



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

DIEGO GUILHERME DIAS DE RABELLO

**EFICÁCIA CLÍNICA DOS PROTOCOLOS DE PREPARO ENDODÔNTICO
E DA MEDICAÇÃO INTRACANAL NA REDUÇÃO DE ENDOTOXINAS E
BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS NOS CANAIS RADICULARES DE
PACIENTES QUE FORAM SUBMETIDOS À IRRADIAÇÃO DE CABEÇA E
PESCOÇO**

2019

DIEGO GUILHERME DIAS DE RABELLO

**EFICÁCIA CLÍNICA DOS PROTOCOLOS DE PREPARO
ENDODÔNTICO E DA MEDICAÇÃO INTRACANAL NA REDUÇÃO DE
ENDOTOXINAS E BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS NOS CANAIS
RADICULARES DE PACIENTES QUE FORAM SUBMETIDOS À
IRRADIAÇÃO DE CABEÇA E PESCOÇO**

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

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho

São José dos Campos

2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Cláudio Antônio Talge Carvalho (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia do Campus
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Carla Renata Sipert

Universidade de São Paulo - USP
Campus de São Paulo

Profa.Dra. Flávia Goulart da Rosa Cardoso

Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP
São José dos Campos

Prof. Dra. Márcia Carneiro Valera Garakis

Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia do Campus
Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Lúcio Murilo dos Santos

Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia do Campus
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 11 de dezembro de 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

À minha esposa, Nádia, minha companheira e meu amor por todo seu apoio em mais uma etapa que temos caminhado juntos nestes 25 anos. Estar ao seu lado sempre será a melhor parte da minha vida.

Aos meus pais, Osvaldo e Teresinha, por todo carinho e dedicação. Através de muito esforço e trabalho nos deram tudo que precisamos e sempre nos ensinaram o caminho do bem.

Às minhas queridas irmãs, Letícia e Carmem, de quem eu tenho tanto orgulho pela coragem e determinação. Vocês foram os presentes mais especiais que nossos pais poderiam me dar.

AGRADECIMENTOS

Deus, obrigado por suas graças durante minha jornada. Minha vida tem sido marcada por maravilhas, que muitas vezes não dou o devido valor, mas eu sei que a benção do Senhor está presente em toda minha existência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho, que me guiou durante o doutorado, demonstrando ser uma pessoa calma e sempre prestativa e que no andar destes últimos 13 anos, sempre se mostrou um excelente professor .

Ao Instituto de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista em nome do Coordenador do Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, Prof. Dr. Alexandre Luiz Souto Borges, por oferecer a possibilidade de poder evoluir como profissionais, com muito respeito e admiração por todos os funcionários que sempre nos ajudaram.

À Prof. Tit. Dra. Márcia Carneiro Valera Garakis. Primeiro me deu a oportunidade de me especializar, mas me ensinou muito mais do que isto, demonstrou o que é ser professor, ao ter a paciência de se dedicar tanto tempo ao nosso ensino ao longo destes quase 13 anos.

Ao meu ex-orientador e amigo, Prof. Dr. Frederico Canato Martinho por idealizar este projeto e mesmo de longe me ajudar com a ciência.

Ao Prof. Dr. Lúcio Murilo dos Santos. Sua dedicação à clínica de oncologia é algo emocionante e muito inspirador para todos os alunos.

A toda equipe de Oncologia, especialmente Prof. Dr. Maximiliano Piero Neisser pela dedicação aos pacientes e alunos. Aos meus amigos Marcus, Rosana, Ana, Tatiana, Gabriela, Pedro, Victoria, Cláudio, Gustavo, Jéssica, Danielle, Cinthya,

Talita, Dani, Reginaldo, Letícia, Ana Luiza, João, Ísis, Danillo, Dan, Larissa, Livia e Gabriela que sempre foram prestativos e companheiros.

À Prof. Dra. Ana Paula Martins Gomes e assim como nas clínicas, desde a época de especialização, sempre disposta a acrescentar com seu enorme conhecimento e experiência nos atendimentos aos pacientes.

À Prof. Dra. Flávia Goulart da Rosa Cardoso por seu companheirismo nestes 5 anos de clínica integrada.

Ao Prof. Dr. Gustavo Giacomelli Nascimento da University of Aarhus pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos e com isto representando toda a querida instituição USP Bauru, me norteando desde a época de graduação.

À minha amiga e companheira de pós-graduação e que foi minha primeira coorientada de iniciação científica, Bruna Jordão Motta Corazza.

Aos meus amigos da pós-graduação, Alessandra Manchini Cardoso, Amjad Abu Hasna, Cássia Cestari Toia, Daniel Oliveira Castanho, Esteban Isai Flores Orozco, Felipe de Souza Matos, Prof. Dra. Flávia Cardoso, Giovanna Minhoto, Miguel Christian Castillo, Monique Costa Moreira França, Rayana Duarte Khoury. Vocês são amigos especiais e é sempre uma alegria estarmos juntos. Fizeram todas as dificuldades do doutorado ficarem menos árduas quando estavam presentes. Obrigado pela amizade e ajuda de cada um. Sucesso à todos nós.

Aos alunos da graduação, que se esforçam tanto para serem ótimos profissionais. Vocês são a razão de tentarmos melhorar a cada dia o meu aprender para ser professor.

Aos pacientes, principalmente aos pacientes de oncologia, pela paciência e calma em nossos atendimentos. Meu respeito sempre.

“Senhor, dai-me força para mudar o que pode ser mudado...
Resignação para aceitar o que não pode ser mudado...
E sabedoria para distinguir uma coisa da outra”.
(São Francisco de Assis)

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 ARTIGOS	12
2.1 Artigo – Rabello DGD, Martinho FC, Corazza BJ, Valera MCG, Carvalho, CAT. Eficácia clínica de protocolos endodônticos na redução de bactérias e endotoxina em canais radiculares infectados em pacientes que se submeteram à radioterapia em cabeça e pescoço / <i>Clinical efficacy of endodontic protocols on reduction of cultivable bacteria and endotoxin in infected root canal in patients who have undergone radiation therapy to the head and neck*</i>	12
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	29
REFERÊNCIAS	32
ANEXOS.....	37

Rabello DGD. Eficácia clínica dos protocolos de preparo endodôntico e da medicação intracanal na redução de endotoxinas e bactérias cultiváveis nos canais radiculares de pacientes que foram submetidos à irradiação de cabeça e pescoço. [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

RESUMO

Este estudo clínico foi conduzido para comparar a eficácia de protocolos do preparo endodôntico biomecânico, assim como da medicação intracanal em pacientes que foram submetidos à radioterapia. 22 dentes com infecção endodôntica em pacientes que se submeteram à radioterapia de cabeça e pescoço foram selecionados e canais foram preparados com movimento recíprocante. Então como protocolo de irrigação suplementar, randomizadamente divididos em 2 grupos de 11 pacientes: G1, pressão apical positiva e G2, irrigação ultrassônica passiva. Ambos grupos envolveram múltiplas sessões com colocação de medicação à base de Ca(OH)_2 por 14 dias. Amostras foram coletadas antes e após procedimentos endodônticos. Teste LAL foi usado para quantificar endotoxinas. Teste de culturas foram realizados para quantificar carga bacteriana. Porcentagem foi calculada após entre grupos usando ANOVA com Tukey com nível de significância de 5%. Houve uma média de 16 meses de acompanhamento pós-cirúrgico. Dos 22 casos, 21 (95%) foram considerados sucesso. Em um caso foi detectado sinus tractus após 12 meses. Não houve ocorrência de osteorradionecrose. Endotoxinas e bactérias cultiváveis foram encontrados em todas as amostras iniciais. Todos os protocolos de tratamento foram estatisticamente significante em reduzir carga bacteriana e endotoxinas dos canais infectados (todos, $P < .05$): G1 (95.41%), G2 (97.86%) e após medicação intracanal G1 após Ca(OH)_2 (97.41%), e G2 após Ca(OH)_2 (98.95%). Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos tratados ($P > .05$). Todos os protocolos de tratamento foram estatisticamente eficazes em reduzir os níveis iniciais de endotoxinas. Redução média: G1 de 78.61 % e para G2, 86.04% ($P < .05$). Além do mais, medicação intracanal com Ca(OH)_2 reduziu níveis de endotoxinas em 94.87% (G1) e em 95.34% (G2) (todos, $P < .05$). Este estudo clínico demonstrou que tratamento endodôntico em pacientes irradiados podem ser eficazes. O preparo com movimentos recíprocantes e suplementação com irrigação tanto com ultrassom quanto com seringa, são capazes de reduzir o conteúdo contaminante dos canais radiculares. O uso de medicação intracanal com Ca(OH)_2 nesta situação também se mostrou bastante eficiente na redução de carga bacteriana e níveis de endotoxinas.

Palavras-chave: Periodontite periapical. Tratamento do canal radicular. Endotoxina. Radioterapia. Ultrassom. Cancer.

Rabello DGD. Clinical efficacy of endodontic biomechanical preparation protocols, as well as the intracanal medication on the reduction of endotoxins and cultivable bacteria of infected root canal in patients who have received irradiation to the head and neck. [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University, Institute of Science and Technology; 2019.

ABSTRACT

Objective: this clinical study was conducted to compare the efficacy of endodontic biomechanical preparation protocols, as well as the intracanal medication on the reduction of endotoxins and cultivable bacteria of infected root canal in patients who have received irradiation to the head and neck. Methods: twenty-two infected root canals in patients who have undergone radiation therapy to the head and neck were selected and canals were prepared by reciprocating motion. Then, as supplementary irrigation protocol, randomly divided into 2 groups of 11 patients: G1, apical positive pressure (APP) and G2, passive ultrasonic irrigation (PUI). Both groups involved 2-visit treatment with the placement of Ca(OH)₂ medication for 14 days. Samples were collected before and after clinical procedures. A chromogenic LAL assay test was used to quantify endotoxins. Culture techniques were used to determine bacterial counts. The mean percentage after the procedures was compared statistically between groups using the ANOVA post hoc Tukey test with a significance level set at 5%. Results: there was a mean follow-up period of 16 months. Of 22 cases, 21 (95%) were considered successful. One was found with sinus tractus after 12 months. There were no occurrences of osteoradionecrosis. Endotoxins and cultivable bacteria were detected in 100% of the initial samples. All treatment protocols were statistically effective in reducing bacterial load from infected root canals (all, $P < .05$): G1 (95.41%), G2 (97.86%) and after intracanal medication the bacterial load was G1 after Ca(OH)₂ (97.41%), and G2 after Ca(OH)₂ (98.95%). No differences were found in bacterial load reduction when comparing the treatment groups ($P > .05$). All treatment protocols were statistically effective in reducing endotoxin from initial levels. Median reduction for G1 was 78.61 % and for G2, 86.04% ($P < .05$). Furthermore, intracanal medication with Ca(OH)₂ reduced level of endotoxin in 94.87% (G1) and in 95.34% (G2) (all, $P < .05$). Conclusions: our clinical study demonstrated that endodontic treatment in irradiated patients may be efficacious. The reciprocating preparation and supplemental irrigation with either ultrasonic or syringe demonstrated efficacy in reducing the contaminant contents of root canal. The use of intracanal medication with Ca(OH)₂ in this situation was also very efficient regarding the bacterial load and endotoxins levels.

Keywords: *Periapical periodontitis. Endodontic treatment. Endotoxins. Radiation therapy. Ultrasonic. Cancer.*

1 INTRODUÇÃO

A prevalência de câncer na região de cabeça e pescoço é de aproximadamente 30 pessoas a cada 100.000 nos Estados Unidos, o que representa cerca de 4% de todos os tipos de câncer, sendo que em cerca de 2/3 são homens e são diagnosticados na maior parte do tempo em maiores de 50 anos (US National Cancer Institute). O tratamento de câncer nesta região do corpo pode ser realizada através de diferentes métodos, como cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou uma combinação de tratamentos.

Quando opta-se pela radioterapia, a maior parte dos oncologistas tratam seus pacientes com fracionamento convencional, que consiste de uma dose total de 50 – 72 Gy de radiação de alta energia em frações diárias de 2 Gy durante 5 a 7 semanas, 5 dias por semana (Scully, Epstein, 1996; Karthaus et al., 1999).

Pacientes que são submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço para tratamento de câncer são passíveis de várias alterações teciduais. Estas alterações incluem mudanças da mucosa (Sonis et al., 1999), muscular (Goldstein et al., 1999), vascular e tecidos ósseos (Stevenson-Moore, 1990; Jansma et al., 1992) e dentários (Springer et al., 2005). Alterações das glândulas salivares são comuns e incluem a queda da produção de serina e mucina, com uma subsequente diminuição do pH salivar (Eisbruch et al., 1999). Acompanhando esta alteração em pH está a transformação da microflora oral, resultando em maior concentração de bactérias cariogênicas (Schiødt, Hermund, 2002). Estas mudanças transformam as pessoas submetidas à radioterapia em pacientes de alto risco de cárie.

Em pacientes que não são irradiados, há dois tipos de tratamentos alternativos para cáries que resultam em pulpite irreversível ou necrose pulpar: Terapia endodôntica ou exodontia. No entanto, àqueles pacientes irradiados, a extração dentária está associada à alta incidência de desenvolvimento de osteoradionecrose (Sulaiman et al, 2003). Osteoradionecrose e seus tratamento pode ser debilitador, pode desfigurar a face e ser doloroso (Thorn et al., 2000; Kanatas et al., 2002). Por esta razão extração em pacientes irradiados deve ser evitada. As alternativas para dentes em situações como essa é o tratamento endodôntico.

Em casos de periodontite apical, o tratamento indicado é a endodontia, porém a taxa de sucesso em pacientes que receberam terapia endodôntica após irradiação não é amplamente conhecido. Enquanto alguns autores relatam alta taxa de insucesso com possibilidade deste fator de baixa taxa de cura estar relacionado com redução do potencial reparador de ossos irradiados (Cox, 1976; Lilly et al., 1998; Markitziu et al., 1981; Seto et al., 1985).

Dentre os fatores que podem dificultar o sucesso do tratamento endodôntico, estão as complexas estruturas anatômicas que podem hospedar microorganismos e seus subprodutos, tais quais as ramificações apicais, canais laterais, istmos (Chan et al., 2019; Carr et al., 2009).

2 ARTIGOS

2.1 Artigo – Rabello DGD, Martinho FC, Corazza BJ, Valera MCG, Carvalho, CAT. Eficácia clínica de protocolos endodônticos na redução de bactérias e endotoxina em canais radiculares infectados em pacientes que se submeteram à radioterapia em cabeça e pescoço / *Clinical efficacy of endodontic protocols on reduction of cultivable bacteria and endotoxin in infected root canal in patients who have undergone radiation therapy to the head and neck**

RESUMO

Este estudo clínico foi conduzido para comparar a eficácia de protocolos do preparo endodôntico biomecânico, assim como da medicação intracanal em pacientes que foram submetidos à radioterapia. 22 dentes com infecção endodôntica em pacientes que se submeteram à radioterapia de cabeça e pescoço foram selecionados e canais foram preparados com movimento recíprocante. Então como protocolo de irrigação suplementar, randomizadamente divididos em 2 grupos de 11 pacientes: G1, pressão apical positiva e G2, irrigação ultrassônica passiva. Ambos grupos envolveram múltiplas sessões com colocação de medicação à base de Ca(OH)_2 por 14 dias. Amostras foram coletadas antes e após procedimentos endodônticos. Teste LAL foi usado para quantificar endotoxinas. Teste de culturas foram realizados para quantificar carga bacteriana. Porcentagem foi calculada após entre grupos usando ANOVA com Tukey com nível de significância de 5%. Houve uma média de 16 meses de acompanhamento pós-cirúrgico. Dos 22 casos, 21 (95%) foram considerados sucesso. Em um caso foi detectado sinus tractus após 12 meses. Não houve ocorrência de osteorradionecrose. Endotoxinas e bactérias cultiváveis foram encontrados em todas as amostras iniciais. Todos os protocolos de tratamento foram estatisticamente significante em reduzir carga bacteriana e endotoxinas dos canais infectados (todos, $P < .05$): G1 (95.41%), G2 (97.86%) e após medicação intracanal G1 após Ca(OH)_2 (97.41%), e G2 após Ca(OH)_2 (98.95%). Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos tratados na redução de carga bacteriana ($P > .05$). Todos os protocolos de tratamento foram estatisticamente eficazes em reduzir os níveis iniciais de endotoxinas. Redução média: G1 de 78.61 % e para G2, 86.04% ($P < .05$). Além do mais, medicação intracanal com Ca(OH)_2 reduziu níveis de endotoxinas em 94.87% (G1) e em 95.34% (G2) (todos, $P < .05$). Este estudo clínico demonstrou que tratamento endodôntico em pacientes irradiados podem ser eficazes. O preparo com movimentos recíprocantes e suplementação com irrigação tanto com ultrassom quanto com seringa, são capazes de reduzir o conteúdo contaminante dos canais radiculares. O uso de medicação intracanal com Ca(OH)_2 nesta situação se mostrou bastante eficiente na redução de carga bacteriana e níveis de endotoxinas e deve ser utilizado nesta situação.

Palavras-chave: Periodontite periapical, Tratamento do canal radicular, Endotoxina, Radioterapia, Ultrassom, Cancer.

*Artigo elaborado de acordo com as normas do Periódico *Journal of Endodontics*. A ser submetido em 11.2019.

ABSTRACT

Objective: this clinical study was conducted to compare the efficacy of endodontic biomechanical preparation protocols, as well as the intracanal medication on the reduction of endotoxins and cultivable bacteria of infected root canal in patients who have received irradiation to the head and neck.

Methods: twenty-two infected root canals in patients who have undergone radiation therapy to the head and neck were selected and canals were prepared by reciprocating motion. Then, as supplementary irrigation protocol, randomly divided into 2 groups of 11 patients: G1, apical positive pressure (APP) and G2, passive ultrasonic irrigation (PUI). Both groups involved 2-visit treatment with the placement of Ca(OH)₂ medication for 14 days. Samples were collected before and after clinical procedures. A chromogenic LAL assay test was used to quantify endotoxins. Culture techniques were used to determine bacterial counts. The mean percentage after the procedures was compared statistically between groups using the ANOVA post hoc Tukey test with a significance level set at 5%.

Results: there was a mean follow-up period of 16 months. Of 22 cases, 21 (95%) were considered successful. One was found with sinus tractus after 12 months. There were no occurrences of osteoradionecrosis. Endotoxins and cultivable bacteria were detected in 100% of the initial samples. All treatment protocols were statistically effective in reducing bacterial load from infected root canals (all, $P < .05$): G1 (95.41%), G2 (97.86%) and after intracanal medication the bacterial load was G1 after Ca(OH)₂ (97.41%), and G2 after Ca(OH)₂ (98.95%). No differences were found in bacterial load reduction when comparing the treatment groups ($P > .05$). All treatment protocols were statistically effective in reducing endotoxin from initial levels. Median reduction for G1 was 78.61 % and for G2, 86.04% ($P < .05$). Furthermore, intracanal medication with Ca(OH)₂ reduced level of endotoxin in 94.87% (G1) and in 95.34% (G2) (all, $P < .05$).

Conclusions: our clinical study demonstrated that endodontic treatment in irradiated patients may be efficacious. The reciprocating preparation and supplemental irrigation with either ultrasonic or syringe demonstrated efficacy in reducing the endodontic contaminant contents and the use of intracanal medication with Ca(OH)₂ was efficient regarding the bacterial load and endotoxins levels and should be performed in irradiated patients with infected root canals.

Keywords: Endodontic treatment, Endotoxins, Radiation therapy, Ultrasonic, Cancer.

Introduction

Radiation therapy (RT) for the treatment of cancer in the head and neck affects the mucosal, muscular, vascular, dental and osseous tissues, leading to mucositis, xerostomia, trismus, radiation caries, and osteoradionecrosis (1,2). Radiation caries is a severe dental disease caused by hyposalivation and diminution of saliva pH after RT in the head and neck region (3) associated to alteration of dental hard tissues (4,5). The radiation caries often leads to root canal infection (6,7).

The infectious disease in root canal is a complex dynamic process related to the number of bacterial cells, microbial virulence, and immunologic system (8). In patients who undergo RT, the bone is due to be compromised (9) and so definitely, optimal endodontic therapy for teeth with apical periodontitis should be able to eradicate bacteria (10, 11) and its virulence factors (12,13).

Endotoxin is a toxic constituent of gram-negative bacteria and has a central role in the endodontic lesion (14). Clinical studies have revealed the presence of endotoxin in every root canal with apical periodontitis (15-24), with high levels related to the development of clinical symptoms and larger area of bone destruction (17, 19, 20-24) and therefore, the elimination of endotoxin during the root canal treatment is assumed to be important for healing process.

During endodontic biomechanical preparation, the irrigation is an important step in neutralizing microbes and their by-products (25). However, controversy exists on whether the passive ultrasonic instrumentation is more efficient than standard irrigation using a needle adapted to a syringe associated with apical positive pressure (26-28).

Furthermore, calcium hydroxide, the most used intracanal medication, has been proven to be effective against endotoxins as demonstrated by in vitro (29-30) and in vivo studies (31-38). Nevertheless, no clinical study has demonstrated the efficiency of Ca(OH)₂ in patients submitted to radiotherapy in the head and neck region.

There is presently no study showing the efficiency of endodontic treatment protocols from infected root canals in patients who undergo RT to the head and neck. Therefore, this clinical research aimed to compare biomechanical preparation complemented by either ultrasonic or syringe as well as intracanal medication in reducing endotoxins and cultivable bacteria from infected root canals in irradiated patients.

Materials and Methods

Study Design and Patient Selection

This single-blinded and randomized clinical study in irradiated patients compared biomechanical preparation complemented by passive ultrasonic irrigation and apical positive pressure with manual irrigation and also intracanal medication concerning the bacterial load and endotoxin reduction from root canals after biomechanical preparation.

Twenty two patients who have undergone radiation therapy of at least 50 Gy for malign tumor in the head and neck needing primary endodontic treatment were included in this clinical research. The time from the last radiation session had to be a minimum of 6 months. All the patients were attending the São José dos Campos Dental School (UNESP), São José dos Campos (SP), Brazil.

Complete dental history and signed consent form was obtained from every patient after approval of the human research ethics committee of the São José dos Campos Dental School (UNESP) (CAAE: 02236718.9.0000.0077). Patients under antibiotic treatment in the last 3 months could not be included in this clinical study.

Only single-rooted teeth with diagnostic of primary endodontic infection that was confirmed by a negative response to cold thermal testing with difluorodichloromethane at -50°C (EndoFrost; Roeko, Langenau, Germany) were selected. A further requirement was the nonexistences of periodontal pockets deeper than 4 mm. Teeth not able to be isolated with rubber dam were excluded.

Sampling Procedures

All the instruments used in this study were apyrogenic after Co60 gamma radiation (EMBRARAD, SP, Brazil). Disinfection of the operative field has been already reported (33). In resume, after rubber dam isolation, the crown and adjacent area were disinfected with 30% H₂O₂, for 30 seconds, then 2.5% NaOCl (for 30s) and finally inactivated with 5% sodium thiosulfate.

Endodontic access was made under irrigation with sterile saline solution and by using high-speed diamond bur. The first step removed carious lesion and restoration and before accessing pulp chamber, the area was disinfected again as detailed above.

Sampling was done by inserting apyrogenic paper points (size #15; Dentsply-Maillefer, Balaigues, Switzerland) into the full length of the canal, determined by periapical radiography, and maintained in place for 60 seconds.

The first sample was to determine endotoxin and placed in an apyrogenic tube containing 1 mL of limulus amebocyte lysate (LAL) water of the kinetic chromogenic LAL (Lonza, Walkersville, MD) assay. Then sampling was repeated with three paper points that were deposited in a sterile tube containing 1 mL VMGA III transport medium (39) for microbial cultivation.

Afterwards, the root canal length was established by using an apex locator (RomiApex A-15; Romidan, Kiryat-Ono, Israel). The biomechanical preparation with reciprocating motion was determined according to the root canal anatomy and previously described (40). In summary, the nonresistance entrance of K-file (VDW, München, Germany) #30 or #20 to the working length (WL), determined 1 mm short of the apex, allowed canals to be prepared with, respectively the R50 or R40 Reciproc file (VDW, München, Germany). If the K-file #20 was not manageable to reach the WL, than Reciproc R25 file was used instead. The instrument was used in an in-and-out pecking motion. After three pecking movements, the instrument was removed from the canal and irrigated with 2.5% NaOCl. By the end of reciprocating motion, a total of 10 mL of 2.5% NaOCl irrigation liquid by means of a syringe and 30-gauge NaviTip (Ultradent, South Jordan, USA) was used in every root canal. Then, canal was irrigated with 5 mL sterile/apyrogenic saline solution, followed by 17% EDTA that was agitated with hand K-files #20 for 3 minutes. Finally, canals were rinsed with 5 mL sterile/apyrogenic saline solution.

From this point, teeth were randomly divided into 2 groups of 11 patients to evaluate the efficiency of final irrigation protocols: G1, apical positive pressure (APP) and G2, passive ultrasonic irrigation (PUI).

For APP group (G1), 5 mL of 2.5% hypochlorite irrigated the canal positioning the NaviTip up to 2 mm coronal of the WL, with a pecking motion for 2 minutes.

For PUI group (G2), an E1 Irrisonic tip (Helse, SP, Brazil) installed on an ultrasonic unit (MMO Emisonic 230, MMOptics, São Paulo, Brazil), set at frequency of 30 Hz was used in combination with 0.5 mL of 2.5% hypochlorite. The tip was placed 2 mm short to the WL, and an in-and-out passive motion for a period of 20 seconds. The canals were then irrigated with 1.5 mL of 2.5% NaOCl and activated for another 20 s. A total of 3 cycles using PUI was conducted for every canal. Refill of the irrigant solution was done by means of a syringe and 30-gauge NaviTip.

NaOCl was neutralized with 5 mL of 0.5% sodium thiosulfate for 1 minute and removed with 5 mL sterile/apyrogenic water. After complete biomechanical preparation the second sampling was accomplished with paper points as described above for evaluation of endotoxin and microbial account.

Later the canals were filled with mixed paste of Ca(OH)_2 in saline solution for 14 days. The paste was inserted into the canals by a lentulo spiral. Provisional restorations with ionomer cement followed by composite were placed.

After 14 days with intracanal medication, teeth were isolated, disinfected as described before and temporary restorations were displaced. Root canals were washed with 10 mL saline solution, and calcium hydroxide was inactivated with 0.5% citric acid. Then, the third sampling of endotoxins and bacterial material was accomplished in the same manner as previously described.

Quantification of endotoxin concentration: kinetic chromogenic LAL assay

The methodology for measuring the endotoxin levels has been clarified (15). 1 mL of limulus amebocyte lysate (LAL) water of the kinetic chromogenic LAL assay (Lonza, Walkersville, MD) was pipetted to each tube containing the paper point sampled and the endotoxin extraction was achieved by vortex for 60 s. Afterwards, the content was serially diluted to 10^{-1} . To quantify endotoxins, *Escherichia coli* endotoxin was used as pattern. 100 μL of apyrogenic water (blank), an endotoxin scale (concentration from 0.005 to 50 endotoxin units in EU/mL), root canal samples, and positive controls (ex vivo teeth had canal contaminated with a pre-determined endotoxin level) were added to a 96- well apyrogenic plate (Easypath, São Paulo, SP, Brazil). The tests were executed in triplicate. After 10 min incubation at 37°C , plate was measured in a KineticQCL reader employing the WinKQCL software (Lonza). After that, 100 μL of the chromogenic reagent was pipetted to each well. For the kinetic test, wave's absorbance at 405 nm could calculate relation between reaction time of each standard solution and corresponding endotoxin concentration.

Quantification of total cultivable bacterial counts

The method used for bacterial culture procedures has been published (40). Shortly, after vortex of the transport media carrying the root canal samples for 60 seconds, concentration of samples were diluted up to 10^{-4} in tubes with fastidious anaerobe broth (FAB; Lab M, Bury, UK). 50 μL of the resultants was pipetted on 5% defibrinated sheep blood fastidious anaerobe agar (FAA; LabM) and incubated at 37°C in anaerobic atmosphere for up to 14 days to grow nonselectively obligate anaerobes and facultative anaerobes. Then, colony-forming units (CFUs) could be quantified.

Statistical analysis

The obtained data (endotoxin level and bacterial count) were statistically analyzed by using the Graph Pad Prism 8 for Windows (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). In intragroup evaluation, repeated measure ANOVA and Tukey's tests were used, while for intergroup the One-Way ANOVA and Tukey's test was employed. The significance level was set at 5% ($P < .05$).

Results:

In this clinical study, 22 patients comprehending 15 males and 7 females, were included in this research and randomly divided in two groups of 11 patients. In the G1 (7 males and 4 females) and in the G2 (8 males and 3 females) took part (Table 1). The age of patients had a median of 46 years, ranging from 40 to 58. Participants were selected from February/ 2017 until February/ 2019 and the flow chart is demonstrated in Figure 1.

Effect of endodontic treatment protocols on bacterial counts

In every initial sample of the 22 primarily infected root canals investigated bacteria were detected, with total bacterial load with a range from 1.2×10^4 to 7.6×10^6 CFU/mL (median value, 3.7×10^5 CFU/mL). In table 2 the values of median and range are described.

After biomechanical preparation and final irrigation protocol using apical positive pressure in group G1, reduction of the median value of total bacterial load (from 3.1×10^5 to 1.4×10^3 CFU/mL) ($p < .05$) and after intracanal medication with Ca(OH)_2 (from 1.4×10^3 to 8.0×10^2 CFU/mL) ($p > .05$).

Bacterial load after passive ultrasonic irrigation (PUI) in group G2 had a median value reduction of total bacterial load from 4.3×10^4 to 9.2×10^2 CFU/mL ($p < .05$) and after intracanal medication with Ca(OH)_2 from 9.2×10^2 to 4.5×10^2 CFU/mL ($p > .05$).

Comparison of total CFU counts found after biomechanical preparation and different irrigation protocols showed no difference between apical positive pressure and passive ultrasonic irrigation groups ($p > .05$).

The bacterial reductions in APP group (G1) were 95.41% after biomechanical preparation and 97.42% after intracanal medication (Table 2). Bacteria could be detected from canals after complete biomechanical preparation (10/11) and after intracanal medication (10/11) groups.

In group 2, the biomechanical preparation supplemented by PUI significantly decreased the percentage values of bacterial reductions to 97.86% and after intracanal medication to 98.95% and decreased the number of root canals producing positive culture (10/11) after biomechanical preparation complemented by PUI and (9/11) after 14 days of calcium hydroxide dressing (Table 2).

Effect of endodontic treatment protocols on endotoxin

After reaching standard curve linearity ($r=1$), LAL assay showed the presence of endotoxins in all the initial root canal samples (22/22), with a median value of 35.000 EU/mL (ranging from 3.100 to 80.700 EU/mL). Median and range values of endotoxin levels found in the groups are shown in Table 3.

With regard to the biomechanical preparation, supplemented with final irrigation protocol using apical positive pressure in group G1 reduced the median levels of endotoxin from 37.400 to 8.000 EU/mL ($p<.05$) and after intracanal medication for 14 days from 8.000 to 1.920 EU/mL ($p>.05$) (Table 3). The median percentage values of endotoxin reduction were 78.61% and 94.87%, respectively (Table 3).

Endotoxin after passive ultrasonic irrigation (PUI) in group G2 had a median value reduction of endotoxin level from 32.600 to 4.500 EU/mL ($p<.05$) and after intracanal medication with Ca(OH)_2 (from 4.500 to 1.520 EU/mL) ($p>.05$).

In group 2, the biomechanical preparation supplemented by PUI significantly decreased the median percentage values of endotoxin to 86.04% and after intracanal medication to 95.34% (Table 3).

In both groups, despite reduction of endotoxin levels, endotoxins were still detected in 100% (22/22) of the root canal samples.

Discussion

Despite high radiation doses to the head and neck, the patients selected in this clinical research had no osteoradionecroses correlated to root canal therapy. It seems that endodontic treatment is a safe procedure in patients who have been

through radiation therapy to the head and neck cancer (41, 42), when compared to the high incidence of ORN seen after teeth extraction in irradiated patients (43-45).

The patients who participated in this clinical investigation had an average 16 months follow up. Of 22 cases, 21 (95%) were considered successful. One was found with sinus tractus after 12 months and the high success rate is in agreement to other clinical study (42). In contrast, some clinical studies (46, 47) presented lower success rate. It has been shown a higher incidence of ORN to the molar region of the lower jaw, and in the molar region of the upper jaw (48). None of the teeth treated in this research was a molar or multi-rooted teeth, but rather anterior teeth and single-rooted premolar, which might explain some different outcomes from other studies. Single-rooted teeth were chosen for the different treatment protocols to be performed in anatomical similarities.

Multiple studies demonstrated alterations in the organization and micro hardness of enamel and dentin after radiation therapy (4,5). Dental biomechanical characteristics are often collapsed and higher obliteration of the dentin tubules, preceded by a degeneration of the odontoblast processes is described (49). Due to this fragile dental hard tissue, the usage of topic fluorine, a pre-RT dental procedure and dental checkups after RT are important in the prevention of ORN (48, 50). Even though patients treated in this study were scheduled to return every 6 months after root canal treatment and use of fluorine were prescribed, dental caries occurred after RT and advanced rapidly in some of the patients (11 out of 22) which was also found in other studies (48, 51).

One of the patients presented sinus tractus after 12 months of root canal treatment. The canal was retreated and after new biomechanical preparation and intracanal medication for 14 days, clinical sign of infection disappeared. It is important to point out that the coronal sealing of this tooth was missing by the time of sinus tractus detection, which might be due to radiation effect on nano-mechanical properties and chemical composition of enamel and dentine(4-7).

In this clinical study, patients have been irradiated to the head and neck with a dose of 50 to 60 Gy (54 Gy in average). Radiation dosage higher than 50 Gy to the head and neck and the occurrence of osteoradionecrosis (ORN) have been associated (52). In addition, the occurrence of postradiation xerostomia was evaluated in this study and all the patients were totally or partially affected. Radiation exposure of salivary glands can have an impact on the risk of xerostomia and ORN (2, 53) and help understand the high incidence of dental caries.

This clinical study aimed to compare the antimicrobial efficacy of endodontic treatment in irradiated patients. Data obtained in this research disclosed that biomechanical protocol with reciprocation motion, complemented by 2,5% NaOCl irrigation, either with apical positive pressure or passive ultrasonic irrigation, resulted

in statistically significant improvement of bacterial load and endotoxin removal from primarily infected root canals in patients who have undergone radiation therapy.

Initial samples were positive for the presence of bacteria in 100% of the canals evaluated with total bacterial count ranging from 1.2×10^4 to 7.6×10^6 CFU/mL (median value, 3.7×10^5 CFU/mL) presenting similarities to other studies in no irradiated patients (11, 31, 54- 57).

Meaningful bacterial load reduction was achieved by biomechanical preparation (higher than 95% in both groups). The efficacy of the reciprocating motion associated to the 2.5% NaOCl solution has been demonstrated (10, 58, 59). Regarding bacterial load, in this investigation, no statistic difference was found between the group treated with ultrasonic device and manual irrigation. Although ultrasonic is more effective than syringe irrigation in the removal of the rest of pulp tissue and smear layer (59, 60), contradictory results were found in microbiological studies (57, 62-64).

In the present study, endotoxin reduction using passive ultrasonic irrigation was not statistically significant in decrease the remaining LPS levels when compared to the apical positive pressure. This result is in contrast with a previous research (65), but compatible with a clinical trial that evaluated the efficacy of ultrasonic activation in lowering endotoxin levels in infected root canals (57), even though, none of them were in patients with the same characteristics, named irradiated patients.

After 14 days of intracanal medication with Ca(OH)_2 a further decrease of endotoxin levels could be detected in both groups, especially when compared to G1 that used syringe, which is in agreement with other studies (31-38, 57). The use of calcium hydroxide also lowered levels of bacteria. The action of calcium hydroxide over bacterial protein, DNA and cytoplasmic membranes were previously demonstrated (66). LPS or endotoxins are affected by the extremely basic pH that causes the hydrolysis of lipid A (67). However, even after intracanal medication in most of the root canals lower level of bacteria and endotoxin could be recovered which was also observed in other clinical studies (31-38).

A logistic regression analysis revealed the radiation dose as a significant predictor of apical periodontitis (68). Damage to the extracellular matrix and fibroatrophy increases the risk of late reactivated inflammation in the event of local injury of the bone (69). Furthermore, it was revealed that the diversity of root canal microflora increases significantly after head-neck radiotherapy (70). Therefore, future studies in irradiated patients should demand efforts for further evaluation on the antimicrobial effect and healing of apical periodontitis in teeth with multiple root canals, especially in the lower jaw molars can bring to light an important aspect of endodontic treatment in irradiated patients.

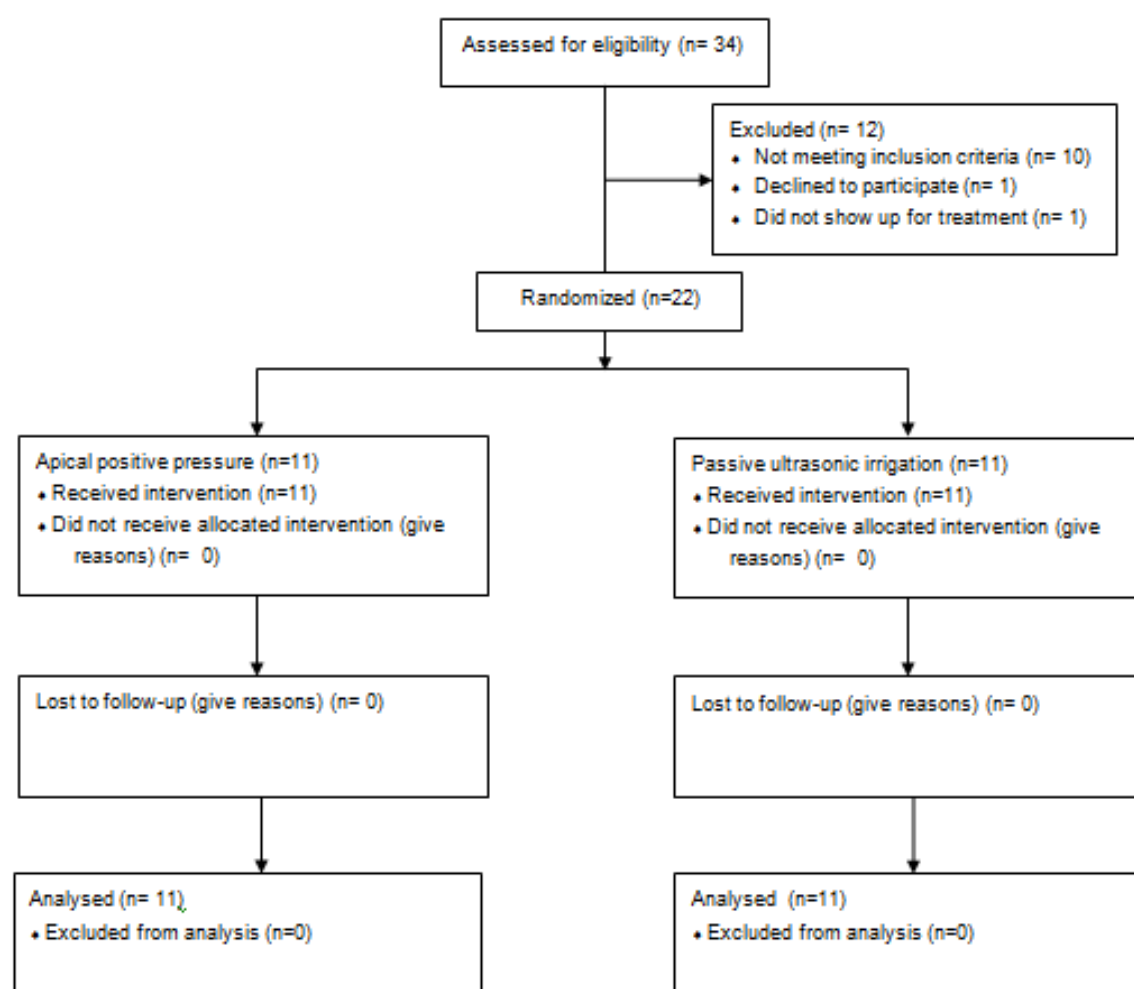


Figure 1. Consolidated standards of reporting trials flow chart.

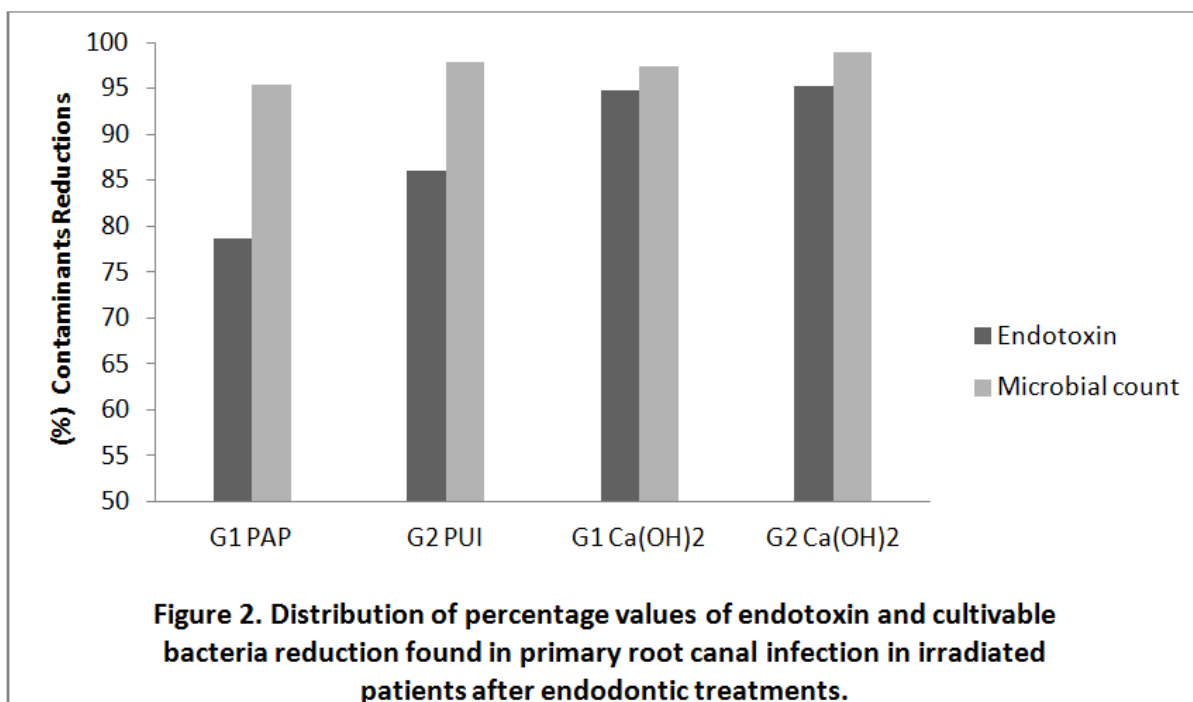


Table 2. Efficacy of endodontic biomechanical preparation protocols and intracanal medication on the reduction cultivable bacteria (CFU/mL)

G1 - Apical positive pressure			
Sampling times	Bacterial Load (CFU/mL) Median/ Range values	Median % of reduction	# of root canals with positive cultures
Before biomechanical preparation	3.1×10^5 ($1.3 \times 10^4 - 1.7 \times 10^6$) Aa	x	11/11
After biomechanical preparation	1.4×10^3 ($0 - 3.98 \times 10^3$) Bb	95.41%	10/11
After Ca(OH)2 intracanal medication	8.0×10^2 ($0 - 1.2 \times 10^2$) Bb	97.42%	10/11
G2 - Passive ultrasonic Irrigation			
Sampling times	Bacterial Load (CFU/mL) Median/ Range values	Median % of reduction	# of root canals with positive cultures
Before biomechanical preparation	4.3×10^4 ($1.12 \times 10^4 - 7.6 \times 10^6$) Aa	x	11/11
After biomechanical preparation	9.2×10^2 ($0 - 2.6 \times 10^3$) Bb	97.86%	10/11
After Ca(OH)2 intracanal medication	4.5×10^2 ($0 - 1.4 \times 10^3$) Bb	98.95%	10/11

Table 3. Efficacy of endodontic biomechanical preparation protocols and intracanal medication on the endotoxin reduction (EU/mL)

G1 – Apical positive pressure			
Sampling	Endotoxin contents (EU/mL) Median/ Range values	Median % of reduction	# of root canals positive for endotoxins
Before biomechanical preparation	37.400 (5.500-80.700) Aa	x	11/11
After biomechanical preparation	8.000 (0.283-51.300) Bb	78.61%	11/11
After Ca(OH)2 intracanal medication	1.920 (0.195-14.200)Bb	94.87%	11/11
G2- Passive ultrasonic irrigation			
Sampling	Endotoxin contents (EU/mL) Median/ Range values	Median % of reduction	# of root canals positive for endotoxins
Before biomechanical preparation	32.600 (3.900 - 49.400) Aa	x	11/11
After biomechanical preparation	4.550(0.190-35.600) Bb	86.04%	11/11
After Ca(OH)2 intracanal medication	1.520 (0.019-2.500)Bb	95.34%	11/11

- Intra-group analysis - different capital letters = $p < .05$.

- Inter-group analysis - different lower case letters = $p < .05$.

References

- 1 Vissink A, Jansma J, Spijkervet FKL, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:199 –212.
- 2 Kielbassa, AM, Hinkelbein, W, Hellwig, E, Meyer-Lückel, H. Radiation-related damage to dentition. *The lancet oncology*, 2006; 7(4), 326-335.
- 3 Stevenson-Moore P, Epstein JB. The management of teeth in irradiated sites. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1993;29B:39-43.
- 4 Kielbassa AM, Beetz I, Schendera A, Hellwig E. Irradiation effects on microhardness of fluoridated and non-fluoridated bovine dentin. *Eur J Oral Sci* 1997; 105: 444–47.
- 5 Kielbassa AM, Wrbas K-Th, Dornfeld B, et al. Zum Einfluß der tumortherapeutischen Bestrahlung auf die Kariesentstehung in menschlichem Dentin. Eine In-vitro- und In-situ-Untersuchung. *Dtsch Zahnärztl Z* 1999; **54**: 31–37.
- 6 Campos, VM, Farha, AL, da Silva, SP, Shiota, A, et al. Gamma radiation increases the risk of radiation-related root dental caries. *Oral oncology*, 2017; 71, 184.
- 7 Springer, IN, Niehoff, P, Warnke, PH, Böcek, G, et al. Radiation caries—radiogenic destruction of dental collagen. *Oral oncology*, 2005; 41(7), 723-8.
- 8 Siqueira JF Jr, Rocas IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 2008;34:1291–301.
- 9 Seto BG, Beumer J, Kagawa T, Klokkevold R, Wolinsky L. Analysis of endodontic therapy in patients irradiated for head and neck cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985;60:540-5.
- 10 Roças IN, Siqueira JF Jr. In vivo antimicrobial effects of endodontic treatment procedures as assessed by molecular microbiologic techniques. *J Endod* 2011; 37:304–10.
- 11 Martinho FC, Gomes BP. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod* 2008;34:268–72.
- 12 Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod* 1975;1:19–21.
- 13 Pitts DL, Williams BL, Morton TH Jr. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. *J Endod* 1982;8:10–8.
- 14 Martinho, F. C., de Rabello, D. G. D., Ferreira, L. L., & Nascimento, G. G. (2017). Participation of endotoxin in root canal infections: A systematic review and meta- analysis. *European journal of dentistry*, 11(3), 398.

- 15 Martinho FC, Chiesa WMM, Zaia AA, et al. Comparison of endotoxin levels in previous studies on primary endodontic infections. *J Endod* 2011;37:163–7.
- 16 Endo MS, Martinho FC, Zaia AA, et al. Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemomechanical preparation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:2575–83.
- 17 Machado, C. A. D., Souza, A. C. A., Loureiro, C., Martinho, F. C., Cintra, L. T. Â., Dezan Junior, E., & Jacinto, R. D. C. (2019). Comparison of two rotary systems in bacteria/lps removal from endodontic infections: randomized clinical trial. *Brazilian Oral Research*, 33.
- 18 Duque, T. M., Prado, M., Herrera, D. R., & Gomes, B. P. (2019). Periodontal and endodontic infectious/inflammatory profile in primary periodontal lesions with secondary endodontic involvement after a calcium hydroxide-based intracanal medication. *Clin Oral Inv*, 23(1), 53-63.
- 19 Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. *J Endod* 2010;36:1467-74.
- 20 Martinho FC, Chiesa WM, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Souza-Filho FJ, et al. Comparison of endotoxin levels in previous studies on primary endodontic infections. *J Endod* 2011;37:163-7.
- 21 Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ, et al. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol* 2005;54:777-83.
- 22 Endo MS, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP, et al. Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:2575-83.
- 23 Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod* 2012;38:1082-6.
- 24 Martinho FC, Gomes BP. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod* 2008;34:268-72.
- 25 Siqueira JF Jr, Alves FRF, Versiani MA et al. (2013) Correlative bacteriologic and micro-computed tomographic analysis of mandibular molar mesial canals prepared by Self- Adjusting File, Reciproc, and Twisted File systems. *J Endod* 39, 1044–50.
- 26 Leoni, G. B., Versiani, M. A., Silva-Sousa, Y. T., Bruniera, J. F. B., Pécora, J. D., & Sousa-Neto, M. D. D. (2017). Ex vivo evaluation of four final irrigation protocols on the removal of hard-tissue debris from the mesial root canal system of mandibular first molars. *Int Endod J*, 50(4), 398-406.

- 27 Thomas AR, Velmurugan N, Smita S, Jothilatha S (2014) Comparative evaluation of canal isthmus debridement efficacy of modified EndoVac technique with different irrigation systems. *J Endod* 40, 1676–80.
- 28 Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y (2014) Irrigation in endodontics. *British Dental Journal* 216, 299–303.
- 29 Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru M, et al. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J* 2003;36:733–9.
- 30 Oliveira LD, Leao MV, Carvalho CA, et al. In vitro effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. *J Dent* 2005;33:107–14.
- 31 Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, et al. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22(6):411–8. Doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00379.x.
- 32 De Oliveira Luciane Dias, Carvalho Cláudio Antonio Talge, Carvalho Alessandra Sverberi, De Souza Alves Jéssica, Valera Marcia Carneiro, Jorge Antonio Olavo Cardoso. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. *J Endod* 2012;38(8):1053–7. Doi: 10.1016/j.joen.2012.04.015.
- 33 Xavier AC, Martinho FC, Chung A, et al. One-visit versus two-visit root canal treatment: effectiveness in the removal of endotoxins and cultivable bacteria. *J Endod* 2013;39, 959-64.
- 34 Sousa Ezilmara LR, Martinho Frederico C, Nascimento Gustavo G, Leite Fabio RM, Gomes Brenda PFA. Quantification of Endotoxins in Infected Root Canals and Acute Apical Abscess Exudates: Monitoring the Effectiveness of Root Canal Procedures in the Reduction of Endotoxins. *J Endod* 2014;40(2):177–81. Doi: 10.1016/j.joen.2013.10.008.
- 35 Marinho Ariane Cassia Salustiano, Martinho Frederico Canato, Zaia Alexandre Augusto, Ferraz Caio Cezar Randi, Gomes Brenda Paula Figueiredo De Almeida. Monitoring the effectiveness of root canal procedures on endotoxin levels found in teeth with chronic apical periodontitis. *J Appl Oral Sci* 2014;22(6):490–5. Doi: 10.1590/1678-775720130664.
- 36 Adl Alireza, Motamedifar Mohammad, Shams Mahdi Sedigh, Mirzaie Ahmad. Clinical investigation of the effect of calcium hydroxide intracanal dressing on bacterial lipopolysaccharide reduction from infected root canals. *Aust Endod J* 2015;41(1):12–6. Doi: 10.1111/aej.12054.
- 37 Marinho Ariane CS, Martinho Frederico C, Leite Fábio RM, Nascimento Gustavo G, Gomes Brenda PFA. Proinflammatory Activity of Primarily Infected Endodontic Content against Macrophages after Different Phases of the Root Canal Therapy. *J Endod* 2015;41(6):817–23. Doi: 10.1016/j.joen.2015.01.017.
- 38 Carvalho Alessandra Sverberi, Oliveira Luciane Dias De, Cardoso Flávia Goulart da Rosa, Oliveira Felipe Eduardo De, Valera Marcia Carneiro, Carvalho

Cláudio Antônio Talge. Limewater and polymyxin B associated with NaOCl for endotoxin detoxification in root canal with necrotic pulp. *Braz Dent J* 2016;27(5):573–7. Doi: 10.1590/0103-6440201600934.

39 Moller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth: methodological studies. *Odontol Tidskr* 1966;74:380.

40 Rabello, D. G., Corazza, B. J., Ferreira, L. L., Santamaria, M. P., Gomes, A. P., & Martinho, F. C. (2017). Does supplemental photodynamic therapy optimize the disinfection of bacteria and endotoxins in one-visit and two-visit root canal therapy? A randomized clinical trial. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 19, 205-211.

41 Seto, B. G., Beumer III, J., Kagawa, T., Klokkevold, P., & Wolinsky, L.. Analysis of endodontic therapy in patients irradiated for head and neck cancer. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 1985; 60(5), 540-545.

42 Lilly, J. P., Cox, D., Arcuri, M., & Krell, K. V. (1998). An evaluation of root canal treatment in patients who have received irradiation to the mandible and maxilla. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 86(2), 224-226.

43 Regezi JA, Courtney RM, Kerr DA: Dental management of patients irradiated for oral cancer, *Cancer* 38: 994-1000,1976.

44 Aarup-Kristensen, S., Hansen, C. R., Forner, L., Brink, C., Eriksen, J. G., & Johansen, J. (2019). Osteoradionecrosis of the mandible after radiotherapy for head and neck cancer: risk factors and dose-volume correlations. *Acta Oncologica*, 1-5.

45 Beech, N. M., Porceddu, S., & Batstone, M. D. (2017). Radiotherapy-associated dental extractions and osteoradionecrosis. *Head & neck*, 39(1), 128-132.

46 Markitzin A, Heling I. Endodontic treatment of patients who have undergone irradiation of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981 ;52:294-8.

47 Montgomery S. Endodontic complications in an irradiated patient. *J Endod* 1977;3:277-9.

48 Kojima, Y., Yanamoto, S., Umeda, M., Kawashita, Y., Saito, I., Hasegawa, T., ... & Kurita, H. (2017). Relationship between dental status and development of osteoradionecrosis of the jaw: a multicenter retrospective study. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 124(2), 139-145.

49 Grötz KA, Duschner H, Kutzner J, Thelen M, Wagner W (1997) New evidence for the etiology of the so-called radiation caries. Proof for direct radiogenic damage of the dento-enamel junction. *Strahlenther Onkol* 173:668–676

50 Katsura K, Sasai K, Sato K, Saito M, Hoshina H, Hayashi T. Relationship between oral health status and development of osteoradionecrosis of the mandible: A retrospective longitudinal study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;105:731-738.

- 51 Thariat, J., Ramus, L., Darcourt, V., Marcy, P. Y., Guevara, N., Odin, G., ... & Righini, C. (2012). Compliance with fluoride custom trays in irradiated head and neck cancer patients. *Supportive Care in Cancer*, 20(8), 1811-1814.
- 52 Tsai, C. J., Hofstede, T. M., Sturgis, E. M., Garden, A. S., Lindberg, M. E., Wei, Q., ... & Dong, L. (2013). Osteoradionecrosis and radiation dose to the mandible in patients with oropharyngeal cancer. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 85(2), 415-420.
- 53 Wang X, Hu C, Eisbruch A. Organ-sparing radiation therapy for head and neck cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:639-648.
- 54 Siqueira JF Jr, Paiva SS, Rocas IN. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *J Endod* 2007;33:541–7.
- 55 Siqueira JF Jr, Rocas IN, Paiva SS, et al. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:122–30.
- 56 Cardoso, FG, Martinho, FC, Ferreira, ND, Prado, RF, et al. Correlation Between Volume of Root Canal, Cultivable Bacteria, Bacterial Complexes and Endotoxins in Primary Infection. *Braz Dent J*, 2019; 30(2), 117-122.
- 57 Nakamura, V. C., Pinheiro, E. T., Prado, L. C., Silveira, A. C., Carvalho, A. P. L., Mayer, M. P. A., & Gavini, G. (2018). Effect of ultrasonic activation on the reduction of bacteria and endotoxins in root canals: a randomized clinical trial. *Int Endod J*, 51, e12-e22.
- 58 Martinho FC, Gomes AP, Fernandes AM et al. (2014) Clinical comparison of the effectiveness of single-file reciprocating systems and rotary systems for removal of endotoxins and cultivable bacteria from primarily infected root canals. *J Endod* 40, 625–9.
- 59 Vianna ME, Horz HP, Gomes BP et al. (2006) In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J* 39, 484–92.
- 60 Neelakantan P, Devaraj S, Jagannathan N. Histologic assessment of debridement of the root canal isthmus of mandibular molars by irrigant activation techniques ex vivo. *J Endod* 2016;42:1268–72.
- 61 Burleson A, Nusstein J, Reader A, Beck M. The in vivo evaluation of hand/rotary/ultrasound instrumentation in necrotic, human mandibular molars. *J Endod* 2007; 33:782–7.
- 62 Cheng X, Xiang D, He W, et al. Bactericidal effect of Er:YAG laser-activated sodium hypochlorite irrigation against biofilms of *Enterococcus faecalis* isolate from canal of root-filled teeth with periapical lesions. *Photomed Laser Surg* 2017;35:386–92.

- 63 Maden M, Ertugrul IF, Orhan EO, et al. Enhancing antibacterial effect of sodium hypochlorite by low electric current-assisted sonic agitation. *PLoS One* 2017;12: e0183895.
- 64 Liang YH, Jiang LM, Jiang L, et al. Radiographic healing after a root canal treatment performed in single-rooted teeth with and without ultrasonic activation of the irrigant: a randomized controlled trial. *J Endod* 2013;39:1218–25.
- 65 Herrera DR, Martinho FC, Soares A et al. (2016) Clinical efficacy of EDTA ultrasonic activation in the reduction of endotoxins and cultivable bacteria. *Int Endod J* 24, 1–8.
- 66 Mohammadi Z, Dummer PM (2011) Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J* 44, 697–730.
- 67 Safavi KE, Nichols FC (1993) Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod* 19, 76–8.
- 68 Hommez, G. M., De Meerleer, G. O., De Neve, W. J., & De Moor, R. J. (2012). Effect of radiation dose on the prevalence of apical periodontitis—a dosimetric analysis. *Clin Oral Inv*, 16(6), 1543-1547.
- 69 Chrcanovic BR, Reher P, Sousa AA, Harris M (2010) Osteoradionecrosis of the jaws—a current overview—part 1. Pathophysiology and risk and predisposing factors. *Oral Maxillofac Surg* 14:3–16
- 70 Hommez, GM, Verhelst, R, Vaneechoutte, M, Claeys, G, et al. (2008). Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the microflora in necrotic teeth of patients irradiated in the head and neck region. *J Endod*, 34(9), 1048-1051.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A taxa de cárie em dentes de pacientes irradiados é consideravelmente mais alta do que em pacientes não irradiados, porém a taxa de periodontite apical é parecida, o que sugere uma alteração no padrão da microbiota e/ou mudança na celularidade e vascularização do osso irradiado (Hommez et al., 2008).

Apesar das altas taxas de irradiação na região de cabeça e pescoço, os pacientes selecionados neste estudo clínico não tiveram osteorradionecrose associado à terapia endodôntica. Aparentemente o tratamento endodôntico é um procedimento seguro para os pacientes que foram submetidos à radiação de cabeça e pescoço (41,42) quando se compara com taxas mais altas de ORN vista após extração dentária (43-45).

Infecção endodôntica primária é uma infecção polimicrobiana (Fabricius et al., 1982; Martinho et al., 2010; Martinho et al., 2014b) causada predominantemente por bactérias grã-negativas anaeróbicas que apresentam lipopolissacarídeos (LPS), conhecidos como endotoxinas, em suas paredes celulares (Siqueira et al., 2011; Martinho et al., 2014b; Martinho et al., 2014 c). Ao ser liberado, LPS é capaz de penetrar nos tecidos periradiculares levando à inflamação periradicular e destruição óssea (Lim et al., 1994; Hong et al., 2004; Martinho, Gomes, 2008; Martinho et al., 2011a, 2012a; 2014a).

Os pacientes que participaram desta investigação clínica tiveram um acompanhamento pós-operatório médio de 16 meses. Dos 22 casos, 21(95%) foram considerados sucesso. Um foi encontrado com fístula após 12 meses e a alta taxa de sucesso está em acordo com outro estudo clínico (42). Em contraste, alguns estudos clínicos (46, 47) apresentaram menores taxas de sucesso. Foi demonstrado uma maior taxa de ORN na região molar da mandíbula e maxila (48). Nenhum dos dentes tratados nesta pesquisa foram realizados em

multirradiculares ou molars, mas sim em dentes anteriores e unirradiculares, o que pode explicar as diferenças de resultado em relação à outros estudos. Dentes unirradiculares foram escolhidos para haver maior padronização anatômico.

Múltiplos estudos demonstraram alterações na organização e microdureza de esmalte e dentina após terapia de radiação (Kielbassa et al., 1997, 1999). Características dentárias biomecânicas são frequentemente colapsadas e maior obliteração dos túbulos dentinários, precedidos de degeneração dos processos odontoblásticos são descritos (Grotz et al., 1997). Devido a esta fragilidade do tecido dentário, o uso de flúor tópico e consultas regulares são importantes na prevenção de ORN (Kojima et al, 2017; Katsura et al., 2008). Apesar dos pacientes que participaram deste estudo retornaram aproximadamente a cada 6 meses após terapia endodôntica e da prescrição de uso de flúor, cáries ocorreram após radioterapia e avançaram rapidamente em alguns pacientes (11 dos 22) o que se encontrou em outros estudos também (Kojima et al, 2017, Thariat et al., 2012).

Um dos pacientes apresentou fístula após 12 meses do tratamento endodôntico. O canal foi retratado e após novo prepare biomecânico e medicação intracanal por 14 dias, sinais clínicos de infecção desapareceram. é importante salientar que o selamento coronário não estava presente no momento de detecção da fístula, que pode ser devido ao efeito da radiação nas propriedades nano-mecânicas e composição química do esmalte e dentina (Kielbassa et al., 1997, 1999; Campos et al., 2017; Springer et al., 2005).

Neste estudo clinic, pacientes foram irradiados na região de cabeça e pescoço com dose entre 50 e 70 Gy (54 Gy em média). Dose de radiação maior que 50 Gy na cabeça e pescoço tem sido associado com maior risco de ORN (Tasi et al., 2013). Em adição, a ocorrência de xerostomia pós irradiação foi avaliada neste estudo e todos os pacientes foram total ou parcialmente afetados. A exposição à radiação das glândulas salivares podem ter impacto no risco de

xerostomia e ORN (Kielbassa et al., 2006; Wang et al., 2011) e ajuda a entender a alta incidência de cáries.

Investigações clínicas de infecções endodônticas primárias tem elucidado uma forte correlação entre a presença de periodontite apical e LPS bacteriana oral. Além disso, altas concentrações de endotoxinas no periápice de canais radiculares contribuem para aumento de substâncias vasoativas e neurotransmissores nas terminações nervosas (Seltzer et al., 1994) e por isso são associados com dores espontâneas e sinais e sintomas clínicos tais quais dores na palpação, sensibilidade à percussão e presença de exudatos (Schein, Schilder, 1975; Horiba et al., 1989; Jacinto et al., 2005; Martinho & Gomes 2008; Martinho et al., 2010; Martinho et al., 2011b).

Devido a estes problemas citados, pesquisadores e clínicos avaliam as mais eficientes combinações de tratamentos químico-mecânico na endodontia a fim de eliminar os microorganismos e seus subprodutos (Byström, Sundqvist, 1981; Tronstad et al., 1990).

Este estudo clínico teve por objetivo comparar a eficácia antimicrobiana do tratamento endodôntico em pacientes irradiados. Dados obtidos nesta pesquisa demonstram que os protocolos biomecânicos com movimentos reciprocantes, complementados com irrigação de hipoclorito de sódio 2,5%, tanto com irrigação com seringa, quanto por irrigação ultrassônica passiva, resultaram em melhora estatisticamente significativa na carga bacteriana e na remoção de endotoxinas dos canais com infecção primária em pacientes irradiados.

Amostras iniciais foram positivas para presença bacteriana em 100% dos canais avaliados com contagem bacteriana total variando de 1.2×10^4 to 7.6×10^6 CFU/mL (valor médio de 3.7×10^5 CFU/mL) apresentando valores próximos de outros estudos clínicos em pacientes não irradiados (Martinho et al., 2008; Vianna et al., 2007; Siqueira et al., 2007a 2007b; Cardoso et al.,

2019; Nakamura et al., 2018).

Significante redução de carga bacteriana foi alcançado por preparo biomecânico (maior que 95% em ambos os grupos). A eficácia do movimento reciprocante associado à solução 2.5% NaOCl tem sido demonstrado (Roças et al., 2011; Martinho et al., 2014; Vianna et al., 2006). Em relação à carga bacteriana, nesta investigação, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com irrigação manual e com ultrassom. Apesar do ultrassom ser mais efetivo que uso exclusivo da seringa na remoção de restos pulpares e lama dentinária (Vianna et al., 2006; Neelakantan et al., 2016), resultados conflitantes foram vistos em estudo microbiológicos (Nakamura et al., 2018, Cheng et al., 2017).

No presente estudo, redução de endotoxina usando irrigação ultrassônica passiva não foi estatisticamente significativa na diminuição de níveis de LPS comparado à irrigação exclusiva com seringa. Este resultado está em contraste com prévio estudo (Herrera et al., 2016), mas compatível com um ensaio clínico que avaliou a eficácia da ativação ultrassônica em reduzir os níveis de endotoxinas dos canais radiculares (Nakamura et al., 2018), contudo em nenhum dos estudos foi realizado em pacientes com característica semelhantes, que é a terapia de irradiação prévia.

O hipoclorito de sódio é o irrigante mais utilizado como auxiliar no preparo químico-mecânico, e apresenta ótimas características de dissolução tecidual (Senia et al., 1971; Cunningham, Balekjian, 1980; Naenni et al., 1994), ação antimicrobiana (Gomes et al., 2001; Vianna et al., 2004), no entanto, com reduzida eficácia na inativação de endotoxinas (Tanomaru et al., 2003; Xavier et al., 2013).

Ativação por ultrassom melhora aspectos mecânicos e químicos da irrigação, como mostrado in vitro (Jiang et al., 2010; Macedo et al., 2010; Chan et al., 2019).

Após 14 dias de medicação intracanal com Ca(OH)_2 , uma redução maior de níveis de endotoxinas pode ser detectada em ambos os grupos, especialmente quando comparado com G1 que irrigou exclusivamente com seringa, o que está em acordo com outros estudos (Vianna et al., 2007; Oliveira et al., 2012; Xavier et al., 2013; Sousa et al., 2014; Marinho et al., 2014, 2015; Adl et al 2015; Nakamura et al., 2018). O uso do hidróxido de cálcio também diminuiu os níveis de bactérias. Ca(OH)_2 tem sido a medicação intracanal de escolha devido ao seu potencial sobre proteína, DNA e membrana citoplasmática antimicrobiana, sua capacidade de dissolver tecido, de induzir a mineralização, bem como por seu efeito anti-inflamatório (Camargo et al., 2006; Maekawa et al., 2011) e por inativar lipopolissacarídeos devido seu Ph básico que causa hidrólise de Lipídio A (Silva et al., 2002; Marinho et al, 2014). Contudo, mesmo após uso de medicação intracanal menores níveis de bactérias e endotoxinas puderam ser recuperadas, o que pode ser observado também em outros estudo clínicos (Vianna et al., 2007; Oliveira et al., 2012; Xavier et al., 2013; Sousa et al., 2014; Marinho et al., 2014, 2015; Adl et al 2015).

Em casos de dentes com necrose pulpar e lesão endodôntica primária, a realização de patência foraminal é indicada por muitas escolas de odontologia (Cailleteau, Mullaney, 1997) para remoção de debris da região do ápice foraminal, pois os mesmos podem prevenir a reparação tecidual (Buchanan, 1989).

Porém, para pacientes irradiados, a ampliação foraminal pode ser um risco maior de osteorradionecrose por se tratar de um procedimento mais invasivo em uma estrutura óssea que está comprometido na fisiologia de reparação tecidual (Stevenson-Moore, 1990; Jansma et al., 1992), e por isso foi determinado comprimento de trabalho 1 mm do apex.

Uma regressão logística revelou que altas doses de radiação apresentam significativa predisposição para periodontite apical (Hommeiz et al., 2008).

Danos à matriz extracelular e fibroatrofia aumentam o risco tardio de reativar inflamação no local da lesão óssea (Chrcanovic et al., 2010). Além dos mais, foi revelado que a diversidade da micro-flora do canal radicular aumenta significativamente após terapia de irradiação (Hommez et al., 2008). Portanto, futuros estudos em pacientes irradiados devem ser realizados para avaliar efeitos sobre bactérias e na recuperação de lesões apicais em dentes molares , especialmente na região de mandíbula em pacienes que foram submetidos à radiação de cabeça e pescoço.

REFERÊNCIAS*

Artese L, Piattelli A, Quaranta M, et al. Immunoreactivity for interleukin 1-beta and tumor necrosis factor-alpha and ultrastructural features of monocytes/macrophages in periapical granulomas. *Journal of Endodontics* 1991;17:483–7.

Bandow K, Maeda A, Kakimoto K, et al. Molecular mechanisms of the inhibitory effect of lipopolysaccharide (LPS) on osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;402:755-61.

Beutler B, Cerami A. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986;320:584–8.

Cardoso FGR, Ferreira NS, Martinho FC, et al. Correlation between volume of apical periodontitis determined by cone-beam computed tomography analysis and endotoxin levels found in primary root canal infection. *Journal of Endodontics* 2015;41:1015-9.

Cardoso, F., Chung, A., Martinho, F., Camargo, C., Carvalho, C., Gomes, B. A., Valera, M. Investigation of Bacterial Contents From Persistent Endodontic Infection and Evaluation of Their Inflammatory Potential. *Brazilian Dental Journal* 2016., 27(4), 412-418.

Chrepa V, Kotsakis GA, Pagonis TC, Hargreaves KM. The effect of photodynamic therapy in root canal disinfection: a systematic review. *Journal of Endodontics* . 2014; 40(7):891-8.

Diogenes A, Ferraz CC, Akopian AN, et al. LPS sensitizes TRPV1 via activation of TLR4 in trigeminal sensory neurons. *J Dent Res* 2011;90:759-64.

Diogenes A, Ferraz CC, Akopian AN, et al. LPS sensitizes TRPV1 via activation of TLR4 in trigeminal sensory neurons. *J Dent Res* 2011;90:759-64.

Endo MS, Martinho FC, Zaia AA, et al. Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:2575-83.

Fabricius L, Dahlén G, Holm SE, Möller AJR. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* 1982;90:200–6.

Ferraz CC, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Lipopolysaccharide from

Porphyromonas gingivalis sensitizes capsaicin-sensitive nociceptors. *Journal of Endodontics* 2011;37:45-8.

Ferraz CC, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* sensitizes capsaicin-sensitive nociceptors. *Journal of Endodontics* 2011;37:45-8.

Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J* 1996;29:69-75.

Gomes BPFA, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *Journal of Endodontics* 2012;38:1082-6.

Gomes BPFA, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *Journal of Endodontics* 2009;35:1350-3.

Herrera, D. R., Martinho, F. C., de-Jesus-Soares, A. J., Zaia, A. A., Ferraz, C. C., Almeida, J. F., & Gomes, B. P. Clinical efficacy of EDTA ultrasonic activation in the reduction of endotoxins and cultivable bacteria. *International Endodontic Journal* 2016.

Hong CY, Lin SK, Kok SH, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med* 2004;33:162-9.

Hong CY, Lin SK, Kok SH, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med* 2004;33:162–9.

Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, et al. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;71:492–5.

Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, et al. Cytotoxicity against various cell lines of lipopolysaccharides purified from bacteroides, fusobacterium, and veillonella isolated from infected root canals. *Journal of Endodontics* 1989;15:530–4.

Hosoya S, Matsushima K. Stimulation of interleukin-1 beta production of human dental pulp cells by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *Journal of Endodontics* 1997;23:39–42.

Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, et al. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol* 2005;54:777-83.

Kassem A, Henning P, Lundberg P, et al. *Porphyromonas gingivalis* Stimulates Bone Resorption by Enhancing RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) through Activation of Toll-like Receptor 2 in Osteoblasts. *J Biol Chem* 2015. 290:20147-58.

Khan AA, Diogenes A, Jeske NA, et al. Tumor necrosis factor alpha enhances the sensitivity of rat trigeminal neurons to capsaicin. *Neuroscience* 2008;155:503-9.

Khan AA, Diogenes A, Jeske NA, et al. Tumor necrosis factor alpha enhances the sensitivity of rat trigeminal neurons to capsaicin. *Neuroscience* 2008;155:503-9.

Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg Med*. 2011; 43(7):755-67.

Kuo ML, Lamster IB, Hasselgren G. Host mediators in endodontic exudates. Indicators of inflammation and humoral immunity. *Journal of Endodontics* 1998;24:598-603.

Lim GC, Torabinejad M, Kettering J, et al. Interleukin 1 b in symptomatic and asymptomatic human periradicular lesions. *Journal of Endodontics* 1994;20:225–7.

Lim GC, Torabinejad M, Kettering J, et al. Interleukin 1-beta in symptomatic and asymptomatic human periradicular lesions. *Journal of Endodontics* 1994;20:225-7.

Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev*. 1976; 9():65-107.

Marinho ACS, Martinho FC, Leite FRM, et al. Proinflammatory activity of primarily infected endodontic content against macrophages after different phases of the root canal therapy. *Journal of Endodontics* 2015;41:817-23.

Martinho FC, Chiesa WM, Leite FRM, et al. Antigenicity of Primary Endodontic Infection against Macrophages by the Levels of PGE2 Production. *Journal of Endodontics* 2011;37:602-7.

Martinho FC, Chiesa WM, Zaia AA, et al. Clinical investigation of the efficacy of chemo-mechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. *Journal of Endodontics* 2010;36:1766-9.

Martinho FC, Chiesa WMM, Leite FRM, et al. Correlation between

Clinical/Radiographic Features and Inflammatory Cytokine Networks Produced by Macrophages Stimulated with Endodontic Content. Journal of Endodontics 2012;38:740-5.

Martinho FC, Gomes APM, Fernandes AMM, et al. Clinical comparison of the effectiveness of single-file reciprocating systems and rotary systems for removal of endotoxins and cultivable bacteria from primarily infected root canals. Journal of Endodontics 2014;40:625-9.

Martinho FC, Gomes BPFA. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. Journal of Endodontics 2008;34:268-72

Martinho FC, Leite FRM, Nascimento GG, et al. Clinical investigation of bacterial species and endotoxin in endodontic infection and evaluation of root canal content activity against macrophages by cytokine production. Clin Oral Invest 2014;18:2095-2102.

Matsuo T, Ebisu S, Shimabukuro Y, et al. Quantitative analysis of immunocompetent cells in human periapical lesions: correlations with clinical findings of the involved teeth. Journal of Endodontics 1992;18:497–500.

McNicholas S, Torabinejad M, Blankenship J, Bakland L. The concentration of prostaglandin E2 in human periradicular lesions. Journal of Endodontics 1991;17:97-100.

Morrison DC, Kline LF. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). J Immunol 1977;118:362-8.

Norton LA, Proffit WR, Moore RR. In vitro bone growth inhibition in the presence of histamine and endotoxins. J Periodontol 1970;41:153-7.

Oliveira BP, Aguiar CM, Câmara AC, Albuquerque MM, Correia AC, Soares MF. The efficacy of photodynamic therapy and sodium hypochlorite in root canal disinfection by a single-file instrumentation technique. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2015 12(3): 436-43.

Oliveira LD, Carvalho CAT, Carvalho AS, et al. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. Journal of Endodontics 2012;38:1053-7.

Richards D, Rutherford RB. The effects of interleukin 1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal-ligament and gingival

fibroblast. Arch Oral Biol 1988;33:237-43.

Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. Sci Am 1992;267:54-61.

Rôças IN, Siqueira JF Jr. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. Journal of Endodontics 2010;36:45-52.

Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. Journal of Endodontics 1975;1:19–21.

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

Silva E, 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. International Endodontic Journal 2016.

Stashenko P, Dewhirst FE, Rooney ML, et al. Interleukin-1 beta is a potent inhibitor of bone formation in vitro. J Bone Miner Res 1987;2:559–65.

Takayama S, Miki Y, Shimauchi H, Okada H. Relationship between prostaglandin E2 concentrations in periapical exudates from root canals and clinical findings of periapical periodontitis. Journal of Endodontics 1996;22:677-80.

Vianna ME, Hartz H-P, Conrads G, et al. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. Oral Microbiol Immunol 2007;22:411–8.

Vianna ME, Horz HP, Conrads G, et al. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. Oral Microbiol Immunol 2008;23:282–90.

Xavier AC, Martinho FC, Chung A, et al. One-visit versus two-visit root canal treatment: effectiveness in the removal of endotoxins and cultivable bacteria. Journal of Endodontics 2013;39:959–64.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

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

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Investigação da condição bacteriana endodôntica em pacientes oncológicos submetidos à radioterapia.

Pesquisador: Cláudio Antonio Talge Carvalho

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 02236718.9.0000.0077

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.073.157

Apresentação do Projeto:

Em casos de pacientes com câncer que são submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço, os dentes remanescentes devem ser preservados e evita-se os procedimentos de extrações dentárias, uma vez que há um grande risco de osteorradionecrose. Com isso, dentes que sofrem danos devem tentar ser preservados e em muitas situações o tratamento endodôntico se faz necessário. Portanto, o conhecimento das espécies microbianas, a quantificação de endotoxinas lipopolissacarídeos – LPS) e o efeito da terapia endodôntica pode determinar o sucesso do tratamento, afim de manter o paciente livre de contaminações. Assim sendo, a proposta do presente estudo é avaliar o efeito do tratamento endodôntico em dentes com necrose pulpar em pacientes que foram submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço em diversos aspectos, tais quais: 1) Investigar a microbiota e endotoxina presente nas lesões periapicais de dentes com infecções endodônticas primárias, correlacionando com a presença de sintomatologia clínica; 2) Analisar as mudanças microbiológicas e de endotoxinas após o preparo químico-mecânico; 3) Analisar as mudanças microbiológicas e de endotoxinas após a medicação intracanal. 4) Correlacionar microbiota encontrada na saliva com microbiotapresente no sistema de canais radiculares.

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph.ict@unesp.br

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



Continuação do Parecer: 3.073.157

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

A proposta deste estudo é verificar taxas de sucesso em pacientes que receberam terapia endodôntica em casos clínicos que apresentam necrose pulpar em pessoas que foram previamente submetidos à radioterapia. Será estudado quais

microorganismos são predominantes no processo de infecção endodôntica, bem como os níveis de endotoxinas. **Objetivo Secundário:**

Outro objetivo deste trabalho é comparar taxa de redução de microorganismos antes e após preparo químico-mecânico, assim como após

medicação intracanal com hidróxido de cálcio. Por último, será feita uma comparação das características dos microorganismos coletados na saliva com o que é encontrado no interior do conduto radicular.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Nenhum paciente vai ser submetido à algum tratamento diferente do recomendado para qualquer paciente que é submetido à tratamento endodôntico nesta Universidade. Portanto, os riscos são aqueles que todos os pacientes submetidos à terapia endodôntica se submetem: risco de eventual processo de inflamação após o tratamento.

Benefícios: Os pacientes serão submetidos à terapia endodôntica para solucionar um problema já estabelecido de necrose pulpar e infecção já presente.

Principalmente em pacientes submetidos à radioterapia a solução de processo infeccioso é fundamental na prevenção de osteorradionecrose

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo irá verificar taxas de sucesso em pacientes que receberam terapia endodôntica em casos clínicos que apresentam necrose pulpar em pessoas que foram previamente submetidos à radioterapia. Será estudado quais microorganismos são predominantes no processo de infecção endodôntica, bem como os níveis de endotoxinas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE, foi reformulado, inserindo os riscos, conforme solicitado no parecer anterior, bem como na Plataforma Brasil foi alterado a opção de sim para não, com relação a dispensa do TCLE.

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.ict@unesp.br

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



Continuação do Parecer: 3.073.157

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Como o pesquisador atendeu as pendências anotadas anteriormente, o protocolo poderá ser aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer do(a) Relator(a).

O (a) pesquisador(a) irá receber e-mail da Secretaria do CEPH-ICT-CAMPUS DE SJCAMPOS-UNESP, para envio de relatórios parciais/final, para não incorrer na penalidade de não o fazendo, em não ter novas submissões avaliada pelo Comitê de Ética, até que sane a pendência de envio do relatório, na forma de notificação através do sistema da Plataforma Brasil. Obs:- No site <https://www2.ict.unesp.br/> – Sobre o ICT – Comissões e Comitês - Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos, encontrará o formulário para envio do Relatório parcial/final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1248808.pdf	26/11/2018 11:57:28		Aceito
Outros	formularioesppend.doc	26/11/2018 11:56:52	Cláudio Antonio Talge Carvalho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_reformulado.doc	26/11/2018 11:54:38	Cláudio Antonio Talge Carvalho	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	31/10/2018 17:38:14	Cláudio Antonio Talge Carvalho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.doc	31/10/2018 11:45:59	Cláudio Antonio Talge Carvalho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

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

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



Continuação do Parecer: 3.073.157

SAO JOSE DOS CAMPOS, 11 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Denise Nicodemo
(Coordenador(a))

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Caro(a) Senhor(a)

Eu, Cláudio Antonio Talge Carvalho, professor da Disciplina de Endodontia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos-ICT/ UNESP , portador do CPF 407.872.573-20, estabelecido à Avenida Eng. Francisco José Longo, 777, na cidade de São José dos Campos-SP, telefone para contato (12) 3947 9048, sou responsável pela pesquisa cujo título é **“Investigação da condição bacteriana endodôntica em pacientes oncológicos submetidos à radioterapia”** o que significa que iremos realizar o tratamento de uma doença dentária e verificar as mudanças dos microorganismos (bactérias) ao longo do tratamento.

O objetivo deste estudo clínico é avaliar o efeito do tratamento endodôntico na doença periapical provocado por microorganismos, ou seja, na região do canal e do osso próximo ao dente. Para esta avaliação, será coletado com um papel absorvente, líquido presente no interior do canal do dente a ser tratado e, em seguida, em laboratório, o material coletado será submetido a análise e relacionaremos estes fatores com sintomatologia clínica.

O projeto não acarretará nenhum risco para a saúde do paciente, além de um eventual processo de inflamação após o tratamento e trará o benefício de tratar uma doença dentária e óssea provocada por infecção microbológica (bacteriana). Todos os procedimentos serão realizados dentro das normas de biossegurança (normas que assegurem as condições para que não haja contaminação). Serão necessários 2 atendimentos (1 hora cada sessão). O paciente receberá número de telefone para entrar em contato em caso de dor do dente em tratamento e será atendido imediatamente. Os pacientes serão chamados para acompanhamento 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) do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos-ICT/ UNESP, situada na Av. Engº Francisco José Longo, 777 – CEP 12245000, em São José dos Campos-SP, tel (12) 3947 9076 aos cuidados de Denise Nicodemo. Informo que será garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela colaboração.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

NOME/RESPONSÁVEL _____

RG _____ CPF _____

ENDEREÇO COMPLETO _____

Assinatura Responsável_____
Assinatura Pesquisador