*, 2014)

Buscando promover uma melhor efetividade das soluções irrigadoras especialmente nas áreas de difícil acesso, novos métodos de irrigação vêm sendo propostos (Gu *et al.*, 2009; Gulabivala *et al.*, 2010). A irrigação ativada com ultrassom potencializa as propriedades da solução irrigadora devido aos diferentes fenômenos que ocorrem durante a aplicação do mesmo no canal radicular. A agitação, cavitação, microcorrente acústica e geração de calor irão produzir efeitos nas estruturas dentais, especialmente sobre a dentina e *smear layer*, que em combinação com soluções irrigadoras aumentam os efeitos antimicrobianos (Padrón, 2006). De acordo com Briseno *et al.* (1992), a utilização do NaOCl associado ao ultrassom faz com que ocorra maior eliminação de resíduos da camada de *smear layer*, levando a melhor limpeza do sistema de canais radiculares.

Na prática endodôntica, utiliza-se o NaOCl seguido do EDTA pois o NaOCl atua na matéria orgânica enquanto que o EDTA remove o componente inorgânico da camada residual deixada nas paredes do canal durante o preparo biomecânico (Baumgartner, Mader, 1987; Briseno *et al.*, 1992). Sendo assim, a combinação destes irrigantes associados e a ativação por ultrassom pode resultar em maior limpeza dos canais radiculares e aumento das propriedades antimicrobianas dos irrigantes (Al-Jadaa *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2010), contribuindo para maior sucesso da terapia endodôntica.

Entretanto, as bactérias presentes no sistema de canais radiculares, e zonas de propagação microbiana podem não ser atingidas durante a instrumentação e irrigação, sendo necessário o uso de medicação intracanal para auxiliar na

eliminação das bactérias e seus produtos, possibilitando assim atingir maior o sucesso clínico (Katebzadeh *et al.*, 1999; Nelson-Filho *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2015). Entre as substâncias utilizadas, o hidróxido de cálcio, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ é a principal medicação intracanal devido a suas propriedades antimicrobianas contra a maioria dos agentes patogênicos (Athanasiadis *et al.*, 2007; Mohammadi, Dummer, 2011; Mohammadi *et al.*, 2012; Capar *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2015).

Assim, o presente trabalho foi delineado com objetivo de avaliar a eficácia da instrumentação endodôntica com NaOCl e EDTA ativados ou não com ultrassom, e uso de medicação intracanal com $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Espera-se com este estudo, verificar que a agitação dos irrigantes com ultrassom após o preparo biomecânico, reduzirá a carga microbiana e endotoxinas dos canais radiculares em comparação a não utilização da ativação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ultrassom na limpeza do sistema de canais radiculares

O sucesso do tratamento endodôntico baseia-se na eliminação dos micro-organismos, tecido infectado ou necrosado dentro do sistema de canais radiculares, e do completo selamento do canal radicular, a fim de eliminar a infecção e prevenir a reinfecção da cavidade pulpar (Lin *et al.*, 1992).

Durante a instrumentação do canal radicular ocorre a deposição de uma camada de debris nas paredes do canal radicular denominada lama dentinária ou *smear layer*, constituída por uma parte inorgânica, raspas de dentina, e uma parte orgânica composta por tecido necrótico ou vital, podendo incluir remanescentes de processos odontoblásticos, tecido pulpar e bactérias (Mccomb, Smith, 1975).

Para otimizar a desinfecção do canal radicular, a remoção de micro-organismos e seus produtos e a remoção de *smear layer*, os protocolos de irrigação final com o uso de irrigação ultrassônica passiva (PUI), tem sido altamente utilizados.

Van Der Sluis *et al.* (2005) analisaram e compararam a eficácia de um arame liso e uma lima K convencional, na remoção de detritos de dentina na ranhura feita em canais radiculares de blocos de resina, durante a irrigação ultrassônica. Cada bloco de resina com um canal simulado, foi dividido longitudinalmente formando duas metades. Foi feito nas paredes do canal, um padrão de ranhura de 4 mm de comprimento, 0.2 mm de largura e 0.5 mm de espessura. Cada ranhura foi preenchida com detritos de dentina misturada com NaOCl 2%, para simular uma situação em que o cone acumula detritos nas extensões do canal radicular. Cada canal foi remontado nas duas metades do bloco de resina mediante fios e cera pegajosa. Os canais foram irrigados com ultrassom e NaOCl 2% durante 3 minutos. Em um grupo (n = 20) foi utilizada uma lima K convencional. No outro grupo foi utilizado um arame liso com um diâmetro e comprimento igual ao lima K. Antes e após a irrigação, as imagens com as ranhuras de cada metade foram tomadas, usando um microscópio e uma câmara digital, e posteriormente digitalizadas em um

computador. A quantidade de detritos de dentina na ranhura foi avaliada utilizando um sistema de pontuação, quanto maior o valor, maior é a quantidade de detritos remanescentes. Os dados da contagem foram analisados mediante o teste de Mann-Whitney. Os resultados mostraram não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0.429$), concluindo que o uso de um arame liso durante a irrigação ultrassônica é tão eficaz como uma lima K15, na remoção de debris feito artificialmente em blocos de resina.

Van Der Sluis *et al.* (2006) pesquisaram a influência do volume do irrigante e o método de limpeza na remoção de detritos no ápice dos canais radiculares durante a irrigação com uso de ultrassom de forma passiva. Quinze dentes caninos foram divididos em grupos: no grupo 1: o canal foi irrigado mediante fluxo contínuo com 50 ml de hipoclorito de sódio 2%; grupo 2: o canal não foi irrigado com fluxo contínuo, utilizando 12 ml de hipoclorito de sódio 2% lavando 2 ml cada 30 segundos; grupo 3: foi tratado da mesma maneira que o do grupo 2, mas foi lavado com 6 ml de NaOCl 2% a uma velocidade de 2 ml/minuto; grupo 4: tratado da mesma forma que o grupo 1, sendo utilizado neste último água como irrigante. Foi avaliada a quantidade de debris no interior das ranhuras do canal. Verificaram que os grupos 1, 2 e 3 diferiram significativamente do grupo 4, sendo entre os grupos 1, 2 e 3 não houve diferença estatística significativa ($p = 0.550$). Concluiu-se que a irrigação com 6 e 12 ml de NaOCl 2% foi tão eficaz quanto o fluxo contínuo de 50 ml de NaOCl 2%. E que a água não foi capaz de remover detritos das ranhuras da porção apical do canal radicular.

A irrigação com NaOCl em combinação com o ultrassom, um sistema de onda vibratória, tem o maior efeito antibacteriano. Este método melhora a troca de substâncias dentro do canal, permite o aquecimento de substâncias e elimina os detritos e a camada de resíduos, permitindo assim maior limpeza (Briseno *et al.*, 1992). Em geral, a literatura recomenda deixar atuar o NaOCl um período de tempo de 30 segundos a 3 minutos, sendo que não existe um consenso sobre o tempo definido de atuação do mesmo.

Carvalho *et al.* (2008) avaliaram a eficácia das substâncias químicas utilizadas na irrigação do canal radicular durante o preparo biomecânico. Analisaram 32 dentes humanos unirradiculares fazendo uma instrumentação estandarizada e utilizando diferentes protocolos de irrigação. No G1 usou-se NaOCl 2.5 % + EDTA %17, G2

clorexidina gel 2% + EDTA 17%, no G3 Canal Plus + NaOCl 2.5 e G4 solução saline + EDTA 17%. Após a instrumentação analisaram a limpeza dos túbulos dentinários nos diferentes terços radiculares mediante Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os resultados mostraram diferença estatística com alta quantidade de túbulos dentinários abertos nos grupos 1 e 3, e sendo que em todos os grupos a limpeza do terço cervical foi melhor do que nos terços médio e apical, com uma diferença estatística significativa no grupo de clorexidina com NaOCl, concluindo que a combinação de NaOCl seguido do EDTA produz melhor limpeza do canal radicular.

Em um estudo *in vitro* feito por Tardivo *et al.* (2010) analisou-se o efeito antibacteriológico da irrigação ultrassônica passiva (PUI) associada ao NaOCl 5.25%, verificando que não houve diferença entre o regime de PUI, seringa de irrigação e ativação sônica passiva na eliminação de *E. faecalis*.

Amato *et al.* (2011) compararam a eficácia da irrigação heterodinâmica, a irrigação ultrassônica ativada e seringa convencional na remoção de detritos de dentina em canais radiculares retos e curvos. Doze dentes humanos foram selecionados para o estudo. 6 pré-molares unirradiculares com canais retos e 6 raízes de molares com canais curvos foram instrumentados até lima 45 e divididos longitudinalmente. Para simular irregularidades do canal, foram realizados 3 furos standardizados nas paredes do canal. Os canais e furos foram então cobertos com detritos. Após, as metades foram remontadas e as 3 técnicas de irrigação foram comparadas, irrigação convencional com seringa, irrigação heterodinâmica, e irrigação ativa com ultrassom. Os resultados mostraram que as técnicas de irrigação hidrodinâmicas e de ultrassom foram significativamente ($P < 0.001$) mais eficientes em comparação com a seringa de irrigação tanto em canais retos quanto em canais curvos. A irrigação ultrassônica mostrou maior eficácia na limpeza dos canais retos ($P, 0.01$), sendo que a irrigação hidrodinâmica foi mais eficiente nos canais curvos.

Mancini *et al.* (2013) avaliaram a eficácia de diferentes métodos de irrigação na remoção de *smear layer* no 1, 3, 5 e 8 mm a partir do ápice radicular. 65 pré-molares inferiores unirradiculares tiveram suas coroas removidas e foram instrumentados com Protaper F4 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) e irrigação com NaOCl 5.25% a 37°C. Os dentes foram divididos em 5 grupos (2 grupos controle $n = 10$) e 3 grupos para teste ($n = 15$) de acordo com a técnica de

irrigação final utilizada: PUI: ativar com ultrassom; EA: ativar com sistema EndoActivator; EV: ativar com sistema EndoVac. Após, os canais foram divididos longitudinalmente e avaliados mediante microscopia eletrônica de varredura. Os dados foram analisados, o sistema EndoActivator foi significativamente mais eficiente do que PUI e os grupos controle na remoção da camada de debris nos 3,5 e 8 mm. O sistema EndoVac (Discus Dental, Culver City, CA) removeu estatisticamente maior quantidade de smear layer que nos grupos restantes desde 1, 3, 5 e 8 mm. PUI e EndoVac não diferiram estatisticamente nos 5 e 8 mm, mas ambos realizaram uma limpeza melhor que nos grupos controle. Concluindo-se que nenhum dos sistemas de ativação removeu completamente a camada de *smear layer* das paredes de dentina. No entanto, EndoActivator e EndoVac mostraram melhores resultados: em 3, 5 e 8 mm (EndoActivator) e nos 1, 3, 5 e 8 mm (EndoVac).

Martins Justo *et al.* (2014) realizaram um estudo em vitro comparando a efetividade da solução salina, NaOCl 2.5% e clorexidina 2% ativadas com PUI, na remoção de debris em irregularidades simuladas no preparo do canal radicular. Os 90 espécimes de dentes bovinos foram divididos em 3 grupos experimentais (n=30) de acordo com os irrigantes utilizados, e foram instrumentados com lima manual e sistema oscilatório NSK, (Tokyo, Japan). Foram utilizados diferentes protocolos de irrigação final associados ou não a PUI (hipoclorito/PUI, clorexidina/PUI e solução salina/PUI). Nos grupos PUI foi realizada ativação 3 vezes por 20 segundos. Após os dentes foram analisados por MEV, os resultados mostraram maior remoção de detritos nos grupos onde foi utilizado o ultrassom ($P < 0.05$), sendo que não teve diferença estatística entre os irrigantes ativados com PUI ($P = 0.87$). Concluíram que com a utilização de PUI houve melhores resultados na remoção de debris, que nos grupos onde não foi utilizado o ultrassom.

Macedo *et al.* (2014) quantificaram a possível ocorrência de cavitação transitiva (formação de bolhas e implosão) durante a irrigação ultrassônica e sônica ativa (UAI). A quantidade de cavitação gerada ao redor de vários instrumentos endodônticos foi medida em canais radiculares com complexidade e dimensões variáveis. A frequência da instrumentação oscilatória, energia ultrassônica e limas de instrumentação influenciam na quantidade e ocorrência da cavitação. Os resultados mostraram que na UAI, a cavitação foi distribuída entre a lima e a parede do canal,

se estendendo dentro de canais laterais/istmos. Na irrigação sônica ativa, não foi detectada a cavitação. As conclusões mostraram cavitação na Irrigação Ultrassônica Ativa em configurações clinicamente relevantes, tanto em canais retos quanto curvos.

Metri *et al.* (2015) avaliaram a limpeza do canal radicular mediante duas técnicas de irrigação final, fazendo interagir NaOCl e Clorexidina. 60 dentes incisivos foram divididos em 3 grupos (n=20), o grupo 1; irrigados com 5 ml de NaOCl 2.5% e 5 ml de clorexidina 2%, o grupo 2: irrigou-se com 5 ml de NaOCl e 5 ml de clorexidina 2%, somando mais 5 ml de solução salina e agitado com lima F; o grupo 3; irrigação com 5 ml de NaOCl 2.5% e 5 ml de clorexidina 2%, adicionando 5 ml de ácido cítrico ao 15% mais agitação passiva com ultrassom. Posteriormente os dentes foram clivados e analisados no estereomicroscópio, onde pode-se perceber diferença significativa entre os grupos 2 e 3 comparados com o grupo 1, concluindo que a irrigação passiva ultrassônica é mais efetiva quanto a técnica com agitação da lima F.

Schmidt *et al.* (2015) avaliaram a eficácia da irrigação ultrassônica passiva (PUI) com EDTA 17% e NaOCl 1% na remoção de *smear layer*. Trinta e dois dentes humanos foram preparados mecanicamente com o sistema Protaper, que foram divididos em 4 grupos de acordo com os diferentes protocolos de irrigação final: grupo 1, EDTA + NaOCl; grupo 2 EDTA com PUI + NaOCl; grupo 3, EDTA + NaOCl com PUI; e grupo 4 EDTA + NaOCl ambos com PUI. Os dentes foram clivados longitudinalmente para permitir a quantificação de *smear layer* nos terços cervical, médio e apical utilizando microscopia eletrônica de varredura. Os terços cervicais de todas as amostras de todos os grupos apresentaram maior porcentagem de remoção de *smear layer* com áreas de tubulos dentinários abertos, seguido pelos terços medio e apical. Entre os grupos de irrigação, houve diferença estatística significativa da limpeza do terço cervical entre os grupos 2 e 4, com a maior e a menor porcentagem de remoção de *smear layer*, respectivamente. Concluindo que a PUI utilizando NaOCl 1% e ponta de ultrassom, não mostrou maior eficácia na remoção de *smear layer* em comparação com irrigação convencional.

Kato *et al.* (2016) analisaram a eficácia da irrigação ultrassônica passiva versus o sistema reciprocante Easy Clean (Easy Equipamentos Odontológicos, Belo Horizonte, Brasil) na remoção de debris. Concluindo que ativação do irrigante com o

sistema Easy Clean promove uma remoção mais eficaz de debris das regiões mais apicais do canal radicular quando comparado com PUI.

2.2 Infecção endodôntica

As bactérias presentes nas infecções endodônticas são só um grupo restrito de espécies do total da microbiota bucal. Sendo que algumas bactérias precisam de carboidratos para obtenção de energia. Certas condições presentes no sistema de canais radiculares permitem o crescimento das bactérias anaeróbias capazes da fermentação de aminoácidos e peptídeos. Dado que existe uma forte relação entre as espécies presentes no canal radicular baseada na demanda nutricional, assim a patogenicidade gerada pela comunidade polimicrobiana depende de seu sinergismo (Sundqvist, 1994). As interações bacterianas são decorrentes das necessidades da cadeia alimentar, na qual o próprio metabolismo de algumas espécies produz os nutrientes essenciais para o desenvolvimento de outras (Sundqvist, 1992).

As bactérias *Prevotella* e *Porphyromonas* requerem uma nutrição bem específica dependendo de vitamina K e hemina para seu crescimento. A Vitamina K pode ser produzida por outras bactérias, enquanto que a hemina torna-se disponível pela quebra da hemoglobina (Gibbons, Engle, 1964). Poucas bactérias podem produzir hemina, por exemplo *Camphylobacter rectus*, o qual estimula o crescimento de *Porphyromonas*. *Camphylobacter rectus*, por serem micro-organismos estritamente anaeróbios, necessitam de fontes de energia de outros micro-organismos que produzem hidrogênio, como por exemplo as *Porphyromonas* (Gibbons, Engle, 1964).

Jacinto *et al.* (2003) estudaram a correlação que existe entre a microbiota coletada do canal radicular em dentes com periodontite apical e sua relação com sinais e sintomas, assim como a susceptibilidade dos mesmos ao uso de antibióticos. Foram avaliados 48 coletas de canais radiculares, dos quais, 29 apresentavam sintomatologia e 19 não apresentaram sintomas. Os dentes que apresentaram dor mostraram maior número de crescimento bacteriano principalmente bactérias anaeróbias gram negativas.

Gomes *et al.* (2004) investigaram a microbiota das infecções endodônticas primárias e secundárias em relação com os sinais e sintomas. Do total das amostras cultivadas, 70% pertenceram a bactérias anaeróbias, entre as quais encontraram *Peptostreptococcus micros* 35%, *Fusobacterium necrophorum* 23.3%, *Fusobacterium nucleatum* 11.7%, *Prevotella intermédia/nigrescens* 16.7%, *Porphyromonas gingivalis* 6.7% e *Porphyromonas endodontalis* 5%. Os autores sugerem existe relação entre as bactérias anaeróbias gram negativas e a presença de dor, exudato purulento e edema. Concluindo que existe uma interação potencial entre as espécies bacterianas e as características clínicas, e a grande diferença que pode ter entre a microbiota bacteriana presente nas infecções endodônticas primárias e as infecções endodônticas secundárias.

Sassone *et al.* (2007) avaliaram a composição da microbiota presente nas lesões endodônticas primárias de 111 dentes unirradiculares com necrose pulpar. As amostras foram coletadas utilizando pontas de papel estéreis e analisadas mediante a prova de *checkerboard* e *PCR*, obtendo uma leitura de 40 espécies bacterianas distintas, cujo média refletiu um número em torno de 22 espécies em cada mostra. *Enterococcus faecalis* (89.3%), *Campylobacter gracilis* (89.3%), *Leptotrichia buccalis* (89.3%), *Neisseria mucosa* (87.5%), *Prevotella melaninogenica* (86.6%), *Fusobacterium nucleatum ssp. vincentii* (85.7%), *Eubacterium saburreum* (75.9%), *Streptococcus anginosus* (75%), e *Veillonella parvula* (74.1%) foram as espécies mais prevalentes. Os resultados sugerem que as espécies presentes nas patologias orais são as mesmas envolvidas na etiologia das infecções endodônticas primárias devida sua alta prevalência.

Sassone *et al.* (2008) fizeram um estudo para avaliar a microbiologia presente nas infecções endodônticas primárias com e sem a presença de fístula. Foram pegos 30 casos nos quais a metade teve presença de fístula (n=15), a outra metade não teve presença de fístula (n=15), as amostras foram coletadas com ajuda de uma lima tipo H #15 e dois cones de papel estéreis. O estudo de *checkerboard* determinou a presença de 40 espécies bacterianas distintas, das espécies encontradas em alta prevalência foram *Fusobacterium nucleatum sp. vincentii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Veillonella parvula*, *Enterococcus faecalis*, *Campylobacter gracilis* e *Neisseria mucosa*. Concluindo que a presença ou não de uma fístula contém uma microbiota específica.

Rôças e Siqueira (2010) mediante reação em cadeia da *polimerase transcriptase* reversa (RT-PCR) e *checkerboard* avaliaram a presença de micro-organismos no tratamento endodôntico em dentes com periodontite apical. Foram feitas três coletas durante o tratamento, após a abertura coronária, após o preparo biomecânico utilizando NaOCL como irrigante e após mediação intracanal com hidróxido de cálcio. A presença de bactérias esteve em todas as mostras iniciais. Níveis de RNA ribossomal bacteriano utilizado como indicador de viabilidade foram encontrados em 60% dos casos após o preparo biomecânico, e 53% após medicação intracanal. A taxa de prevalência na 1ª coleta foi *Olsenella uli* (67%), *Pyramidobacter piscolens* (60%), *Streptococcus sp* (53%), e *Bacteroidetes clone X083* (53%). Na 2ª coleta encontrou-se *Streptococcus sp* (47%), *Fusobacterium nucleatum* (40%), e *O. uli* (33%), *Streptococcus sp* (47%), *Propionibacterium acnes* (27%), e *O. uli* (27%) foram as taxas de maior frequência na 3ª coleta. Podendo-se concluir que o índice bacteriológico presente no começo do tratamento reduz fortemente após o preparo biomecânico e medicação intracanal, porém, as taxas bacteriológicas identificadas após tratamento podem significar um risco para a persistência da infecção.

Rôças e Siqueira (2011) avaliaram o efeito antimicrobiano após o preparo biomecânico e após o uso de medicação intracanal em dentes com presença de periodontite apical. Coletaram mostras de 24 canais radiculares com necrose pulpar utilizando irrigante NaOCl 2.5% e hidróxido de cálcio como medicação intracanal, avaliando a presença de micro-organismos mediante reação em cadeia da polimerase (PCR). Todas as mostras foram positivas para bactérias e negativas na leitura fungos. Podendo-se concluir que os níveis de bactérias reduziram em grande quantidade após o preparo biomecânico e medicação intracanal, mas ainda precisam ser estudadas as estratégias para a eficácia do tratamento antimicrobiano.

Martinho *et al.* (2012) analisaram a relação que existe entre os sinais e sintomas e características radiográficas de acordo com os níveis de interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e prostaglandina E₂ (PGE₂) produzidas por macrófagos presentes nas infecções endodônticas primárias com periodontites apical. Foram avaliados 21 canais radiculares com necrose pulpar e lesão periapical tomando coletas com pontas de papel, avaliando condições como presença de exsudado, dor à palpação e percussão e tamanho da lesão, mediante

estudo de PCR reação em cadeia de polimerase e contagem de endotoxinas por estudo de LAL. Os resultados mostraram que IL-6 e TNF- α tem correlação com o tamanho da lesão e a presença de exsudado. Assim como a presença de IL-6 e PGE₂ tiveram correlação na presença de dor à palpação mas negativamente correlacionados no tamanho da lesão.

Valera *et al.* (2014) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a ação do hipoclorito de sódio no preparo biomecânico e o uso de *Zingiber officinale* com e sem hidróxido de cálcio para combater a microbiota bacteriana simulada em dentes humanos extraídos. As amostras foram divididas em 4 grupos de acordo com a medicação intracanal utilizada. Foram pegas coletas imediatamente após contaminação dos espécimes, 7 dias após o preparo biomecânico, 4 dias após medicação intracanal e 7 dias após a remoção da medicação intracanal. Mediante o teste de Kruskal-Wallis e Dunn os resultados obtidos mostraram que o uso de NaOCl elimina 100% dos micro-organismos no interior dos canais radiculares e reduz 88.8% das endotoxinas após a preparação biomecanizada.

Ferreira *et al.* (2015) estudaram mediante *checkerboard DNA-DNA hybridization* a microbiota do interior dos canais radiculares antes e após MIC. No G1 utilizou-se hidróxido de cálcio + soro fisiológico e no G2 utilizou-se hidróxido de cálcio + clorexidina. Para o estudo foram atendidos 20 pacientes que apresentavam lesão endodôntica primária, durante o procedimento foram realizadas coletas do conteúdo do canal radicular, antes do PBM, após o PBM e após 14 dias da MIC. Os resultados obtidos não mostraram diferença estatística entre o G1 e G2, sendo que o grupo G2 refletiu maior redução da carga microbiana.

Valera *et al.* (2016) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a ação antimicrobiana da clorexidina gel 2% como substância química auxiliar e a medicação intracanal sobre *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e suas endotoxinas nos canais radiculares. Foram analisados 48 dentes unirradiculares em 4 grupos (n=12) divididos de acordo com a medicação intracanal utilizada: G1 hidróxido de cálcio + solução salina, G2 extrato de gengibre glicólico 20%, G3 hidróxido de cálcio + extrato de gengibre glicólico 20%, G4 Solução salina como grupo controle. As coletas foram realizadas do conteúdo do canal radicular, após abertura coronária (1ª coleta), após instrumentação (2ª coleta), 7 dias após a ação da medicação (3ª coleta), após 14 dias de ação da medicação intracanal (4ª

coleta) e após 7 dias da remoção da medicação intracanal (5ª coleta). A atividade antimicrobiana e endotoxinas foram avaliados estatisticamente mediante o teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn com um nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que com o uso de clorexidina obtiveram a eliminação completa de *Candida albicans* e *Escherichia coli*, excetuando *Enterococcus faecalis* obtendo sua completa eliminação só após medicação intracanal. A redução das endotoxinas após instrumentação e medicação intracanal foi revelada em todos os grupos, sendo o grupo com maior redução de endotoxinas hidróxido de cálcio + solução salina, seguido pelo grupo de extrato de gengibre glicólico 20%. Concluindo que o uso de clorexidina foi capaz de eliminar os micro-organismos no canal radicular, sendo que as endotoxinas não foram eliminadas na sua totalidade.

2.3 Tomografia computadorizada de feixe cônico nas lesões periapicais

Um diagnóstico radiográfico nem sempre mostra com exatidão as condições normais ou patogênicas dos dentes. As radiografias clínicas de rotina podem não detectar a presença de lesões inflamatórias ou neoplasias que causam a destruição óssea (Bender, 1997; Bender, Seltzer, 2003).

Hoje em dia os tratamentos de sucesso são baseados sempre em um planejamento completo, para o qual geralmente requer o uso de imagens e a necessidade de avaliar as estruturas e anatomia dos tecidos mediante três dimensões (Hirsch *et al.*, 2008). Em imagens por TCFC é possível distinguir qual é a raiz ou raízes envolvidas na lesão periapical, assim como a sua localização exata e volumetria (Stavropoulos, Wenzel, 2007).

Garcia de Paula-Silva *et al.* (2009) realizaram um estudo para determinar o sucesso de tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical mediante uma avaliação utilizando radiografia periapical e avaliação por CBCT. Foram tratados 96 canais radiculares e de cães com presença de lesão periapical e divididos em 4 grupos, o G1 foi o grupo controle canais sem lesão periapical, G2 canais tratados em sessão única, G3 canais tratados em duas sessões e G4 canais sem receber tratamento e com presença de lesão periapical. A medida da lesão foi avaliada

mediante radiografia periapical e uso de tomografia antes e após 6 meses de tratamento. Os resultados obtidos mostraram que nos grupos 1, 2 e 3 a lesão reduziu em 79% ao ser observado por radiografia periapical, e um resultado estatístico de sucesso em um 35% utilizando CBCT.

Ordinola-Zapata *et al.* (2011) estudaram a influência da radiografia periapical e secções da CBCT assim como volumetria, para determinar a destruição óssea gerada nas infecções endodônticas. Foram utilizados 30 canais inoculados previamente com *Enterococcus faecalis* para induzir periodontite apical. Após 60 dias de inoculação, 15 canais distais foram tratados endodonticamente, e 15 canais mesiais permaneceram como o grupo controle. O tratamento foi avaliado após 6 meses de acompanhamento mediante radiografia periapical e CBCT (cortes coronal e sagital). A área da lesão foi medida mediante o programa *ImageTool software* tanto nas radiografia periapicais quanto na CBCT. Os resultados obtidos mostraram a presença de periodontite apical crônica em todos os dentes inoculados. Após seis meses de tratamento as radiografias periapicais, secções coronais da CBCT e dados volumétricos, mostraram baixa destruição óssea nos tratamentos endodônticos comparado com o grupo controle. Não foi encontrada correlação entre radiografia periapical e valores volumétricos da CBCT no tratamento dos canais radiculares. Os dados da volumetria nas Tomografias refletiram, que as lesões periapicais dos canais radiculares tratados endodonticamente apresentavam uma diminuição da lesão num 50%.

Metska *et al.* (2013) avaliaram mediante CBCT a volumetria da lesão em dentes retratados endodonticamente após um ano de acompanhamento. Foram retratados 45 dentes com presença de periodontite apical persistente e tendo feito o tratamento de canal, se realizou duas tomografias, uma prévio ao tratamento e uma um ano após o acompanhamento. Dois avaliadores independentes mediram a volumetria da lesão utilizando o Software AMIRA e mediante o teste estadístico Wilcoxon para sua análise. Os resultados mostraram uma diminuição na volumetria da lesão em 57% dos casos, um 23% dos casos permaneceram inalterados e 20% dos casos teve aumento na lesão. Concluindo que após 1 ano do retratamento endodôntico, o volume de radiolucência nas lesões periapicais foram significativamente reduzidas em 57% dos casos.

Abella *et al.* (2014) estudaram a presença ou ausência de radiolucência periapical de dentes com polpas necróticas, mediante uma avaliação com radiografia periapical e CBCT. Foram estudados 161 dentes endodonticamente tratados com diagnóstico de polpa não vital (necrose pulpar com tecido periapical normal, periodontite apical assintomática, abscesso apical agudo e abscesso apical crônico). Os resultados obtidos mostraram que a radiolucência na radiografia periapical esteve presente em 38.8% dos casos e quando avaliada com CBCT mostrou um resultado do 57.6%, sendo assim estatisticamente significativo. Concluindo que ao contrário das radiografias periapicais, a CBCT revelou uma maior prevalência de radiolucência na zona periapical dos dentes tratados endodonticamente com presença de polpas não vitais.

3 PROPOSIÇÃO

- a) Verificar a carga microbiana e quantificar endotoxinas presentes nos canais radiculares de dentes com infecção endodôntica primária;
- b) Comparar a efetividade antibacteriana e sobre endotoxinas do preparo biomecânico com dois métodos de irrigação final: com ou sem irrigação ultrassônica passiva (PUI);
- c) Correlacionar sinais e sintomas com a microbiota presente e complexos bacterianos;
- d) Relacionar níveis de endotoxinas e carga microbiana com sinais e sintomas clínicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP (ANEXO B).

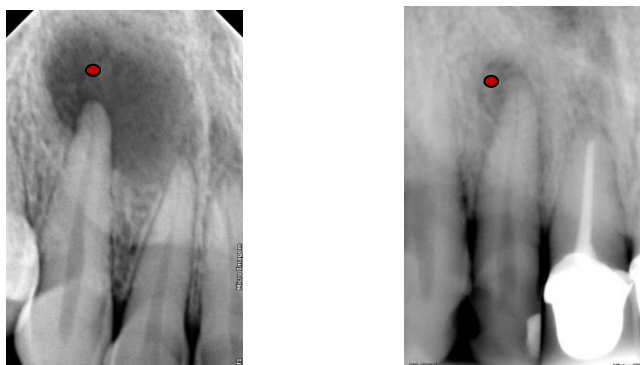
4.1 Seleção de pacientes

Foi realizada triagem e seleção dos pacientes por meio de anamnese, exame clínico e radiográfico em pacientes que procuraram a Clínica de Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos (UNESP), onde foram avaliados 200 pacientes com dentes portadores de infecção endodôntica. Os critérios para seleção dos pacientes e dos casos foram; condições de saúde favoráveis, tanto locais quanto sistêmicas, assim como não ter feito uso de antibioticoterapia sistêmica nos últimos 3 meses. Os pacientes assinaram um termo de esclarecimento e consentimento livre para fazerem parte da pesquisa, tomando ciência dos termos e condições da mesma. (ANEXO C).

4.2 Seleção dos casos

Dos 200 pacientes foram selecionados 20 dentes que apresentaram necrose pulpar e lesão periapical seguindo critérios de inclusão e exclusão pré-estabelecidos (Figura 1).

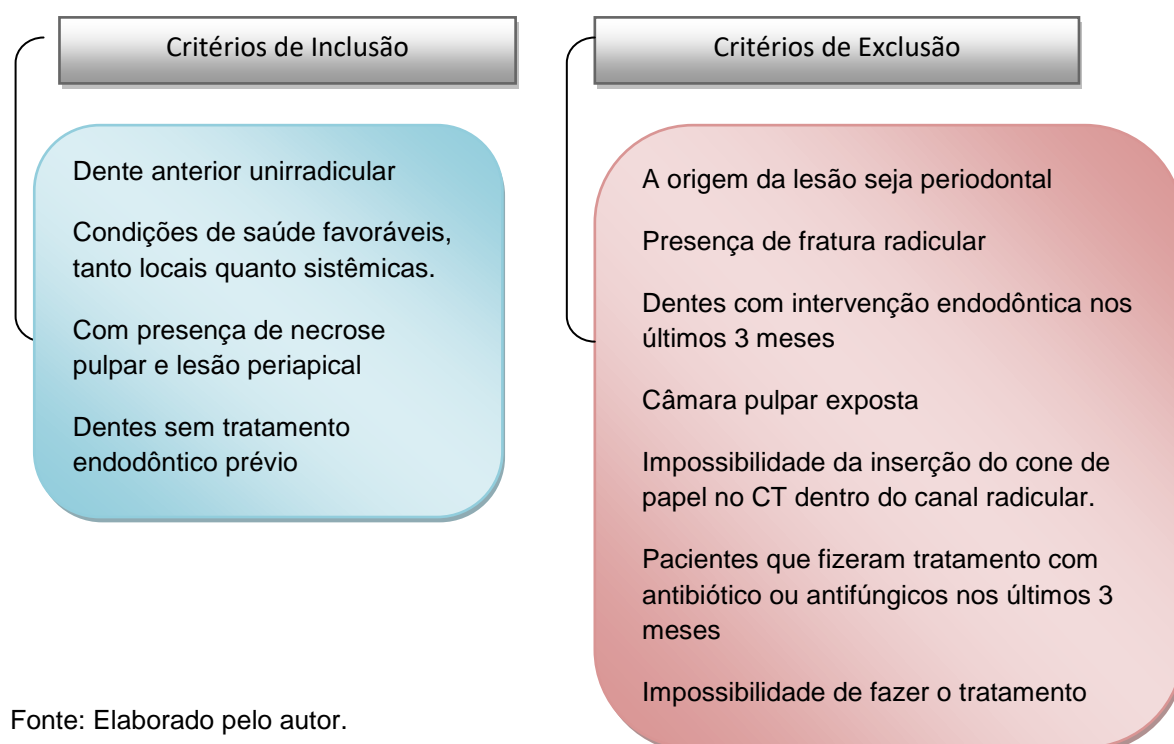
Figura 1 – Radiografias digitais dos dentes com presença de necrose pulpar e lesão periapical selecionados para tratamento endodôntico



Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram excluídos da pesquisa dentes com doença periodontal, fratura radicular, exposição da câmara pulpar ao meio bucal, tratamento endodôntico prévio no dente interessado, pacientes que utilizaram antifúngicos e antibióticos três meses antes do tratamento endodôntico, impossibilidade de isolamento absoluto e de inserção do cone de papel no canal radicular em seu comprimento de trabalho (Figura 2).

Figura 2 – Descrição dos critérios de inclusão e exclusão



Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram anotados os dados pessoais, a história médica e a história dentária. No exame subjetivo foram obtidas informações sobre a condição atual do dente a ser tratado e quanto à presença ou ausência de dor. No exame objetivo dados como a presença de edema, fístulas, presença de restaurações, cáries e fraturas também foram anotados. Foram realizados testes para verificar dor à percussão, à palpação e mobilidade, além da realização de sondagem periodontal. Todas as características clínicas referentes ao dente investigado foram anotadas na ficha clínica de cada paciente (APÊNDICE A).

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

4.3 Divisão dos grupos experimentais

Para a divisão dos grupos, foi realizada randomização de acordo com o *Consort (Consolidated Standards of Reporting Trials)*, a partir do sorteio de papéis, colocados em envelope selado, com o tipo de tratamento a ser executado. Este sorteio foi realizado antes da primeira sessão de atendimento do paciente. Os 20 dentes foram divididos em 2 grupos ($n = 10$) de acordo com o protocolo de irrigação final empregado (Quadro 1).

Quadro 1 – Divisão dos grupos experimentais

Divisão dos grupos para irrigação final (após PBM)				
Grupos	n	Volume da irrigação	Tempo de atuação	Procedência
G1 Sem PUI (NaOCl + EDTA)	10		NaOCl : 1 minuto EDTA: 5 minutos	Byoformula, São Jose dos Campos, SP, Brasil
G2 Com PUI (NaOCl + PUI) + (EDTA + PUI)	10	NaOCl: 8ml EDTA: 1 ml	NaOCl: 4 ml + 30 segundos de PUI + 4ml + 30 segundos de PUI (Total 1 min) EDTA: 1 ml + 2 minutos em agitação com lima + 1 min. de PUI + 2 minutos em agitação com lima (Total 5 min)	

Legenda: PUI=Irrigação ultrassônica passiva; NaOCl = hipoclorito de sódio; EDTA = ácido etilendiamino tetra-acético 17%.

Fonte: Elaborado pelo autor.

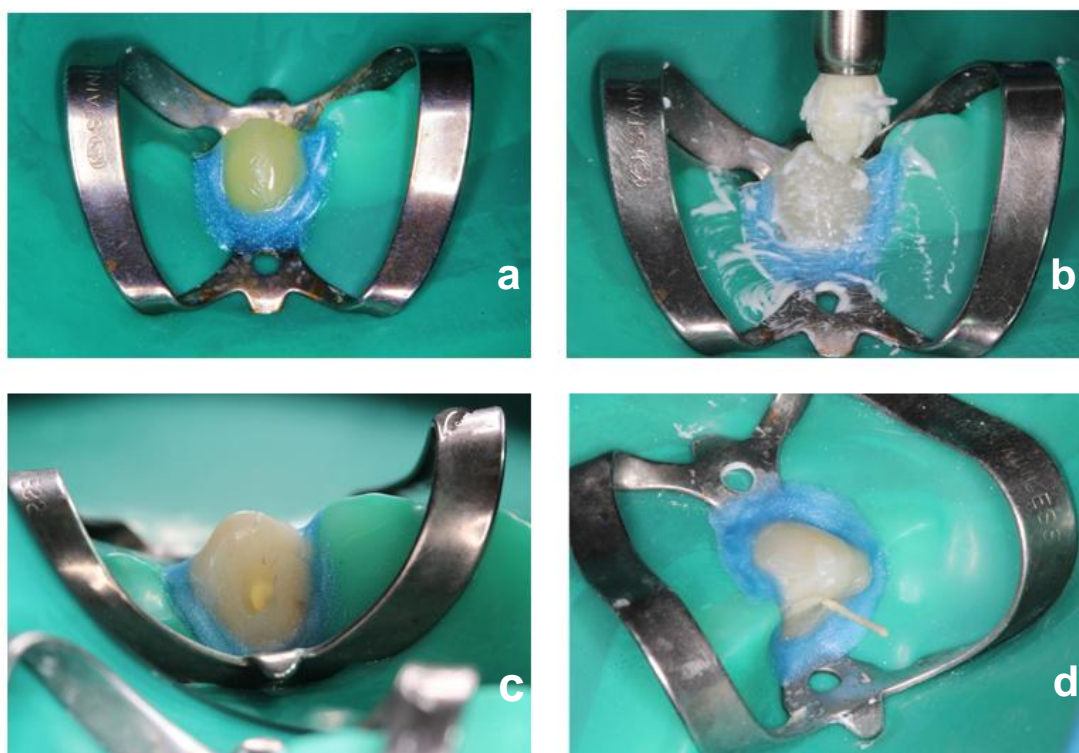
4.4 Intervenção Odontológica

Todos os instrumentais e materiais utilizados foram submetidos à esterilização por radiação gama com cobalto 60 (dose 20 KGy por 6 horas) pela Embrarad (Empresa Brasileira de Radiação, Cotia, SP, Brasil) e todos os passos subsequentes foram realizados de forma asséptica.

Inicialmente os pacientes foram submetidos à anestesia na região do elemento dentário e o mesmo foi individualmente isolado da cavidade oral com auxílio de grampos (S.S. White Duflex, Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) e lençol de borracha (Madeitex, São José dos Campos, SP, Brasil). Depois os dentes foram lavados com solução salina fisiológica (Laboratório Sanobiol, Pouso Alegre, MG, Brasil) e um vedamento da interface coroa/lençol foi feito utilizando uma barreira física de resina fotopolimerizável (Top Dam – FGM Produtos Odontológicos,

Joinville, SC, Brasil). O dente isolado recebeu profilaxia com pasta profilática (Vigodent S/A Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ Brasil) e escova de Robinson (Microdont – Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, foi realizada a desinfecção do campo operatório utilizando cotonetes (Jiangsu Medical Materials Co. Ltda, Jiangsu, China) estéreis umedecidos em água oxigenada 30 volumes (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) seguido de hipoclorito de sódio 5,25% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil). Para evitar a contaminação química do canal radicular com essa solução e a interferência com a cultura microbiológica, foi realizada a neutralização do hipoclorito de sódio com tiosulfato de sódio 5% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil). Realizou-se abertura coronária com auxílio de brocas acionadas em alta rotação, sob refrigeração com solução salina fisiológica aprotogênica (Figura 3). Terminada a abertura coronária, foi realizada a **1ª Coleta** do conteúdo do canal radicular.

Figura 3 – Intervenção odontológica



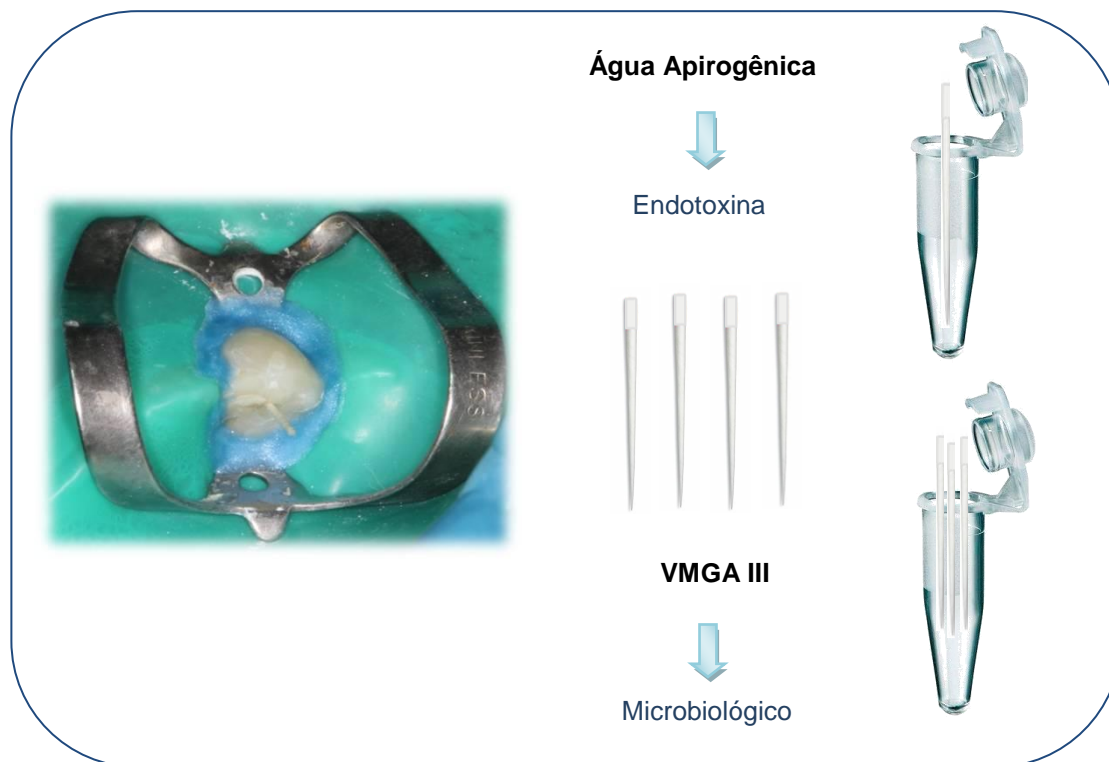
Legenda: a) Isolamento do campo operatório e selamento com barreira gengival fotopolimerizável; b) profilaxia do campo operatório com escova de Robson e pasta profilática; c) abertura coronária; d) primeira coleta com cone de papel absorvente

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Coletas do canal radicular

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

Figura 4 – Coletas do conteúdo do canal radicular



Legenda: 1º cone de papel armazenado em 1 ml de água apirogênica e 3 cones de papel armazenados em 1 ml de VMGA III

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Preparo biomecânico

Uma vez feita a primeira coleta, o preparo dos canais radiculares foi realizado por um único operador, com o sistema de lima única de Níquel Titânio Reciproc R40 (VDW GmbH, Munich, Germany) conicidade 40/.06 e motor específico VDW Silver Reciproc. O preparo foi no sentido coroa-ápice, realizando neutralização por terços cervical, médio e apical. A odontometria foi realizada com o uso do localizador apical *RomiApex* (RomiBras LTDA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), e confirmada com radiografia periapical digital. O comprimento de trabalho foi determinado subtraindo 1 mm do comprimento total do dente.

Durante o preparo do canal radicular foram utilizados 24 ml de solução de hipoclorito de sódio 2.5%, divididos nos terços cervical, médio e apical. Para a irrigação do terço apical no grupo PUI foi utilizado o ultrassom. O canal foi inundado primeiro com 4 ml de NaOCl 2.5% (Byoformula, São Jose dos Campos, SP, Brasil), que foi agitado com ultrassom por 30 segundos. Em seguida, foi irrigado e inundado com mais 4 ml de NaOCl, seguido de nova agitação com ultrassom. Após o NaOCl foi removido e neutralizado com Tiosulfato de Sódio 5%. Na sequência, foi realizada irrigação com 10 ml de solução salina fisiológica e realizada a **2ª Coleta** do conteúdo do canal.

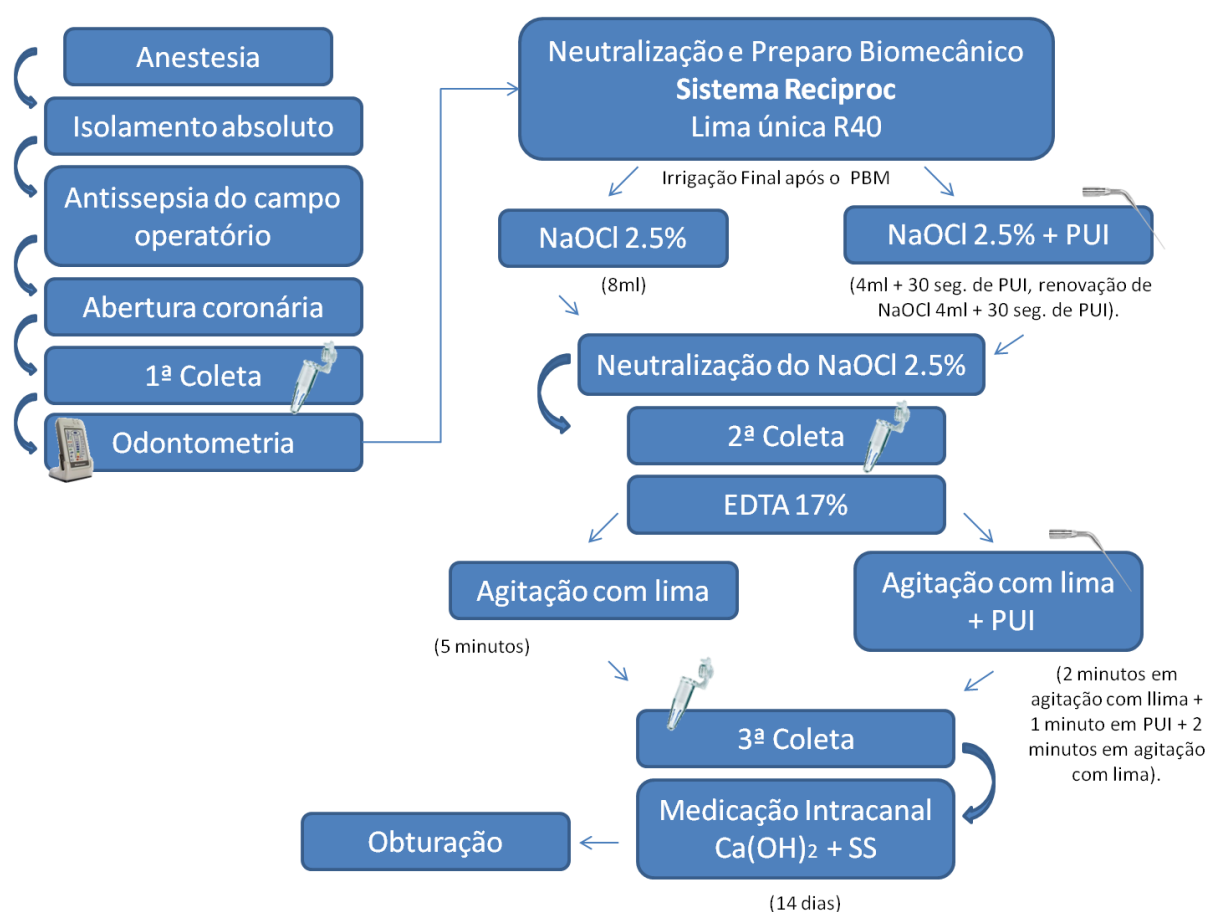
Após, os canais foram preenchidos com EDTA 17 % (Inodon, Porto Alegre, RS, Brasil) que após 2 minutos foi agitado com ultrassom por 60 segundos, permanecendo no canal até completar 5 minutos. Foi realizada irrigação final com 10 ml de solução salina fisiológica e em seguida realizada a **3ª Coleta** do conteúdo do canal radicular.

Para agitação com ultrassom foi utilizada a ponta Irrisonic E1 (Helse Dental Technology Santa Rosa de Viterbo, SP, Brasil). A ponta foi utilizada no aparelho ALT (Equipamentos Médicos e Odontológicos, Campos Elíseos Ribeirão Preto, SP, Brasil) com potência mínima de 1000 hz; a ponta foi inserida no canal 1 mm aquém do comprimento de trabalho evitando, o contato com as paredes do canal radicular.

No grupo sem ultrassom o terço apical foi irrigado da mesma forma que os terços cervical e médio (8ml de NaOCL), seguido da neutralização com tiosulfato de sódio, irrigar com 10 ml de solução salina fisiológica e realizada a **2ª Coleta**.

Após os canais foram inundados com EDTA 17% por 5 minutos, irrigando com 10 ml de solução salina fisiológica e realizada a **3ª Coleta**. A figura 5 ilustra a sequência dos procedimentos realizados.

Figura 5 – Sequência do tratamento e divisão dos grupos experimentais



Fonte: Elaborado pelo autor

4.7 Medicação Intracanal

Após a terceira coleta os canais foram secos e preenchidos com medicação intracanal (MIC) de Hidróxido de Cálcio (Biodinâmica, Ibirapurã, PR, Brasil) com

Solução Salina Fisiológica (Laboratório Sanobiol, Pouso Alegre, MG, Brasil) por um período de 14 dias. A associação da medicação foi realizada na proporção 1:1 em volume e levada ao interior do canal radicular com auxílio de uma lima e lentulo (Dentsply/Maillefer Instruments AS, Ballaigues, Switzerland) até completo preenchimento do canal. Em seguida os dentes foram selados com uma camada de coltosol (Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) seguido de restauração provisória com cimento de ionômero de vidro (S.S. White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Após duas semanas o paciente foi novamente submetido à anestesia e a restauração provisória foi retirada de forma asséptica semelhante à primeira sessão após a abertura coronária. A MIC foi retirada com ajuda de uma lima tipo Kerr 30 e 10 ml de solução salina apirogênica.

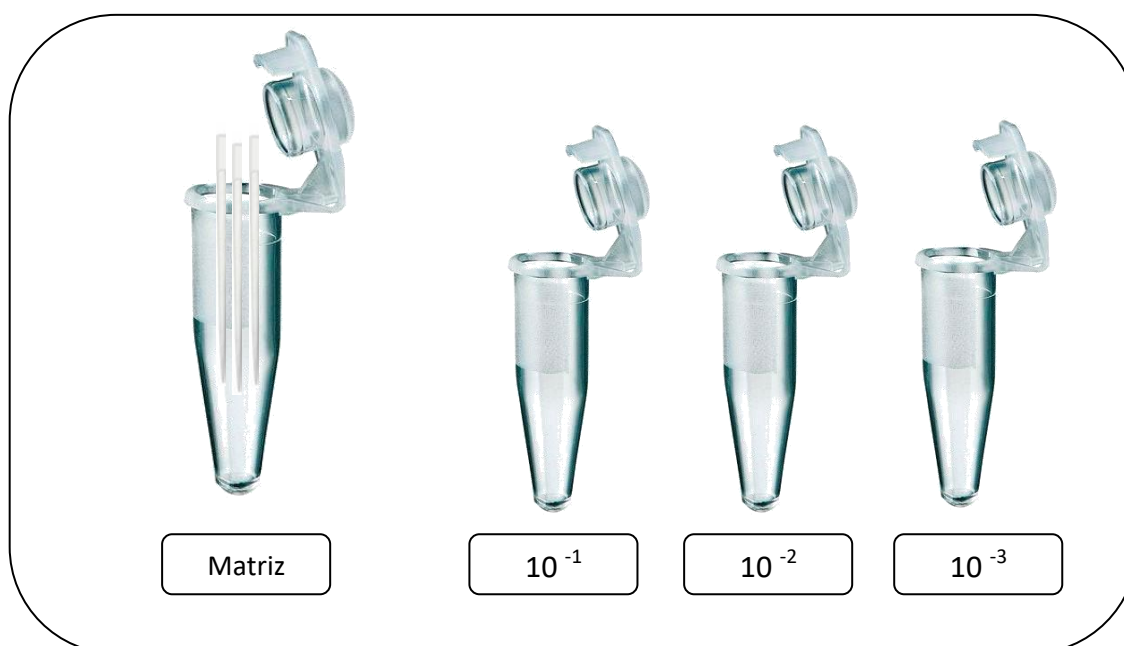
4.8 Obturação dos Canais Radiculares

Após a remoção da MIC, o canal foi preenchido com EDTA 17% durante 5 minutos, seguido de 10 ml de solução salina fisiológica apirogênica, e em seguida foi seco com pontas de papel apirogênicas. Posteriormente os casos que se apresentaram sem dor, canal sem odor e secos, foram obturados com cones de guta-percha Reciproc R40 (VDW, Munich, Germany) previamente desinfetados no NaOCl 5.25% por 5 minutos e cimento obturador AH Plus (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz). Foram realizadas radiografias para comprovação do limite adequado da obturação do canal radicular bem como de seu preenchimento em lateralidade. A guta-percha foi cortada dois milímetros abaixo da coroa clínica para posterior selamento do dente com uma camada de coltosol (Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e resina fotopolimerizável (Filtek Z250 XT, 3M ESPE).

4.9 Atividade microbiana

Para todas as coletas, a atividade antimicrobiana foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de micro-organismos remanescentes no canal radicular. O microtubo contendo os 3 cones de papel (amostra matriz) armazenados em 1 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III foi agitado até a dessorção do conteúdo para facilitar a dispersão dos micro-organismos. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas transferindo 100 μ L da amostra matriz para a diluição 10^{-1} e assim consecutivamente até a diluição 10^{-3} em tubos eppendorf (1,5 mL) contendo 900 μ L de Caldo Infuso Cérebro Coração (BHI) (Brain Heart Infusion Broth - HiMedia Laboratories Pvt. Ltda, Mubai, Índia) (Figura 6).

Figura 6 – Diluições seriadas a partir da amostra matriz

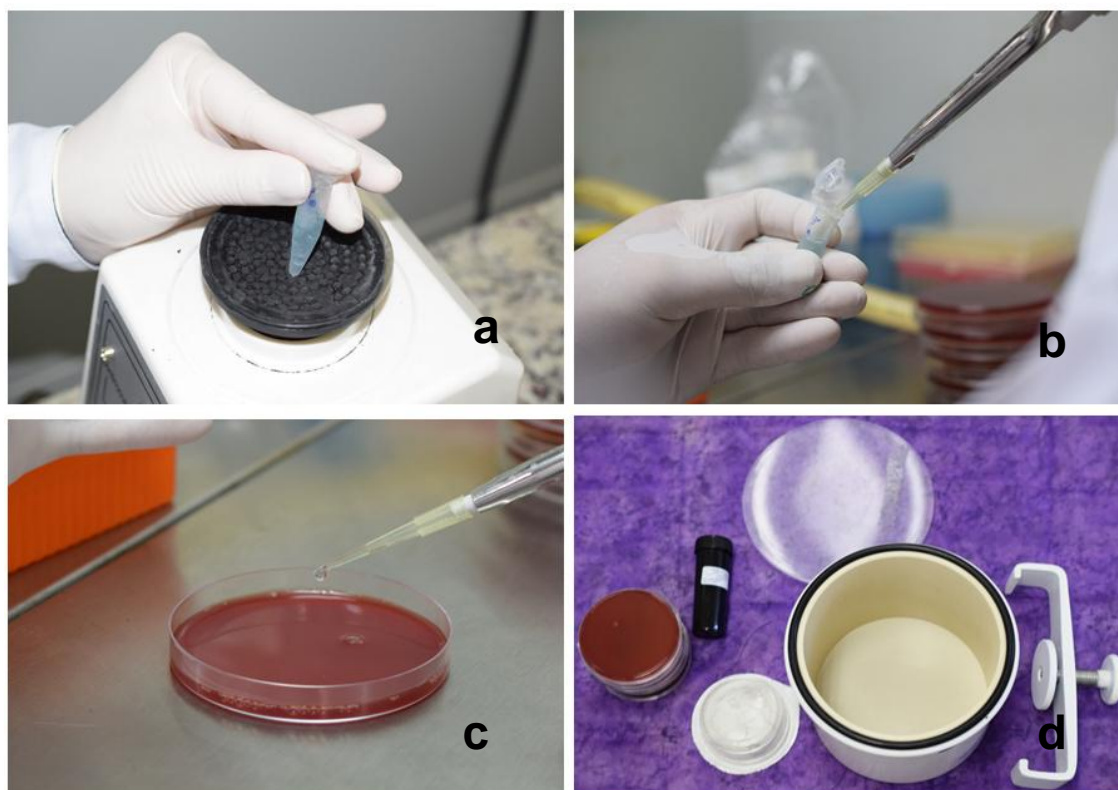


Fonte: Elaborado pelo autor.

Vale ressaltar que anteriormente a realização do experimento, foi realizado um estudo piloto para determinar quais seriam as amostras semeadas para detecção de micro-organismos anaeróbios e facultativos. Desta forma, foram

semeados 50 μ L da amostra matriz (sem diluição) e 50 μ L da diluição 10^{-3} em placas de Petri (Interlab distribuidora de produtos científicos, São Paulo, SP, Brasil) contendo Fastidious Anaerobe Agar (FAA – Neogen Corporation, Michigan, USA), acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado suplementados por hemina (5 mg/L) e vitamina K1 (1 mg/L) (APÊNDICE B). Essas placas foram incubadas em jarra de anaerobiose a 37 °C por 14 dias, para permitir a detecção de micro-organismos anaeróbios e facultativos (Figura 7). O número de unidade formadora de colônias (UFCs) foi determinado a partir da contagem do número de colônias nas placas analisadas. Para a obtenção do número de UFCs presentes na amostra por mL (amostra inicial) foi necessário multiplicar por 20 ou 20.000 o número de UFCs observadas na contagem das placas, dependendo da diluição utilizada. A escolha da placa para contagem de UFCs estava relacionada à possibilidade de contar de forma individual o número de UFCs presentes. Quando não possibilitado a contagem na amostra inicial, foi utilizada a diluição 10^{-3} . Ou seja, quando a diluição 10^{-3} foi escolhida, o valor correspondente a essa diluição é 1000 vezes menor que o inicial (1 mL). A alíquota plaqueada foi de 50 μ L, ou seja, 20 vezes menor que 1mL. Portanto o fator de multiplicação do número de UFCs obtido seria 20.000.

Figura 7 – Análise da presença de micro-organismos e contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL)



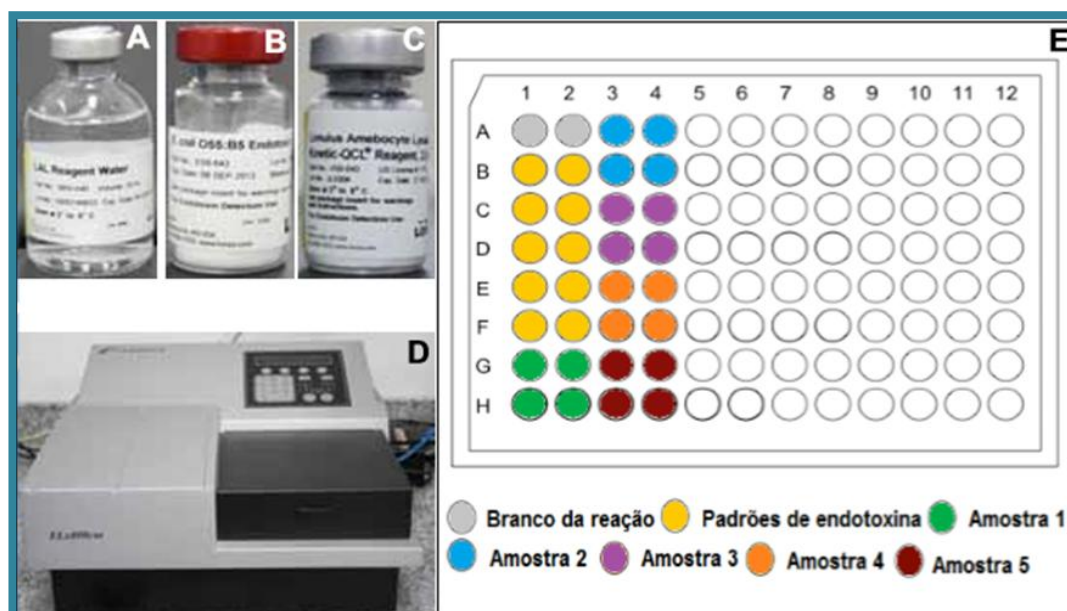
Legenda: a) Agitação de eppendorf contendo VMGA e cones de papel absorvente com coletas do conteúdo do canal radicular; b e c) plaqueamento das amostras das coletas do conteúdo do canal radicular; d) Jarra de anaerobiose onde foram incubadas as placas por 14 dias a 37°C em estufa
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.10 Quantificação de endotoxinas

Para verificar a neutralização da endotoxina, as amostras coletadas dos canais radiculares foram submetidas à análise quantitativa pelo teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (cinético QCL - LAL) (Lonza, Walkersville, MD, EUA). Inicialmente foi realizado uma curva-padrão (APÊNDICE D). O controle padrão de endotoxina de *Escherichia coli* foi reconstituído com um volume especificado, no certificado de qualidade, da água apirogênica. Esta suspensão contém 50 EU/mL. Foram realizadas diluições a partir deste padrão de endotoxina em diferentes concentrações (50; 5; 0,5; 0,05; 0,005 EU/mL). Para cada

amostra, foi realizado um controle positivo (amostra do conteúdo do canal radicular adicionada de uma quantidade conhecida de endotoxina). Em uma placa apirogênica de 96 poços, foram adicionados 100 μ L de água apirogênica (branco da reação), os padrões de endotoxina, as amostras coletadas do canal radicular e os controles positivos (Figura 8). A placa foi incubada no leitor cinético QCL a 37 ± 1 °C por 10 minutos, o qual estava acoplado a um microcomputador com software WinkQCL™ específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Após, foram adicionados em cada poço da placa 100 μ L do reagente cinético cromogênico do LAL, com uma micropipeta multicanal e ponteiras apirogênicas (Figura 8). Após o início do ensaio cinético, o software da leitora de microplacas monitorava, de forma contínua durante todo o ensaio, a absorbância a 405 nm em cada poço da microplaca. O software WinkQCL™ automaticamente calculou uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Os parâmetros da curva-padrão foram impressos no relatório de impressão.

Figura 8 – Quantificação de endotoxinas.



Legenda: a) água apirogênica; b) endotoxina padrão de E. coli; c) reagente cinético cromogênico do LAL; d) leitor cinético QCL; e) esquema de montagem da placa de 96 poços
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.11 Análise por *checkerboard*

O método *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Odontologia II – Microbiologia, Imunologia e Biologia Molecular da Universidade de Guarulhos (UnG), onde as amostras obtidas foram submetidas ao teste, investigando 40 espécies bacterianas.

Os tubos eppendorf contendo os 3 cones de papel (amostra matriz) armazenados em 1 mL de meio de transporte pré reduzido VMGA III foram agitados até a dessorção do conteúdo para facilitar a dispersão dos micro-organismos e 300 µL de cada amostra foram transferidos para outro tubo eppendorf. Após esse procedimento, os tubos foram centrifugados a 8.000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante neles contido foi então descartado e o pellet ressuspendido com 150 µL de solução TE (10 Mm Tris-HCL, 1 Mm EDTA pH 7.6). A cada tubo plástico contendo amostras e solução tampão TE foram acrescentados 100 µL de NaOH (Labsynth) a 0,5M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por um longo período de tempo. Em seguida, as amostras foram armazenadas sob refrigeração a -20°C até que fossem analisadas.

4.11.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento

A lista das 40 cepas bacterianas utilizadas neste estudo para o preparo das sondas de DNA está apresentada no Quadro 2. As espécies avaliadas foram selecionadas devido à sua associação as infecções endodônticas ou a sua presença em outras infecções orais e saliva. Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA) ou do Forsyth Institute (Boston, MA, EUA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de Mycoplasma (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e cultivado em Agar-triptose de soja (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) contendo 5% de sangue desfibrinado de ovelha (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, EUA) a 35 °C sob condição de anaerobiose. Algumas bactérias foram cultivadas em

meios de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais. *T. forsythia*, por exemplo, foi cultivada em ágar-triptose de soja com 5% de sangue desfibrinado de ovelha e 10 µg/mL de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA); enquanto *P. gingivalis* cresceu em um meio similar, suplementado com 5% de sangue desfibrinado de ovelha, 0,3 µg/mL de menadiona e 5 µg/mL de hemina. As espécies *T. denticola* e *Treponema socranskii* foram cultivadas em caldo para crescimento de Mycoplasma suplementado com 1 mg/mL de glicose (Sigma), 400 µg/mL de niacinamida (Sigma), 150 µg/mL de espermina tetraidroclorídrica (Sigma), 20 µg/mL de isobutirato de sódio (ICN, costa Mesa, CA, EUA), 1mg/mL de L-cisteína (Sigma), 5 µg/mL de tiamina pirofosfato (Sigma) e 0,5% de soro bovino (Laborclin, São José dos Pinhais, PR, Brasil).

Quadro 2 - Relação das cepas bacterianas, o metabolismo respiratório e a coloração Gram das bactérias utilizadas para o desenvolvimento da sonda de DNA bacteriano

(continua)

Espécie	Cepas	Metabolismo	Gram
Complexo vermelho			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277	Anaeróbio estrito	Gram -
<i>Tannerella forsythia</i>	43037	Anaeróbio estrito	Gram -
<i>Treponema denticola</i>	B1	Anaeróbio estrito	Gram -
Complexo roxo			
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929	Anaeróbio facultativo	Gram +
<i>Veillonella parvula</i>	10790	Anaeróbio estrito	Gram -
Complexo verde			
<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans (a+b)</i>	43718 e 29523	Anaeróbio estrito	Gram -
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	Anaeróbio estrito	Gram -
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596	Anaeróbio estrito	Gram -
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612	Anaeróbio estrito	Gram -
<i>Eikenella corrodens</i>	23837	Anaeróbio facultativo	Gram -
Complexo laranja principal			
<i>Fusobacterium nucleatum ssp nucleatum</i>	25586	Anaeróbio estrito	Gram -
<i>Fusobacterium nucleatum ssp polymorphum</i>	10953	Anaeróbio estrito	Gram -
<i>Fusobacterium nucleatum ssp vincentii</i>	49256	Anaeróbio estrito	Gram -
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693	Anaeróbio estrito	Gram -
<i>Parvimonas micra</i>	33270	Anaeróbio estrito	Gram +
<i>Prevotella intermédia</i>	25611	Anaeróbio estrito	Gram -
<i>Prevotella nigrescens</i>	33563	Anaeróbio estrito	Gram -
<i>Streptococcus constellatus</i>	27823	Anaeróbio facultativo	Gram +
Complexo laranja periférico			
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236	Anaeróbio estrito	Gram -
<i>Campylobacter rectus</i>	33238	Anaeróbio estrito	Gram -

(conclusão)

Espécie	Cepas	Metabolismo	Gram
<i>Campylobacter showae</i>	51146	Anaeróbio estrito	Gram -
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099	Anaeróbio estrito	Gram +
Complexo Amarelo			
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558	Anaeróbio facultativo	Gram +
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335	Anaeróbio facultativo	Gram +
<i>Streptococcus mitis</i>	49456	Anaeróbio facultativo	Gram +
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556	Anaeróbio facultativo	Gram +
Outras espécies			
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	Anaeróbio facultativo	Gram +
<i>Actinomyces oris</i>	43146	Anaeróbio facultativo	Gram +
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	Anaeróbio facultativo	Gram +
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	Anaeróbio facultativo	Gram +
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271	Anaeróbio estrito	Gram +
<i>Gemella morbillorum</i>	27824	Anaeróbio estrito	Gram +
<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201	Anaeróbio estrito	Gram -
<i>Neisseria mucosa</i>	19696	Anaeróbio facultativo	Gram -
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406	Anaeróbio estrito	Gram -
<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845	Anaeróbio estrito	Gram -
<i>Propionibacterium acnes</i> (I+II)	11827 e 11282	Anaeróbio aerotolerável	Gram +
<i>Selemonas noxia</i>	43541	Anaeróbio estrito	Gram -
<i>Streptococcus anginosus</i>	33397	Anaeróbio facultativo	Gram +
<i>Treponema socranskii</i>	S1	Anaeróbio estrito	Gram -

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.11.2 Isolamento do DNA e preparo das sondas

As cepas bacterianas foram cultivadas anaerobicamente e as colônias foram raspadas e depositadas em tubos plásticos para microcentrifuga de 1.5 mL contendo 1 mL de solução TE (pH 7.6). As células foram lavadas 2 vezes por centrifugação na solução TE a 3500xg por 10 minutos. Em seguida, as cepas Gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas em SDS (dodecilsulfato de sódio, Labsynth) a 10% e proteinase K (Sigma) em uma concentração de 20 mg/mL. As cepas de bactérias Gram-positivas foram lisadas em 150 µL de uma mistura enzimática contendo 15 mg/mL de lisozima (Sigma) e 5 mg/mL de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão TE (pH 8.0). O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith *et al.* (1989). As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1 µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *random primer digoxigenin labeling kit* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA), de acordo com o método descrito por Feinberg e Vogelstein (1983).

4.11.3 *Checkerboard DNA-DNA hybridization*

As suspensões contendo as amostras coletadas foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0.8 mL de acetato de amônia ($C_2H_7NO_2$) a 5 M. Com isto, as células bacterianas foram lisadas e o DNA ficou suspenso na solução. Uma membrana de *nylon* (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences, Chicago, IL- USA) foi montada em Minislot 30® (Immunitics, Cambridge, MA – USA).

Suspensão de cada amostra contendo DNA livre foi depositada nas fendas do *Minislot* 30® e o DNA permaneceu depositado na membrana de *nylon*. As duas últimas canaletas do *Minislot* 30® foram reservadas para a colocação dos controles, contendo uma mistura das espécies dos micro-organismos que foram investigados pelas sondas de DNA, em duas concentrações, 10^5 e 10^6 células bacterianas, ou seja, 0.001 μ g e 0.01 μ g de cada espécie, respectivamente.

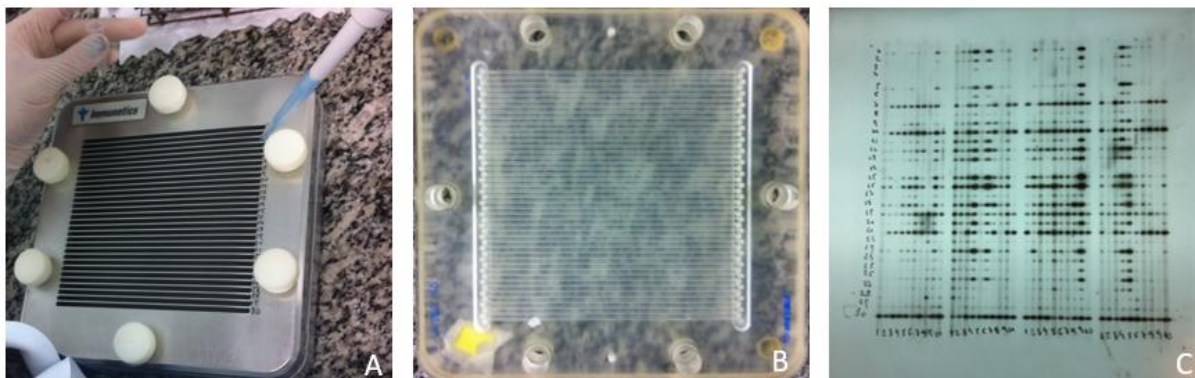
A membrana foi removida do aparato e o DNA, previamente depositado na mesma, foi fixado por intermédio de aquecimento em forno a 120°C, por 20 minutos. A membrana contendo o DNA fixado foi pré-hibridizada a 42°C, por uma hora, em uma solução de 50% formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% caseína (Vetec), 5 x solução salina citrada (SSC) (1 x SSC = 150 mM NaCl) (Vetec), 15M de citrato de sódio (pH 7,0) (J.T.Baker, Edo. Fr Méx., México), 25 mM de fosfato de sódio (pH 6.5) (Labsynth) e 0.5 mg/mL de RNA de levedura (Sigma). Em seguida a membrana foi posicionada no *Miniblotter* 45® (Immunitics, Cambridge, MA – USA) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles perpendiculares às canaletas do aparato.

Cada sonda de DNA contida numa solução de hibridização (45% formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6.5), 0.2 mg/mL de RNA levedura, 10% de sulfato de dextrano, 1% de caseína e 20 mg/mL de sonda de DNA) foi colocada em uma canaleta do *Miniblotter* 45®, de modo que cada canaleta foi preenchida com 135 μ L de uma determinada sonda. As sondas hibridizaram perpendicularmente às linhas contendo o DNA bacteriano fixado, propiciando um formato xadrez, uma vez que as linhas de DNA horizontais se cruzaram com as verticais correspondente às canaletas contendo as sondas de DNA. O aparato *Miniblotter* 45® e a membrana

com as sondas e o DNA das amostras bacterianas fixadas, foram colocados dentro de um saco plástico umedecido para evitar a desidratação das mesmas e incubado a 42°C para que a hibridização ocorresse. A hibridização das membranas com as sondas ocorreu durante um período mínimo de 12 horas (*overnight*).

Após a hibridização com as sondas, as membranas foram removidas do *Miniblotter* 45® e lavadas por 40 minutos a 65°C, numa solução adstringente composta por 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20 mM de Na₂HPO₄, a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por 1 hora sob agitação, em uma solução bloqueadora contendo 1% de ácido maleico (Vetec), 3 M NaCl, 0.2 M NaOH (Labsynth), 0.3% Tween 20 (Vetec), 0.5% caseína (pH 8.0) e, logo após, por 30 minutos na mesma solução contendo anticorpo anti-digoxigenina (*Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments* – Roche Diagnostics GmbH, Mannheim – Germany) conjugado à fosfatase alcalina (Roche), em uma concentração de 1:10000. As membranas foram, então, lavadas 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1 M ácido maleico, 3 M NaCl, 0.2 M NaOH, 0.3% Tween 20, pH 8.0, e uma vez, por 5 minutos, em uma solução de 0.1 M de Tris HCl, 0.1 M de NaCl (pH 9.5). Para detecção dos sinais as membranas foram incubadas por 45 minutos a 37 °C em uma solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina, *CDP-Star Detection Reagent*® (Amershan Biosciences UK Limited, Buckinghamshire – UK). Em seguida, as membranas foram colocadas em um cassete, Chassi Radiográfico 30 x 40 cm (Konex, São Paulo, SP, Brasil) sob um filme radiográfico (Kodak® X-OMAT Kodak Brasileira Com. E Ind. Ltda, São José dos Campos, SP) por aproximadamente 40 minutos. Os filmes foram posteriormente revelados manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com as orientações do fabricante (Figura 9).

Figura 9 - Teste checkerboard DNA-DNA hybridization



Legenda: a) deposição da amostra em aparato de *Minislot 30*® contendo membrana de *nylon* com carga positiva; b) aparato de *Miniblotter 45*®; c) filme radiográfico revelado contendo os sinais produzidos pelas sondas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, calibrado e cego para as terapias empregadas. A leitura foi realizada 2 vezes, em dias diferentes, para conferência de resultados. Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra dos canais radiculares foi comparado, em intensidade, ao sinal produzido pela mesma sonda nas 2 linhas de controles contendo 10^5 e 10^6 células bacterianas. A intensidade de hibridização foi dividida em 6 classes diferentes em relação aos níveis observados de contagem: (0) não detectado; (1) $<10^5$ células, (2) cerca de 10^5 células, (3) entre 10^5 e 10^6 células; (4) cerca de 10^6 células ou mais.

4.12 Análise volumétrica da destruição óssea periapical

As TCFC realizadas antes do tratamento endodôntico serão submetidas a medidas através da volumetria da lesão periapical. Os exames tomográficos foram realizados na Clínica de Radiologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos (UNESP). Para a aquisição do volume da TCFC, o plano de oclusão do paciente será orientado paralelamente ao plano horizontal (correspondente ao plano

axial) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Todos os exames foram feitos usando o tomógrafo *Classic I-Cat* (Imaging Science International, Hatchfield, EUA) com 6 cm de campo de visão ou FOV (field of view), voxel isotrópico de 0,25 mm, 120 kVp, 36,15 mAs e 12 bits de profundidade de escala de cinza. Todos os exames serão trabalhados em formato DICOM (Digital Image and Communication in Medicine) e lidos em software específico. Os dados DICOM de cada varredura serão salvos em arquivos separados, e, em seguida, importados e avaliados com o software Nemotec® (Nemotec®, Madrid, Espanha).

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

- a) De posse da tela de reconstrução multiplanar (MPR) será realizado o posicionamento das coordenadas “X”, “Y” e “Z” nos planos axial, sagital e coronal, de acordo com a arcada superior: corte axial – orientado com o plano intermaxilar alinhado ao sagital; corte sagital – orientado pelo plano maxilar formado pela espinha nasal anterior com a posterior, posicionado paralelamente ao plano horizontal; e corte coronal – orientado com a base da cavidade nasal paralela com o plano horizontal; sendo que todos os cortes deverão passar pela região de maior dimensão da lesão periapical;
- b) Realização da segmentação 2D e medidas das lesões periapicais (corte axial: medidas ântero-posterior e vestíbulo-palatina; corte sagital: medidas vestíbulo-palatina e supero-inferior; corte coronal: medidas supero-inferior e ântero-posterior) em todos os 3 planos para determinar a área radiolúcida que delimita a lesão;
- c) Após a criação das medidas nos planos de corte, sagital, coronal e axial, será determinado um polígono que abrangesse todo o limite da lesão, com margem de segurança, para a formatação da reconstrução 3D da radiolucência periapical;
- d) Será inspecionado os limites da lesão para verificar se contempla no polígono gerado e corrigir quando necessário;

- e) Utilizar a opção “detectar volume” do software para automaticamente calcular o volume da lesão.

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

Foram elaboradas tabelas contendo dados dos dentes selecionados, tais como volumetria da lesão periapical utilizando TCFC, níveis de endotoxinas e micro-organismos, e sinais / sintomas clínicos como dor prévia, sensibilidade a palpação e a percussão, presença de fístula e exsudato.

4.13 Análise volumétrica dos canais radiculares

Com as TCFC realizadas antes do tratamento endodôntico, verificaremos também as medidas dos canais radiculares com infecção primária com finalidade de obter o volume dos mesmos, a fim de verificar a se há relação entre os níveis de endotoxinas e carga microbiana com o volume do canal radicular.

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

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

- a) De posse da tela de reconstrução MPR será realizado o posicionamento das coordenadas “X”, “Y” e “Z” nos planos axial, coronal e sagital, de acordo com o dente a ser avaliado: corte axial – perpendicular ao longo eixo do dente, corte sagital – paralelo ao longo

eixo do dente, alinhado ao rebordo alveolar, corte coronal – alinhado ao longo eixo do dente;

- b) Realização da segmentação 2D e medidas dos canais radiculares em todos os 3 planos (axial, sagital e coronal) para determinar a área radiolúcida que delimita o canal radicular;
- c) Após a criação das medidas nos planos de corte sagital, coronal e axial, será determinado uma forma que abranja todo o limite do canal radicular, com margem de segurança, para formatação da reconstrução 3D da radiolucência do canal.
- d) Será inspecionado os limites do canal para verificar se está contemplada na forma gerada;
- e) Utilizar a opção “detectar volume” do software para automaticamente calcular os volumes dos canais radiculares.

Foram testados possíveis relações entre os níveis de endotoxinas (EU/mL) e carga de micro-organismos cultiváveis (UFC/mL) com o volume (mm³) do canal radicular e volume da lesão obtidas em TCFC.

4.14 Análise estatística

Os dados obtidos foram digitados em uma planilha do Excel, e analisados com o software Stata 12.0 (StataCorp., College 62 Station, TX, EUA). Inicialmente, a análise descritiva foi realizada a fim de ver a distribuição de dados. A relação entre as características clínicas e endotoxinas, UFC, micro-organismos e complexo bacteriano na 1^a coleta foi testada com o teste Mann Whitney.

Os resultados de UFC/mL foram transformados em log₁₀ e não apresentaram distribuição normal, sendo que o Modelo Linear Generalizado, com teste tipo análise de variância de medidas repetidas foi utilizado para monitorar a eficácia da Irrigação Ultrassônica Passiva.

O número de espécies de bactérias e carga bacteriana separada por complexos no *checkerboard*, foram analisados utilizando o Modelo Linear Generalizado, com teste tipo análise de variância.

Para análise de endotoxinas os dados foram transformados em log10 e apresentaram distribuição e foram submetidos ao teste ANOVA a dois fatores de medidas repetidas (5%).

Para todos os testes realizados, um valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

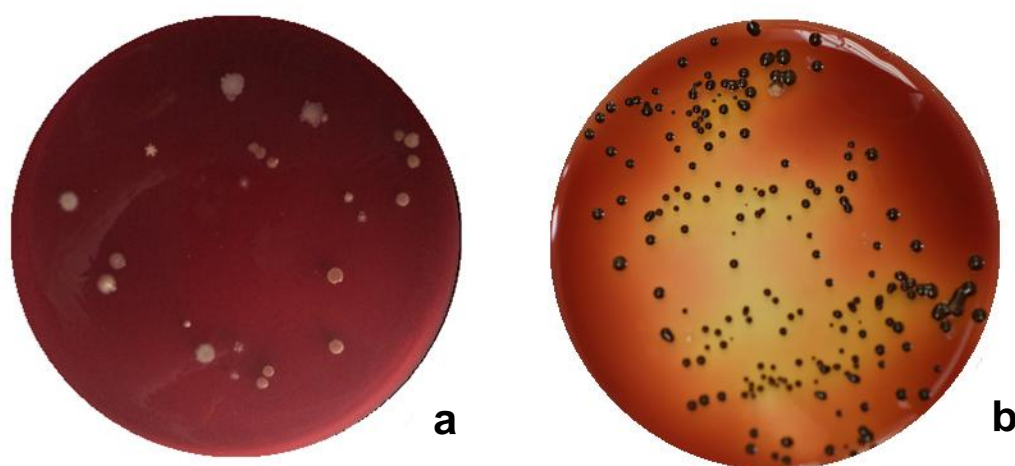
5 RESULTADO

5.1 Monitoramento do perfil microbiológico

5.1.1 Método de cultivo microbiológico

No método para cultivo microbiano, verificou-se crescimento de micro-organismos aeróbios e anaeróbios foi verificado em 95% das coletas (19/20) (Tabela 1, 2 e 3 e Figura 10).

Figura 10 – Placas *petri* para cultura microbiológica, evidenciando o crescimento de colônias bacterianas



Legenda: a) micro-organismos aeróbios (meio BHI); b) micro-organismos anaeróbios (meio FAA)
Fonte: Elaborado pelo autor.

As tabelas 1 à 4 mostram a carga de micro-organismos (UFC/mL) aeróbios e anaeróbios encontrados antes e após cada etapa do tratamento. O crescimento de micro-organismos aeróbios foi verificado em 75% dos casos das amostras iniciais coletadas (15/20).

Na tabela 1 é possível verificar a prevalência de micro-organismos aeróbios na coleta inicial, mostrando a redução nas etapas seguintes. Após PBM e irrigação final do NaOCl com e sem PUI (2ª coleta), pode-se observar que 90% das amostras (9/10) reduziram a carga microbiana no grupo com PUI, e 50% (5/10) no grupo sem PUI. Após a irrigação final do EDTA com e sem PUI (3ª coleta) não foi observado crescimento de micro-organismos aeróbios em 90% (9/10) dos casos no grupo com PUI, e 60% (6/10) no grupo sem PUI.

Tabela 1 – Número de micro-organismos aeróbios (UFC/mL) encontrado antes e após cada etapa do tratamento endodôntico

Grupo	Paciente	Dente	Coletas		
			1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta
Sem PUI	3	22	280	0	0
	5	34	7520	440	0
	6	12	2980	260	100
	8	45	7600	20	20
	9	21	0	0	0
	10	33	200	60	0
	11	21	1000	0	0
	14	44	5800	320	2520
	18	34	7000	0	20
	19	22	0	0	0
Com PUI	21	11	20	0	0
	22	31	0	0	0
	23	41	1300	0	0
	24	42	0	0	20
	25	12	1040	0	0
	28	22	0	0	0
	29	45	1400	0	0
	33	33	83200	0	0
	35	12	134000	40	0
	36	22	28000	0	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

O número de UFC foi transformado em log₁₀. Os dados não apresentaram distribuição normal ($p < 0,05$ para as coletas 2 e 3) e foram submetidos ao teste Linear - tipo de análise de variância a dois fatores de medidas repetidas (5%). A

utilização de PUI não influenciou nos resultados de UFC para aeróbios. O tempo de coleta foi estatisticamente significativo, sendo que a primeira coleta resultou em valores superiores de UFC/mL de aeróbio. As coletas seguintes apresentaram valores inferiores UFC/mL de aeróbios em comparação com a 1ª coleta, porém sem diferenças entre si (Tabela 2).

Tabela 2 – Média do número de micro-organismos aeróbios encontradas em cada grupo inicialmente e após o tratamento

Grupos	1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta
C/PUI	2.507252 Aa	0.160206 Ab	0.130103 Ab
S/PUI	2.658796 Aa	1.064276 Ab	0.800346 Ab

Legenda: Descrição Estatística (Aeróbios x Coleta – log 10).

Letras maiúsculas indicam diferenças nas colunas, letras minúsculas indicam diferenças nas linhas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O crescimento de micro-organismos anaeróbios estritos e facultativos foi observado em 95% dos casos (19/20) das coletas iniciais. Observando na tabela 3 verifica-se a diminuição de micro-organismos cultiváveis nas distintas etapas do tratamento endodôntico. Após o PBM e irrigação final do NaOCl com e sem PUI (2ª coleta), 90% (9/10) dos casos não apresentaram crescimento de micro-organismos anaeróbios no grupo com PUI, e 20% (2/10) no grupo sem PUI. Após a irrigação final do EDTA com e sem PUI (3ª coleta) não foi observado crescimento de micro-organismos anaeróbios em 80% (8/10) no grupo com PUI, e 30% (3/10) no grupo sem PUI. Após MIC (4ª Coleta) não houve crescimento em 80% (8/10) dos casos no grupo com PUI, e 10% (1/10) no grupo sem PUI.

Tabela 3 – Número de micro-organismos anaeróbios (UFC/mL) encontrado antes e após cada etapa do tratamento endodôntico

Grupo	Paciente	Dente	Coletas		
			1 ^a Coleta	2 ^a Coleta	3 ^a Coleta
Sem PUI	3	22	6080	0	0
	5	34	18880	30080	1600
	6	12	4400	60	40
	8	45	96000	1140	1120
	9	21	0	0	0
	10	33	694000	22560	10800
	11	21	29200	2520	1200
	14	44	1424000	780	2800
	18	34	26200	40	0
	19	22	6400	60	60
Com PUI	21	11	1840000	0	0
	22	31	320	0	0
	23	41	2840	0	0
	24	42	2340	0	380
	25	12	640	0	0
	28	22	20	0	0
	29	45	584000	0	0
	33	33	3840	0	0
	35	12	142000	60	0
	36	22	1240	0	40

Fonte: Elaborado pelo autor.

O número de UFC foi transformado em log₁₀. Os dados não apresentaram distribuição normal ($p < 0,05$ para as coletas 2 e 3) e foram submetidos ao teste Linear - tipo de análise de variância a dois fatores de medidas repetidas (5%). A utilização de PUI influenciou nos resultados de UFC para anaeróbios, sendo que menor número (UFC anaeróbio) foi detectado com PUI. O tempo de coleta foi estatisticamente significativo, sendo que a primeira coleta resultou em valores superiores de UFC de anaeróbios. As coletas seguintes apresentaram valores inferiores UFC de anaeróbios em comparação com a 1ª coleta, porém sem diferenças entre si. Houve interação entre os fatores uma vez que as coletas 1 e 3 apresentaram valores similares quando da comparação com ou sem PUI (Tabela 4).

Tabela 4 – Média do número de micro-organismos anaeróbios encontradas em cada grupo inicialmente e após o tratamento

Grupos	1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta
C/PUI	3.729617 Aa	0.177815 Ab	0.418184 Ab
S/PUI	4.137036 Aa	2.334038 Bb	2.019331 Bb

Legenda: Descrição Estatística (Anaeróbios x Coleta – log 10).

Letras maiúsculas indicam diferenças nas colunas, letras minúsculas indicam diferenças nas linhas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

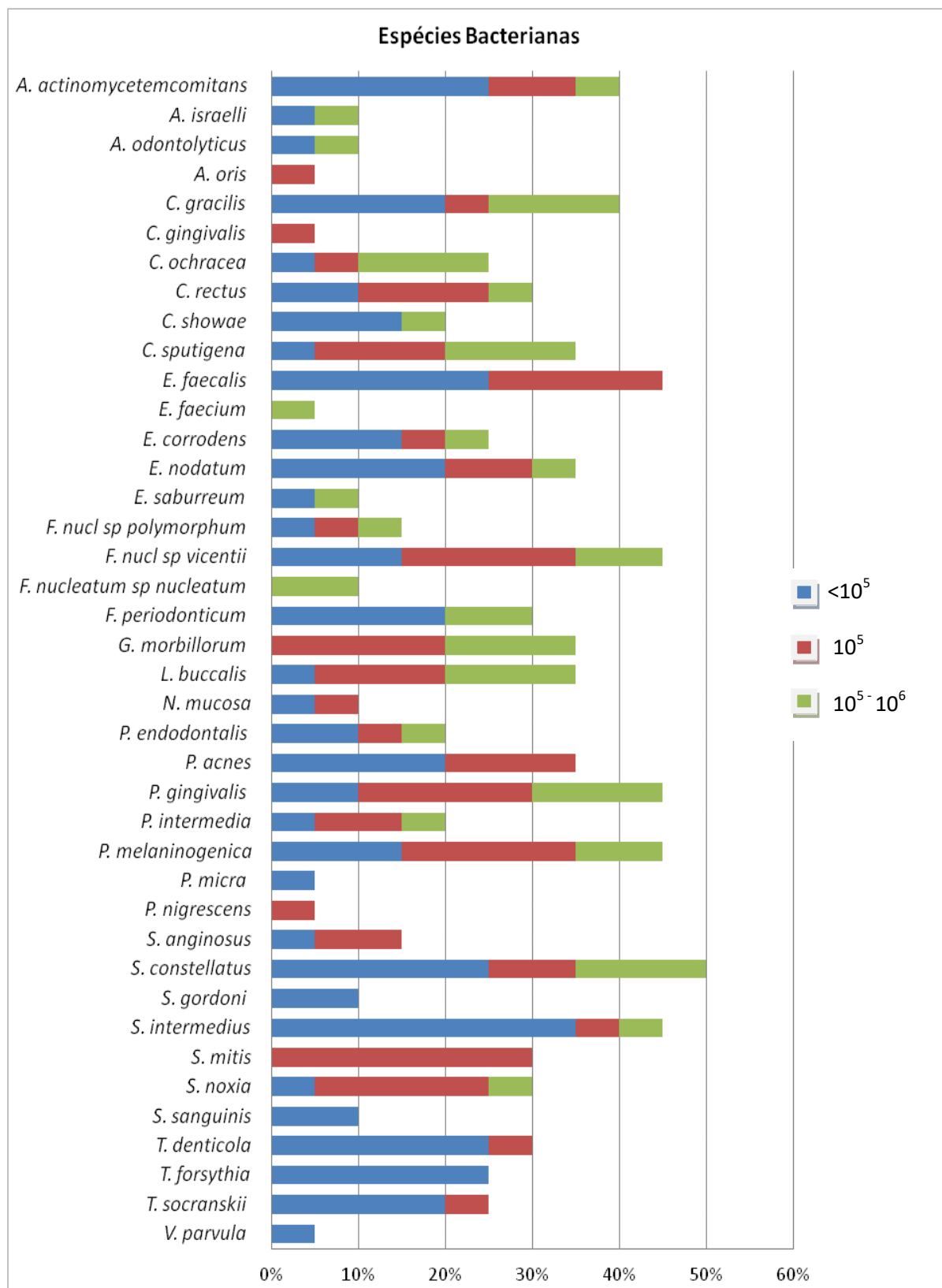
5.1.2 Monitoramento por *checkerboard* do perfil microbiano durante as diferentes fases do tratamento endodôntico.

Pelo método de hibridização DNA-DNA *checkerboard* em todas as amostras foram encontrados micro-organismos. O mínimo de espécies encontrado variou de 1 a 18 com média de 9.6 na primeira coleta. As espécies mais prevalentes foram *S. constellatus* (50%), *E. faecalis* (45%), *F. nucleatum SP* (45%), *P. gingivalis* (45%), *P. melaninogenica* (45%) e *S. intermedius* (45%) (Figura 11).

Nas amostras coletadas após o preparo biomecânico a frequência no número de espécies variou de 1 a 23 com média de 9.65 na segunda coleta, as espécies mais prevalentes foram *E. faecalis* (55%), *L. buccalis* (50%), *P. gingivalis* (50%), *A. actinomycetemcomitans* (45%), *P. acnes* (45%) e *S. constellatus* (45%) (Figura 12).

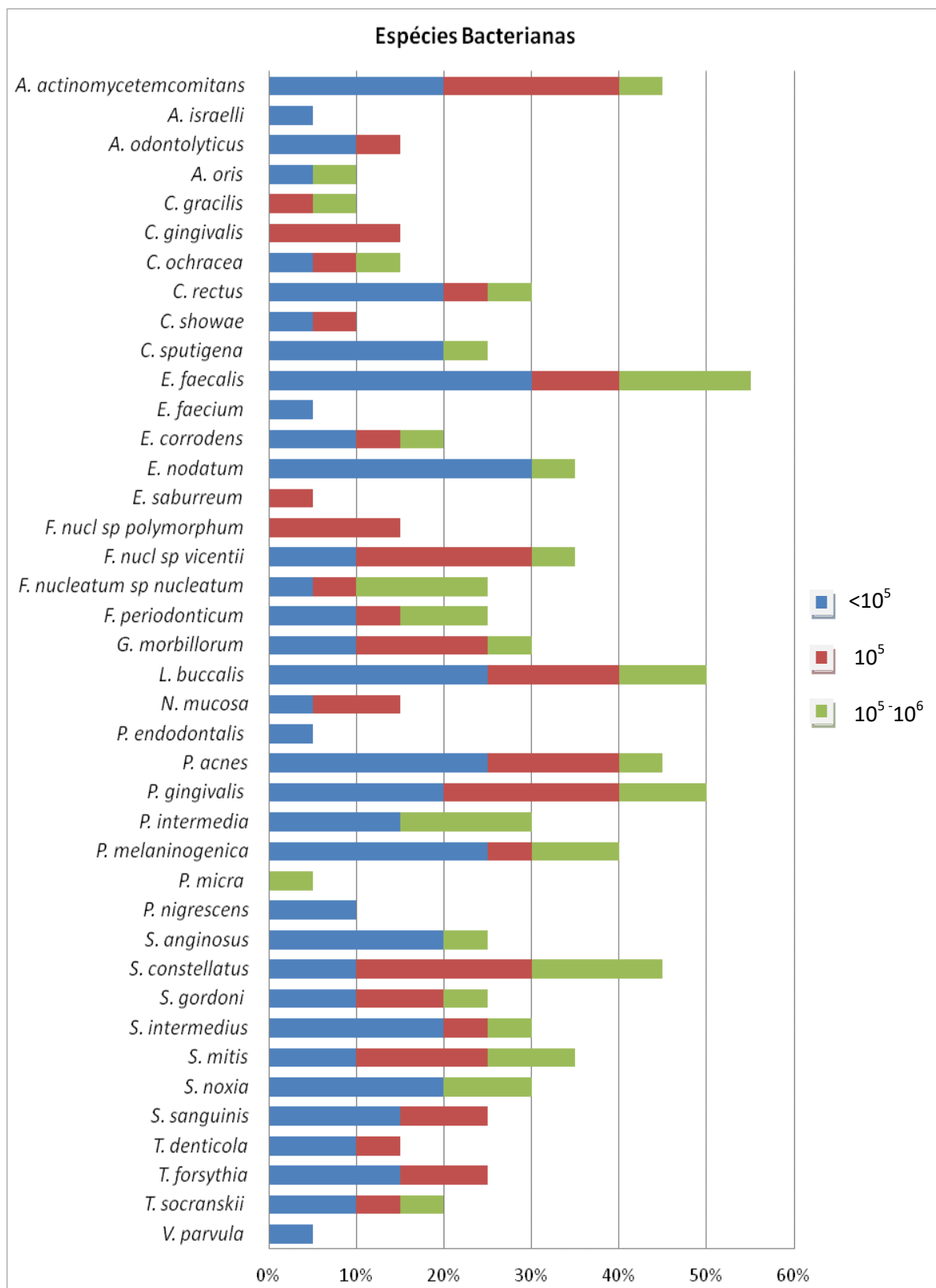
Nas amostras coletadas após colocação de EDTA a frequência no número de espécies variou de 1 a 23 com média de 8.7 na terceira coleta, as espécies mais prevalentes foram *E. faecalis* (50%), *C. gracilis* (45%), *S. constellatus* (45%) *L. buccalis* (40%) e *S. intermedius* (45%) (Figura 13).

Figura 11 – Gráfico referente a frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano em amostras de canais radiculares na primeira coleta



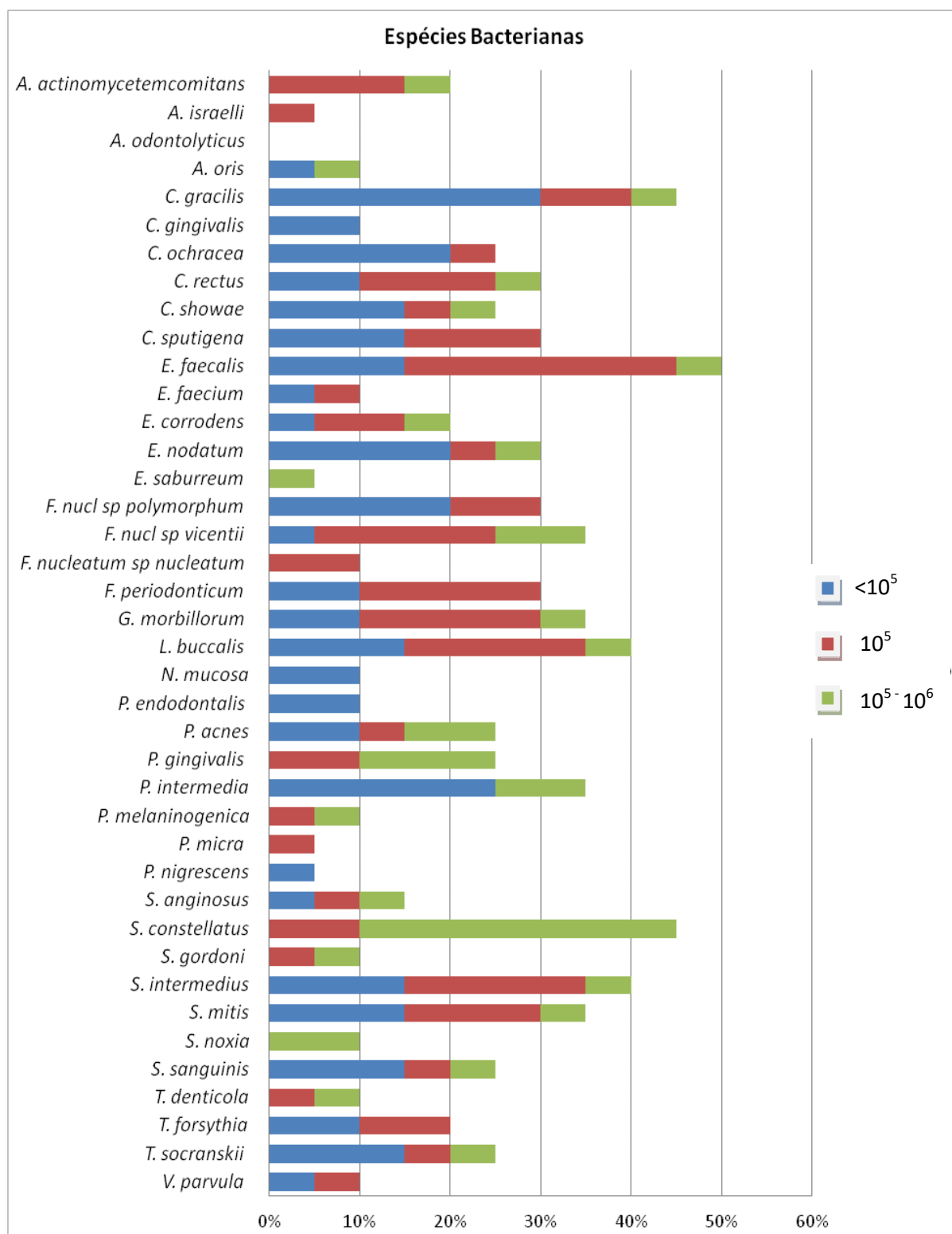
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 – Gráfico referente a frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano em amostras de canais radiculares na segunda coleta



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 – Gráfico referente a frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano em amostras de canais radiculares na terceira coleta



Fonte: Elaborado pelo autor.

O quadro 3 mostra a frequência das espécies bacterianas nas diferentes fases do tratamento

Quadro 3 - Frequência em número de casos de detecção dos micro-organismos pesquisados antes e após o preparo biomecânico e irrigação final com e sem PUI

(continua)

Micro-organismos	Incial	NaOCI		EDTA	
		C/ PUI	S/ PUI	C/ PUI	S/ PUI
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (g - est)	18	13	5	11	2
<i>Tannerella forsythia</i> (g- est)	5	3	4	0	7
<i>Treponema denticola</i> (g- est)	7	3	1	3	2
<i>Actinomyces odontolyticus</i> (g + fac)	0	2	2	0	0
<i>Veillonella parvula</i> (g - est)	1	1	0	2	1
<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans</i> (g - fac)	12	13	2	4	5
<i>Capnocytophaga gingivalis</i> (g - est)	2	2	4	0	2
<i>Capnocytophaga ochracea</i> (g - est)	12	2	4	1	5
<i>Capnocytophaga sputigena</i> (g- est)	16	3	4	2	7
<i>Eikenella corrodens</i> (g- fac)	8	1	6	3	5
<i>Fusobacterium nucleatum ssp nucleatum</i> (g- est)	6	6	6	0	4
<i>Fusobacterium nucleatum ssp polymorphum</i> (g - est)	6	6	0	4	4
<i>Fusobacterium nucleatum ssp vincentii</i> (g- est)	17	2	11	12	3
<i>Fusobacterium periodonticum</i> (g- est)	10	4	6	3	7
<i>Parvimonas micra</i> (g+ est)	1	3	0	2	0
<i>Prevotella intermédia</i> (g- est)	8	6	6	5	6
<i>Prevotella nigrescens</i> (g- est)	2	2	0	0	1
<i>Streptococcus constellatus</i> (g+ fac)	15	16	3	19	6
<i>Campylobacter gracilis</i> (g- est)	15	2	3	6	7
<i>Campylobacter rectus</i> (g- est)	11	3	6	6	5
<i>Campylobacter showae</i> (g- est)	9	3	0	2	6
<i>Eubacterium nodatum</i> (g+ est)	11	8	1	8	1
<i>Streptococcus gordonii</i> (g+ fac)	2	2	7	0	5
<i>Streptococcus intermedius</i> (g+ fac)	12	5	4	4	10
<i>Streptococcus mitis</i> (g+ fac)	12	5	9	4	8
<i>Streptococcus sanguinis</i> (g + fac)	2	3	4	1	7
<i>Enterococcus faecalis</i> (g+ fac)	13	11	8	12	6
<i>Treponema socranskii</i> (g- est)	6	5	2	6	2
<i>Eubacterium saburreum</i> (g+ est)	4	2	0	3	0
<i>Actinomyces oris</i> (g+ fac)	2	4	0	3	1
<i>Streptococcus anginosus</i> (g+ fac)	5	5	2	3	3
<i>Porphyromonas endodontalis</i> (g - est)	7	1	0	1	1
<i>Enterococcus faecium</i> (g+ fac)	3	1	0	1	2

Micro-organismos	Incial	NaOCl		EDTA	
		C/ PUI	S/ PUI	C/ PUI	S/ PUI
<i>Actinomyces israelii (g+ fac)</i>	4	1	0	0	2
<i>Neisseria mucosa (g- fac)</i>	3	2	3	0	2
<i>Selemonas noxia (g- est)</i>	12	5	5	0	6
<i>Propionibacterium acnes (g+ earotoletante)</i>	10	6	8	3	7
<i>Prevotella melaninogenica (g- est)</i>	12	5	8	0	5
<i>Gemella morbillorum (g+ est)</i>	8	3	8	7	6
<i>Leptotrichia buccalis (g- est)</i>	10	7	10	7	7

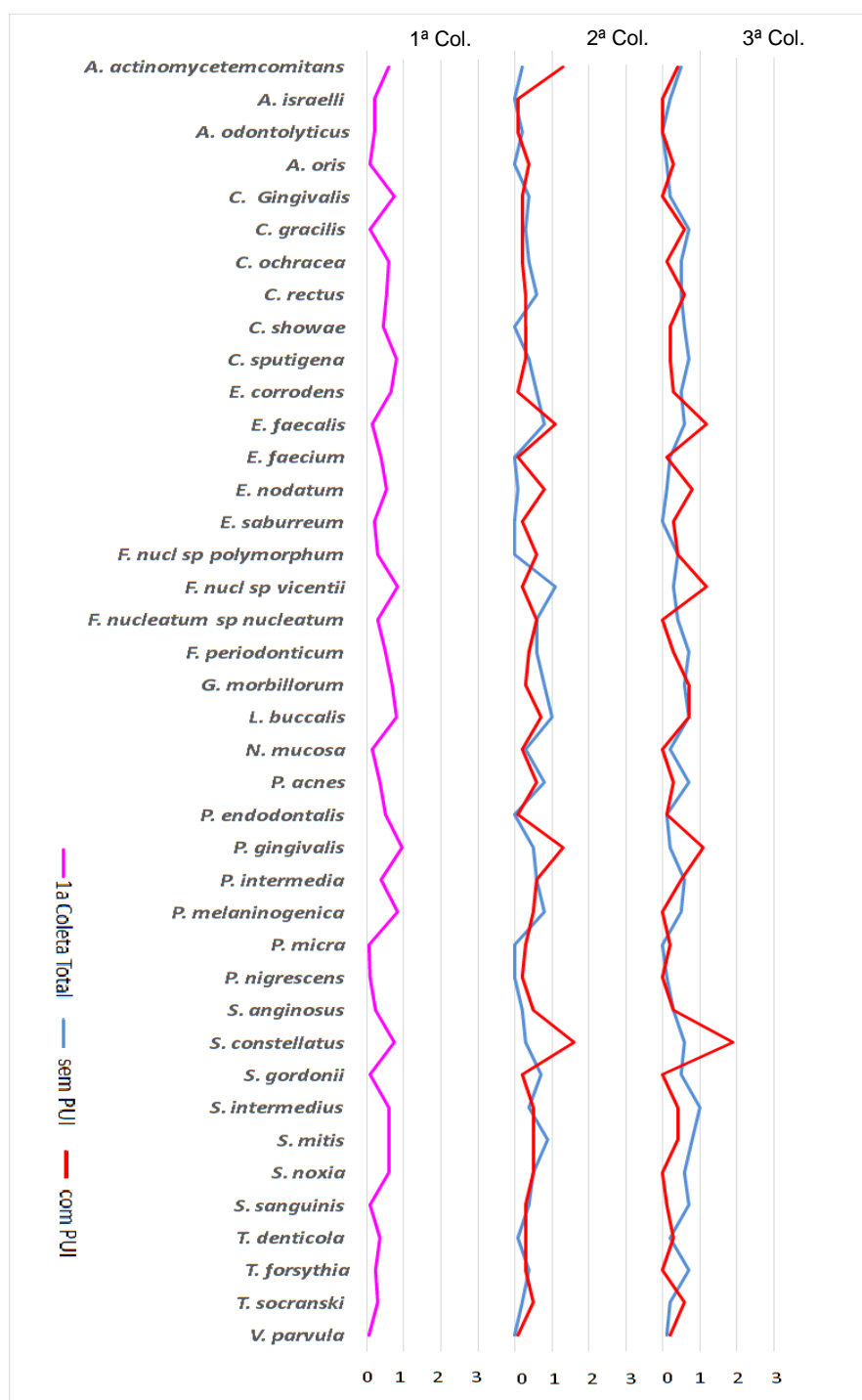
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Associação de sinais e sintomas com microbiota presente e complexos

Durante a pesquisa foram tratados 20 dentes anteriores unirradiculares com presença de lesão periapical e necrose pulpar. Na realização da anamnese se apresentaram 3 incisivos centrais superiores (3/20), 7 incisivos laterais superiores (7/20), 2 incisivos centrais inferiores (2/20), 1 incisivo lateral inferior (1/20), 2 caninos inferiores (2/20), 3 primeiros pré-molares inferiores (3/20) e 2 segundos pré-molares inferiores (2/20). Foi avaliada a presença de dor previa ao atendimento, dor na palpação apical e dor ao realizar percussão vertical; verificou-se presença de fístula e a presença de exsudato durante o atendimento (Tabelas 5 e 6).

A figura 14 mostra a diferença entre o valor médio da carga bacteriana balanceado pelo número de pacientes para todas as espécies pesquisadas no *checkerboard* durante as diferentes fases do atendimento.

Figura 14 – Gráfico de linhas mostrando a diferença entre o valor médio da carga bacteriana balanceado pelo número de pacientes para todas as espécies pesquisadas nas diferentes fases do tratamento endodôntico



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 – Sinais e sintomas nos diferentes grupos experimentais

Grupo	Paciente	Dente	Dor	Dor à percussão	Dor à palpação	Presença de fistula	Presença de exsudato
Sem PUI	3	22	✗	✗	✓	✓	✓
	5	34	✗	✗	✗	✗	✗
	6	12	✓	✗	✗	✗	✗
	8	45	✗	✗	✗	✗	✗
	9	21	✗	✗	✗	✗	✗
	10	33	✗	✗	✗	✗	✗
	11	21	✗	✗	✗	✗	✗
	14	44	✗	✗	✗	✗	✗
	18	34	✗	✗	✗	✗	✗
	19	22	✓	✓	✗	✗	✗
Com PUI	21	11	✗	✗	✗	✗	✗
	22	31	✗	✗	✓	✗	✓
	23	41	✗	✗	✓	✗	✓
	24	42	✗	✗	✓	✓	✗
	25	12	✗	✗	✗	✗	✗
	28	22	✗	✗	✗	✗	✗
	29	45	✗	✗	✗	✗	✗
	33	33	✗	✗	✗	✗	✗
	35	12	✗	✓	✓	✗	✗
	36	22	✓	✓	✗	✗	✗

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6 – Distribuição porcentual dos sinais e sintomas nos diferentes grupos experimentais






Grupo	Dor	Dor à percussão	Dor à palpação	Presença de fístula	Presença de exsudato	Total
Sem PUI	2 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)	6
Com PUI	1 (10)	2 (10)	4 (10)	1 (10)	2 (10)	10
Total	3 (20)	3 (20)	5 (20)	2 (20)	3 (20)	16(20)
	15%	15%	25%	10%	15%	80%

Fonte: Elaborado pelo autor.

A tabela 6 mostra a porcentagem dos pacientes que apresentaram sinais e sintomas, dos 20 pacientes em atendimento 15% (3/20) apresentaram dor prévia, 15% apresentaram dor a percussão (3/20), 25% (5/20) relataram ter tido dor ao realizar palpação da zona lesada, 10% dos 20 casos apresentaram fístula e 15% (3/20) teve a presença de exsudato durante o atendimento.

Quando avaliado a influência do PUI após preparo biomecânico ou a irrigação final com solução de NaOCl e EDTA, nos diferentes complexos bacterianos e bactérias isoladas foi possível verificar associação positiva entre em complexo laranja e sinais e sintomas bem como entre *P. endodontalis*, *E. faecium*, *E. saburreum* com sinais e sintomas (Quadro 4).

Quadro 4 - Associações positivas entre complexos e micro-organismos com sinais e sintomas clínicos

Sinais e Sintomas	Associação Positiva	
	Complexos Bacterianos	Espécies de micro-organismos
Dor prévia	Laranja Principal 	<i>P. endodontalis</i> <i>E. faecium</i>
Dor à percussão	Laranja Principal  Laranja Periférico 	<i>E. faecium</i>
Presença de Fístula	Laranja Principal  Laranja Periférico 	<i>E. saburreum</i>

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Quantificação de endotoxinas

A tabela 7 mostra a redução dos níveis de endotoxinas ocorrido durante o tratamento endodôntico, em relação a coleta inicial. Endotoxinas foram verificadas

em 100% (20/20) das amostras.

Tabela 7 – Quantificação de endotoxinas (EU/mL) antes e durante o tratamento endodôntico

Grupo	Paciente	Dente	1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta
Sem PUI	3	22	4.75	0.388	28.7
	5	34	1960	1143	30.3
	6	12	388	162	172
	8	45	28	3.39	1.26
	9	21	3.54	6.69	0.718
	10	33	1.76	8.22	2.73
	11	21	188	28.6	38.8
	14	44	179	1.4	47,5
	18	34	626	1.86	32.8
	19	22	522	2.07	37.8
Com PUI	21	11	117	1.23	12.5
	22	31	118	2.34	9.6
	23	41	23.2	325	6.73
	24	42	319	77.7	42.7
	25	12	55.6	6.29	11.3
	28	22	2.28	26.2	6.66
	29	45	32	4.74	7.69
	33	33	802	149	18.4
	35	12	9.79	33	4.33
	36	22	16.7	0.473	1.33

Fonte: Elaborado pelo autor.

Verificou-se que a utilização de PUI não influenciou nos resultados e que os valores de endotoxinas foram maiores na primeira coleta; a segunda e terceira coleta foram semelhantes entre si (Tabela 8).

Tabela 8. Média do número de endotoxinas encontradas em cada grupo na 1ª coleta e após o tratamento: 1ª coleta > 2ª coleta = 3ª coleta. (Letras maiúsculas indicam diferenças nas colunas, letras minúsculas indicam diferenças nas linhas)

Grupos	1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta
C/PUI	1.673518 Aa	1.112072 Ab	0.932526 Ab
S/PUI	1.884071 Aa	0.931487 Ab	1.192640 Ab

Legenda: Descrição Estatística (Endotoxinas x Coleta – log 10)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Pode se observar que os tratamentos com e sem PUI diminuíram o número de endotoxinas quando comparado com a coleta inicial. Não tendo diferença entre os resultados finais.

6 DISCUSSÃO

6.1 Da metodologia

Diferentes protocolos de desinfecção têm sido utilizados na tentativa de conseguir a completa limpeza do canal radicular, visto que a remoção de micro-organismos e seus produtos do interior do sistema de canais radiculares é de extrema importância para o sucesso endodôntico. O objetivo deste estudo, portanto, foi comparar a efetividade antibacteriana e sobre endotoxinas de dois diferentes métodos de irrigação.

Durante o preparo biomecânico do sistema de canais radiculares é produzida uma camada de *smear layer* (“lama dentinária”), que deve ser removida das paredes do canal radicular. A *smear layer* se apresenta como um material orgânico e inorgânico, de aparência amorfa, irregular com presença de bactérias e seus subprodutos (Mccomb, Smith, 1975; Lester, Boyde, 1977), sendo fundamental sua remoção ao término do preparo, uma vez que sua permanência pode comprometer o sucesso do tratamento endodôntico (Mccomb, Smith, 1975). O uso alternado de solução de NaOCl e EDTA é utilizado para remover a porção orgânica e inorgânica desta camada (Menezes AC *et al.*, 2003) no entanto, estudos prévios tem mostrado que o ultrassom pode melhorar a remoção de *smear layer* (Van Der Sluis *et al.*, 2007) uma vez que gera uma onda cavitacional nas soluções favorecendo a remoção dos micro-organismos que estão aderidos nas paredes do canal radicular e nos túbulos dentinários.

No presente estudo foi proposto avaliar a efetividade *in vivo* do NaOCl 2.5% e EDTA com e sem ativação com irrigação ultrassônica passiva na limpeza e desinfecção de canais com infecções endodônticas primárias.

Utilizou-se neste estudo o hipoclorito de sódio 2.5% como solução irrigadora por ser considerado uma das principais soluções utilizadas durante o preparo biomecânico, uma vez que apresenta propriedades antimicrobianas e capacidade de dissolver tecido pulpar (Byström, Sundqvist, 1983; Siqueira *et al.*, 1998). Foram utilizados 24 mL de hipoclorito de sódio 2.5% durante o preparo biomecânico,

realizando a neutralização por terços do conteúdo necrótico, semelhante à metodologia utilizada em outros estudos (Kuruvilla, Kamath, 1998; Valera *et al.*, 2010, 2014; Ferreira *et al.*, 2015; Cardoso *et al.*, 2016).

Entretanto, NaOCl é incapaz de remover a camada de *smear layer* (Chang *et al.*, 2001; Menezes AC *et al.*, 2003; Asna Ashari *et al.*, 2009; Valera *et al.*, 2010), uma vez que não atua sobre a parte inorgânica da camada residual. Assim, para melhor remoção desta camada, torna-se necessário o uso de uma solução que tenha propriedades desmineralizantes (Hülsmann *et al.*, 2003), sendo o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a substância química mais utilizada, com eficiência comprovada na dissolução de *smear layer* (Carvalho *et al.*, 2008; Haapasalo M *et al.*, 2010; Valera *et al.*, 2010; Martins Justo *et al.*, 2014). O EDTA reage com os íons de cálcio na dentina e forma quelatos de cálcio solúveis, sendo que o mesmo descalcifica a dentina a uma profundidade de 20-30 µm (Frithjof Von Der Fehr, Ôstby, 1963; Al-Jadaa *et al.*, 2009). Neste estudo foi utilizado 1mL de EDTA, até que o canal fosse preenchido, deixando-o atuar somente na camada residual por 5 minutos, como preconizado em trabalhos anteriores (Cardoso *et al.*, 2016).

Vários métodos têm sido pesquisados para a quantificação e identificação de bactérias, assim como, para a quantificação de endotoxinas. No presente estudo o conteúdo do canal radicular foi armazenado durante diferentes fases do atendimento clínico em VMGA III (Ali *et al.*, 1995) utilizado como meio de transporte, com a finalidade de identificar a viabilidade bacteriana. Na sequência foi realizada a semeadura das amostras em placas de petri contendo meio de cultura FAA e BHI, auxiliando na detecção de microrganismos anaeróbios estritos ou facultativos e aeróbios, respectivamente, presentes nos canais radiculares.

Métodos de diagnóstico molecular têm sido amplamente utilizados em estudos clínicos para detectar e quantificar as espécies microbianas que podem colonizar a cavidade oral (Socransky *et al.*, 1994; Do Nascimento *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2015). A metodologia de hibridização DNA-DNA realizada nesta pesquisa, utiliza sondas de DNA (segmentos de DNA de cadeia simples) marcadas com uma enzima, isótopos radioativos ou um componente quimiluminescente, que podem localizar e ligar-se às suas sequências de ácido nucléico complementares. Sondas de oligonucleotídeos baseadas em genes específicos podem apresentar limitada reatividade cruzada, podendo diferenciar espécies intimamente relacionadas

ou mesmo subespécies (Socransky *et al.*, 1994; Siqueira, Rôças, 2005). Este método permitiu a identificação e quantificação de até 40 microrganismos presentes nos canais radiculares, nas coletas realizadas nas diferentes fases do tratamento.

6.2 Dos resultados

Os resultados do presente estudo mostraram que pelo método de cultivo houve redução significativa dos micro-organismos após o preparo biomecânico com e sem uso de PUI. Estes resultados são devido a ação mecânica dos instrumentos associados ao uso do NaOCl como solução irrigadora. O NaOCl possui excelente ação solvente de tecido e pH altamente alcalino favorecendo a morte dos micro-organismos (Ordinola-Zapata *et al.*, 2012).

Em associação ao EDTA, a ação do NaOCl é potencializada uma vez que o EDTA auxilia na remoção do *smear layer* por sua ação quelante (Carvalho *et al.*, 2008) e age na matéria inorgânica favorecendo a limpeza das paredes do canal radicular. De acordo com Haapasalo K *et al.* (2012) a remoção da camada residual só pode ser obtida quando se utiliza NaOCl seguido de EDTA; pode ser verificado neste estudo redução significativa de micro-organismos após o preparo com NaOCl seguido de EDTA com e sem irrigação ultrassônica passiva.

No presente estudo valores absolutos mostraram maior remoção de micro-organismos com uso de PUI, entretanto sem diferenças significantes entre eles; Rodrigues *et al.* (2015) encontraram resultados semelhantes ao do presente estudo uma vez que observaram redução porcentual média de micro-organismos com uso de PUI, mas esta redução não foi significativa comparado ao grupo sem PUI.

A irrigação ultrassônica passiva tem sido sugerida como complemento ao preparo biomecânico para potencializar a limpeza e a desinfecção do sistema de canais radiculares (Plotino *et al.*, 2007). De acordo com Ahmad *et al.* (1987) e Van Der Sluis *et al.* (2007) os benefícios do PUI estão relacionados a cavitação e aquecimento da solução irrigadora. Quando se associa o US com NaOCl, ocorre um aquecimento desta substância, aumentando a ação antimicrobiana e a eliminação de detritos do interior dos canais radiculares (Briseno *et al.*, 1992), devido a micro-

corrente acústica ocorre aumento da velocidade e do efeito do irrigante no canal radicular (Van Der Sluis *et al.*, 2007), contribuindo para o arraste mecânico dos detritos e micro-organismos presentes. Vários autores verificaram *in vitro* a efetividade desta ação conjunta da solução NaOCl com irrigação ultrassônica passiva.

De Almeida *et al.* (2014) verificaram que PUI contribui de forma significativa na redução do conteúdo microbiano durante o tratamento de canais radiculares infectados com *E. faecalis*. Beus *et al.* (2012) realizaram um estudo clínico randomizado comparando preparo com e sem ativação com PUI e verificaram que 84% dos canais estavam livres de bactérias ao final do preparo biomecânico tendo como irrigação final a ativação por PUI, dos casos sem ativação esta redução de bactérias foi de 80%. Paiva *et al.* (2013), também verificaram que a abordagem suplementar com PUI vai melhorar significativamente a desinfecção dos canais radiculares de forma semelhante aos resultados encontrados no presente estudo.

Neste estudo todas as amostras apresentaram entre 1 e 18 espécies de micro-organismos, tendo uma média de 9,6 bactérias por canal, o que sustenta o fato de que as infecções endodônticas possuem caráter polimicrobiano (Siqueira, 2003). Das bactérias mais prevalentes na primeira coleta verificou-se três G+ anaeróbios facultativos e três anaeróbios estritos G-, que foram encontradas em 45% ou mais dos casos. *S. constellatus* foi a mais frequente, seguido de *E. faecalis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. melaninogenica* e *Sintermedius*. Verificou-se que *S. constellatus* foi o micro-organismo mais frequente (50% dos casos) e de acordo com (Claridge *et al.*, 2001) esta bactéria possui um fenótipo invasivo e esta relacionado a formação de abscesso. Verificou-se que mesmo após o PBM e uso de MIC esta bactéria não foi eliminada. (Gomes *et al.*, 2015) verificaram alta frequência de *S. constellatus* em canais infectados e associados a bolsa periodontal. Também os demais micro-organismos encontrados como *Fusobacterium nucleatum sp* e *Porphyromonas gingivalis*, bactérias Gram negativas foram relacionadas em trabalhos anteriores a dentes com infecção endodôntica primária (Siqueira, 2003; Ferreira *et al.*, 2015). *E. faecalis* foi encontrado em 45% dos casos na 1ª coleta e aumentou em frequência na 2ª e 3ª coletas após PBM. *E. faecalis* é um coco anaeróbio facultativo G+ com alta capacidade de formar biofilme e está relacionado à infecção endodôntica persistente (Stuart *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2006). Além

disso, é considerado um micro-organismo resistente ao tratamento endodôntico uma vez que se adapta facilmente a mudanças como: a) pH, o que o torna resistente ao hidróxido de cálcio (Ferreira *et al.*, 2015); b) osmolaridade mesmo na presença de soluções irrigadoras e do preparo ele pode permanecer no sistema de canais radiculares (Peciulienė *et al.*, 2001); c) ausência ou alteração nutricional o que lhe dá resistência aos tratamentos e lhe permite crescer em monoculturas (Moller *et al.*, 2004; Fisher, Phillips, 2009) ainda do uso de ultrassom aumentar a temperatura da solução irrigadora, no presente estudo o tratamento com PUI não foi capaz de eliminar ou reduzir a frequência deste micro-organismo uma vez que *E. faecalis* pode sobreviver a temperatura de 60 graus durante 30 minutos (Stuart *et al.*, 2006).

As infecções endodônticas primárias são caracterizadas por comunidades de 83 multiespécies (Sundqvist, 1992; Jacinto *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2015). Assim a interação entre estes micro-organismos pode resultar em sintomas clínicos diferentes dos obtidos por espécies bacterianas sozinhas (Gomes *et al.*, 2004).

No presente estudo verificou-se que dor espontânea e à percussão e fístula estavam associados ao complexo bacteriano laranja; as bactérias independentes como *E. saburreum* associado a fístula; *E. faecium* relacionado a dor espontânea e à percussão e *P. endodontalis* relacionada à dor.

Quando se trata das amostras em complexos, os sinais e sintomas clínicos estiveram associados a bactérias Gram-negativas. As bactérias Gram-negativas, além de possuírem diversos fatores de virulência, que desencadeiam uma reação inflamatória e reabsorção óssea (Leonardo *et al.*, 2004). Estudos anteriores mostram que fatores de virulência de bactérias gram – como endotoxinas estão associadas à sintomatologia clínica e maiores áreas de reabsorção óssea (Leonardo *et al.*, 2004; Jacinto *et al.*, 2005; Martinho, Gomes, 2008)

Bactérias Gram-negativas possuem na sua parede celular LPS que durante sua morte ou duplicação são liberados. Verificou-se no presente estudo grande quantidade de microrganismos anaeróbios Gram-negativos, o que está de acordo com demais estudos que avaliam infecções endodônticas primárias (Fabricius *et al.*, 2006). Assim, verificou-se também grande quantidade de endotoxinas em todas as amostras de canais observadas no presente estudo. Devido a porção lipídica, o LPS requer um período de tratamento mais longo para que ocorra sua inativação efetiva

(Siqueira, Lopes, 1999). Assim, no presente estudo houve redução dos níveis de endotoxinas, mas somente com o preparo biomecânico elas não foram eliminadas totalmente. Mesmo com o uso de PUI não houve melhora na redução deste LPS. Outros estudos tiveram resultados semelhantes. Valera et al. (2016), verificaram que após preparo biomecânico as endotoxinas foram reduzidas, mas não completamente eliminadas. Silva *et al.* (2016), ao avaliar a efetividade do preparo na remoção das endotoxinas do canal radicular de dentes com periodontite apical, verificaram que a ampliação apical foi eficaz na redução dos níveis de endotoxina, mas não foi possível eliminá-las completamente. Valera et al. (2015), também verificaram que mesmo utilizando medicação intracanal não foi possível eliminar completamente as endotoxinas.

Os resultados obtidos no presente estudo revelam que o uso em conjunto dos agentes químicos durante o preparo biomecânico e da Irrigação Ultrassônica Passiva na terapêutica de canais radiculares influenciam na eliminação de bactérias anaeróbias mas, não nos níveis de endotoxinas.

7 CONCLUSÃO

Após análise dos resultados do presente estudo foi possível concluir que:

- a) Todos os canais apresentaram micro-organismos sendo que anaeróbios estiveram presentes em grande quantidade;
- b) Os micro-organismos mais frequentes foram *S. constellatus*, *E. faecalis*, *F. nucleatum SP*, *P. gingivalis* e *S. intermedius*;
- c) Após preparo biomecânico do canal radicular e irrigação com PUI, houve redução significativa da carga de micro-organismos anaeróbios;
- d) Os micro-organismos mais resistentes ao preparo biomecânico com e sem PUI foram *S. constellatus*, *E. faecalis*, *S. intermedius* e *L. bucalis*;
- e) Houve associação positiva entre sinais e sintomas clínicos com complexo laranja e com micro-organismos;
- f) Os níveis de endotoxinas que diminuíram após o preparo biomecânico não foram inferenciados por PUI a irrigação convencional.

REFERÊNCIAS*

- Abella F, Patel S, Durán-Sindreu F, Mercadé M, Bueno R, Roig M. An evaluation of the periapical status of teeth with necrotic pulps using periapical radiography and cone-beam computed tomography. *Int Endod J*. 2014 Apr;47(4):387-96. doi: 10.1111/iej.12159. Epub 2013 Jul 26. PMID: 23889592.
- Ahmad M, Pitt Ford TR, Crum LA. Ultrasonic debridement of root canals: an insight into the mechanisms involved. *J Endod*. 1987 Mar;13(3):93-101. doi: 10.1016/S0099-2399(87)80173-5 PMID: 3471836
- Al-Jadaa A, Paqué F, Attin T, Zehnder M. Acoustic hypochlorite activation in simulated curved canals. *J Endod*. 2009 Oct;35(10):1408-11. doi: 10.1016/j.joen.2009.07.007. PMID: 19801241.
- Ali RW, Bancescu G, Nielsen O, Skaug N. Viability of four putative periodontal pathogens and enteric rods in the anaerobic transport medium VMGA III. *Oral Microbiol Immunol*. 1995 Dec;10(6):365-71.
- Amato M, Vanoni-Heineken I, Hecker H, Weiger R. Curved versus straight root canals: the benefit of activated irrigation techniques on dentin debris removal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Apr;111(4):529-34. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.11.002. PMID: 21310632.
- Asna Ashari M, Fayaz F, Moezzi Ghadim N, Alim Marvasti L, Mehrabi Y. Evaluation of the antimicrobial effects of MTAD, NaOCl against selected endodontic pathogens. *Iran Endod J*. 2009 Spring;4(2):63-8. Epub 2009 Apr 17. PMID: 23940488.
- Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J*. 2007 Mar;52(1 Suppl):S64-82. PMID: 17546863.
- Baumgartner JC, Mader CL. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. *J Endod*. 1987 Apr;13(4):147-57. PMID: 3106553.
- Bender IB. Factors influencing the radiographic appearance of bony lesions. *J Endod*. 1997 Jan;23(1):5-14. PMID: 9594738.
- Bender IB, Seltzer S. Roentgenographic and direct observation of experimental lesions in bone: I. 1961. *J Endod*. 2003 Nov;29(11):702-6; discussion 701. PMID: 14651274.
- Beus C, Safavi K, Stratton J, Kaufman B. Comparison of the effect of two endodontic irrigation protocols on the elimination of bacteria from root canal system: a prospective, randomized clinical trial. *J Endod*. 2012 Nov;38(11):1479-83. doi: 10.1016/j.joen.2012.07.005. PMID: 23063221.

Briseno BM, Wirth R, Hamm G, Standhartinger W. Efficacy of different irrigation methods and concentrations of root canal irrigation solutions on bacteria in the root canal. *Endod Dent Traumatol*. 1992 Feb;8(1):6-11. PMID: 1396362.

Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1983 Mar;55(3):307-12. PMID: 6572884.

Capar ID, Ozcan E, Arslan H, Ertas H, Aydinbelge HA. Effect of different final irrigation methods on the removal of calcium hydroxide from an artificial standardized groove in the apical third of root canals. *J Endod*. 2014 Mar;40(3):451-4. doi: 10.1016/j.joen.2013.10.019. PMID: 24565670.

Cardoso FG, Chung A, Martinho FC, Camargo CH, Carvalho CA, Gomes BP, et al. Investigation of bacterial contents from persistent endodontic infection and evaluation of their inflammatory potential. *Braz Dent J*. 2016 Jul-Aug;27(4):412-8. doi: 10.1590/0103-6440201600520.

Carvalho AS, Camargo CHR, Valera MC, Camargo SEA, Mancini MNG. Smear Layer Removal by Auxiliary Chemical Substances in Biomechanical Preparation: A Scanning Electron Microscope Study. *J Endod*. 2008 Nov;34(11):1396-400. doi:10.1016/j.joen.2008.08.012. PMID: S0099239908007322.

Cengiz T, Aktener BO, Piskin B. Effect of dentinal tubule orientation on the removal of smear layer by root canal irrigants. A scanning electron microscopic study. *Int Endod J*. 1990 May;23(3):163-71. PMID: 2128075.

Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 Oct;92(4):446-50. PMID: 11598582.

Claridge JE 3rd, Attorri S, Musher DM, Hebert J, Dunbar S. *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus anginosus* ("Streptococcus milleri group") are of different clinical importance and are not equally associated with abscess. *Clin Infect Dis*. 2001 May 15;32(10):1511-5. doi: 10.1086/320163. PMID: 11317256.

Cunningham WT, Balekjian AY. Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1980 Feb;49(2):175-7. PMID:6928291.

De Almeida AP, Souza MA, Miyagaki DC, Dal Bello Y, Cecchin D, Farina AP. Comparative evaluation of calcium hypochlorite and sodium hypochlorite associated with passive ultrasonic irrigation on antimicrobial activity of a root canal system infected with *Enterococcus faecalis*: an in vitro study. *J Endod*. 2014 Dec;40(12):1953-7. doi: 10.1016/j.joen.2014.08.025.

Do Nascimento C, dos Santos JN, Pedrazzi V, Pita MS, Monesi N, Ribeiro RF, et al. Impact of temperature and time storage on the microbial detection of oral samples by Checkerboard DNA-DNA hybridization method. *Arch Oral Biol.* 2014 Jan;59(1):12-21. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.10.007. PMID: 24246268

Fabricius L, Dahlén G, Sundqvist G, Happonen RP, Möller AJ. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *Eur J Oral Sci.* 2006 Aug;114(4):278-85. doi: 10.1111/j.1600-0722.2006.00380.x. PMID: 16911098.

Ferreira NS, Martinho FC, Cardoso FG, Nascimento GG, Carvalho CA, Valera MC. Microbiological profile resistant to different intracanal medications in primary endodontic infections. *J Endod.* 2015 Jun;41(6):824-30. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.031. Epub 2015 Apr 17. PMID: 25892513.

Fisher K, Phillips C. In vitro inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* in the presence of citrus essential oils. *Br J Biomed Sci.* 2009;66(4):180-5. PMID: 20095125.

Frithjof R. von der Fehr, Birger Nygaard Östby, Ph.D. Effect of edta and sulfuric acid on root canal dentine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1963;160(2):199-205. doi:10.1016/0030-4220(63)90033-1.

Garcia de Paula-Silva FW, Hassan B, Bezerra da Silva LA, Leonardo MR, Wu MK. Outcome of root canal treatment in dogs determined by periapical radiography and cone-beam computed tomography scans. *J Endod.* 2009 May;35(5):723-6. doi: 10.1016/j.joen.2009.01.023. PMID: 19410092.

Gibbons RJ, Engle LP. Vitamin K compounds in bacteria that are obligate anaerobes. *Science.* 1964 Dec 4;146(3649):1307-9. PMID: 14207457.

Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Polymerase chain reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. *J Endod.* 2007 Sep;33(9):1049-52. Epub 2007 Jul 19. PMID: 17931930.

Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Apr;19(2):71-6. PMID: 14871344.

Gomes BP, Berber VB, Kokaras AS, Chen T, Paster BJ. Microbiomes of Endodontic-Periodontal Lesions before and after Chemomechanical Preparation. *J Endod.* 2015 Dec;41(12):1975-84. doi: 10.1016/j.joen.2015.08.022. PMID: 26521147

Gu LS, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *J Endod.* 2009 Jun;35(6):791-804. doi: 10.1016/j.joen.2009.03.010. PMID: 19482174.

Guerreiro-Tanomaru JM, Chávez-Andrade GM, de Faria-Júnior NB, Watanabe E, Tanomaru-Filho M. Effect of Passive Ultrasonic Irrigation on *Enterococcus faecalis* from root canals: an ex vivo study. *Braz Dent J*. 2015 Jul-Aug;26(4):342-6. doi: 10.1590/0103-6440201300022. PMID: 26312969.

Gulabivala K, Ng YL, Gilbertson M, Eames I. The fluid mechanics of root canal irrigation. *Physiol Meas*. 2010 Dec;31(12):R49-84. doi: 10.1088/0967-3334/31/12/R01. Epub 2010 Nov 12. PMID: 21071831.

Haapasalo K, Vuopio J, Syrjänen J, Suvilehto J, Massinen S, Karppelin M, et al. Acquisition of complement factor H is important for pathogenesis of *Streptococcus pyogenes* infections: evidence from bacterial in vitro survival and human genetic association. *J Immunol*. 2012 Jan 1;188(1):426-35. doi: 10.4049/jimmunol.1102545.

Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am*. 2010 Apr;54(2):291-312. doi: 10.1016/j.cden.2009.12.001. PMID: 20433979.

Hirsch E, Wolf U, Heinicke F, Silva MA. Dosimetry of the cone beam computed tomography Veraviewepocs 3D compared with the 3D Accuitomo in different fields of view. *Dentomaxillofac Radiol*. 2008 Jul;37(5):268-73. doi: 10.1259/dmfr/23424132. PMID: 18606748.

Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J*. 2003 Dec;36(12):810-30. PMID: 14641420.

Hülsmann M, Peters OA, Dummer PMH. Mechanical preparation of root canals: shaping goals, techniques and means. *Endod Topics* 2005. Aug;10(1):30-76. doi: 10.1111/j.1601-1546.2005.00152.x.

Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol*. 2005 Aug;54(Pt 8):777-83. doi: 10.1099/jmm.0.45976-0. PMID: 16014432.

Jacinto RC, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 2003 Oct;18(5):285-92. PMID: 12930519.

Katebzadeh N, Hupp J, Trope M. Histological periapical repair after obturation of infected root canals in dogs. *J Endod*. 1999 May;25(5):364-8. PMID: 10530263.

Kato AS, Cunha RS, da Silveira Bueno CE, Pelegrine RA, Fontana CE, de Martin AS. Investigation of the efficacy of passive ultrasonic irrigation versus irrigation with reciprocating activation: an environmental scanning electron microscopic study. *J Endod*. 2016 Apr;42(4):659-63. doi: 10.1016/j.joen.2016.01.016. PMID: 26906240.

Khademi AA, Amini K, Ghodsian B, Zahed SM, Teymori F, Shadmehr E. Removal efficiency of calcium hydroxide intracanal medicament with RinsEndo system in comparison with passive ultrasonic irrigation, an in vitro study. *Dent Res J (Isfahan)*. 2015 Mar-Apr;12(2):157-60. PMID: 25878681.

Khademi A, Usefian E, Feizianfard M. Tissue dissolving ability of several endodontic irrigants on bovine pulp tissue. *Iran Endod J*. 2007 Summer;2(2):65-8. PMID: 24327817.

Koskinen KP, Meurman JH, Stenvall H. Appearance of chemically treated root canal walls in the scanning electron microscope. *Scand J Dent Res*. 1980 Dec;88(6):505-12. PMID: 6264586.

Kuruville JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod*. 1998 Jul;24(7):472-6. doi: 10.1016/S0099-2399(98)80049-6. PMID: 9693573.

Leonardo MR, Silva RA, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *J Appl Oral Sci*. 2004 Jun;12(2):93-8. PMID: 21365128.

Lester KS, Boyde A. Scanning electron microscopy of instrumented, irrigated and filled root canals. *Br Dent J*. 1977 Dec 6;143(11):359-67. PMID: 271004.

Lin LM, Skribner JE, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. *J Endod*. 1992 Dec;18(12):625-7. PMID: 1298804.

Macedo R, Verhaagen B, Rivas DF, Versluis M, Wesselink P, van der Sluis L. Cavitation measurement during sonic and ultrasonic activated irrigation. *J Endod*. 2014 Apr;40(4):580-3. doi: 10.1016/j.joen.2013.09.018. PMID: 24666916.

Mancini M, Cerroni L, Iorio L, Armellini E, Conte G, Cianconi L. Smear layer removal and canal cleanliness using different irrigation systems (EndoActivator, EndoVac, and passive ultrasonic irrigation): field emission scanning electron microscopic evaluation in an in vitro study. *J Endod*. 2013 Nov;39(11):1456-60. doi: 10.1016/j.joen.2013.07.028. PMID: 24139274.

Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. *J Endod*. 2012 Jun;38(6):740-5. doi: 10.1016/j.joen.2012.02.021. PMID: 22595105.

Martinho FC, Gomes BP. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod*. 2008 Mar;34(3):268-72. doi: 10.1016/j.joen.2007.11.015.

Martins Justo A, Abreu da Rosa R, Santini MF, Cardoso Ferreira MB, Pereira JR, Húngaro Duarte MA, et al. Effectiveness of final irrigant protocols for debris removal from simulated canal irregularities. *J Endod*. 2014 Dec;40(12):2009-14. doi: 10.1016/j.joen.2014.08.006. PMID: 25266470.

McComb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. *J Endod.* 1975 Jul;1(7):238-42. PMID: 1061799.

Menezes AC, Zanet CG, Valera MC. Smear layer removal capacity of disinfectant solutions used with and without EDTA for the irrigation of canals: a SEM study. *Pesqui Odontol Bras.* 2003 Oct-Dec;17(4):349-55. PMID: 15107918.

Menezes MM, Valera MC, Jorge AO, Koga-Ito CY, Camargo CH, Mancini MN. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J.* 2004 May;37(5):311-9. PMID: 15086752.

Metri M, Hegde S, Dinesh K, Indiresha HN, Nagaraj S, Bhandi SH. Comparative evaluation of two final irrigation techniques for the removal of precipitate formed by the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Contemp Dent Pract.* 2015 Nov 1;16(11):850-3. PMID: 26718289.

Metska ME, Parsa A, Aartman IH, Wesselink PR, Ozok AR. Volumetric changes in apical radiolucencies of endodontically treated teeth assessed by cone-beam computed tomography 1 year after orthograde retreatment. *J Endod.* 2013 Dec;39(12):1504-9. doi: 10.1016/j.joen.2013.08.034. PMID: 24238437.

Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J.* 2011 Aug;44(8):697-730. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01886.x. PMID: 21535021.

Mohammadi Z, Shalavi S, Yazdizadeh M. Antimicrobial activity of calcium hydroxide in endodontics: a review. *Chonnam Med J.* 2012 Dec;48(3):133-40. doi: 10.4068/cmj.2012.48.3.133. PMID: 23323217.

Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Sundqvist G, Happonen RP. Apical periodontitis development and bacterial response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains. *Eur J Oral Sci.* 2004 Jun;112(3):207-15. doi: 10.1111/j.1600-0722.2004.00135.x. PMID: 15154917.

Moorer WR, Wesselink PR. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J.* 1982 Oct;15(4):187-96. PMID: 6964523.

Mozo S, Llana C, Forner L. Review of ultrasonic irrigation in endodontics: increasing action of irrigating solutions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012 May 1;17(3):e512-6. PMID: 22143738.

Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LA, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod.* 2002 Oct;28(10):694-6. PMID: 12398166.

Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MS, Gomes de Moraes I, Marciano M, et al. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *Int Endod J*. 2012 Feb;45(2):162-8. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01959.x. PMID: 21985189.

Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Duarte MH, Ramos Fernandes LM, Camargo EJ, de Moraes IG, et al. The influence of cone-beam computed tomography and periapical radiographic evaluation on the assessment of periapical bone destruction in dog's teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Aug;112(2):272-9. doi:10.1016/j.tripleo.2011.01.031. PMID: 21530334.

Padrón EJ. Ultrasonido en Endodoncia. Centro de especialidades odontológicas "Carlos Bóveda" [internet], Departamento de endodoncia, Caracas-Venezuela. 2006 [acesso 2016 Fev 03]. Disponível em: http://www.innovadent-si.com/pdf/ultra_en_endodoncia.pdf.

Paiva SS, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC, et al. Molecular microbiological evaluation of passive ultrasonic activation as a supplementary disinfecting step: a clinical study. *J Endod*. 2013 Feb;39(2):190-4. doi: 10.1016/j.joen.2012.09.014. PMID: 23321229.

Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J*. 2001 Sep;34(6):429-34. PMID: 11556508.

Rosenfeld EF, James GA, Burch BS. Vital pulp tissue response to sodium hypochlorite. *J Endod*. 1978 May;4(5):140-6. PMID: 283180. doi: 10.1016/S0099-2399(78)80129-0.

Rôças IN, Siqueira JF. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *J Endod*. 2010 Jan;36(1):45-52. doi: 10.1016/j.joen.2009.10.022. PMID: 20003934.

Rôças IN, Siqueira JF. In vivo antimicrobial effects of endodontic treatment procedures as assessed by molecular microbiologic techniques. *J Endod*. 2011 Mar;37(3):304-10. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.003. PMID: 21329812.

Plotino G, Pameijer CH, Grande NM, Somma F. Ultrasonics in endodontics: a review of the literature. *J Endod*. 2007 Feb;33(2):81-95. doi: 10.1016/j.joen.2006.10.008. PMID: 17258622.

Rodrigues RC, Antunes HS, Neves MA, Siqueira JF Jr, Rôças IN. Infection control in retreatment cases: in vivo antibacterial effects of 2 instrumentation systems. *J Endod*. 2015 Oct;41(10):1600-5. doi: 10.1016/j.joen.2015.06.005.

Sahar-Helft S, Sarp AS, Stabholtz A, Gutkin V, Redenski I, Steinberg D. Comparison of positive-pressure, passive ultrasonic, and laser-activated irrigations on smear-layer removal from the root canal surface. *Photomed Laser Surg.* 2015 Mar;33(3):129-35. doi: 10.1089/pho.2014.3788. Epub 2015 Feb 26. PMID: 25719951.

Sassone LM, Fidel R, Figueiredo L, Fidel S, Faveri M, Feres M. Evaluation of the microbiota of primary endodontic infections using checkerboard DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiol Immunol.* 2007 Dec;22(6):390-7. PMID: 17949342.

Sassone LM, Fidel R, Faveri M, Fidel S, Figueiredo L, Feres M. Microbiological evaluation of primary endodontic infections in teeth with and without sinus tract. *Int Endod J.* 2008 Jun;41(6):508-15. doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01397.x. PMID: 18422583.

Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. 1975. *J Endod.* 2006 Apr;32(4):293-5. doi: 10.1016/j.joen.2006.02.008. PMID: 16554197

Schmidt TF, Teixeira CS, Felipe MC, Felipe WT, Pashley DH, Bortoluzzi EA. Effect of ultrasonic activation of irrigants on smear layer removal. *J Endod.* 2015 Aug;41(8):1359-63. doi: 10.1016/j.joen.2015.03.023. PMID: 25960002.

Shen Y, Stojcic S, Qian W, Olsen I, Haapasalo M. The synergistic antimicrobial effect by mechanical agitation and two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria. *J Endod.* 2010 Jan;36(1):100-4. doi: 10.1016/j.joen.2009.09.018. PMID: 20003944.

Silva EJ, Ferreira VM, Silva CC, Herrera DR, De-Deus G, Gomes BP. Influence of apical enlargement and complementary canal preparation with the Self-Adjusting File on endotoxin reduction in retreatment cases. *Int Endod J.* 2016 Jul 12. doi: 10.1111/iej.12677. PMID: 27400743.

Siqueira JF Jr. Taxonomic changes of bacteria associated with endodontic infections. *J Endod.* 2003 Oct;29(10):619-23. doi: 10.1097/00004770-200310000-00001. PMID: 14606780.

Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod.* 1998 Jun;24(6):414-6. doi: 10.1016/S0099-2399(98)80023-X. PMID: 9693585.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod.* 2005 Jun;31(6):411-23. PMID: 15917679.

Siqueira JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* 1999;32(5):361-9. PMID: 10551109.

Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, Zehnder M. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *J Endod*. 2005 Sep;31(9):669-71. PMID: 16123703.

Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques*. 1994 Oct;17(4):788-92. PMID: 7833043.

Stavropoulos A, Wenzel A. Accuracy of cone beam dental CT, intraoral digital and conventional film radiography for the detection of periapical lesions. An ex vivo study in pig jaws. *Clin Oral Investig*. 2007 Mar;11(1):101-6. PMID: 17048029.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod*. 2006 Feb;32(2):93-8.

Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod*. 1992 Sep;18(9):427-30. doi: 10.1016/S0099-2399(06)80842-3. PMID: 9796509.

Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994 Oct;78(4):522-30. PMID: 7800383.

Tanomaru-Filho M, Miano LM, Chávez-Andrade GM, Torres FF, Leonardo Rde T, Guerreiro-Tanomaru JM. Cleaning of root canal system by different irrigation methods. *J Contemp Dent Pract*. 2015 Nov 1;16(11):859-63. PMID: 26718291

Tardivo D, Pommel L, La Scola B, About I, Camps J. Antibacterial efficiency of passive ultrasonic versus sonic irrigation. *Ultrasonic root canal irrigation. Odontostomatol Trop*. 2010 Mar;33(129):29-35. PMID: 20839477.

Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K, et al. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod*. 2014 May;40(5):670-7. doi: 10.1016/j.joen.2013.10.005. PMID: 24767562.

Valera MC, Chung A, Menezes MM, Fernandes CE, Carvalho CA, Camargo SE, et al. Scanning electron microscope evaluation of chlorhexidine gel and liquid associated with sodium hypochlorite cleaning on the root canal walls. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Nov;110(5):e82-7. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.04.051. PMID: 20692188.

Valera MC, Maekawa LE, Chung A, Cardoso FG, Oliveira LD, Oliveira CL, et al. The effect of sodium hypochlorite and ginger extract on microorganisms and endotoxins in endodontic treatment of infected root canals. *Gen Dent*. 2014 May-Jun;62(3):25-9. PMID: 24784510.

Valera MC, Maekawa LE, de Oliveira LD, Jorge AO, Shygei É, Carvalho CA. In vitro antimicrobial activity of auxiliary chemical substances and natural extracts on *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Appl Oral Sci*. 2013 Mar-Apr;21(2):118-23. doi: 10.1590/1678 7757201302135. PMID: 23739849.

Valera MC, Cardoso FG, Chung A, Xavier AC, Figueiredo MD, Martinho FC, et al. Comparison of Different Irrigants in the Removal of Endotoxins and Cultivable Microorganisms from Infected Root Canals. *ScientificWorldJournal*. 2015;2015:125636. doi: 10.1155/2015/125636. PMID: 26346574.

Valera MC, Oliveira SA, Maekawa LE, Cardoso FG, Chung A, Silva SF, et al. Action of chlorhexidine, zingiber officinale, and calcium hydroxide on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, and endotoxin in the root canals. *J Contemp Dent Pract*. 2016 Feb 1;17(2):114-8. PMID: 27206998.

Van der Sluis LW, Gambarini G, Wu MK, Wesselink PR. The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation. *Int Endod J*. 2006 Jun;39(6):472-6. PMID: 166774742.

Van der Sluis LW, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *Int Endod J*. 2007 Jun;40(6):415-26. doi: 10.1111/j.1365-2591.2007.01243.x. PMID: 17442017.

Van der Sluis LW, Wu MK, Wesselink PR. A comparison between a smooth wire and a K-file in removing artificially placed dentine debris from root canals in resin blocks during ultrasonic irrigation. *Int Endod J*. 2005 Sep;38(9):593-6. PMID: 16104971.

Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J Endod*. 2006 Aug;32(8):715-21. doi: 10.1016/j.joen.2006.02.031. PMID: 16861068.

White RR, Goldman M, Lin PS. The influence of the smeared layer upon dentinal tubule penetration by plastic filling materials. *J Endod*. 1984 Dec;10(12):558-62. doi: 10.1016/S0099-2399(84)80100-4. PMID: 6440943.

Yamada RS, Armas A, Goldman M, Lin PS. A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions: Part 3. *J Endod*. 1983 Apr;9(4):137-42. doi: 10.1016/S0099-2399(83)80032-6. PMID: 6406635.

Zehnder M, Kosicki D, Luder H, Sener B, Waltimo T. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002 Dec;94(6):756-62. PMID: 12464903.

APÊNDICE A – Ficha Clínica

Nome: _____

Data: ____/____/____ **DENTE** _____**HISTÓRIA MÉDICA**

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

HISTÓRIA CLÍNICA

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

EXAME CLÍNICO LOCAL

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

TESTES

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

EXAME RADIOGRÁFICO

Câmara pulpar:	Canal radicular:
Estruturas adjacentes:	Diagnóstico provável:
Tratamento indicado:	

TRATAMENTO RADICAL

Medida aparente do dente no RX inicial:

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

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

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

CONTROLES RADIOGRÁFICOS

Data	Observações
1°	
2°	
3°	

APÊNDICE B– Meio de Cultura

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

Preparo

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

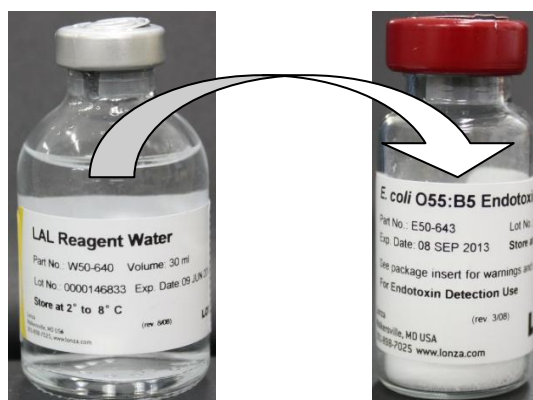
Enriquecimento do Meio

Pesar 0,1 g de vitamina K1 e adicionar a um tubo contendo 100 mL de etanol absoluto. Armazenar o vidro em refrigerador, devidamente vedado e protegido da luz. Adicionar 1µL da solução a cada mL de meio produzido. Dissolver 0,5 g de Hemina em 10 mL de hidróxido de sódio 1 N. Completar com água destilada até atingir 100 mL. Autoclavar a 121° C por 15 min. Adicionar 1µL da solução a cada mL de meio produzido. O meio preparado deve ser armazenado em placas de petri por até 7 dias, em temperatura média de 4° C, fora do alcance de luz.

APÊNDICE D – Realização da curva padrão

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

Figura 15 - Esquema para suspender endotoxina de *E. coli* utilizando água apirogênica



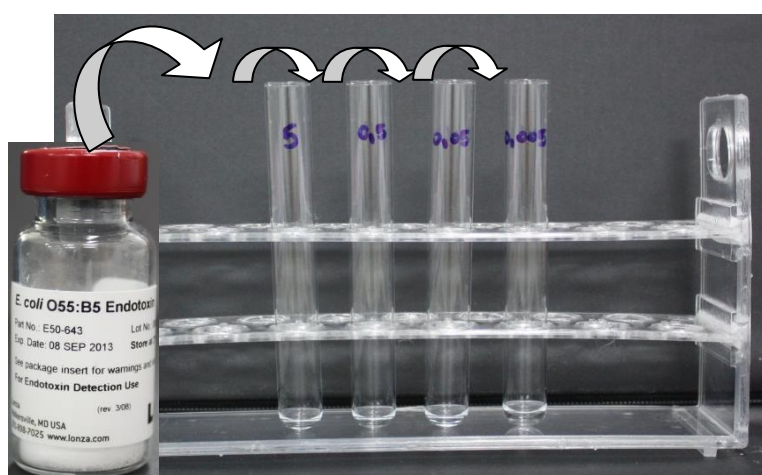
- C) Agitar a suspensão durante 15 minutos.
- D) Separar 4 tubos de vidro apirogênicos, tamanho 13 mm x 100 mm (Lonza, Walkersville, MD, EUA), identificá-los de acordo com as diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) e pipetar 900 μ L de água apirogênica em cada tubo de vidro.

Figura 16 - Tubos de vidro apirrogênicos necessários para diluição da endotoxina



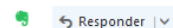
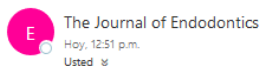
- A) Decorridos os 15 minutos, transferir 100 μL da suspensão de endotoxina para o tubo “5” (referente à diluição 10^{-1}). Agitar 1 minuto, transferir 100 μL para o próximo tubo “0,5” (referente à diluição 10^{-2}) e assim sucessivamente.

Figura 17 - Esquema de diluições da endotoxina para realização da curva padrão



ANEXO A – Comprovante de artigo submetido.

Your recent submission to JOE



Dear Dr. Esteban Orozco,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Journal of Endodontics

Corresponding Author: Marcia Valera

Co-Authors: Esteban F Orozco; Daiana Cavalli; Cassia C Toia; Rayana D Khoury; Flávia G Cardoso, PhD; Eduardo Bresciani, PhD;

Title: Effect of passive ultrasonic irrigation on microorganisms in primary root canal infection: a clinical trial

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at marcia@fosjc.unesp.br; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/joe/i.asp?i=93684&l=LCD7WNN5>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Journal of Endodontics

ANEXO B - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

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

**COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

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

Pesquisador: Marcia Carneiro Valera

Versão: 3

CAAE: 45554115.7.0000.0077

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

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 048393/2015

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

Informamos que o projeto QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINAS E SUA RELAÇÃO COM SINAIS / SINTOMAS E VOLUMETRIA DO CANAL RADICULAR E DA LESÃO PERIAPICAL EM DENTES COM INFECÇÃO ENDODÔNTICA PRIMÁRIA que tem como pesquisador responsável Marcia Carneiro Valera, foi recebido para análise ética no CEP UNESP - Instituto de Ciência e Tecnologia - Campus de São José dos Campos em 27/05/2015 às 15:51.

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Caro(a) Senhor(a)

Eu, Marcia Carneiro Valera, professora Titular da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, portadora do CPF 039.137.548-22, estabelecido à Avenida Eng. Francisco José Longo, 777, na cidade de São José dos Campos-SP, telefone para contato (12) 3947 9048, sou responsável pela pesquisa cujo título **Efeito do ultrassom na eliminação de micro-organismos e endotoxinas em dentes com infecção endodôntica primária.**

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

O projeto não acarretará risco algum para o paciente uma vez que será realizado dentro das normas de biossegurança. Além disso, o protocolo de conduta adotado é o mesmo já utilizado na prática clínica odontológica desta faculdade. Serão necessários de 2 a 4 atendimentos (3 horas cada atendimento) até a conclusão do tratamento de canal. O responsável pelo tratamento é o Cirurgião Dentista e aluno de Pós Graduação Esteban Flores Orozco, (celular: 981257965 email: esteban_cuacua@hotmail.com), e em caso de dúvida ou necessidade de intervenção, deve-se entrar em contato com ele, ou com outros participantes da pesquisa. Os pacientes serão chamados para acompanhamento radiográfico após 1 ano do tratamento finalizado.

Se houver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética (CEP) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, situada na Av. Engº Francisco José Longo, 777 – CEP 12245000, em São José dos Campos-SP, fone (12) 3947-9028, e-mail: cep@fosjc.unesp.br. Informo que será garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela colaboração.

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

NOME _____

RG _____ CPF _____

ENDEREÇO COMPLETO _____

Assinatura Paciente

Assinatura Pesquisador

Termo de Assentimento para Menores de Idade

Devido a sinais e sintomas identificados pelo Cirurgião Dentista e confirmados com radiografia, há a necessidade de realizar um tratamento de canal no dente envolvido. Esse tratamento é realizado em isolamento absoluto (uso de um lençol de borracha que evita que materiais e líquidos utilizados no dente caiam na boca), e o dente será aberto e limpo, colocado um medicamento no interior do dente, e em outra sessão, o dente será obturado e restaurado, impedindo que mais micro-organismos entrem no dente envolvido, restaurando a saúde do paciente.

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

NOME DO PACIENTE _____

RESPONSÁVEL _____

RG _____ CPF _____

ENDEREÇO COMPLETO _____

Assinatura Responsável

Assinatura Pesquisador

Assinatura do paciente