

**SARAH ALMEIDA COELHO DE OLIVEIRA**

**EFICÁCIA DO PREPARO BIOMECÂNICO UTILIZANDO  
HIPOCLORITO DE SÓDIO 1%, CLOREXIDINA GEL 2% E  
EXTRATO GLICÓLICO DE PRÓPOLIS 12%, COMO  
SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS AUXILIARES SOBRE O ÁCIDO  
LIPOTEICÓICO DE *Enterococcus faecalis***



São José dos Campos

2012

**SARAH ALMEIDA COELHO DE OLIVEIRA**

**EFICÁCIA DO PREPARO BIOMECÂNICO UTILIZANDO HIPOCLORITO DE SÓDIO 1%, CLOREXIDINA GEL 2% E EXTRATO GLICÓLICO DE PRÓPOLIS 12%, COMO SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS AUXILIARES SOBRE O ÁCIDO LIPOTEICÓICO DE *Enterococcus faecalis***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade em Endodontia.

Orientador: Prof. Adj. Claudio Antonio Talge Carvalho

São José dos Campos

2012

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos Campos: FOSJC/UNESP; 2012.

O4e Oliveira, Sarah Almeida Coelho de

Eficácia do preparo biomecânico utilizando hipoclorito de sódio 1%, clorexidina gel 2% e extrato glicólico de própolis 12%, como substâncias químicas auxiliares sobre o ácido lipoteicóico de *Enterococcus faecalis* / Sarah Almeida Coelho de Oliveira. - São José dos Campos : [s.n.], 2012.  
110 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) –Faculdade de Odontologia de José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2012.

Orientador: Prof. Adj. Antonio Talge Carvalho.

1. Ácido lipoteicóico. 2. Hipoclorito de Sódio. 3. Clorexidina. 4. Própolis. 5. Irrigantes do canal radicular. I. Carvalho, Antonio Talge. II. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. IV. UNESP – Univ Estadual Paulista. V. Título

tD24

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP

## AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 18 de fevereiro de 2013.

Assinatura :

E-mail: [sarah.aco@gmail.com](mailto:sarah.aco@gmail.com)

**BANCA EXAMINADORA**

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

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos  
UNESP- Univ Estadual Paulista

**Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera**

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos  
UNESP – Univ Estrada Paulista

**Profa. Dra. Mariella Vieira Pereira Leão**

Univ de Taubaté - UNITAU

São José dos Campos, 10 de Dezembro de 2012

## DEDICATÓRIA

### ***A Deus:***

*Por estar ao meu lado em todos os momentos, por guiar meus passos, por me proteger e iluminar, porque esteve presente, cuidando de cada detalhe para a realização desse trabalho. Se hoje sou o que sou, foi porque o Senhor me amou primeiro e colocou pessoas abençoadas para o meu cuidado.*

“Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte,  
não temerei mal algum, porque tu estás comigo;  
o teu bordão e teu cajado me consolam.”

Salmos 23:4

***Aos meus pais:***

*Oswaldo e Eli Maria, vocês que sempre estiveram ao meu lado nas horas que chorei e nas horas que sorri, nas horas que me lamentei e nas horas que, de uma forma ou de outra, demonstrei total alegria. Ensinaram-me que o mais importante na vida é o crescimento interior e buscar sempre o que desejar, porque tudo se torna possível quando se tem vontade e coragem para lutar. Obrigada por acreditar em mim quando eu mesma achei difícil acreditar. Minha eterna admiração e gratidão, porque tudo que sou devo a vocês.*

***Ao meu irmão e amigo:***

*Aaron Felipe, Anjo e alegria em minha vida! Tenho você sempre no coração. Agradeço por você também ser o meu maior presente de Deus. Te amo parceirinho!*

“Sem seu amor, eu nada seria...”

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

### ***À Família,***

*Aos meus avós, tios e primos queridos por estarem sempre ao meu lado, pela compreensão e pelo suporte quando eu realmente precisei, pelo amor que me deram, pelos incentivos e pelos ensinamentos que só a experiência de vida e Deus podem dar, por todo o apoio, conversas, pela torcida e pela consideração. Muito Obrigada Família Querida!*

### ***Ao querido Émerson Arantes,***

*Obrigada pelo carinho e pelo amor, por cuidar de mim, por se preocupar, por me respeitar, por toda a compreensão e paciência nessa fase tão importante da minha vida.*

### ***Ao meu orientador, Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho***

*Agradeço pela oportunidade de aprendizado, pela confiança depositada em mim e pela compreensão e otimismo nas horas difíceis, pela convivência muito divertida, meu eterno carinho e gratidão por tê-lo como orientador.*

***À Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira***

*Agradeço pelas essenciais orientações, ensinamentos e ajuda na confecção e realização deste trabalho, não tenho palavras para agradecer. Te admiro pela sua sinceridade, sua busca pelo conhecimento e sua força interior.*

***À Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera***

*Agradeço por ter sido minha orientadora de Iniciação Científica, a qual me despertou o interesse pelo ensino e pela pesquisa. Obrigada por ter me ensinado muito durante a graduação, pelo carinho e preocupação. Com certeza, com a senhora aprendi coisas a serem levadas para a vida toda. Guardo por ti professora um imenso carinho como aluna, e um enorme respeito e admiração pela mulher, profissional e docente dedicada que és! Um exemplo a ser seguido.*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos– Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.*

*À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.*

*Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, na pessoa da coordenadora Profa. Titular Marcia Carneiro Valera.*

*À Erena, Rosemary, e ao Bruno e Ivan, da secretaria da Pós graduação, pelas informações e ajuda durante todo o curso de Mestrado.*

*Aos professores da disciplina de endodontia: Ana Paula Martins Gomes, Carlos Henrique Ribeiro Camargo, Simone Helena G. de Oliveira e Bruno Cavalcante pela contribuição na minha formação acadêmica, pelos ensinamentos transmitidos e atenção dispensada sempre que solicitada.*

*Aos professores da disciplina de microbiologia: Antonio Olavo Cardoso Jorge e Juliana Campos Junqueira, pela orientação, ensinamentos, por estar presente nos momentos em que mais precisamos no laboratório.*

*Ao Prof. Ivan Balducci, pela paciência em ensinar a realizar a análise estatística dos dados deste trabalho.*

*Aos colegas do laboratório de microbiologia da FOSJC/ UNESP, **Cristiane, Junia, Rodinei, Fernanda, Adeline, Michelle** pela amizade e auxílio e especial meu querido amigo **Jonatas Rafael** por me ensinar toda a metodologia, por ser essa pessoa maravilhosa, sempre disposto a ajudar, ensinar, por sua dedicação surpreendente que um dia espero poder recompensá-lo à altura.*

*Às **Amigas da graduação Renata, Monique, Tânia, Paloma**, que sempre estiverem comigo nesta jornada, pela amizade e carinho sempre e à **Stephanie minha dupla** por estar sempre ao meu lado nos momentos que eu mais precisei nesses anos de amizade, por acreditar no meu trabalho, agradeço a Deus pela sua amizade.*

*Às **Amigas Jorgiana, Jessica e Tina** pela convivência e pelos momentos em casa tão divertidos.*

*À **Flávia Cardoso, Adrina Chung e Lilian Maekawa** pelos momentos de convivência durante a iniciação científica.*

*Às **Amigas do mestrado Camila Said, Marcella Pavanello, Rafaela Vasconcelos e Maria Tereza** tive muita sorte de conhecer e conviver com pessoas tão especiais como vocês, foi com vocês que aprendi que sozinho não chegamos a lugar algum. Tenho certeza que vocês terão um futuro brilhante. Vocês moram no meu coração.*

*Às **Amigas do doutorado Ivany, Nádia, Gleyce e Ana Cláudia** pela agradável convivência durante esses dois anos de Pós-Graduação.*

*Às secretárias **Rosângela e Vanessa**, pelas informações e atenção prestadas.*

*Às alunas **Jussimara Akemi, Jéssica Zanella, Cristina Gibertoni** pelas conversas e pela convivência e respeito durante os trabalhos de Iniciação Científica.*

*As técnicas de laboratório, **Josy e Fernanda**, pelo suporte nos trabalhos realizados.*

*Aos técnicos do laboratório de microbiologia, **Sérgio Alves e Domingos**, pela amizade e auxílios prestados durante o desenvolvimento do trabalho.*

*Ao **Carlos Alberto Guedes**, pelas orientações nos projetos desde a graduação.*

*À dona **Marinete**, pela alegria diária e pelos cafezinhos da Restauradora.*

*À **Solange, Dona Iraci, Aline, Ana Cecília e Julio** por me ensinarem a arte da odontologia, com vocês por perto tudo fica mais fácil, obrigada por acreditar no meu trabalho e pelos ensinamentos a cada dia. Às **Queridas amigas Jussara, Marina, Giovana e Raquel** que sempre torceram por mim e me ajudaram em todas as áreas da minha vida. Obrigada pelo carinho, alegria, confiança e momentos divertidos. Vocês são muito especiais para mim.*

*“Aprender é a única coisa da qual a mente humana nunca se cansa, nunca tem medo e jamais se arrepende”.*

*(Leonardo da Vinci)*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	16
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	18
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1 <i>Enterococcus Faecalis-LTA</i> em canais radiculares.....	25
2.2 Produção de Citocinas.....	29
2.3 Substâncias Químicas Auxiliares.....	34
2.3.1 Hipoclorito de sódio.....	34
2.3.2 Clorexidina.....	42
2.3.3 Própolis.....	50
3 PROPOSIÇÃO.....	57
4 MATERIAL E MÉTODO.....	58
4.1 Preparo dos espécimes.....	58
4.2 Preparo e Inoculação do ácido lipoteicóico.....	61
4.3 Divisão dos grupos experimentais.....	62
4.4 Coleta do conteúdo do canal radicular.....	64
4.5 Cultura celular.....	65
4.5.1 Viabilidade da cultura de células.....	67
4.5.2 Adição das amostras a cultura celular.....	68
4.6 Quantificação de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) – Teste imunoenzimático (ELISA).....	69
4.7 Análise estatística.....	71
5 RESULTADOS.....	72
5.1 Produção de IL-1 $\beta$ .....	72

<b>5.2 Produção de IL-6.....</b>	<b>74</b>
<b>5.3 Produção de TNF-<math>\alpha</math>.....</b>	<b>77</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>111</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Secção das coroas.....	58
Figura 2- A) Vedamento apical; B) Impermeabilização das raízes.....	59
Figura 3 - Fixação das raízes / esterilização.....	60
Figura 4 – Contaminação dos dentes.....	61
Figura 5 – A) Motor elétrico Xsmart mostrando velocidade e torque de acordo com as recomendações do fabricante. B) Contra-ângulo conectado ao motor elétrico com Lima BR6 (50/0.04), mostrando instrumentação dos canais.....	62
Figura 6 – Coleta do Canal radicular.....	64
Figura 7 – Macrófagos Raw 264.7.....	65
Figura 8 - A) Aspiração do meio DMEM do frasco de cultivo celular. B) Remoção das células aderidas no fundo do frasco de cultura com varredor celular.....	66
Figura 9 - A) Após centrifugação (9 mil rpm por cinco minutos, as células se agrupam no fundo do tubo. (B) Homogeneização das células com o meio fresco.....	66
Figura 10 - A) Câmara de Neubauer com alíquotas de 10 µL do material celular corado com azul de Trypan em microtubo, após ressuspensão das células; B) Vista da câmara de Neubauer em microscópio óptico (aumento de 200X). As células coradas em azul são consideradas inviáveis.....	67

Figura 11 – Distribuição das células na placa de 24 poços que foram ativadas com 30 ul de amostra coletada dos canais radiculares .....	68
Figura 12 – Kit para dosagem de citocinas.....	69
Figura 13 - Distribuição das amostras na microplaca de 96 poços para teste ELISA, após sensibilização com anticorpos de captura. (A) Curva-padrão de citocinas; (B) Adição do sobrenadante adquirido do contato das células com o conteúdo coletado do canal radicular (n=12) distribuídos em duplicata.....	70
Figura 14 - A) Reação revelada com substrato cromogênico após incubação das amostras com anticorpo de detecção marcado com biotina. B) Bloqueio da reação revelada com adição do ácido sulfúrico 2N.....	71

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1- Distribuição dos espécimes nos grupos experimentais, de acordo com a substância química auxiliar e medicação intracanal.....	63
Tabela 1 -Valores médios de IL-1 $\beta$ (pg/mL) presentes nos sobrenadantes das culturas de macrófagos estimulados pelo conteúdo dos canais radiculares após preparo biomecânico com os irrigantes utilizados, bem como o grupo controle celular.....	73
Tabela 2 - Valores mínimos, máximos, medianas e quartis obtidos na produção de IL-1 $\beta$ (pg/mL) por macrófagos após 24 horas de exposição ao conteúdo do canal radicular.....	73
Tabela 3 - Valores médios, desvios-padrão obtidos na produção de IL-1 $\beta$ (pg/mL) de cada grupo estudado e disposição dos grupos homogêneos.....	74
Tabela 4 -Valores médios de IL-6 (pg/mL) presentes nos sobrenadantes das culturas de macrófagos estimulados pelo conteúdo dos canais radiculares após preparo biomecânico com os irrigantes utilizados, bem como o grupo controle celular. ....	75
Tabela 5 - Valores mínimos, máximos, medianas e quartis obtidos na produção de IL-6 (pg/mL) por macrófagos após 24 horas de exposição ao conteúdo do canal radicular.....	76
Tabela 6 - Valores médios, desvios-padrão obtidos na produção de IL-6 (pg/mL) de cada grupo estudado e disposição dos grupos homogêneos.....	76
Tabela 7 - Valores médios de TNF- $\alpha$ (pg/mL) presentes nos sobrenadantes das culturas de macrófagos estimulados pelo conteúdo dos canais radiculares após preparo biomecânico com os irrigantes utilizados, bem como o grupo controle celular.....	78
Tabela 8 - Valores mínimos, máximos, medianas e quartis obtidos na produção de TNF- $\alpha$ (pg/mL) por macrófagos após 24 horas de exposição ao conteúdo do canal radicular .....	78
Tabela 9 - Valores médios, desvios-padrão e medianas obtidos na produção de TNF- $\alpha$ (pg/mL) de cada grupo estudado e disposição dos grupos homogêneos.....	79

Oliveira SAC. Eficácia do preparo biomecânico utilizando hipoclorito de sódio 1%, clorexidina gel 2% e extrato glicólico de própolis 12 %, como substâncias químicas auxiliares sobre o ácido lipoteicóico de *Enterococcus faecalis* [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP-Univ Estadual Paulista; 2012.

## RESUMO

Bactérias Gram-positivas presentes nas infecções dos canais radiculares possuem em sua parede celular ácido lipoteicóico (LTA), que apresenta potente ação citotóxica. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de substâncias químicas auxiliares como hipoclorito de sódio 1%, clorexidina gel 2%, extrato glicólico de própolis 12%, em neutralizar o ácido lipoteicóico de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares, analisando os efeitos na produção de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) por macrófagos (RAW 264.7). Solução salina fisiológica aprotinase 0,9% foi utilizada como controle positivo. Foram utilizadas 40 raízes de dentes unirradiculares padronizadas, distribuídos em 4 grupos (n=10) em placas de poliestireno. Após esterilização, foram inoculados 10 $\mu$ L de uma solução de LTA de *Enterococcus faecalis* nos canais radiculares por 24h, processo repetido 3 vezes, e posteriormente, realizou-se a instrumentação dos canais radiculares. Foi realizada a coleta do conteúdo imediatamente após a instrumentação. Estas amostras foram utilizadas para verificar se as substâncias químicas apresentavam capacidade de neutralizar o LTA. Para tanto, macrófagos (RAW 264.7) foram ativados com as amostras coletadas dos canais radiculares e os sobrenadantes foram utilizados para verificar a produção de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) pelo teste imunoenzimático (ELISA). Os resultados foram analisados estatisticamente (Kruskal-Wallis, e teste de Dunn 5%). Em relação a produção de IL-1 $\beta$  e IL-6, os níveis encontrados nos grupos instrumentados com NaOCl e PRO foram inferiores aos grupos CLX e SS. Em TNF- $\alpha$  todos os grupos experimentais, NaOCl: 1496pg/mL, PRO: 1113pg/mL, CLX: 961pg/mL e SS: 1046pg/mL foram estatisticamente semelhantes entre si (p>0,05). Conclui-se que as substâncias químicas auxiliares testadas: NaOCl e PRO foram eficazes em neutralizar o ácido lipoteicóico (LTA) de *E. faecalis* em canais radiculares quando comparadas com o grupo SS (controle positivo). Para o grupo CLX a produção de citocinas (IL-1 $\beta$ ) e (IL-6) foi maior do que nos demais grupos, mostrando-se menos efetiva que as demais soluções. Porém todas as substâncias utilizadas neste estudo mostraram-se semelhantes em relação a citocina (TNF- $\alpha$ ). O PRO, foi o grupo que apresentou menor produção de citocinas semelhante ou menor que o controle e viabilidade celular.

Palavras-chave: Ácido lipoteicóico. Hipoclorito de Sódio. Clorexidina. Própolis. Irrigantes do Canal Radicular.

Oliveira SAC. Efficacy of biomechanical preparations using 1% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine gel, and 12% propolis glycolic extract as auxiliary chemical substances on lipoteichoic acid derived from *Enterococcus faecalis* [dissertation] São José dos Campos: School of dentistry of São José dos Campos, UNESP-Univ Estadual Paulista; 2012

## ABSTRACT

The purpose of this study is to assess the ability of 1% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine gel, 12% glycolic extract of propolis and 0,9%apyrogenic saline physiological solution in the neutralization of the lipoteichoic acid (LTA) derived from *Enterococcus faecalis* in root canals by analyzing the production of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  by macrophages (RAW264.7). For this study, 40 single-rooted roots, standardized to 16mm, were used. The root canals were prepared using a 15K-file and then prepared using rotatory system (BioRaCe) until the working length (15mm); the specimens were distributed in microplates with 10 specimens each. After sterilization, 10 $\mu$ L of *E. faecalis* LTA solution was used in the root canals, and subsequently was performed a root canal instrumentation with rotatory system. The samples were then divided into 4 groups (n=10) on the basis of the irrigating agent used as follows: (a) NaOCl: 1% sodium hypochlorite; (b) CLX: 2% chlorhexidine gel; (c) PRO: 12% glycolic extract of propolis; (d) group SS: 0,9%apyrogenic saline physiological solution. The root canal content was collected immediately after instrumentation to verify the production of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , from the macrophages, tested by ELISA. Results were analyzed statistically by (Kruskal-Wallis test, p-value = 0.0001 <0.05 and Dunn test 5%). Where it was found that in levels found in the groups instrumented with NaOCl and PRO were lower than CLX and SS. TNF- $\alpha$  in all experimental groups, NaOCl: 1496pg/mL, PRO: 1113pg/mL, CLX: 961pg/mL and SS: 1046pg/mL were statistically similar (p > 0.05). It is concluded that the auxiliary chemicals tested: NaOCl and PRO were effective in neutralizing the lipoteichoic acid (LTA) of *E. faecalis* in root canals compared with the SS group (positive control). For group CLX cytokine production (IL-1 $\beta$ ) and (IL-6) was higher than in the other groups. proving to be less effective than other solutions. But all the substances used in this study were similar with respect to cytokine (TNF- $\alpha$ ). The PRO, was the group that showed lower production of cytokines similar or less than control and cell viability.

Keywords-Lipoteichoic acid. Sodium Hypochlorite. Chlorhexidine. Propolis. Root Canal Irrigants.

## 1 INTRODUÇÃO

As bactérias são os principais agentes etiológicos da inflamação periapical, em grande parte devido aos fatores de virulência da sua parede celular (Hahn, Liewehr, 2007; Manzur et al., 2007). Com os avanços tecnológicos na cultura e identificação microbiológica, estudos mostraram que, em canais radiculares de dentes portadores de necrose pulpar e lesão periapical crônica, existe grande diversidade microbiana (Leonardo, 2005; Leonardo et al., 2000; Seltzer, Farber, 1994).

Apesar de infecções endodônticas e periapicais serem polimicrobianas, as infecções persistentes podem apresentar a dominância de alguns microrganismos, como *Enterococcus faecalis* (Kayaoglu, Orstavik, 2004). *E. faecalis* ganhou considerável atenção por ser freqüentemente encontrado em casos de infecções pós-tratamento endodôntico (Gomes et al., 2008; Rocas et al., 2008), podendo colonizar canais (Chavez de Paz, 2007; Duggan, Sedgley, 2007), podendo ainda penetrar em profundidade nos túbulos dentinários, além disto, é um microrganismo difícil de ser eliminado após preparo biomecânico (Waltimo et al., 2000; Love, 2001), podendo sobreviver mesmo em condições adversas, sob a ação de irrigantes e medicamentos intracanais (Orstavik, Haapasalo, 1990), aliado ainda à habilidade de resistir a resposta do hospedeiro (Silva et al., 2010).

*E. faecalis* expressa vários fatores de virulência como, o ácido lipoteicóico (LTA), substâncias de agregação, adesinas de superfície e enzimas líticas-gelatinase e hialuronidase (Ginsburg, 2002). O LTA é considerado um dos mais importantes fatores etiológicos que está intimamente envolvido na patogenicidade, com base nos seguintes

aspectos: o LTA é responsável pelas respostas inflamatórias e danos causados aos tecidos; na sua forma pura o LTA de *E. faecalis* é capaz de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico (NO) (Baik et al., 2008), além de contribuir para aderência bacteriana e formação de biofilme, tornando-se resistente às substâncias antimicrobianas (Fabretti et al., 2006).

O LTA é uma molécula ancorada à parede celular bacteriana e está associado a processos inflamatórios. LTAs possuem duas cadeias lipídicas aderidas a uma estrutura de glicerol que é conectada a um glicerofosfato hidrofílico ou a uma cadeia de polímero de tetrassacarídeo ribitol fosforilada (Jin et al., 2007). Age como uma molécula de adesão para diversas espécies Gram-positivas facilitando a colonização e invasão de bactérias para o interior dos tecidos (Ginsburg, 2002), estimula a reabsorção óssea, além de estimular diversas células polimorfonucleadas a liberarem mediadores inflamatórios, contribuindo para o dano tecidual (Kayaoglu, Orstavik, 2004).

A falta de estudos com LTA parece ser devido a dificuldades na preparação do LTA puro e estruturalmente intacto, pois o LTA utilizado em estudos anteriores, era muitas vezes contaminado (Gao et al., 2001) ou estruturalmente danificado (Morath et al, 2002) durante a depuração. Recentemente, LTA purificado de alta qualidade de *Enterococcus faecalis*, foi produzido usando um método melhorado (Baik et al., 2008) viabilizando mais estudos com o mesmo.

Sendo o (LTA) um componente da parede celular das bactérias Gram-positivas não causa lesões celulares ou teciduais diretamente, entretanto é um fator que estimula células competentes como macrófagos, neutrófilos e fibroblastos, desencadeando a liberação de um grande número de mediadores químicos inflamatórios bioativos ou citocinas, causando uma série de efeitos biológicos que levam a uma reação inflamatória, imunológica e reabsorção óssea periapical (Mattison

et al., 1987; Wang, Stashenko, 1993; Yamasaki et al., 1992). Além da reação inflamatória, pode agir de forma irreversível nos tecidos mineralizados da região apical e periapical (osso e cimento) (Schein, Schilder, 1975). Atua na síntese e liberação de citocinas como a Interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Wang e Stashenko, 1993), também estimulando as células do hospedeiro na liberação de prostaglandina-E2 (Safavi, Nichols, 1994), a qual tem influência sobre os osteoclastos, perpetuando a reação inflamatória periapical (Leonardo, 2005).

Sendo um dos objetivos do preparo biomecânico, obter a limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares, é possível que, mesmo após a remoção destes microrganismos, esses produtos bacterianos capazes de induzir ou manter lesões periapicais permaneçam no sistema de canais radiculares, predispondo o caso ao insucesso (Leonardo, 2005).

Para que se promova uma desinfecção adequada de todo o sistema de canais radiculares, é preciso irrigação constante durante o preparo biomecânico, associado a ação química, que consiga alcançar os túbulos dentinários. A solução irrigadora usada deve promover a desinfecção e ainda não deve causar danos aos tecidos periapicais. Portanto, a irrigação é uma parte essencial na desinfecção do canal radicular, pois permite a limpeza do canal, além daquilo que poderia ser alcançado por meio da instrumentação apenas (Svec, Harrison, 1977; Gulabivala et al., 2005).

Para esta desinfecção, agentes irrigantes utilizados durante o preparo biomecânico devem preferencialmente apresentar amplo espectro de ação antimicrobiana, além de capacidade de dissolver tecidos, ausência de toxicidade e capacidade de inativar produtos dos microrganismos (Onawunmi, Ogunlana, 1986; Silva et al., 2002; Oliveira et al., 2005; Zehnder, 2006).

Durante o preparo biomecânico, várias substâncias químicas têm sido utilizadas como soluções irrigadoras. Devido a uma série de propriedades, o hipoclorito de sódio é atualmente a substância mais utilizada durante a instrumentação de canais radiculares (Siqueira Jr et al., 2000; Valera et al., 2001; Estrela et al., 2003; Menezes et al., 2004; Leonardo, 2005; Tanomaru et al., 2005). Seu mecanismo de ação provoca alterações biossintéticas no metabolismo celular, destruição de fosfolípidos, formação de cloraminas que interferem no metabolismo celular e ação oxidante que provoca inibição enzimática irreversível (Estrela et al., 2002). Em concentrações mais elevadas, sua capacidade de dissolver matéria orgânica e suas propriedades anti-sépticas são maiores (Carson et al., 2005). Entretanto, a utilização de altas concentrações do hipoclorito de sódio pode causar irritação aos tecidos periapicais (Soares et al., 2003; Leonardo, 2005). Por este motivo, soluções alternativas têm sido propostas visando a associação de efetividade antimicrobiana e biocompatibilidade.

Outra substância que tem sido utilizada é a clorexidina gel 2%, que surgiu como uma alternativa para solução irrigante no lugar do hipoclorito de sódio, devido a seus efeitos antimicrobianos, substantividade e biocompatibilidade (Ferreira et al., 2002; Menezes et al., 2004; Leonardo, 2005; Tanomaru et al., 2005; D'Arcangelo et al., 2007; Ferraz et al., 2007). A clorexidina é uma bis-guanidina catiônica, que age na parede celular de microrganismos, resultando na perda de seus componentes intracelulares. Em baixas concentrações tem efeito bacteriostático (McDonnell, Russell, 1999), no entanto, é considerado bactericida devido à sua capacidade de precipitação e coagulação intracelular das bactérias (Wang et al., 2007). Além disso, dentre as propriedades da clorexidina devem ser ressaltadas sua excelente capacidade de ação sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e apresenta substantividade, pois sua ação bactericida persiste no canal por 12 semanas após o seu uso como agente irrigante (White et al., 1997;

Rosenthal et al., 2004).

Atualmente, verifica-se um crescente aumento nos estudos e no uso de fitoterápicos na área médica. Extratos, óleos essenciais ou chás de diversas plantas são utilizados na medicina popular desde épocas remotas, entretanto, suas reais propriedades e aplicações ainda estão sendo cientificamente avaliadas. Muitas destes extratos naturais têm seus efeitos comprovados cientificamente (Park et al., 1996, Ledon et al., 1997; Menezes et al., 1999; Ozturk, Cerci, 2000).

O extrato de própolis apresenta atividades antiinflamatórias, anestésicas e antimicrobianas (Grange, Davey, 1990). Vários autores (Duarte et al., 2003; Park et al., 1998; Grange, Davey, 1990) demonstraram que o extrato de própolis apresenta atividade contra *Streptococcus mutans*. Duarte et al. (2005), demonstraram sua influência na redução da produção de ácidos por *S. mutans* e *S. sobrinus* no biofilme dentário, além de sua ação inibitória na atividade da F-ATPase dos *S. mutans*. Segundo Koo et al. 2000a o crescimento de várias bactérias, como *S. mutans* e *S. sanguis*, foi significativamente reduzido pelo extrato de própolis 10%, que também afetou o crescimento de bactérias anaeróbias. Lotufo, (2003) avaliou *in vitro* a citotoxicidade da solução de própolis em propilenoglicol e verificou que esta solução é biocompatível, não afetando ou impedindo o crescimento e a viabilidade celular dos fibroblastos da mucosa bucal humana. Com base na literatura apresentada pode-se verificar que o extrato de própolis apresenta várias qualidades como ação antiinflamatória, anestésica e antimicrobiana, que são desejáveis em uma solução irrigadora.

Devido à relevância do LTA nos processos patológicos ligados à respostas inflamatórias e danos causados aos tecidos e pela importância de *E. faecalis* na patologia de infecções persistentes em endodontia, esta molécula foi um dos antígenos escolhido para este estudo. Frente a todas essas considerações, tornou-se importante

verificar *in vitro* o uso de soluções irrigadoras durante o preparo biomecânico, e sua ação sobre o ácido lipoteicóico (LTA), verificando a produção de citocinas como Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleucina-6 (IL-6) e Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), por macrófagos ativados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Enterococcus faecalis* e Ácido Lipoteicóico LTA em canais radiculares

Um dos maiores fatores associados à falha no tratamento endodôntico é a persistência de infecção microbiana no sistema de canais radiculares e na região periapical (Siqueira, Rocas, 2004). A periodontite apical primária está associada à microbiota mista composta por bactérias anaeróbias Gram negativas e Gram positivas e usualmente contendo muitas espécies por canal, enquanto que, nas infecções secundárias, há um predomínio de bactérias anaeróbias facultativas Gram-positivas, abrigando uma ou duas espécies por canal (Gomes et al., 2004), sendo *Enterococcus faecalis* um dos microrganismos mais comumente encontrado (Siqueira, Rocas, 2004).

*Enterococcus* compõe um grupo de bactérias Gram-positivas que são associadas a infecções endodônticas em odontologia. No entanto, essas espécies correspondem a uma porcentagem muito pequena da microbiota bacteriana inicial de dentes com polpas necróticas sem tratamento (Sundqvist, 1992). *E. faecalis* é freqüentemente encontrado em canais obturados, exibindo sinais de periodontite crônica apical (Figdor et al., 2003). Estudos *in vitro* (Zoletti et al., 2006; Rocas et al., 2004) demonstraram a capacidade do *E. faecalis* de penetrar nos túbulos dentinários, habilidade esta não demonstrada por todas as espécies bacterianas. Essa espécie bacteriana impede a liberação de enzimas hidrolíticas por células polimorfonucleadas, o que pode explicar o seu domínio em infecções pulpares (Zoletti et al., 2006).

Sundqvist et al. em 1998 verificaram a taxa de sucesso do

retratamento endodôntico e identificaram os fatores que podem influenciar no prognóstico com base nos dados da composição da microbiota em dentes previamente obturados e que apresentavam lesão periapical persistente. Foram realizadas três coletas microbiológicas; a primeira após a desobturação dos canais radiculares; a segunda antes do preparo dos canais radiculares e a terceira após o preparo e a utilização de medicação intracanal com hidróxido de cálcio por 7–14 dias. Os autores verificaram a predominância de bactérias Gram positivas, o *E. faecalis* foi microrganismo mais comumente encontrado, representando 37,5% dos casos. O índice de sucesso no retratamento endodôntico foi de 74%, entretanto nos canais onde foi identificada a presença de *E. faecalis* o índice de sucesso foi de 66%.

Pinheiro et al. em 2003 determinaram a microbiota nos casos de insucesso endodôntico e relacionaram as características clínicas com as bactérias presentes. Coletas foram obtidas após a desobturação. Os autores observaram presença de 108 culturas positivas com 37 espécies diferentes, havendo predominância de bactérias Gram positivas anaeróbicas facultativas, especialmente *E. faecalis* presente em 45% das amostras com cultura positiva.

Os fatores de virulência de *E. faecalis* mais citados na literatura são a produção de substância de agregação, adesinas de superfície, ácido lipoteicóico, produção extracelular de superóxido, enzima lítica gelatinase e hialuronidase (Kayaoglu, Orstavik, 2004). Cada um desses fatores pode estar associado a vários estágios de infecções endodônticas, bem como à inflamação periapical. *E. faecalis* apresenta em sua parede celular o ácido lipoteicóico (LTA), que auxilia na ligação das bactérias às células eucarióticas, incluindo linfócitos (Beachey et al., 1977; Beachey et al., 1979). O LTA estimula reabsorção óssea, além de estimular diversas células polimorfonucleadas a liberarem mediadores inflamatórios, contribuindo para o dano tecidual (Kayaoglu, Orstavik,

2004).

O LTA é uma molécula ancorada à parede celular bacteriana e está associado a processos inflamatórios. LTAs possuem duas cadeias lipídicas aderidas a uma estrutura de glicerol que é conectada a um glicerofosfato hidrofílico ou a uma cadeia de polímero de tetrassacarídeo ribitol fosforilada (Jin et al., 2007). É considerado um dos mais importantes fatores etiológicos que estão intimamente envolvidos na patogenicidade, com base nos seguintes aspectos: o LTA é responsável pelas respostas inflamatórias e danos causados aos tecidos; na sua forma pura o LTA de *E. faecalis* é capaz de induzir citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico NO (Baik et al. 2008), além de contribuir para aderência bacteriana e formação de biofilme, o qual se torna resistente as substâncias antimicrobianas (Fabretti et al., 2006).

Oliveira e Barbosa, em 2003 avaliaram os efeitos das lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* e ácido lipoteicóico (LTA) de *Enterococcus faecalis* na polpa dentária. A inoculação em polpa cirurgicamente aberta e restauração coronária com cimento de ionômero de vidro foi o método escolhido. Os tempos de avaliação foram de 1, 7, 15, 30 e 60 dias. Os resultados mostraram que o LPS e LTA, a 150 ug/ml, produz interferência negativa na polpa conduzindo à destruição. A inflamação causada por LPS e LTA da polpa de cães foi intensa. E a resposta inflamatória foi elevada com um aumento no número de leucócitos. E ainda a estrutura do tecido era irregular apresentando algumas áreas de necrose. O LTA estabeleceu um padrão citotóxico menos agressivo a polpa que o LPS.

Costa Junior et al., em 2003 observaram que o ácido lipoteicóico (LTA), tem características físico-químicas que favorecem sua ação como imunógeno. Para o estudo os autores utilizaram ratos que receberam implantes subcutâneo, de tubo de Teflon, a fim de avaliar a reação do tecido subcutâneo do rato, preenchido com Fibrinol embebido

em solução de ácido lipoteicóico à 150 µg/ml. Os animais foram divididos em 4 grupos com 4 animais cada, e 2 do grupo controle (recebeu somente o implante sem LTA) e 2 animais do grupo experimental (implantes com LTA), os tecidos foram observados aos 2, 7, 14 e 30 dias. Os resultados mostraram que no grupo experimental, a reação inflamatória foi mais intensa do que no grupo controle mostrando a ação irritante do LTA.

Baik et al, em 2008, avaliaram a inativação do ácido lipoteicóico de *Enterococcus faecalis* pelo hidróxido de cálcio. Os autores propuseram avaliar se o hidróxido de cálcio pode inativar o LTA de *E. faecalis*, levando à perda ou diminuição da resposta inflamatória. Uma enzima imunoabsorvente ligada mostrou que a morte de *E. faecalis* pelo hidróxido de cálcio foi menos potente que a morte bacteriana estimulada pela liberação do fator de necrose tumoral- $\alpha$  por macrófagos da linhagem RAW 264.7 ( $p < 0.05$ ). O pré-tratamento do LTA com hidróxido de cálcio notavelmente anula a capacidade do LTA de liberar fator de necrose tumoral- $\alpha$  ( $p < 0.05$ ). Além disso, o tratamento do LTA com hidróxido de cálcio não foi capaz de estimular o receptor 2, que manteve o LTA funcionalmente intacto. Esses resultados sugerem que o hidróxido de cálcio pode inibir a toxicidade do LTA, promovendo uma diminuição da resposta inflamatória ao *E. faecalis*.

Estudos como (Costa Junior et al., 2003, Oliveira, Barbosa, 2003) comprovam que o LTA pode iniciar ou perpetuar processos inflamatórios. Assim, entender o papel do LTA é importante para uma conduta terapêutica endodôntica capaz de eliminar os microrganismos e também o ácido lipoteicóico.

## 2.2 Produção de citocinas

Citocinas fazem parte de um grande grupo de proteínas solúveis, sendo mediadores da resposta imune, e controlando diferentes funções celulares que incluem proliferação, diferenciação e morte celular, por meio de ligações aos seus receptores na superfície celular (Romagnani, 2006). São produzidas durante os processos inflamatórios, e que nelas participam, são estimuladores da produção de proteínas presentes na fase aguda da inflamação. Elas são produzidas por uma variedade de tipos de células, mas as fontes mais importantes são os macrófagos e monócitos nos locais de inflamação (Gabay, 2006).

Classificadas em grupos (por exemplo, interleucinas, interferons, e quimiocinas), com base nas homologias estruturais de seus receptores, no passado acreditava-se, sobretudo, que eram antivirais ou agentes antineoplásicas (Oppenheim, 2001). Podem ser sintetizadas por células do sistema imune. Algumas citocinas podem ser classificadas como pró-inflamatórias, derivadas principalmente de células da resposta imune inata: fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-12), ou de células de padrão Th1: interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), ou como citocinas anti-inflamatórias, sintetizadas principalmente por células do perfil Th2, por T regulatórias: fator de transformação e crescimento beta (TGF- $\beta$ ), IL-4, IL-10, e IL-5 (Elenkov, 2004; Romagnani, 2006; Wan, Flavell, 2006).

Segundo Heinrich et al. (1990) e Watkins et al. (1995), em doenças inflamatórias, as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  estimulam o organismo a produzir febre, ao aumento do sono e da síntese de proteínas pelo fígado, à diminuição da ingestão de água e de alimentos, à elevação da liberação de corticosteróides, à alteração da atividade cerebral, à diminuição da interatividade social e ao aumento do estímulo à

dor. Fatores que ocorrem no intuito de acelerar as atividades enzimáticas defensivas, reduzir a replicação de patógenos e aumentar a proliferação de células defensoras, além de isolar a área afetada e poupar energia.

Com relação às citocinas pró-inflamatórias, a IL-1 $\beta$  é secretada principalmente por macrófagos, células endoteliais e fibroblastos e suas funções são semelhantes às do TNF- $\alpha$ , recrutando neutrófilos e induzindo a expressão de molécula de adesão endotelial, sendo este, um mecanismo essencial para a adesão de leucócitos na superfície endotelial e posterior migração para os tecidos. A IL-1 $\beta$  tem capacidade de induzir a síntese de outras citocinas, e apresenta função co-estimuladora de células T (Reyes et al., 2003).

Murakami et al., em 2001, em um estudo epidemiológico, mostraram que o LPS é detectado em níveis significantes no material infectado de pacientes com periodontite apical ou abscesso odontogênico. Cento e vinte e três pacientes participaram da pesquisa e foram classificados em 3 grupos: fluido de canais radiculares não infectados (Dentes sem infecção) (controle, n=16), fluido de canais radiculares com contaminação bacteriana (n=56) e secreção purulenta de abscessos maxilofaciais (n=51). Com as amostras coletadas foi realizada inicialmente a detecção do lipopolissacarídeo e do *P. endodontalis*. A quantificação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  do material infectado foi realizada, por reação de ELISA. O material infectado induziu a expressão de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Um aumento significativo foi observado nos níveis de IL-1 $\beta$  em canais infectados, diferente significativamente dos canais não infectados. Segundo os autores, os resultados sugerem que o LPS do *P. endodontalis* possui um papel importante na patogenicidade da formação de abscessos maxilofaciais via expressão de citocinas inflamatórias.

Barkhordar et al., em 2002, quantificaram o conteúdo da interleucina 1 $\beta$  e avaliaram seus efeitos sobre a síntese de colágeno em culturas de fibroblastos derivados de polpas dentárias doentes e

saudáveis. As polpas doentes foram obtidas de dentes com diagnóstico de pulpíte e as polpas normais foram obtidas de terceiros molares recém-extraídos. Para quantificação das concentrações de IL-1 $\beta$  presente nas polpas foi utilizado o teste ELISA. A síntese de colágeno foi avaliada utilizando-se radioatividade. Os autores encontraram uma concentração 2,5 vezes maior de IL-1 $\beta$  nos fibroblastos de polpas inflamadas, além de uma síntese 80% maior de colágeno comparado aos fibroblastos de polpas saudáveis.

A citocina IL-6, atua tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, sendo sintetizada por várias células (linfócitos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, músculo-esqueléticas, dentre outras) e ativada pela via de sinalização, em resposta a microrganismos e outras citocinas (IL-1 e TNF). É associada ao controle e coordenação de respostas do sistema imunológico, além de atuar nos sistemas hematopoiético, nervoso e endócrino e participar do metabolismo ósseo (Petersen, Pedersen, 2005). Na imunidade inata, estimula a síntese de proteínas da fase aguda pelo fígado, atuando na resposta de fase aguda. Entretanto, na imunidade adaptativa, IL-6 estimula o crescimento de células B, que se diferenciam em produtoras de anticorpos, e estimula a proliferação e ativação das células T (Forsey et al., 2003). IL-6 apresenta um pico de meia vida curto (6 a 12 horas), e sua elevação reflete e depende da ativação da resposta inflamatória. Indivíduos com quadros de sepse apresentam elevados níveis circulantes de IL-6 (Loisa *et al.*, 2003). Por sua vez, a produção muito elevada e constante de IL-1 e IL-6 podem levar a graves comprometimentos, acarretando colapso vascular, coque e morte (Oberholzer et al., 2000).

Todavia, sugere-se que uma das principais funções da IL-6 seja a auto-limitação da resposta inflamatória. A IL-6 tem ação inibidora na expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1- $\beta$ , ao aumentar a síntese do receptor antagonista da IL-1 (IL-1Ra). Assim, a IL-6

concomitantemente regula atividades pró- e anti-inflamatórias, contribuindo tanto para o desenvolvimento quanto para a resolução da resposta inflamatória (Peterse, Pedersen, 2005).

Gazivoda et al., em 2009, propuseram a estudar a correlação entre citocinas pró-inflamatórias e imunorregulatórias em lesões periapicais e seu relacionamento com a composição celular e situação clínica. Para isto, foram isoladas células inflamatórias de 67 lesões periapicais e cultivadas por 24 horas. Dos sobrenadantes das culturas celulares foram quantificados os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ , além de citocinas imunorregulatórias como fator de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) e IL-10, através de ensaio imunoenzimático ELISA. Os fenótipos celulares também foram avaliados através de imunohistoquímica. Os resultados mostraram que as lesões sintomáticas que possuíam grande quantidade de granulócitos, secretaram altos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, quando comparadas às lesões assintomáticas. Dentes com grandes lesões visíveis radiograficamente apresentavam baixa porcentagem de fagócitos mononucleares, altas porcentagens de células T e níveis consideráveis de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10. Uma correlação negativa foi encontrada entre as concentrações de TGF- $\beta$  e citocinas pró-inflamatórias. TGF- $\beta$  adicionada às culturas celulares provocou uma diminuição nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, principalmente de IL-10, independente do aspecto clínico e do tamanho da lesão. Ao contrário, a IL-10 exógena foi principalmente imunossupressora em culturas de lesões assintomáticas. Frente aos resultados encontrados, os autores concluíram que as lesões sintomáticas são caracterizadas pela elevada produção de citocinas pró-inflamatórias. As citocinas imunorregulatórias são mais importantes na supressão da inflamação em lesões assintomáticas.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina envolvida na regulação de diversos processos fisiológicos e patológicos.

Possui grande importância durante a fase aguda da resposta inflamatória a agentes patogênicos, estimulando alterações fisiológicas que contribuem para: a eliminação dos agentes infecciosos, o controle do dano tecidual e a ativação de processos de reparação. No entanto, níveis elevados de TNF- $\alpha$  estão associados com injúrias presentes em infecções sistêmicas (sepse) (Hehlgans, Pfeffer, 2005).

Prso et al., em 2007, avaliaram a presença de TNF- $\alpha$  e IL-6 em lesões periapicais humanas. Para que tal estudo fosse realizado, foram obtidas amostras de 3 situações clínicas: dentes sintomáticos, presença de lesões assintomáticas e dentes com tecidos periapicais sem inflamação (controle). No grupo dos dentes sintomáticos estavam incluídos aqueles que apresentassem aspectos clínicos e radiográficos de existência de patologia perirradicular, envolvendo destruição da cortical óssea e sensibilidade à percussão e/ou à palpação. No grupo das lesões assintomáticas estavam incluídos os dentes que apresentasse lesões periapicais sem, no entanto, apresentar qualquer sintomatologia à percussão e/ou à palpação. Os pacientes participantes deste estudo foram submetidos à apicetomia para remoção dos tecidos periapicais. Após a excisão, cada espécime foi dividido em duas partes; metade utilizada para análise histopatológica e a outra metade utilizada para análise das citocinas. Os resultados encontrados mostraram que os níveis de TNF- $\alpha$  foram significativamente maiores em lesões sintomáticas comparadas ao grupo controle. O grupo das lesões assintomáticas também diferiu estatisticamente do grupo controle, mas nenhuma diferença foi encontrada nos níveis de TNF- $\alpha$  entre os grupos das lesões sintomáticas e assintomáticas. O mesmo ocorreu com as concentrações de IL-6. Assim, os autores concluíram que as lesões sintomáticas representam o estágio ativo da doença, e as lesões assintomáticas representam o processo da doença em evolução, além de afirmarem que o TNF- $\alpha$  e a IL-6 possuem um papel importante na patogênese da reabsorção óssea.

## 2.3 Substâncias químicas auxiliares

### 2.3.1 Hipoclorito de sódio

O hipoclorito de sódio foi utilizado pela primeira vez em 1792 com o nome de água de Javele, constituindo-se de uma mistura de hipoclorito de sódio e potássio. Em 1820, Labarraque obteve o hipoclorito de sódio com teor de cloro ativo de 2,5% utilizando-o para desinfetar feridas. Entretanto, em 1915, Dakin durante a Primeira Guerra Mundial, observou que, embora houvesse a desinfecção da ferida utilizando-se a solução de Labarraque, a cicatrização ocorria muito lentamente, em consequência da alta concentração de hidróxido de sódio, um álcali livre responsável pela irritação dos tecidos, independente da concentração do hipoclorito de sódio. Propôs, então, o teor de cloro de 0,5% com pH 11, tamponado com ácido bórico 0,4%, o que reduz o pH da solução para em torno de 9, tornando-a mais alcalina, menos estável, porém permitindo a ação desinfetante sem ação das hidroxilas livres. Essa nova solução ficou conhecida com o nome do autor, solução de Dakin (Pécora et al., 1999; Zehnder et al., 2002)

Em 1936, Walker indicou a utilização do hipoclorito de sódio a 5% para o preparo de canais radiculares de dentes com polpas necrosadas, uma vez que auxilia na descontaminação dos instrumentos, manipulação dos canais radiculares e proteção do paciente e do operador, devido aos microrganismos que um canal radicular pode abrigar.

Em 1943, Grossmann propôs o emprego de uma técnica de irrigação de canal radicular alternando o hipoclorito de sódio a 5,0%

com o peróxido de hidrogênio 3%, uma vez que a reação entre as duas substâncias promoveria efervescência com liberação de oxigênio nascente, favorecendo a eliminação de microrganismos e resíduos do canal radicular.

Em seguida, diversos estudos foram realizados buscando avaliar os efeitos das soluções de hipoclorito de sódio na dissolução do tecido pulpar, na permeabilidade dentinária, na limpeza do canal radicular e sua ação bactericida, em suas diferentes concentrações. Ressaltando a superioridade da solução de hipoclorito de sódio frente as demais soluções auxiliares do preparo do canal radicular (Baumgartner et al., 1984; Gomes et al., 2001; Johnson, Remeikis, 1993; Pécora et al., 1997; Shih et al., 1970). Em diferentes concentrações as soluções de hipoclorito de sódio são empregadas durante o preparo biomecânico, por endodontistas e clínicos gerais que praticam a endodontia, não existindo, porém uma unanimidade na escolha das mesmas (Leonardo, 2005).

Sua grande utilização como solução irrigante durante o preparo biomecânico se deve a uma série de características como: ação lubrificante e desodorizante, capacidade de neutralização do conteúdo séptico-tóxico dos canais radiculares, capacidade de dissolução de matéria orgânica e ação antimicrobiana e antifúngica (Valera et al., 2001; Leonardo, 2005; Okino et al., 2004).

Sua atividade antimicrobiana ocorre devido à formação do ácido hipocloroso, que libera cloro nascente, o qual se liga ao grupamento amina (NH) dos aminoácidos, formando cloraminas, interferindo no metabolismo celular e inibindo a função enzimática bacteriana à partir de uma oxidação irreversível dos grupos SH (sulfidrila) de enzimas bacterianas essenciais (Vianna, 2002). Estudos como (Heling, Chandler, 1998; Gomes et al., 2001; Roças, Siqueira Jr, 2011) que analisaram a atividade antimicrobiana do Hipoclorito de sódio (NaOCl) comprovaram sua efetividade.

Heling, Chandler, em 1998, avaliaram a eficácia de soluções de hipoclorito de sódio a 1% e solução de EDTA a 17%, clorexidina e peróxido de hidrogênio, como agentes irrigantes, em raízes de dentes incisivos de bovinos infectados com *E. faecalis*. Incisivos bovinos recém-extraídos foram mantidos em hipoclorito de sódio por 24 horas, após este período foram removidas as coroas e os canais cortados em secções de 4mm. Os espécimes foram padronizados, esterilizados e contaminados com *E. faecalis*. Desses cada seis secções foram expostas as seguintes soluções irrigadoras: 1) Solução salina 10 min (controle); 2) CLX 0,2% por 10min; 3) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% por 10 min; 4)CLX 0,1% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,5% por 10 min; 5)CLX 1,8% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% por 5 min; 6)CLX 0,2% por 5 min + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% por 5 min; 7)Hipoclorito de sódio 1% por 10 min; 8) EDTA 17% por 10 min; 9) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% por 5 min + hipoclorito de sódio 1% por 5 min; 10) hipoclorito de sódio 1% por 5 min + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% por 5 min; 11) EDTA 17% por 5 min + hipoclorito de sódio por 5 min. Todas as soluções irrigadoras foram eficazes no seu efeito antimicrobiano. As soluções de hipoclorito de sódio e clorexidina, apresentaram efeito antimicrobiano semelhante, porém quanto a propriedade solvente de matéria orgânica o hipoclorito de sódio ainda é o de primeira escolha. Devendo ressaltar que, o *E. faecalis* (aeróbio facultativo) é uma das espécies bacterianas gram-positivas, mais resistentes ao tratamento endodôntico.

Gomes et al., em 2001, avaliaram, *in vitro*, a eficácia de diferentes agentes irrigantes, contra *E. faecalis*, usando diferentes concentrações de soluções de hipoclorito de sódio (0,5%, 1%, 2%, 5% e 5,25%) e clorexidina na forma de gel e líquida nas concentrações de (0,2%, 1% e 2%). Foram misturados 2ml de suspensão bacteriana com os irrigantes estudados e colocados em contato por 10, 30 e 45 segundos; 1, 3, 5, 10, 20 e 30 minutos; 1 e 2 horas. Após cada período de tempo, 1ml de cada amostras foi transferida para tubos contendo 2ml de BHI + neutralizadores, a fim de evitar ação residual dos irrigantes. Todos as amostras foram mantidos incubados a 37°C durante 7 dias. Após a análise

microbiológica constataram que todos os irrigantes possuem ação antimicrobiana contra o *Enterococcus faecalis*. O tempo necessário para a clorexidina gel a 2%, 1% e 0,2% em promover culturas negativas foi de 1 minuto, 15 minutos e 2 horas, respectivamente. Clorexidina na forma líquida em todas concentrações testadas (0,2%, 1% e 2%) e hipoclorito de sódio a 5,25% foram os irrigantes mais efetivos, demorando 30 segundos ou menos para inativarem o *E. faecalis*.

Roças e Siqueira, em 2011 realizaram um estudo clínico comparando os efeitos antimicrobianos do hipoclorito de sódio à 2,5% (NaOCl) e clorexidina à 0,12% (CLX) quando esses eram utilizados como irrigantes no tratamento endodôntico. Para o estudo 47 dentes unirradiculares com necrose pulpar e assintomáticos foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão / exclusão do trabalho. No início do estudo foram colhidas amostras bacterianas (S1), e logo após o preparo biomecânico foi realizada uma segunda coleta (S2), onde os dentes de um grupo foram irrigados com NaOCl (n=30) e outro grupo irrigado com CLX (n=17). A presença de bactérias e fungos foi avaliada pelo teste reação de polymerase em cadeia (PCR), enquanto a identificação desses microrganismos foi realizada pelo teste checkerboard para 28 patógenos. Todas as amostras S1 no PCR foram positivas para presença de bactérias. Tanto o NaOCl como a CLX foram significativamente eficazes na redução dos níveis de bactérias. Não houve diferença significativa entre os irrigantes em todos os parâmetros testados, incluindo a incidência de resultados negativos na segunda coleta S2 no PCR (40% de hipoclorito de sódio contra 47% de CLX,  $p = 0,8$ ), a redução do número de taxa por canal ( $p = 0,3$ ), e redução nos níveis bacterianos ( $p = 0,07$ ). A taxa mais prevalente em amostras S2 do grupo NaOCl foram *Propionibacterium acnes*, as espécies de *Streptococcus*, *Porphyromonas endodontalis* e *Selenomonas sputigena*. No grupo de CLX, a taxa mais prevalente em S2 foram *Dialister invisus*, *Actinomyces israelii*, *Prevotella baroniae*, *Propionibacterium acidifaciens*, e espécies de *Streptococcus*. Os autores

concluíram que os protocolos de tratamento utilizando irrigação com hipoclorito de sódio ou Clorexidina foram bem sucedidos na redução significativa do número da taxa de bactérias e dos seus níveis nos canais radiculares infectados, sem diferença significativa entre estas substâncias.

Além disso, outra atividade do hipoclorito também pode ser comprovada, a atividade na dissolução de matéria orgânica pelos estudos de (Chu et al., 2004; Araujo et al., 2006)

Chu et al., em 2004 avaliaram a capacidade de dissolução de tecido pulpar bovino, com o emprego de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Esses autores verificaram através dos resultados submetidos a análise de variância estatística (ANOVA), maior capacidade de dissolução tecidual das soluções mais concentradas, observaram pouca diferença na capacidade solvente entre as concentrações de 5,25% e 6%, porém, houve diferença estatística significativa, entre as concentrações 0,5% ou 1%, para as concentrações de 5,25% e/ou 6%. De acordo com o estudo os resultados sugerem a importância na seleção de maior concentração de hipoclorito de sódio, para aumentar a remoção dos remanescentes pulpares.

Em 2006 Araujo et al., testou o poder solvente de cinco concentrações diferentes de hipoclorito de sódio utilizadas em Endodontia. Foram utilizadas soluções comercializadas, prontas para uso, líquido de dakin, solução de Milton, soda clorada, água sanitária Brilux e soda clorada duplamente concentrada; e soluções de hipoclorito de sódio manipuladas em farmácia nas mesmas concentrações das soluções prontas. Foram divididos em dois grupos experimentais, com 25 amostras em cada grupo: G1-comerciais, G2-manipuladas, cada grupo dividido em cinco subgrupos, cada subgrupo cinco amostras. Cinquenta fragmentos de língua de rato foram submetidos à ação solvente das soluções de hipoclorito de sódio. O tempo de dissolução foi cronometrado. A análise estatística revelou não haver diferença estatisticamente significativa no

poder solvente nos grupos de mesma concentração em: 2,0%; 2,5% e 5,0%, enquanto em: 0,5% e 1,0% há uma diferença significativa entre as soluções comercial e manipulada. As soluções de hipoclorito de sódio quando manipuladas são mais eficientes dissolventes do tecido orgânico, obedecendo a uma relação diretamente proporcional a concentração do teor de cloro ativo da solução.

Podemos observar ainda autores que relatam efetiva ação sobre remoção de *smear layer* formada durante a instrumentação de canais radiculares. Esses estudos mostram que o hipoclorito de sódio age sobre a parte mais superficial da *smear layer*, formada por parte orgânica (Berg et al., 1986). Quando associado a outras substâncias quelantes, tais como EDTA ou ácido cítrico, a remoção da *smear layer* pode ser potencializada (Baumgartner et al., 1984; Yamashita et al., 2003; Carvalho et al., 2008).

Em 2003, o estudo de Yamashita et al., avaliaram in vitro, através de MEV, a limpeza da superfície das paredes de canais radiculares após utilização de diferentes soluções irrigadoras em dentes recém-extraídos, de humanos, divididos em 4 grupos experimentais, nos quais foram utilizadas as seguintes soluções irrigadoras: solução fisiológica, clorexidina 2%, hipoclorito de sódio 2,5% e hipoclorito de sódio 2,5% + EDTA. A limpeza das paredes dos canais radiculares foi avaliada nos terços cervical, médio e apical em cada espécie, por atribuição de escores. Demonstraram esses autores, que, a melhor limpeza da superfície das paredes dos canais radiculares nos terços avaliados, em todos os grupos experimentais foi nos terços cervical e médio e piores resultados no terço apical. E que a associação de hipoclorito de sódio 2,5% + EDTA mostrou melhor resultado.

O hipoclorito de sódio também apresenta ação efetiva detergente, surfactante e possui baixa tensão superficial, ação desodorizante, clareadora e lubrificante (Bloomfield, Miles, 1979). Porém

apesar de suas ótimas propriedades, estudos sobre a compatibilidade biológica das soluções de hipoclorito de sódio mostraram que, quando em menores concentrações (0.5% e 1%), as mesmas são bem toleradas pelos tecidos (Simões et al., 1989; Bombana et al., 1974, Reynolds, 1989) já quando utilizadas a 5.25% foi observada intensa injúria tecidual (Bombana et al. 1974, Oliveira, 2008), sendo desejável então, que o agente irrigante de escolha apresente alto poder antimicrobiano e baixa toxicidade.

Tanomaru Filho et al., 2002, avaliaram a resposta inflamatória a diferentes soluções irrigadoras endodônticas, através de injeções em cavidades peritoneais de ratos. Sessenta ratos receberam injeção intra-peritoneal de 0,3 mL de hipoclorito de sódio 0,5%, digluconato de clorexidina 2% ou solução salina fosfatada tamponada (PBS, controle). Cinco animais de cada grupo foram sacrificados após 4, 24, 48 horas e 7 dias após a injeção. Foi coletado líquido da cavidade peritoneal de cada animal para contagem e diferenciação celular e infiltração protéica. A solução de hipoclorito de sódio 0,5% apresentou maior migração de neutrófilos e células mononucleares após períodos de 48 a 168 horas ( $p < 0,05$ ). Houve um aumento significativo na infiltração protéica na cavidade peritoneal de 4 a 48 horas no grupo do hipoclorito de sódio 0,5% comparado ao grupo controle. A infiltração protéica foi semelhante em todos os grupos em 168 horas. O grupo da clorexidina 2% apresentou resultados semelhantes aos do grupo controle em todos os períodos. Desta forma, os autores concluíram que o hipoclorito de sódio 0,5% provocou resposta inflamatória, enquanto a clorexidina 2% não levou a uma resposta inflamatória significativa.

Oliveira, em 2008 avaliou a resposta inflamatória do tecido conjuntivo de ratos, aos 3, 7 e 14 dias, frente à aplicação de soluções de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações (0.5%, 1%, 2.5% e 5%) e valores de pH (7.0, 9.0 e 11.0). A análise histomorfológica

revelou que quanto maior a concentração das soluções de hipoclorito de sódio, maior a inflamação observada junto ao tecido conjuntivo até 14 dias e que, ao contrário das demais soluções, a solução de hipoclorito a 5% promoveu destruição tecidual no tempo inicial de 3 e 7 dias. Este estudo mostrou também que o aumento do pH não se mostrou tão agressivo quanto o aumento da concentração, tendo as soluções a 0.5%, 1% e 2.5%, em pH11, apresentado reparação tecidual compatível com os outros valores de pH aos 14 dias.

Além disso, o hipoclorito de sódio não possui efetividade sobre as endotoxinas (Oliveira et al., 2005, Maekawa, 2007). Em 2005 Oliveira, avaliou *in vitro* a efetividade das soluções de hipoclorito de sódio, clorexidina, hidróxido de cálcio e polimixina B, como agentes irrigantes, na neutralização de endotoxinas nos canais radiculares. Foram utilizados 98 dentes humanos unirradiculados, que tiveram suas coroas e ápices seccionados, padronizando o tamanho dos espécimes em 14 mm. Os mesmos foram esterilizados por radiação gama cobalto 60 e endotoxina de *Escherichia coli* foi inoculada nos canais radiculares de 84 espécimes. Após 24 horas, todos os dentes foram instrumentados até a lima K 50, escalonados até LK 80 e foram divididos em sete grupos (n=14), de acordo com a solução irrigadora: G1) NaOCl 2,5%; G2) NaOCl 5,25%; G3) clorexidina 2%; G4) Ca(OH)<sub>2</sub> 0,14%; G5) polimixina B; G6 (controle positivo): água apirogênica; G7 (controle negativo) sem endotoxina e água apirogênica como agente irrigante. Foram realizadas duas coletas do conteúdo do canal radicular para verificar neutralização de endotoxinas, uma logo após a instrumentação (coleta imediata) e outra após sete dias (segunda coleta). A neutralização da endotoxina foi verificada tanto pelo método do lisado de amebócitos de *Limulus* como pela produção de anticorpos em cultura de linfócitos B. Os resultados obtidos no lisado foram submetidos à análise estatística (Kuskall-Wallis e Dunn) e os obtidos na produção de anticorpos foram analisados por ANOVA e teste de Tukey (5%). Na coleta imediata, verificou-se que os

grupos G1 (NaOCl 2,5%), G2 (NaOCl 5,25%) e G3 (clorexidina 2%) não neutralizaram endotoxinas, sendo estatisticamente semelhantes ao G6 (controle positivo) ( $p > 0,05$ ), enquanto que os grupos G4 ( $\text{Ca(OH)}_2$  0,14%) e G5 (polimixina B) demonstraram efetividade sobre LPS, com resultados estatisticamente semelhantes ao G7 (controle negativo) ( $p > 0,05$ ) e diferentes dos demais grupos.

O hipoclorito de sódio como solução química auxiliar no preparo de canais radiculares apresenta algumas limitações, quanto a biocompatibilidade e neutralização de endotoxinas. Assim, como uma alternativa ao hipoclorito de sódio, tem sido sugerido o uso da Clorexidina.

### 2.3.2 Clorexidina

Desde a descoberta da clorexidina como agente antimicrobiano, há mais de 40 anos, seu uso vem ganhando espaço na área da saúde. Na medicina, esse agente é usado na prevenção contra a pneumonia nas unidades de terapia intensiva, na antisepsia da via aérea superior e inferior, na lavagem das mãos ou desinfecção de superfícies (Filgueiras et al., 2004; Jorge et al., 2005; Segers et al., 2006; Mullany et al., 2006; Chlebicki, Safdar, 2007). Atualmente em odontologia, a clorexidina é bastante estudada e utilizada, apresentando importantes propriedades como amplo espectro de ação antimicrobiana (Zehnder, 2006; Ruff et al., 2006; Sena et al., 2006), substantividade (Rosenthal et al., 2004; Dametto et al., 2005) e baixa toxicidade (El Karim et al., 2007). Sendo que esta substância pode ser empregada como solução irrigadora ou como medicação intracanal na terapia endodôntica.

A clorexidina possui um amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias Gram-Positivas, Gram-Negativas, fungos, leveduras e vírus lipofílicos (Tortora *et al.*, 2000). O mecanismo de ação

antibacteriano pode ser explicado pelo fato de a molécula catiônica da clorexidina ser rapidamente atraída pela carga negativa da superfície bacteriana, sendo adsorvida à membrana celular por interações eletrostáticas, provavelmente por ligações hidrofóbicas ou por pontes de hidrogênio, sendo essa adsorção concentração-dependente, causando assim, ruptura da membrana celular. Em dosagens elevadas, ela causa precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas e morte bacteriana e, em doses mais baixas, a integridade da membrana celular é alterada, resultando num extravasamento dos componentes bacterianos de baixo peso molecular (Hugo, Longworth, 1964; Hjeljord et al., 1973; Rölla, Melsen, 1975).

Leonardo et al., em 1999, avaliaram *in vivo* a atividade antimicrobiana e residual da clorexidina 2% como solução irrigadora. Foram utilizados 22 dentes com necrose pulpar e lesões periapicais visíveis radiograficamente que, após a abertura coronária, foi realizada a primeira coleta com cone de papel estéril. Os canais foram instrumentados utilizando a solução de clorexidina 2%. Uma bolinha de algodão estéril foi colocada na entrada do canal radicular e a cavidade selada com cimento de óxido de zinco e eugenol. Após 48 horas, foi realizada a segunda coleta para avaliação microbiológica. Na segunda coleta os resultados mostraram 100% de redução do *Streptococcus mutans* e 77,78% para os microrganismos anaeróbios. Os autores observaram que a clorexidina previne a atividade microbiana com efeitos residuais até 48 horas, sugerindo um possível efeito sinérgico com a medicação intracanal sobre microrganismos em áreas inacessíveis a instrumentação ou ainda em possíveis reinfecções ou infecções secundárias após a instrumentação, especialmente nos túbulos dentinários.

Em estudo realizado por Ferraz et al. (2001) avaliaram a clorexidina gel como substância química auxiliar. Os resultados mostraram

a capacidade lubrificante e a atividade antimicrobiana que a clorexidina gel apresentou contra a maioria dos microrganismos que são encontrados em canais radiculares infectados. Os autores citam que uma das vantagens da clorexidina gel sobre a líquida seria uma menor formação de *smear layer*. Concluíram que a clorexidina em gel tem potencial para ser utilizada na endodontia, pois apresenta baixa toxicidade e ação antimicrobiana significativa.

Önçag et al., em 2003, compararam a atividade antimicrobiana e a toxicidade do NaOCl 5,25%, clorexidina 2% e da clorexidina 0,2% + cetrímide 0,2%. A atividade antimicrobiana das soluções testadas foi avaliada *in vitro* em dentes humanos unirradiculados contaminados com *E. faecalis* por 24 h. Os canais foram instrumentados com as soluções irrigadoras e deixados vazios por 48 horas. O crescimento bacteriano foi avaliado após 5 min. da instrumentação e após 48 horas. Os efeitos tóxicos destas soluções foram avaliadas pela injeção das mesmas em tecido subcutâneo de ratos e a reação inflamatória foi acompanhada após 2 e 48 horas e 2 semanas. No estudo *in vitro*, os resultados mostraram que a clorexidina 2% e a clorexidina 0,2% + cetrímide 0,2% foram significativamente mais efetivas que o NaOCl 5,25% após 5 min., entretanto após 48 horas, as soluções não apresentaram diferença estatística entre si. Na avaliação dos efeitos tóxicos, reação inflamatória moderada foi observada no grupo do NaOCl nos 3 períodos avaliados. Os grupos da clorexidina e da clorexidina 0,2% + cetrímide 0,2% apresentaram reação inflamatória moderada, entretanto, após 48 horas, houve uma diminuição dessa reação. Os autores concluíram que a clorexidina 2% e a clorexidina 0,2% + cetrímide 0,2% foram mais efetivos sobre *E. faecalis* e menos tóxicos que a solução de NaOCl 5,25%.

Dametto et al., em 2005, estudaram a atividade antimicrobiana da clorexidina gel 2%, solução de clorexidina 2% e hipoclorito de sódio 5,25% sobre *Enterococcus faecalis*. Oitenta raízes

humanas foram contaminadas com *E. faecalis* por 7 dias. Foram realizadas três coletas dos canais radiculares: antes da instrumentação, imediatamente após a instrumentação e após 7 dias da instrumentação. A solução e o gel de clorexidina 2% reduziram significativamente a quantidade de microrganismos imediatamente e após 7 dias da instrumentação. O hipoclorito de sódio 5,25% também reduziu a quantidade de *E. faecalis* logo após a instrumentação, entretanto após 7 dias houve um aumento no número de microrganismos. Assim, a clorexidina 2%, gel e solução, foi mais efetiva que o hipoclorito de sódio 5,25%, em manter baixas as unidades formadoras de colônia de *E. faecalis* após 7 dias da instrumentação.

Tanomaru et al., em 2005, avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana das seguintes soluções irrigadoras: hipoclorito de sódio 1%, 2,5% e 5,25% e clorexidina 1% e 2% (solução) e 2% (gel), sobre seis diferentes cepas de microrganismos (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Todos os materiais estudados foram capazes de inibir as cepas microbianas, sendo que as soluções e gel de clorexidina foram mais eficientes que as soluções de hipoclorito de sódio.

Além de possuir ação antimicrobiana de amplo espectro, a clorexidina apresenta a propriedade de substantividade, em que se liga à superfície do esmalte e da dentina como também às glicoproteínas salivares, e, à medida que a sua concentração no meio diminui, desloca-se para esse meio de forma a manter uma concentração mínima por um longo período de tempo (atuação prolongada). (Michelotto et al., 2008)

White et al., em 1997 objetivando avaliar a substantividade da solução de clorexidina 0,12% e 2%, utilizaram dentes extraídos que foram preparados e irrigados com as soluções testes. Após o preparo, os canais foram irrigados com água deionizada para remover os resíduos da solução irrigadora e preenchidos com água deionizada

estéril. Após período de 6, 12, 24, 48 e 72 horas, cones de papel foram introduzidos nos canais por dois minutos e transferidos para meio de cultura em placas inoculadas com *S. mutans*. A maior atividade antibacteriana ocorreu nos dentes tratados com clorexidina a 2%. Esse fato demonstrou que a clorexidina teve substantividade que permaneceu por horas após a realização do preparo químico-mecânico.

Lenet et al. em 2000 estudaram, *in vitro*, a eficácia do digluconato de clorexidina em gel 2% e de um composto de liberação controlada 25%. Após serem instrumentados, 60 dentes bovinos foram divididos igualmente em quatro grupos de acordo com as medicações empregadas: grupo 1 – dispositivo de liberação controlada contendo clorexidina 25%; grupo 2 – clorexidina gel 2%; grupo 3 – pasta de hidróxido de cálcio; grupo 4 – solução salina (grupo controle). Depois de medicados, os espécimes foram inoculados com *E. faecalis* por 21 dias. As raspas de dentina obtidas do uso de brocas esféricas foram separadas em tubos de ensaio contendo BHI como meio de cultura e incubadas por 24 horas. Os resultados sugerem que os canais radiculares medicados com clorexidina gel por sete dias adquiriram propriedades antimicrobianas por no mínimo 21 dias e que esta se mostrou mais eficiente quando comparada ao sistema de liberação controlada e ao hidróxido de cálcio.

Entretanto, mesmo apresentando ação antimicrobiana e substantividade, a clorexidina apresenta pequena atividade sobre os produtos das bactérias, como as endotoxinas presentes em canais radiculares, (Oliveira et al., 2007; Gomes et al., 2009; Valera et al., 2009), tornando mais interessante a busca por substâncias alternativas para uso na prática clínica.

Oliveira et al., 2007, avaliaram *in vitro* os efeitos de alguns irrigantes endodônticos sobre endotoxinas dos canais radiculares. Noventa e oito dentes unirradiculados humanos foram utilizados neste estudo. Os 3mm apicais de cada raiz foram seccionados transversalmente

com auxílio de discos de diamante e as coroas foram seccionadas padronizando os espécimes em 14mm. As áreas apicais foram seladas com resina composta e as demais superfícies externas foram cobertas com 2 camadas de resina epóxi, exceto a abertura cervical. Todos os espécimes foram autoclavados e posteriormente enviados para radiação com gama cobalto para degradação do LPS pré-existente. Terminados os preparos iniciais os canais foram inoculados com endotoxina de *Escherichia coli*. A divisão dos grupos ocorreu de acordo com a solução utilizada. Grupo 1 (G1): NaOCl 2,5%; G2: NaOCl 5,25%; G3: clorexidina 2%; G4: hidróxido de cálcio 0,14%; G5: polimixina B; G6: controle positivo, solução salina; G7: controle negativo, sem endotoxina. Para cada dente foram realizadas duas coletas, a primeira logo após a instrumentação e a segunda após 7 dias. Para todas as amostras (imediate e após 7 dias), dois métodos foram utilizados para verificar a detoxificação da endotoxina: o teste do lisado de amebócito de limulus e a produção de anticorpos pela cultura de linfócitos B. Tanto na coleta imediata quanto na segunda coleta, o hidróxido de cálcio e a polimixina B detoxificaram a endotoxina dos canais radiculares e alteraram as propriedades do LPS de estimular a produção de anticorpos por linfócitos B. O hipoclorito de sódio e a clorexidina sozinhos não foram capazes de inibir a endotoxina.

Valera et al., em 2009 avaliaram a efetividade da solução de clorexidina 2% e medicações intracanaís sobre *Escherichia coli* e endotoxina em canais radiculares. Os canais radiculares de 48 dentes unirradiculados foram contaminados com *E. coli* por 14 dias, instrumentados com solução de clorexidina 2% e divididos em 3 grupos de acordo com a medicação intracanal (MIC) utilizada: pasta de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , polimixina B,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + clorexidina gel 2% (CLX). No grupo controle foi utilizada somente solução fisiológica. Foram realizadas coletas do conteúdo do canal radicular imediatamente após a instrumentação (S1), após 7 dias da instrumentação (S2), imediatamente após 14 dias da ação

da MIC (S3) e 7 dias após remoção da MIC (S4). Para todas as coletas foram realizados os seguintes testes: a) análise microbiológica; b) quantificação de endotoxina pelo teste cromogênico do lisado de amebócitos do *Limulus*. Os resultados foram analisados pelo teste de ANOVA e Dunn (5%). Na amostra S2 a sol. CLX 2% apresentou melhores resultados em relação à solução fisiológica. Na amostra S3 houve diferença estatística do  $\text{Ca(OH)}_2$  + CLX em relação ao  $\text{Ca(OH)}_2$  e polimixina B. Na amostra S4 não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos. Concluíram que somente as medicações intracanais são capazes de diminuir significativamente a quantidade de endotoxinas. Sendo que a associação do  $\text{Ca(OH)}_2$  com a CLX gel 2% apresentou melhores resultados. Assim, é possível que esta associação possa combinar a atividade antimicrobiana da CLX à potente ação mineralizadora e neutralizadora de endotoxinas do  $\text{Ca(OH)}_2$ .

Gomes et al., em 2009 compararam a eficácia do NaOCl 2,5% e da CLX gel 2% sobre LPS bacteriano presente em infecções primárias de canais radiculares. Cinquenta e quatro pacientes foram divididos em 2 grupos, de acordo com a substância química auxiliar utilizada durante o preparo biomecânico dos canais radiculares. Amostras foram coletadas antes e após o preparo, sendo que para cada amostra, quantificação de endotoxinas foi realizada pelo método cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL-1000). Quantidade mediana inicial de EU/mL obtida foi de 272 para o grupo NaOCl 2,5% e 152,46 para o grupo CLX gel 2%, sendo reduzidos após o PBM para 86 e 85, respectivamente. Embora ambas as substâncias tenham sido capazes de diminuir quantidade de endotoxinas dentro do canal radicular, o NaOCl 2,5% reduziu mais a quantidade de endotoxinas do que a CLX gel 2%. No entanto, nenhuma das substâncias foi capaz de eliminar endotoxinas de canais com infecções endodônticas primárias.

Além da clorexidina não ser efetiva contra as endotoxinas,

estudos mostram que também não é capaz de dissolver matéria orgânica (Okino et al., 2004; Naenni et al., 2004)

Okino et al. em 2004, estudaram a capacidade de dissolução da polpa em digluconato de clorexidina em solução aquosa e na forma de gel. Foram utilizadas polpas bovinas e os irrigantes testados foram: NaOCl nas concentrações de 0.5, 1 e 2.5%, solução de digluconato de clorexidina 2%; digluconato de clorexidina 2% na forma de gel (Natrosol); e água destilada como controle. Os fragmentos pulpares bovinos foram pesados e colocados em contato com 20ml de cada substância testada, em uma centrífuga a 150 r.p.m. até a total dissolução. A velocidade de dissolução foi calculada pela divisão do peso da polpa pelo tempo de dissolução. Os valores obtidos dessa divisão foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis para a obtenção dos resultados. A água destilada e ambas as soluções de clorexidina não dissolveram o tecido pulpar dentro de 6 horas. A média de velocidade de dissolução para o NaOCl 0.5, 1 e 2.5% foram 0.31, 0.43 e 0.55 mg/min, respectivamente. A capacidade solvente da solução de clorexidina foi semelhante à da água. Houve diferença estatisticamente significativa nos resultados das soluções de NaOCl, clorexidina e água destilada. Assim, é possível concluir que ambas as formas de clorexidina e a água destilada não possuem capacidade de dissolução do tecido pulpar, enquanto todas as soluções de NaOCl testadas foram eficientes na dissolução do tecido pulpar, com a velocidade de dissolução variando de acordo com a concentração da solução. Devido a essas características da clorexidina torna-se interessante a busca de substâncias químicas auxiliares alternativas para uso na clínica, durante a terapia endodôntica.

### 2.3.3 Própolis

Própolis é o termo genérico usado para denominar um material resinoso coletado pelas abelhas. O nome própolis é derivado de grego pro = em defesa e polis = cidade, o que quer dizer: “em defesa da cidade ou da colméia. As abelhas, de fato usam esta substância para protegê-las de insetos e microrganismos, empregando-a no reparo de frestas ou danos a colméia e no preparo de locais assépticos(Debuyser, 1983). Deste modo, acredita-se que as abelhas utilizam a própolis para defender a vida, preservando a temperatura da sua moradia, impedindo a entrada de agentes estranhos e, em certos casos, impedindo a propagação de agentes epidemiológicos (Burdock, 1998).

A composição da própolis depende da flora da região onde é produzida. Sua coloração pode variar de amarelo-esverdeado a marrom-escuro. Apesar desta variação, em geral, a própolis é composta por 50% de resina, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias (Burdock, 1998). Sua composição química é complexa, sendo que mais de 200 constituintes já foram identificados. Alguns autores atribuem aos flavonóides, aos ácidos aromáticos e aos ésteres, a capacidade antimicrobiana apresentada por esta substância (Grange, Davey, 1990; Burdock, 1998; Bankova et al., 1995; Koo et al., 2000a; Scazzocchio et al., 2005).

Muitos estudos demonstram que a própolis possui atividade antimicrobiana, antiinflamatória, hepatoprotetora (Ghisalberti, 1979; Burdock, 1998; Banskota et al., 2001; Koru et al., 2007), antioxidante, estimulante do sistema imunológico através de diversas vias biológicas (Koru et al., 2007). É utilizada pelo homem e na medicina popular desde pelo menos 300 a. C. (Banskota et al., 2001), devido a

suas propriedades antimicrobianas (Castaldo, Capasso, 2002). A própolis pode agir contra uma grande variedade de bactérias, fungos, vírus (Koru et al., 2007).

Estudo *in vivo*, realizado por Santos et al em 2007, avaliou a eficácia da pomada de própolis sobre feridas crônicas, e constatou a presença de ação terapêutica, baixo custo e estímulo a cicatrização. Estudando a atividade antimicrobiana e inibição da formação do biofilme *in vitro*, Koo et al. (2000a) concluíram que própolis é capaz de prevenir cárie e doença periodontal. Em 2009, Awawdeh et al. estudaram o efeito antimicrobiano da própolis e do hidróxido de cálcio em discos de dentina contaminados com *E. faecalis*, e verificaram que a própolis foi significativamente mais efetiva que o hidróxido de cálcio, eliminando rapidamente o microrganismo.

Estudos em capeamento direto da polpa utilizando os flavonóides extraídos da própolis mostraram que estes podem postergar a inflamação pulpar e estimular a reparação da dentina, com formação de ponte dentinária parcial em um período de 4 semanas (Sabir et al., 2005).

Ferreira et al. em 2007 avaliou a ação antimicrobiana da própolis sobre bactérias anaeróbias comumente isoladas em canais radiculares com necessidade de tratamento endodôntico. Cinco espécies de microrganismos foram testados *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces israelii*, *Clostridium perfringens* e *Enterococcus faecalis*. Os medicamentos testados foram solução de hidróxido de cálcio 10%, Formocresol, Pasta Calen associado ao paramonoclorofenol canforado, extrato etanólico de própolis 10% e etanol puro (veículo do extrato de própolis) como controle. Os resultados deste estudo indicaram eficiente atividade antimicrobiana de todas as substâncias testadas, porém observamos a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis sobre microrganismos como *Prevotella nigrescens* e *Fusobacterium nucleatum*, o que permitiu sugerir a inclusão desta

substância na terapia endodontia, submetendo esta a mais estudos de biocompatibilidade.

Estudos *in vitro* realizados recentemente (Maekawa, 2010; Valera et al., 2010) demonstraram grande efetividade, por parte do extrato glicólico de própolis, sobre microrganismos presentes em canais radiculares necrosados.

Valera et al. em 2010, avaliaram a ação do extrato glicólico de própolis e medicamentos intracanaís contra *Escherichia coli* e endotoxinas. Para este estudo foram utilizados quarenta e oito raízes, que foram preparadas e contaminadas com *E. coli* e todos os espécimes foram mantidos em estufa a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , por 14 dias, sendo que a cada 3 dias, foi adicionado caldo BHI no interior dos canais radiculares. Após este período, foi realizado o preparo biomecânico dos canais utilizando como substância química auxiliar o extrato glicólico de própolis 12% e após a instrumentação, os canais foram preenchidos com 3 ml de soro fisiológico apirogênico e realizada a primeira coleta (S1). Os canais foram preenchidos com soro fisiológico apirogênico e mantidos em estufa a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , por 7 dias e realizada a segunda coleta (S2). Os espécimes foram divididos em grupos experimentais de acordo com o tipo de medicação intracanal (n=12): hidróxido de cálcio, polimixina B e hidróxido de cálcio associado a clorexidina gel 2%; No grupo de controle, a irrigação foi realizada com solução salina apirogênica e foi utilizado sem aplicação de medicação intracanal. Após colocação da medicação intracanal os espécimes foram mantidos em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por 14 dias. Passado este período as medicações foram removidas e realizada a terceira coleta (S3), os canais foram preenchidos com soro fisiológico apirogênico e mantidos em estufa a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , por 7 dias e então foi realizada a quarta coleta (S4). Foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia para análise microbiana e o Teste do Lisado de Amebócito de Limulus para quantificação de endotoxinas. A análise estatística (Teste de Dunn,

$p < 0,05$ ) mostrou que a irrigação dos canais radiculares com própolis foi efetiva, eliminando completamente a *E. coli* e reduzindo os níveis de endotoxinas. Todas as medicações intracanaís contribuíram significativamente na diminuição das endotoxinas. A maior eficácia foi observada para medicamentos contendo hidróxido de cálcio.

Simões et al. em 2008, avaliou, *in vitro* e *ex vivo*, a ação de diferentes concentrações de extratos de própolis, comparativamente à eficácia de anti-sépticos bucais, frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. Foram selecionados 30 doadores de saliva, que receberam orientações para a coleta da saliva. Para a realização dos ensaios *in vitro*, foi adicionada à saliva solução de glicose a 25%, seguindo-se da coleta de alíquotas para a preparação dos grupos controle (C) e experimentais, a cada grupo experimental foi adicionado o respectivo extrato de própolis a 11%, 20% e 30%, e os outros antisépticos bucais industrializados, foram então incubados em estufa a 37°C por 48h. Nas experimentações *ex vivo*, foram coletadas amostras de saliva em jejum (grupo controle) e após o enxágüe individual com os extratos de própolis, seguindo-se da adição de glicose. Nas duas fases, foram recolhidas alíquotas das misturas e determinado o consumo de glicose pelos microrganismos pelo método Glicose Oxidase, nos tempos 0, 24, 48 h de incubação a 37°C. Constatou-se diferenças estatisticamente significantes no consumo de glicose aos serem comparadas as médias do grupo C nas fases 1 e 2 após 24 e 48 h. Entre os grupos experimentais, não foram constatadas diferenças significativas. Conclui-se que as soluções de própolis a 11%, 20% e 30% tiveram a mesma ação antimicrobiana, o que justifica a indicação daquela com menor concentração. Constatou-se também a mesma ação farmacológica em comparação aos anti-sépticos industrializados testados.

Madhubala et al., em 2011 avaliou e comparou a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio, mistura de três

antibióticos (TAM), e um extrato etanólico de própolis como medicação intracanal em canais de raízes infectados com *Enterococcus faecalis*. Para este estudo foram utilizados cento e vinte dentes (incisivos permanentes) que tiveram suas coroas seccionadas e as raízes preparadas. Após a esterilização das amostras, essas foram inoculadas com a cultura pura de *E. faecalis* e incubados em estufa a 37°C por 21 dias. Após a incubação, a primeira amostragem microbiológica foi realizada. Isto foi feito por inundação do canal com solução salina estéril, seguido pela colocação de uma lima Hedstrom 50, para dentro do canal para raspar a dentina durante o processo. Um cone de papel absorvente estéril foi colocado no canal durante 60 segundos e transferidas para tubos de ensaio contendo 1,0 mL de solução fisiológica salina estável. Foi realizada a diluição das amostras e essas foram semeadas. As placas foram incubadas em câmara aeróbia durante 24 horas a 37°C. Unidades formadoras de colônias foram registrados antes da colocação da medicação. Em seguida, as amostras foram divididas aleatoriamente em cinco grupos (n=24). Cada grupo foi então exposto a vários medicamentos intracanaís, hidróxido de cálcio (grupo 1), TAM (grupo 2) e de própolis, (grupo 3), etanol (grupo 4), e solução salina como o grupo de controle (grupo 5). A eficácia antibacteriana dos medicamentos intracanaís foi determinada através de porcentagem de redução na contagem de colônias, no final dos dias 1, 2, e 7. Os dados foram analisados estatisticamente usando one-way análise de variância e teste de Tukey. Os autores observaram que a redução foi maior para própolis mostrando uma redução de 100% no dia 2, seguido de TAM mostrando 82,5%, 92,2%, e 98,4% de redução nos dias 1, 2 e 3, respectivamente. O hidróxido de cálcio mostraram um aumento gradual da atividade antibacteriana com um máximo de 59,4% no dia 7. Concluíram então que própolis foi mais eficaz do que o TAM contra *E. faecalis* em um período de tempo de 2 dias, e ambos eram igualmente eficazes em 7 dias.

Em um estudo realizado por Molina, (2008) avaliou o

extrato glicólico de própolis como solução irrigadora durante a instrumentação de canais radiculares, verificando que este extrato mostrou atividade antimicrobiana sobre *C. albicans*, *E. faecalis* e *E. coli* com efeito residual por sete dias, com resultados semelhantes à solução de clorexidina 2%. Entretanto, este extrato não apresentou redução significativa da quantidade de endotoxinas presentes nos canais radiculares.

Lotufo em 2003 avaliou *in vitro* a citotoxicidade da solução de própolis em propilenoglicol e verificou que esta solução é biocompatível, não afetando ou impedindo o crescimento e a viabilidade celular dos fibroblastos da mucosa bucal humana. Al-Shaher et al. em 2004, Avaliaram *in vitro*, a tolerância de fibroblastos do ligamento periodontal e polpa dentária para extrato de própolis comparando com hidróxido de cálcio. As células de polpa dentária humana e do ligamento periodontal foram obtidos a partir saudáveis terceiros molares. Essas células que foram submetidas a várias concentrações de própolis (0-20 mg / ml) e hidróxido de cálcio (0 - 250 mg / ml). A viabilidade celular após tratamento com própolis foi analisada por coloração com cristal violeta das células, seguida por análise espectrofotométrica. Os dados revelaram que a exposição das células do ligamento periodontal ou das células da polpa para 4 mg/ml ou menores concentrações de própolis resultaram em maior viabilidade de 75% das células. Pelo contrário, hidróxido de cálcio 0,4 mg/ml foi citotóxico e menos de 25% das células foram encontradas para serem viáveis. Estudos adicionais podem mostrar que o própolis pode ser uma alternativa viável como medicação intracanal por causa da sua baixa citotoxicidade, além da capacidade bactericida, antifúngica e antiviral.

Com base na literatura apresentada pode-se verificar que o extrato de própolis apresenta várias propriedades benéficas como ação antiinflamatória e antimicrobiana, que são desejáveis em uma solução

química auxiliar. Além disto, a área médica tem procurado utilizar em suas pesquisas substâncias naturais, que tem mostrado resultados promissores, devendo, portanto, serem avaliados também na Odontologia.

### 3 PROPOSIÇÃO

Considerando que o ácido lipoteicóico (LTA) representa um importante agente etiológico envolvido na patogênese das lesões periapicais, e que as bactérias Gram-positivas como *E. faecalis* liberam LTA o objetivo desta pesquisa foi:

- a) Avaliar a efetividade do preparo biomecânico utilizando diferentes soluções irrigadoras e/ou substância química auxiliar: Hipoclorito de sódio 1%, Clorexidina gel 2%, Extrato de Própolis 12%, Solução Salina Fisiológica Apirogênica 0,9%(controle positivo) em neutralizar o ácido lipoteicóico (LTA) de *E. faecalis* em canais radiculares;
- b) Avaliar a produção de citocinas (Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleucina-6 (IL-6), Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), por macrófagos ativados (RAW 264.7).

## 4 MATERIAL E MÉTODO

Este projeto de Pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP. Sob protocolo nº (023/2011-PH/CEP) (Anexo – A).

### 4.1 Preparo dos espécimes

Foram utilizados 40 dentes humanos unirradiculados, recém-extraídos por indicações clínicas diversas e com prévia autorização dos pacientes por meio de consentimento livre e esclarecido. Os dentes foram limpos e imersos em solução fisiológica até o momento do uso. A seleção dos dentes foi feita baseada nas dimensões e similaridade morfológica da raiz, sendo os dentes radiografados para comprovação da presença de um único canal reto. As coroas foram seccionadas com disco de carborundum, padronizando o tamanho dos espécimes em 16 mm.



Figura 1- Secção das coroas.

Os canais radiculares foram previamente instrumentados para padronização do diâmetro e do volume de LTA que foi inoculado. Para tanto, os canais foram explorados com uma lima K 10 ou 15 até o forame apical e, em seguida, foram preparados com instrumentos níquel-titânio (NiTi) do sistema BioRaCe (FKG Dentaire – Swiss Dental Products – Switzerland) acoplados em um motor elétrico Xsmart (Dentsply) com contra-ângulo, na seguinte sequência: BR0 (25/0.08), para o alargamento dos tercos cervical e médio do preparo; BR1 (15/0.04) até o comprimento de trabalho (15 mm); BR2 (25/0.04) até o comprimento de trabalho (15 mm), sempre utilizando 5 mL de solução fisiológica a cada troca de instrumento. Após, os canais foram preenchidos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 17%, o qual foi agitado com uma lima manual K 15 por 3 min. A irrigação final foi realizada com 10 mL de solução fisiológica. Em seguida, os canais radiculares foram secos com cones de papel nº 30 e foi feito vedamento da região apical nos dentes utilizando-se resina composta fotopolimerizável Z-100 (3M, Dental Products, St Paul, USA), e as raízes foram impermeabilizadas externamente com duas camadas de adesivo epóxi, exceto a região da abertura cervical (Oliveira et al., 2005, 2007; Valera et al., 2010).



Figura 2- A) Vedamento apical; B) Impermeabilização das raízes.

Em seguida, os espécimes foram distribuídos por estratificação randomizada em 4 placas de poliestireno de cultura celular de 24 poços (TPP), com 10 dentes em cada, fixados com resina acrílica quimicamente ativada aproximadamente 5 mm de altura. Estas placas foram tampadas, embaladas e submetidas à esterilização por radiação gama com cobalto 60. Todos os materiais utilizados (limas, gaze, algodão, tesouras, luvas, entre outros) foram esterilizados por radiação gama com cobalto 60 (20 KGy por 6 horas EMBRARAD - (Empresa Brasileira de Radiação, Cotia, São Paulo)) para neutralizar endotoxinas pré-existentes (Oliveira et al., 2005, 2007; Valera et al., 2010).

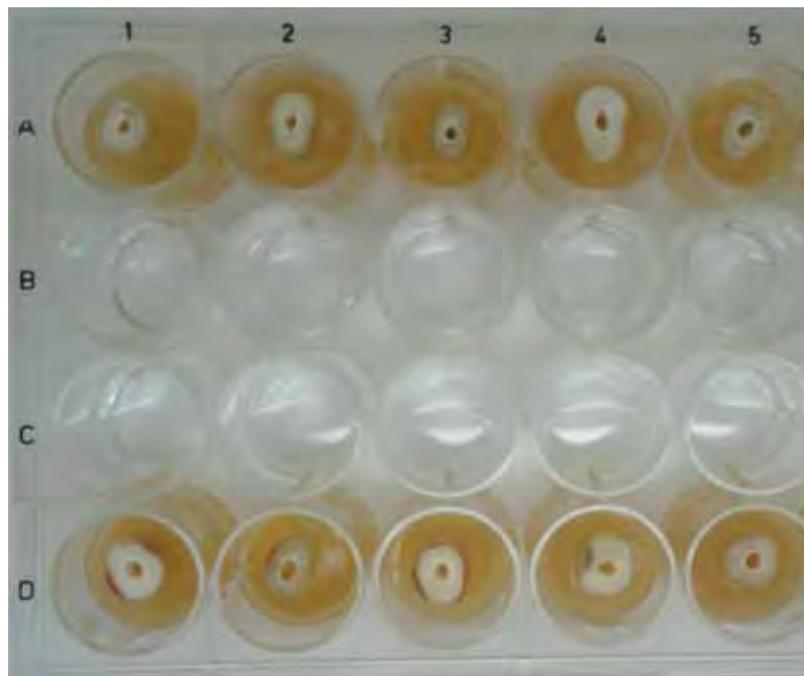


Figura 3 - Fixação das raízes em placa de cultura celular de 24 poços / esterilização.

#### 4.2 Preparo e inoculação do ácido lipoteicóico

Foi utilizado ácido lipoteicóico (LTA) de *Enterococcus faecalis* (L4015 – Sigma), preparado na concentração de 150 µg/mL (Costa-Junior et al., 2003; Oliveira, Barbosa, 2003) com água bidestilada e apirogênica. Em seguida, foram inoculados 10 µL da solução de LTA no interior de cada canal radicular. As placas contendo os espécimes foram fechadas e mantidas em estufa a 37°C, em umidade relativa, por 24 h. Este procedimento foi repetido mais duas vezes, totalizando 3 inoculações repetidas do LTA.



Figura 4 – Contaminação dos dentes.

### 4.3 Divisão dos grupos experimentais

Após o período de 24 h da última inoculação do LTA, foi realizada a instrumentação dos canais radiculares com 5 instrumentos rotatórios NiTi (sistema BioRaCe - FKG Dentaire – Swiss Dental Products – Switzerland), na seguinte sequência: BR3 (25/0.06); BR4 (35/0.04); BR5 (40/0.04); BR6 (50/0.04) e finalizada com o instrumento BR7 (60/0.02). Para tanto, os instrumentos foram montados no contra-ângulo conectado ao motor elétrico Xsmart (Dentsply) de acordo com as especificações do fabricante, sendo a velocidade de 500 rpm e o torque de 1 Ncm (Figura 5A). Foram realizados movimentos de penetração e remoção contínuos buscando alcançar o comprimento de trabalho (15 mm) sem realizar pressão apical (Figura 5B).



Figura 5 – A) Motor elétrico Xsmart mostrando velocidade e torque de acordo com as recomendações do fabricante; B) Contra-ângulo conectado ao motor elétrico com Lima BR6 (50/0.04), mostrando instrumentação dos canais.

A cada troca de instrumento, os canais foram irrigados com 5 mL de solução irrigadora (Quadro 1). Para irrigação foram utilizadas seringas apirogênicas de 5 mL (Injex) e para aspiração pontas White Mac Tips (Ultradent) acopladas a cânula da bomba à vácuo. Assim, de acordo com a substância química auxiliar utilizada durante a

instrumentação, os espécimes foram divididos em 3 grupos experimentais (n=10) (Quadro 1):

Quadro 1 - Distribuição dos espécimes nos grupos experimentais, de acordo com a substância química auxiliar e medicação intracanal:

<b>GRUPOS ( n = 10)</b>	<b>SUBSTÂNCIA QUÍMICA AUXILIAR</b>
NaOCl	Hipoclorito de sódio 1%
CLX	Clorexidina gel 2%
PRO	Extrato Glicólico de Própolis 12%
SS (controle)	Solução Salina Fisiológica 0,9%

- a) grupo NaOCl: solução de hipoclorito de sódio 1% (Asfer Indústria Química, São Caetano do Sul, SP);
- b) grupo CLX: clorexidina gel 2% (Byofórmula Technopharma, São José dos Campos, SP); + solução salina fisiológica apirogênica 0,9% (Aster Produtos Médicos Ltda. – Sorocaba, SP, Brasil)
- c) grupo PRO: extrato glicólico de propólis 12% (Apis Flora, Ribeirão Preto, SP) + solução salina fisiológica apirogênica 0,9%(Aster Produtos Médicos Ltda. – Sorocaba, SP, Brasil)
- d) grupo SS: solução salina fisiológica apirogênica 0,9%(Aster Prod. Méd. Ltda. Sorocaba, SP,Brasil)

No grupo CLX e PRO, o canal foi preenchido com clorexidina gel 2% ou extrato glicólico de própolis 12% e após ação do instrumento rotatório, foi realizada a irrigação e aspiração com 5 mL de solução fisiológica estéril e apirogênica, sendo este procedimento repetido a cada troca de instrumento. Os demais grupos (NaOCl e SS) foram irrigados com 5 mL da solução irrigadora a cada troca de instrumento. Imediatamente após o término da instrumentação, foi realizada a coleta do conteúdo dos canais radiculares.

#### 4.4 Coleta do conteúdo do canal radicular

Foi realizada a coleta do conteúdo do canal radicular: imediatamente após a instrumentação. A coleta dos canais radiculares foi realizada da seguinte forma: os canais foram inundados com solução fisiológica estéril e apirogênica, a qual foi agitada por 1 minuto com uma lima estéril e apirogênica e, em seguida, foi aspirada com auxílio de seringa e agulha tipo insulina 1 ml (Injex Indústrias Cirúrgicas Ltda., Ourinhos, SP, Brasil). Este procedimento foi repetido até completar o volume final da amostra de 100  $\mu$ L. Estas amostras foram utilizadas para verificar se os protocolos de tratamento acima descritos apresentam capacidade de neutralizar os efeitos citotóxicos do ácido lipoteicóico em cultura de macrófagos (RAW 264.7).



Figura 6 – Coleta do Canal radicular.

#### 4.5 Cultura Celular

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

As células foram cultivadas em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Nova York, EUA), em frascos de cultivo celular (TPP, Suíça) e incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica, contendo 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias e houve monitoramento de cada frasco de cultivo celular com auxílio de microscópio com luz invertida (Nikon).

A partir do momento que foi constatado estado de subconfluência das células, caracterizado pela ocupação de mais de 70% do frasco, foram realizados subcultivos celulares (Figura 7).

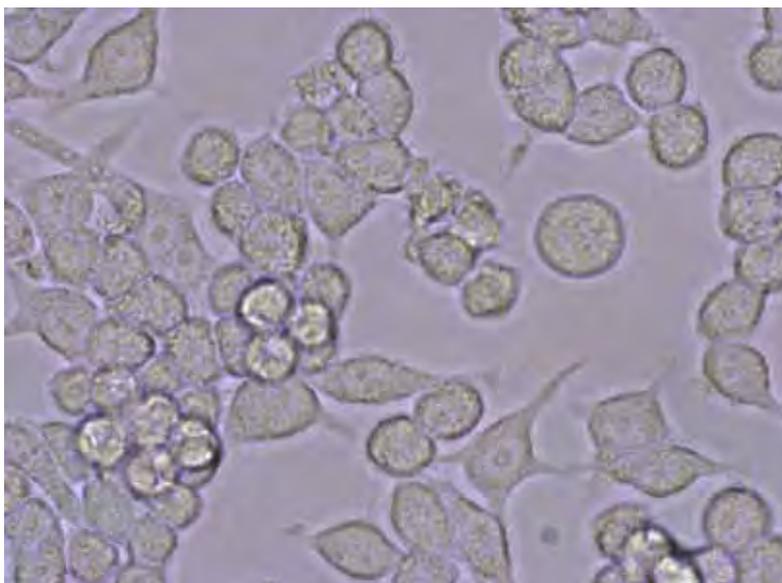


Figura 7 – Macrófagos Raw 264.7.

Para o subcultivo, o meio DMEM do frasco para cultura celular foi aspirado com auxílio de uma pipeta aprotogênica e descartado (Figura 8A). A seguir, as células foram lavadas com 3 mL de meio fresco e depois este também foi descartado. Posteriormente, foram acrescentados mais 3 mL de meio fresco e as células foram removidas cuidadosamente do frasco de cultivo com auxílio de um varredor celular (TPP, Suíça) (Figura 8B).

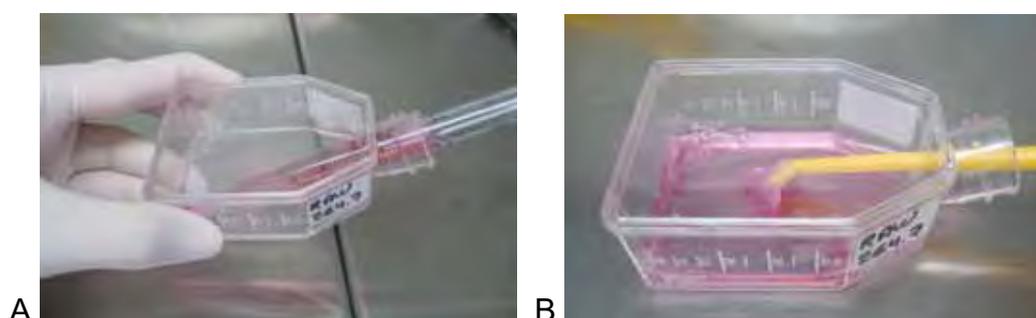


Figura 8 - A) Aspiração do meio DMEM do frasco de cultivo celular; B) Remoção das células aderidas no fundo do frasco de cultura com varredor celular.

O meio fresco contendo a suspensão de células foi centrifugado, em tubo tipo Falcon (TPP, Suíça), a 9 mil rpm durante cinco minutos, a 25°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspendidas em meio fresco e distribuídas em novos frascos de cultivo celular (Figura 9).

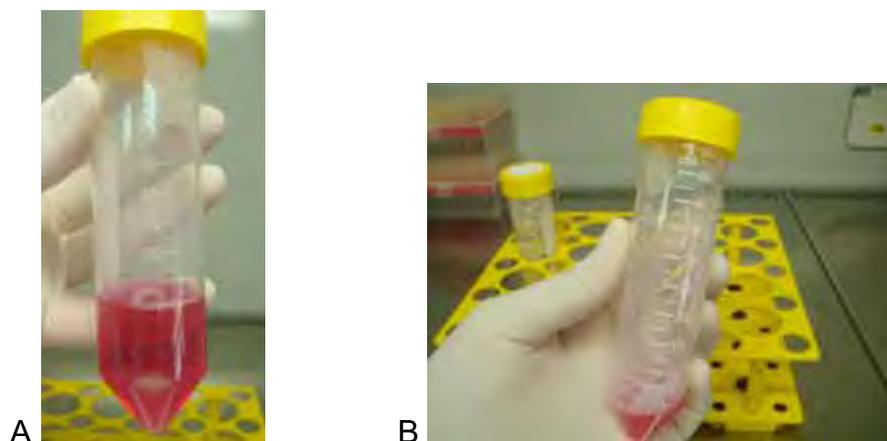


Figura 9 - A) Após centrifugação 9 mil rpm por cinco minutos, as células se agrupam no fundo do tubo; (B) Homogeneização das células com o meio fresco.

#### 4.5.1 Viabilidade da cultura de células

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão utilizando azul de Trypan e contagem das células viáveis em câmara de Neubauer. Para tanto, uma amostra de 100  $\mu\text{L}$  da ressuspensão foi colocada em um microtubo tipo eppendorf juntamente com 100  $\mu\text{L}$  de corante azul de Trypan 0,5% (Sigma). Esta mistura foi agitada com uma pipeta e transferidos 10  $\mu\text{L}$  para a câmara de Neubauer, coberta com lamínula (Figura 10A). A contagem de células viáveis foi realizada em microscopia óptica, sendo consideradas viáveis as células não coradas pelo azul de Trypan (Figura 10B).

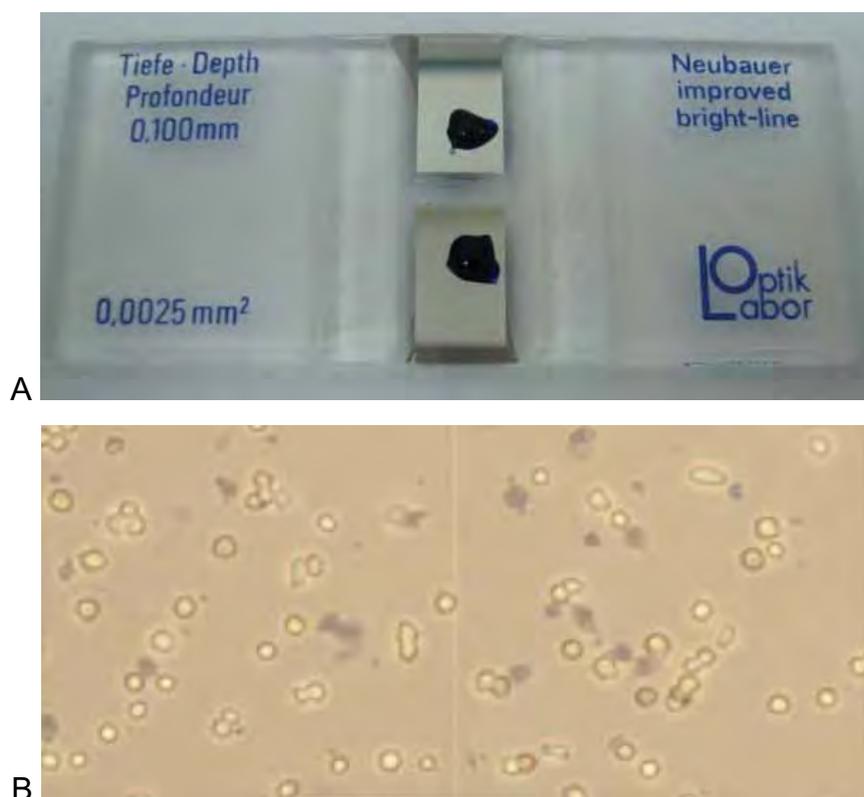


Figura 10 - A) Câmara de Neubauer com alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  do material celular corado com azul de Trypan em microtubo, após ressuspensão das células; B) Vista da câmara de Neubauer em microscópio óptico (aumento de 200X). As células coradas em azul são consideradas inviáveis.

Após realização dos testes, foram colocados  $1.10^6$  células viáveis em cada poço da placa de polistireno de 24 poços (Corning Costar) e foi acrescentado meio DMEM enriquecido com soro fetal bovino até obter volume final de 1 mL.

#### 4.5.2 Adição das amostras a cultura celular

Após distribuição das células nos poços (Fig.11), estas foram ativadas com 30  $\mu$ L de cada amostra coletada dos canais radiculares (Oliveira et al., 2005; 2007) e uma placa contendo apenas cultura celular (controle negativo), onde não foi colocado nenhuma amostra coletada. As placas foram mantidas a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>). Após 24 horas, os sobrenadantes foram removidos e submetidos à detecção e quantificação de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) pelo teste imunoenzimático (ELISA).



Figura 11 – Distribuição das células na placa de 24 poços que foram ativadas com 30  $\mu$ L de amostra coletada dos canais radiculares.

#### 4.6 Quantificação de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) - Teste imunoenzimático (ELISA)

Para realizar a detecção e quantificação de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) através do teste ELISA foram utilizados Kits comerciais *DuoSet ELISA Development System* para TNF- $\alpha$  (catálogo DY410), IL-1 $\beta$  (catálogo DY401) e para IL-6 (catálogo DY406) (R&D, Systems, Minneapolis, EUA)



Figura 12 – Kit para dosagem de citocinas.

Após diluição dos anticorpos de captura, anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$  e anti-IL-6 em PBS, foram adicionados imediatamente 100  $\mu$ L por poço em placas de microtitulação de 96 poços (Greiner-BioOne, Bélgica) para cada citocina e deixadas em temperatura ambiente *overnight* recobertas por filme plástico.

Posteriormente, o conteúdo foi removido dos poços e estes foram lavados com 300  $\mu$ L de Tampão de Lavagem (PBS acrescido de 0,05% de *Tween* 20) por três vezes com auxílio de pipetador multicanal. Após a terceira lavagem foram adicionados em cada poço 300  $\mu$ L de Tampão de Bloqueio (PBS com 1% de soro albumina bovina, BSA) e as placas foram deixadas em temperatura ambiente por uma hora.

Passado período de incubação os procedimentos de lavagem foram repetidos, posteriormente foram adicionados nas placas 100  $\mu$ L do padrão de citocinas para IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (curva-padrão), 100  $\mu$ L das amostras de sobrenadantes obtidos após exposição ao conteúdo coletado do canal radicular e também 100  $\mu$ L do sobrenadante obtidos no grupo controle negativo (cultura celular). Os testes foram feitos em duplicata para cada amostra (Figura 14). As placas foram incubadas por duas horas em temperatura ambiente.

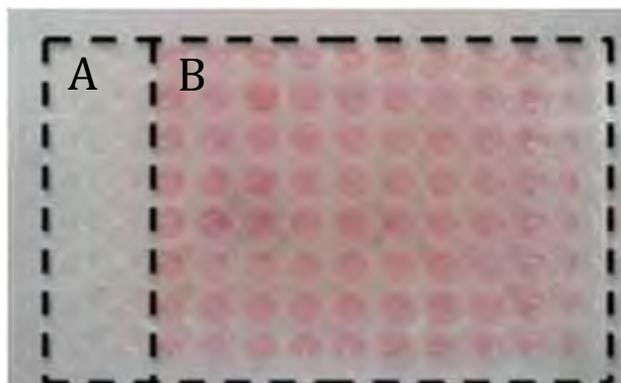


Figura 13 - Distribuição das amostras na microplaca de 96 poços para teste ELISA, após sensibilização com anticorpos de captura; A) Curva-padrão de citocinas; B) Adição do sobrenadante adquirido do contato das células com o conteúdo coletado do canal radicular (n=10) distribuídos em duplicata.

Após os procedimentos de lavagem, foram acrescentados em cada poço das placas 100  $\mu$ L de anticorpo de detecção (anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-6) marcado com biotina. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por duas horas. Novas lavagens foram feitas e logo após foram adicionados em cada poço 100  $\mu$ L de estreptavidina conjugada com enzima peroxidase. As placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas em temperatura ambiente por 20 minutos.

Após os procedimentos de lavagem foram adicionados em cada poço 100  $\mu$ L da solução de substrato cromogênico, composto por Reagente A (peróxido de hidrogênio) e Reagente B (tetrametilbenzidina) na proporção de 1:1 (Figura 14A). As placas foram

incubadas, recobertas com papel alumínio, à temperatura ambiente por 20 minutos.

Logo após, foram adicionados 50  $\mu$ L da Solução de Parada (ácido sulfúrico 2N) (Figura 14B). As placas foram imediatamente levadas ao leitor de microplacas, para obtenção das densidades ópticas DO de cada poço, no comprimento de onda de 450 nm.

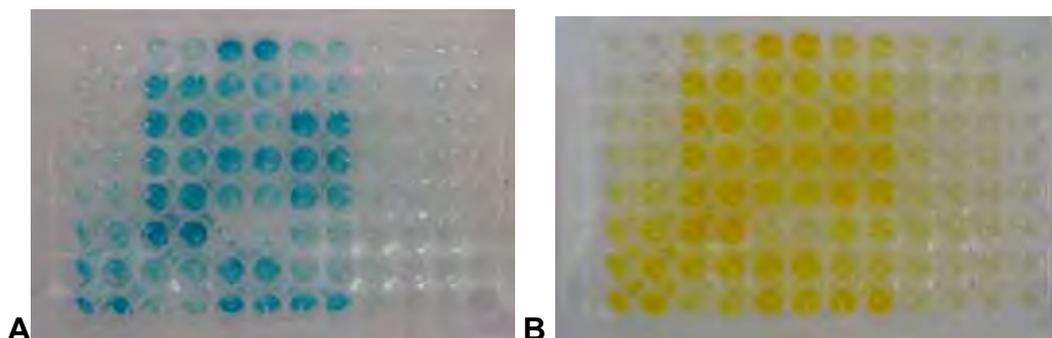


Figura 14 - A) Reação revelada com substrato cromogênico após incubação das amostras com anticorpo de detecção marcado com biotina; B) Bloqueio da reação revelada com adição do ácido sulfúrico 2N.

As densidades ópticas (DO) foram lidas no leitor de microplacas (Biotek) com comprimento de onda de 450 nm. Após obtenção das densidades ópticas, os níveis de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) (pg/mL) presentes nos sobrenadantes das culturas de macrófagos foram determinados utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

#### 4.7 Análise estatística

Todos os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância ANOVA, complementado pelo teste de Kruskal-Wallis, e teste de Dunn 5% a fim de verificar as diferenças estatísticas significantes entre grupos. O nível de significância foi de 5% ( $p \leq 0,05$ ). A análise estatística foi realizada através do programa BioEstat 5.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Produção de IL-1 $\beta$

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados das concentrações de IL-1 $\beta$  (pg/mL) dos sobrenadantes de culturas de macrófagos de camundongo após exposição por 24 horas, que foram estimulados pelo conteúdo coletado dos canais radiculares após preparo biomecânico dos grupos tratados com às substâncias químicas auxiliares

- a) grupo NaOCl: solução de hipoclorito de sódio 1%
- b) grupo CLX: Clorexidina gel 2%
- c) grupo SS: Solução Salina Fisiológica Apirogênica
- d) grupo PRO: Extrato Glicólico de Própolis 12%

Nas Tabela 2 e 3 seguem os valores médios  $\pm$  desvios-padrão, medianas e grupos homogêneos destes resultados obtidos.

Os dados foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis, onde foi visualizada diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados ( $p$ -valor = 0,0001 < 0,05). Em seguida, foi realizado o teste de Dunn (5%).

Tabela 1 -Valores médios de IL-1 $\beta$  (pg/mL) presentes nos sobrenadantes das culturas de macrófagos estimulados pelo conteúdo dos canais radiculares após preparo biomecânico com os irrigantes utilizados, bem como o grupo controle celular

Amostras (n)	GRUPOS				
	CO	SS	CLX	PRO	NaOCl
1	47,37176	91,12666	223,7244	0	30,98195
2	91,12666	91,12668	265,1437	0	44,13527
3	17,43602	47,37176	271,736	0	37,60239
4	24,26371	63,29499	242,5665	0	30,98195
5	17,43602	78,86464	255,379	0	17,43602
6	10,48553	118,2917	223,7244	0	44,13527
7	10,48553	157,0764	169,0227	0	34,30372
8	13,97704	56,97383	268,4312	0	10,48553
9	17,43602	97,20669	275,0588	0	30,98195
10	17,43602	53,79008	205,2457	0	44,13527

**NaOCl:** Solução de hipoclorito de sódio 1%, **CLX:** Clorexidina gel 2%, **SS:** Solução Salina Fisiológica Apirogênica, **PRO:** Extrato Glicólico de Própolis 12% **CO:** Controle de células

Tabela 2 - Valores mínimos, máximos, medianas e quartis obtidos na produção de IL-1 $\beta$  (pg/mL) por macrófagos após 24 horas de exposição ao conteúdo do canal radicular

Amostra	mínimo	Q1	mediana	Q3	máximo
Controle	10.49	13.10	17.44	30.04	91.13
SS	47.4	56.2	85.0	102.5	157.1
CLX	169.0	219.1	249.0	269.3	275.1
PRO	0	0	0	0	0
NaOCl	10.49	27.60	32.64	44.14	44.14

**NaOCl:** Solução de hipoclorito de sódio 1%, **CLX:** Clorexidina gel 2%, **SS:** Solução Salina Fisiológica Apirogênica, **PRO:** Extrato Glicólico de Própolis 12% **CO:** Controle de células

Tabela 3 - Valores médios, desvios-padrão obtidos na produção de IL-1 $\beta$  (pg/mL) de cada grupo estudado e disposição dos grupos homogêneos

<b>Grupos</b>	<b>n</b>	<b>média (pg/ml)</b>	<b>Desvio-Padrão</b>	<b>Grupos Homogêneos</b>
CLX	10	240.0	34.5	A
SS	10	85.5	33.7	AB
NaOCl	10	32.52	11.32	BC
Controle	10	26.75	24.98	C
PRO	10	0	0	D

**NaOCl:** Solução de hipoclorito de sódio 1%, **CLX:** Clorexidina gel 2%, **SS:** Solução Salina Fisiológica Apirogênica, **PRO:** Extrato Glicólico de Própolis 12% **CO:** Controle de células

No presente estudo temos os valores médios da quantidade de IL-1 $\beta$ , obtidos pelas soluções irrigadoras testadas, observamos que os grupos NaOCl e PRO foram estatisticamente inferiores ao grupo SS e CLX ( $p < 0.05$ ). Havendo diferença estatística entre os grupos experimentais.

## 5.2 Produção de IL-6

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados das concentrações de IL-6 (pg/mL) do sobrenadantes de culturas de macrófagos de camundongo após exposição por 24 horas, que foram estimulados pelo conteúdo coletado dos canais radiculares após preparo biomecânico dos grupos tratados com às substâncias químicas auxiliares

- a) grupo **NaOCl:** solução de hipoclorito de sódio 1%
- b) grupo **CLX:** Clorexidina gel 2%
- c) grupo **SS:** Solução Salina Fisiológica Apirogênica

**d) grupo PRO:** Extrato Glicólico de Própolis 12%.

Nas Tabelas 5 e 6 seguem os valores médios  $\pm$  desvios-padrão, medianas e grupos homogêneos destes resultados obtidos.

Os dados foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis, onde foi visualizada diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados ( $p$ -valor = 0,0001 < 0,05). Em seguida, foi realizado o teste de Dunn (5%).

Tabela 4 -Valores médios de IL-6 (pg/mL) presentes nos sobrenadantes das culturas de macrófagos estimulados pelo conteúdo dos canais radiculares após preparo biomecânico com os irrigantes utilizados, bem como o grupo controle celular

Amostras (n)	GRUPOS				
	CO	SS	CLX	PRO	NaOCl
1	0	6,213025	17,62367	0	0
2	0	8,700325	15,92363	0	2,758308
3	0	0,6355083	18,1352	13,72508	0,6355083
4	0	1,2874	1,2874	2,430942	13,21956
5	0,7983751	40,46165	8,035428	17,62367	7,205963
6	1,2874	19,84538	21,2192	10,20068	8,533991
7	0,3099864	36,49662	23,28947	0,7983751	13,72508
8	1,940425	1,2874	0,6355083	0,4727121	1,777063
9	0,9613127	2,267364	4,728532	1,45055	10,20068
10	1,124321	0,4727121	23,63564	11,03681	4,728532

**NaOCl:** Solução de hipoclorito de sódio 1%, **CLX:** Clorexidina gel 2%, **SS:** Solução Salina Fisiológica Apirogênica, **PRO:** Extrato Glicólico de Própolis 12% **CO:** Controle de células

Tabela 5 - Valores mínimos, máximos, medianas e quartis obtidos na produção de IL-6 (pg/mL) por macrófagos após 24 horas de exposição ao conteúdo do canal radicular

Grupos	mínimo	Q1	mediana	Q3	máximo
Controle	0	0	0.55	1.16	1.94
SS	0.47	1.12	4.24	24.01	40.46
CLX	0.64	3.87	16.77	21.74	23.64
PRO	0	0.35	1.94	11.71	17.63
NaOCl	0	1.49	5.97	10.96	13.73

**NaOCl:** Solução de hipoclorito de sódio 1%, **CLX:** Clorexidina gel 2%, **SS:** Solução Salina Fisiológica Apirogênica, **PRO:** Extrato Glicólico de Própolis 12% **CO:** Controle de células

Tabela 6 - Valores médios, desvios-padrão obtidos na produção de IL-6 (pg/mL) de cada grupo estudado e disposição dos grupos homogêneos

Grupos	n	média (pg/ml)	Desvio-Padrão	Grupos Homogêneos
CLX	10	13.45	8.97	A
SS	10	11.77	15.28	AB
NaOCl	10	6.28	5.07	AB
PRO	10	5.77	6.67	AB
Controle	10	0.642	0.685	B

**NaOCl:** Solução de hipoclorito de sódio 1%, **CLX:** Clorexidina gel 2%, **SS:** Solução Salina Fisiológica Apirogênica, **PRO:** Extrato Glicólico de Própolis 12% **CO:** Controle de células

Os valores médios da quantidade de IL-6 (pg/ml) obtidos entre as soluções irrigadoras testadas NaOCl e PRO foram estatisticamente inferiores ao grupo SS e CLX ( $p < 0.05$ ). Havendo diferença estatística entre os grupos experimentais.

### 5.3 Produção de TNF- $\alpha$

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados das concentrações de TNF- $\alpha$  (pg/mL) do sobrenadantes de culturas de macrófagos de camundongo após exposição por 24 horas, que foram estimulados pelo conteúdo coletado dos canais radiculares após preparo biomecânico dos grupos tratados com às substâncias químicas auxiliares

**a) grupo NaOCl:** solução de hipoclorito de sódio 1%;

**b) grupo CLX:** Clorexidina gel 2%;

**c) grupo SS:** Solução Salina Fisiológica Apirogênica;

**d) grupo PRO:** Extrato Glicólico de Própolis 12%;

Nas Tabelas 8 e 9 seguem os valores médios  $\pm$  desvios-padrão, medianas e grupos homogêneos destes resultados obtidos.

Os dados foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis, onde foi visualizada diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados ( $p$ -valor = 0,0001 < 0,05). Em seguida, foi realizado o teste de Dunn (5%).

Tabela 7 - Valores médios de TNF- $\alpha$  (pg/mL) presentes nos sobrenadantes das culturas de macrófagos estimulados pelo conteúdo dos canais radiculares após preparo biomecânico com os irrigantes utilizados, bem como o grupo controle celular

Amostras (n)	GRUPOS				
	CO	SS	CLX	PRO	NaOCl
1	187,4169	1430,93	850,6461	441,4254	1514,696
2	192,3232	1294,807	205,3121	1311,628	927,5107
3	142,348	480,4094	1384,478	1701,168	2000
4	95,51787	563,4104	1510,388	1122,561	1109,032
5	197,21	1579,375	603,5637	1022,703	1563,787
6	238,7789	679,2577	917,3896	473,7542	1393,373
7	237,2052	1002,574	1569,977	2000	2000
8	254,4101	2000	612,242	900,4909	1398,484
9	263,6985	633,1707	504,1518	732,7459	2000
10	259,0626	794,4974	1456,242	1423,06	1049,552

**NaOCl:** Solução de hipoclorito de sódio 1%, **CLX:** Clorexidina gel 2%, **SS:** Solução Salina Fisiológica Apirogênica, **PRO:** Extrato Glicólico de Própolis 12% **CO:** Controle de células

Tabela 8 - Valores mínimos, máximos, medianas e quartis obtidos na produção de TNF- $\alpha$  (pg/mL) por macrófagos após 24 horas de exposição ao conteúdo do canal radicular

Grupos	mínimo	Q1	mediana	Q3	máximo
Controle	95.5	176.1	217.2	255.6	263.7
SS	480	616	899	1468	2000
CLX	205	579	884	1470	1570
PRO	441	668	1073	1493	2000
NaOCl	928	1094	1457	2000	2000

**NaOCl:** Solução de hipoclorito de sódio 1%, **CLX:** Clorexidina gel 2%, **SS:** Solução Salina Fisiológica Apirogênica, **PRO:** Extrato Glicólico de Própolis 12% **CO:** Controle de células

Tabela 9 - Valores médios, desvios-padrão e medianas obtidos na produção de TNF- $\alpha$  (pg/mL) de cada grupo estudado e disposição dos grupos homogêneos

Grupos	n	média (pg/ml)	Desvio-Padrão	Grupos Homogêneos
NaOCl	10	1496	403	A
PRO	10	1113	508	A
SS	10	1046	509	A
CLX	10	961	488	A
Controle	10	206.8	55.2	B

**NaOCl:** Solução de hipoclorito de sódio 1%, **CLX:** Clorexidina gel 2%, **SS:** Solução Salina Fisiológica Apirogênica, **PRO:** Extrato Glicólico de Própolis 12% **CO:** Controle de células

Com a citocina TNF- $\alpha$  todos os grupos experimentais, hipoclorito de sódio 1% (média= 1496 pg/mL), Extrato glicólico de Propópolis 12% (média= 1113 pg/mL), Clorexidina Gel 2% (média= 961 pg/mL), solução fisiológica apirogênica (média=1046pg/mL) foram estatisticamente semelhantes entre si ( $p>0,05$ ). Não havendo diferença estatística entre os grupos experimentais, diferindo apenas do grupo controle.

## 6 DISCUSSÃO

A solução irrigadora ideal deve exibir potente ação antimicrobiana, ter capacidade de dissolver material orgânico, ser lubrificante, apresentar baixa tensão superficial e não apresentar efeitos citotóxicos para os tecidos perirradiculares. Assim, a escolha de uma solução irrigadora não é aleatória, deve estar relacionada com o caso em questão, para se obter o melhor resultado quanto à limpeza e desinfecção. É muito importante que o profissional tenha conhecimento das propriedades químicas das soluções irrigadoras para selecioná-la e utilizá-la da melhor maneira possível, em cada caso em particular (Câmara et al., 2010). As soluções irrigadoras testadas possuem alguns desses requisitos, conforme pesquisas realizadas (Berber 2005, Borin et al., 2007, Câmara et al., 2010, Fabro et al., 2010, Rôças, Siqueira Jr. 2011; Oliveira et al., 2012).

Encontra-se na literatura, estudos comparativos entre soluções irrigadoras (Gomes et al., 2001, Berber, 2005, Borin et al., 2007, Fabro et al., 2010) afim de analisar e avaliar os efeitos no tratamento do sistema de canais radiculares, porém são poucos os estudos que conseguiram avaliar os efeitos citotóxicos do *ácido lipoteicóico* (LTA) de *Enterococcus faecalis*, devido a dificuldade na preparação do LTA puro e estruturalmente onde era muitas vezes contaminado (Gao et al., 2001) ou estruturalmente danificados (Morath et al., 2002) durante a depuração. Recentemente, LTA purificado de alta qualidade de *Enterococcus faecalis*, foi produzido usando um método melhorado (Baik et al., 2008).

Pesquisas comprovaram que o LTA está envolvido na resposta inflamatória, síndrome séptica e na formação de biofilme,

proporcionando resistência bacteriana (Ciardi et al., 1977, Sugiyama et al., 1996, Han et al., 2006, Fabretti et al., 2006, Baik et al., 2008). Os macrófagos, células que participam da resposta inflamatória e diversas outras células do organismo, em resposta a um estímulo ativador, secretam pequenas proteínas, chamadas de citocinas. A ação destas citocinas tem início após a ligação a receptores específicos que provocam alterações à diferentes células do organismo. Elas podem agir no local onde são sintetizadas no organismo ou ter ação distante, quando são secretadas e destinadas à circulação. Estes mediadores da resposta inflamatória podem ser interleucinas, como IL-1 $\beta$ ; IL-6; IL-12, e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), dentre outros, (Kraychete et al., 2006).

No presente estudo as citocinas utilizadas foram, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , que são responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos que induz a expressão da molécula de adesão endotelial e posterior migração para os tecidos. E para quantificação de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  foram utilizados os kits para reação de ELISA do fabricante R & D System (Minneapolis, EUA), pois vários estudos publicados em periódicos internacionais com seletiva política editorial utilizam estes kits para dosar citocinas (Park et al., 2005; Sheeja, Kuttan, 2010; Shih et al., 2010).

As citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  estão presentes, por exemplo, na regulação da reabsorção óssea, como ocorre na região periapical (Stashenko et al., 1998; Lee et al., 2007), são marcantes na patogênese de alterações teciduais, como dos tecidos pulpares e periapicais (Hong et al., 2004), conduzem reações de destruição tecidual da polpa e periápice (Lin et al., 2001), estimulam a secreção de enzimas que degradam componentes da matriz extracelular – as metaloproteinases da matriz (MMP) – (Bodet et al., 2007) levando ao processo de destruição tecidual (Takahashi, 1998; Sorsa et al., 2004). No que diz respeito a IL-6, atua tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, sendo sintetizada por várias células (linfócitos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos,

músculo-esqueléticas, dentre outras) e ativada pela via de sinalização, em resposta a microrganismos e outras citocinas IL-1 e TNF.

Em relação a IL-1 $\beta$  neste estudo, o resultado entre as soluções irrigadoras testadas, os grupos HIP e PRO foram estatisticamente inferiores ao grupo CLX e SS solução fisiológica apirogênica 0,9% ( $p < 0.05$ ) confirmando a efetividade na neutralização do ácido lipoteicóico de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares (Heling et al 1998, Gomes et al 2001). A produção de IL-1 $\beta$  foi mais baixa em todos os casos em relação à produção de TNF-a, demonstrando menor sensibilidade da célula em produzir IL-1 $\beta$ . Estes resultados concordaram com o estudo de Hong et al. (2004), que verificaram que os níveis de IL-1 $\beta$  sintetizados por macrófagos de camundongos (linhagem J774) estimulados por LPS (concentração 1EU/mL) foram insignificantes quando comparado com os altos níveis de TNF-a e IL-1a produzidos. Com isso, pode-se verificar que para a produção de IL-1 $\beta$ , é necessária uma quantidade bastante alta de LTA, para ocorrer uma produção expressiva de IL-1 $\beta$ .

A atividade biológica da IL-6 é muito diversa pois pode realizar: a diferenciação de células B em células plasmáticas, ativar células T, e liberar proteínas de fase aguda pelos hepatócitos e ainda ativar a cascata do sistema complemento (Revel, 1989). De importância particular, é a capacidade de IL-6 para induzir a reabsorção óssea, tanto sozinho e sinergicamente com IL-1 $\beta$  (Ishimi et al., 1990), um fato que tem sido demonstrado em *in vitro* (Mundy, 1991).

Neste estudo a IL-6, apresentou os resultado entre as soluções irrigadoras testadas, sendo que os grupos HIP e PRO estatisticamente inferiores aos grupos CLX e SS ( $p < 0.05$ ) confirmando a efetividade na neutralização do ácido lipoteicóico de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares. A produção de IL-6 foi a mais baixa em todos os casos em relação à produção de TNF-a e IL-1 $\beta$  demonstrando

menor sensibilidade da célula em produzir IL-6. As diferenças podem ter ocorrido também em função do tempo de análise, já que algumas citocinas tem tempo de meia-vida menor que outras (Loisa et al., 2003).

O TNF- $\alpha$  é um mediador importante encontrado em doenças inflamatórias graves que são produzidos pelos macrófagos que são ativadas pelo LTA (Baik et al 2008). Com a citocina TNF- $\alpha$  neste estudo todos os grupos experimentais, hipoclorito de sódio 1% (média= 1496 pg/mL), Extrato glicólico de Propólis 12% (média= 1113 pg/mL), Clorexidina Gel 2% (média= 961 pg/mL), solução fisiológica apirogênica (média=1046pg/mL) foram estatisticamente semelhantes entre si ( $p>0,05$ ). Pode-se observar que todos os grupos avaliados induziram alta produção de TNF-a, com amostras de 2000 pg/mL, ponto máximo de referência da curva-padrão. Assim, pode-se verificar que a produção de TNF-a é mais sensível à presença de ácido lipoteicóico (LTA) que IL-1 $\beta$  e IL-6 concordando com Hong et al. (2004), pois no atual estudo, após instrumentação dos canais radiculares, todos os grupos apresentaram valores médios de citocinas superiores a 961pg/ml(TNF- $\alpha$ ) de modo que as células foram estimuladas a produzir grandes quantidades de TNF- $\alpha$ , demonstrando importante efeito citotóxico do conteúdo coletado dos canais radiculares após instrumentação.

A semelhança no resultado obtido entre as soluções irrigadoras e o controle deve-se pelo fato que o preparo biomecânico consiste de meios físicos, químicos e mecânicos. O meio mecânico também contribui para uma limpeza mesmo que pequena do conteúdo necrotico e no nosso estudo provavelmente pode ter sido aumentada pelo uso do sistema de BioRaCe (FKG Dentaire, Lachaux-defonds,Switzerland), um sistema que emprega uma seqüência baseada no conhecimento do diâmetro anatômico dos canais radiculares com intuito de minimizar o número de limas requeridas reduzindo o estresse sobre cada instrumento, possibilitando um preparo apical com diâmetro

maior, com segurança, maior eficiência da solução irrigadora principalmente no terço apical, área crítica para controle da infecção endodôntica. Quanto as soluções irrigadoras o hipoclorito de sódio 1% e extrato glicólico de própolis mostraram resultados satisfatórios combatendo o LTA de *E. faecalis* reduzindo a produção de IL-1 e IL-6. Por outro lado a clorexidina gel 2% mostrou resultados satisfatórios combatendo o LTA de *E. Faecalis* apenas para a produção de TNF- $\alpha$ . Sabemos que as substâncias irrigadoras testadas como o hipoclorito de sódio já é bastante utilizado na prática endodôntica (Tanomaru Filho et al., 2005) e é devido as suas propriedades antimicrobianas e de dissolução de matéria orgânica, já elucidadas na literatura, que se comprovam neste estudo.

E a mesma atividade antimicrobiana observamos no extrato de própolis, que já foi verificada por outros autores (Koo et al., 2000a; Ferreira et al., 2007; Onçag et al. 2006) que também verificaram a efetividade da própolis sobre *E. faecalis* como medicação intracanal durante 10 dias e, Awawdeh et al. (2009), verificaram que a própolis foi significativamente mais efetiva que o hidróxido de cálcio após pequeno tempo de exposição (1 e 2 dias). Molina (2008) e Valera et al. (2010) utilizando o extrato glicólico da própolis 12% como solução irrigadora durante o preparo biomecânico, verificaram, *in vitro*, a completa eliminação de *E. coli* inoculados em canais radiculares.

Por muito tempo a clorexidina foi considerada não tóxica aos tecidos, sendo biocompatível (Ferreira et al., 2002; Menezes et al., 2004; Leonardo, 2005; Tanomaru Filho et al., 2005; D'Arcangelo et al., 2007; Ferraz et al., 2007). No entanto, estudos recentes em cultura celular ou por meio de inoculação em subcutâneo de ratos (Lessa et al., 2010; Monteiro et al., 2011) têm mostrado relação positiva entre toxicidade celular e concentração da substância. Entretanto, embora apresente ação antimicrobiana, a clorexidina apresenta pequena atividade sobre

endotoxinas presentes em canais radiculares, como já foi demonstrado por alguns estudos (Oliveira et al., 2005; Gomes et al., 2009), tornando mais interessante a busca por substâncias alternativas para uso na prática clínica.

Entretanto, apesar de vários autores verificarem que a própolis possui atividade antimicrobiana, o real mecanismo da ação antimicrobiana parece ser complexo e ainda não é completamente entendido (Koo et al., 2000b). Isto deve ao fato da composição da própolis depender da flora da região onde é produzida. De acordo com o fabricante, o extrato de própolis utilizado neste estudo contém própolis verde e marrom, não sendo possível especificar exatamente a composição deste extrato. Ainda, a empresa fabricante realiza uma avaliação prévia das própolis de várias regiões do Brasil, existindo uma fórmula padrão interna com quantidade mínima de flavonóides totais na sua composição final (5,0 mg/ml). Alguns autores atribuem aos flavonóides à maior capacidade de atuarem como agentes antimicrobianos (Grange, Davey, 1990; Burdock, 1998; Koo et al., 2000a).

Lembrando ainda que a solução fisiológica apirogênica, não deve ser utilizado como solução irrigadora alternativa, pois a mesma não tem estudos que comprovem a sua eficácia na neutralização isoladamente, possuindo apenas a ação mecânica do preparo biomecânico na limpeza do canal radicular (Fabro et al., 2010).

Contudo, de acordo com todos os parâmetros de citotoxicidade avaliados neste estudo, o extrato glicólico de Propólis 12% foi efetivo para todas as citocinas, foi o que apresentou maior capacidade em neutralizar o LTA de *E. faecalis*, com produção de citocinas semelhante ou menor que o controle e viabilidade celular. Assim, é bastante promissora a utilização antimicrobiana deste extrato nas diversas áreas da saúde, incluindo a odontológica, como irrigantes dos canais radiculares, entre outras. No entanto, o extrato avaliado deve ter

seus estudos ampliados, especialmente no que se refere ao possível efeito anti-inflamatório, a fim de ampliar a utilização terapêutica deste fitoterápico. Estas respostas devem ser objetos de estudo futuros, especialmente estudos clínicos longitudinais para melhor compreensão dos mecanismos de manutenção das lesões periapicais.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados neste estudo, pode-se concluir que:

- a) O preparo do canal radicular com as soluções irrigadoras e/ou substância química auxiliar: Hipoclorito de sódio 1%, Extrato de Própolis 12%, foram eficazes em neutralizaram o ácido lipoteicóico (LTA) de *E. faecalis* em canais radiculares quando comparadas com o grupo da solução salina fisiológica aprotogênica 0,9% (controle);
- b) Para o grupo Clorexidina gel 2%, a produção de citocinas (Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleucina-6 (IL-6), foi maior do que nos demais grupos mostrando-se menos efetiva que as demais soluções. Porém todas as substâncias utilizadas neste estudo mostraram-se semelhantes em relação a citocina Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), obtendo um resultado estatisticamente significativo em relação a produção da citocina por macrófagos ativados (RAW 264.7);
- c) O grupo Extrato de Própolis 12%, foi o grupo que apresentou menor produção de citocinas semelhante ou menor que o controle e viabilidade celular.

## 8 REFERÊNCIAS\*

Araújo CJR, Souza VS, Rios MA, Albuquerque DS, Baratto Filho F, Limongi O. Capacidade de dissolução tecidual do hipoclorito de sódio em diferentes concentrações. Rev ABO nac. 2006;14(4): 237-241,.

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

Awawdeh L, Al-Beitawi M, Hammad M. Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: A laboratory study. Aust Endod J. 2009;35(2):52-8.

Baik JE, Kum KY, Yun CH, Lee JK, Lee K, Kim KK, et al. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2008;34(11):1355-9.

Bankova V, Christor R, Kujumgliev A, Marucai MC, Popov S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Zeit für Nat.* 1995; 50(12):167-172 .

Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phyt Res.* 2001;15:561-71

Barkordar RA, Ghani P, Russel TR, Hussain MZ. Interleukin-1 activity and collagen synthesis in human dental pulp fibroblasts. J Endod. 2002; 28(3): 157-59.

---

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

Barkordar RA, Ghani P, Russel TR, Hussain MZ. Interleukin-1 activity and collagen synthesis in human dental pulp fibroblasts. *J Endod.* 2002;28(3):157-9.

Baumgartner JC, Brown CM, Mader CL, Peters DD, Schulman JD. A scanning electron microscopic evaluation of root canal debridement using saline, sodium hypochlorite, and citric acid. *J Endod.* 1984;10(11):525-532.

Beachey EH, Chiang TM, Ofek I, Kang AH. Interaction of lipoteichoic acid of group A streptococci with human platelets. *Infect Immun.* 1977;16(2):649-54.

Beachey EH, Dale JB, Simpson WA, Evans JD, Knox KW, Ofek I et al. Erythrocyte binding properties of streptococcal lipoteichoic acids. *Infect Immun.* 1979;23(3):618-25.

Berber VB. Verificação da redução do *Enterococcus faecalis* no canal radicular e nos túbulos dentinários utilizando diferentes substâncias químicas e técnicas de instrumentação [dissertação] Piracicaba (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2005.

Berg JD, Roberts PV, Martin A. Effect of chlorine dioxide on selected membrane functions of *Escherichia coli*. *J Appl Bacteriol.* 1986; 60(3):213-20.

Bloomfield SF, Miles GA. The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations. *J Appl Bacterio.* 1979;46(1):65-73.

Bodet C, Andrian E, Tanabe S, Grenier D. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide regulates matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of matrix metalloproteinase, and plasminogen activator production by human gingival fibroblasts: a potential role in connective tissue destruction. *J Cell Physiol.* 2007;212(1):189-94.

Bombana AC, Paiva JG, Alvares S, Antoniazzi JH. Reação inflamatória do olho de coelho que se segue à instilação de alguns fármacos de uso endodôntico. Rev Assoc Paul Cir Dent. 1974;28(4):216-23.

Borin G, Becker AN, Oliveira APM. A história do Hipoclorito de sódio e a sua importância como substância auxiliar no preparo químico mecânico de canais radiculares. Rev de Endo Pesq. Ens. On line 2007[periódico na internet]. 2007 Jan Jun [citado 2012Ag 12] 3 (5): [cerca de sp].disponível em : [http:// www.ufsm.br/endodontiaonline](http://www.ufsm.br/endodontiaonline).

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

Câmara AC, Albuquerque MM, Aguiar CM. Soluções Irrigadoras Utilizadas para o Preparo Biomecânico de Canais Radiculares: Pes Bras Odont Clín Int. 2010;127-133.

Carson KR, Goodell GG, McClanahan SB. Comparison of the antimicrobial activity of six irrigants on primary endodontic pathogens. J Endod. 2005 Jun;31(6):471-3.

Carvalho AS, Camargo CH, Valera MC, Camargo SE, Mancini MN. Smear layer removal by auxiliary chemical substances in biomechanical preparation: a scanning electron microscope study. J Endod. 2008 Nov; 34(11):1396-400.

Castaldo S, Capasso F. Propolis: an old remedy used in modern medicine. Fitoter. 2002;73(1):1-6.

Chavez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. J Endod. 2007;33:652– 62.

Chlebicki MP, Safdar N. Topical chlorhexidine for prevention of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis. Crit Care Med. 2007;35:595- 602.

Chu, GT; Fleury, AAP; Murray, P; Flax, MD The ability of diferente concentrations of NaOCL to dissolve and reduce the weight of bovine pulp tissue in vitro. J. Endod.2004; 30, (4):274

Ciardi JE, Rolla G, Bowen WH, Reilly JA. Adsorption of Streptococcus mutans lipoteichoic acid to hydroxyapatite. Scand J Dent Res 1977; 85:387–91.

Costa-Junior ED; Souza-Filho FJ; Barbosa SV Tissue reactions to a componente of root canal system bactéria: Lipoteichoic acid.2003 Braz Dent J 14(2) .

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

Dametto FR, Ferraz CC, Gomes BPA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza- Filho FL. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005;99(6):768-72.

Debuyser E.; La Propolis, These pour le diplome detat de Docteur en pharmacie, Faculte de Pharmacie, Universitá de Nantes, 1983, França 82p

Duarte S et al. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. Biol Pharm Bull. 2003;26:527-31.

Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE et al. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. Arch Oral Biol. 2005; (1):15-22.

Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. J Endod 2007; 33:815– 8.

El-Karim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007;103(4):560-9.

Elenkov, I. J. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. Ann N Y Acad Sci [S.I.] 2004; 1024: 38-46.

Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. Braz Dent J. 2002;13(2):113-7.

Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CR, Pécora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. Braz Dent J. 2003;14(1):58-62.

Fabretti F, Theilacker C, Baldassarri L, et al. Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. Infect Immun 2006;74:4164 –71.

Fabro RMN, Britto MLB; Nabeshima CK. Comparação de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e soro fisiológico utilizados como soluções irrigadoras Odontol. Clin-Cient Recife 2010

Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. Braz Dent J. 2007;18(4): 294-298

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

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

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

Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiology and Immunology* 2003; 18, 234–9.

Filgueiras JL, Cançado RP, Silva CHPM, Salim MAA. Avaliação do efeito imediato e residual do sabão anti-séptico, do PVP-I degermante, do PVP-I tópico e da clorexidina na degermação das mãos. *Rev Bras Odontol* 2004;61:195-198.

Forsey, R. *et al.* Plasma cytokine profiles in elderly humans. *Mech. Ageing. Dev* 2003; 124:487-93.

Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8 ( 2): 3.

Gao JJ, Xue Q, Zuvanich EG, Haghi KR, Morrison DC. Commercial preparations of lipoteichoic acid contain endotoxin that contributes to activation of mouse macrophages in vitro. *Infect Immun* 2001;69:751–7.

Gazivoda D, Dzopalic T, Bozic B, Tatomirovic Z, Brkic z, Colic M. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *J Oral Pathol Med.* 2009; 38:605-11.

Ghisalberti, EL. Propolis: a review. *Bee World*. 1979;60:59-84.

Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:171–9.

Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod*. 2009 Oct;35(10):1350-3.

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.

Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod* 2008;34:537–40.

Gomes, BPF et al. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J, Oxford* 2001; 34(6): 424-428

Grange JM, Davey RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J R Soc Med*. 1990 Mar;83(3):159-60.

Grossman, L.I. Irrigation of root canals. *J Amer Dent Assoc*, 1943; 30(12):1915-1917,

Gulabivala K, Patel B., Evans G. Effects of mechanical and chemical procedures on root canal surfaces. *Endodontic Topics*. 2005;10:103-22.

Hahn CL, Liewehr FR. Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. *J Endod* 2007;33:213–9.

Han SH, Kim JH, Seo HS, et al. Lipoteichoic acid-induced nitric oxide production depends on the activation of platelet-activating factor receptor and Jak2. *J Immunol* 2006;176:573–9.

Hehlgans T., e Pfeffer, K \_ The intriguing biology of the tumor necrosis fator/ tumour necrosis fctor recsptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005; 115(1):1-20.

Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* 1990;265:621-36.

Heling, I.; Chandler N.P. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *Int. Endod. J.*1998; 31(1):8-14

Hjeljord LG, Rolla G, Bonesvoll P. Chlorhexidine-protein interactions. *J Periodontal Res Suppl.* 1973;12:11-6.

Hong C, Lin S, Kok S, Cheng S, Lee M, Wang T, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med.* 2004;33:162-9.

Hong C, Lin S, Kok S, Cheng S, Lee M, Wang T, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med.* 2004;33:162-9.

Hugo WB, Longworth AR. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J Pharm Pharmacol.* 1964;16:655-62.

Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, *et al.* IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* 1990 145:3297-3303.

Jin MS, Kim SE, Heo J Y, et al .Crystal structure of the TLR1- TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 2007;130:1071– 82.

Johnson BR, Remeikis NA. Effectiveshelf- life of prepared sodium hypochlorite solutions. J Endod., Baltimore 1993; 19(1): 40-43.

Jorge AOC, Koga-Ito CY, Maegi B, Barbosa APP, Komiyama EY. Desinfecção de superfície em odontologia: avaliação do álcool gel 70o INPM, lenços embebidos em solução de clorexidina e spray de cloreto benzalcônio. RGO 2005;53:151-154.

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

Kim SJ, Ha MS, Choi EY, Choi JI, Choi IS. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression induced by *Prevotella nigrescens* lipopolysaccharide. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005; 43(1): 51-8.

Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and *Arnica Montana* against oral pathogens. Arch Oral Biol. 2000(a) Feb;45(2):141-8.

Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Ambrosano GM, Murata RM, Yatsuda R, et al. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on *mutans Streptococci*. Curr Microbiol. 2000(b) Sep;41(3):129-6.

Koru O, Toksoy F, Acikel CH, Tunka YM, Baysallar M, Guclu AU, et al. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. Anaerobe. 2007;13:140-5.

Kraychete DC, Calasans MT, Valente CML, Citocinas Pró- inflamatórias e Dor. Rev. Bras. de Reum 2006; 46(3): 199-206

Ledon N. Casaco A. Gonzalez R. Merino N. Gonzalez A. Tolon Z. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. Acta Pharmacologica Sinica, 1997; 18:274-276

Lee DH, Lim BS, Lee YK, Kim NR, Yang HC. Inhibitory effects of root canal sealers on the expression of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-stimulated murine macrophage cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;83(1):91-6.

Lenet BJ, Komorowski R, Lawrence HP, Friedman S. Antimicrobial substantivity of bovine root dentin exposed to different chlorhexidine delivery vehicles. *J Endod*. 2000 Nov;26(11):652-5.

Leonardo MR, Silva LAB, Leonardo RT. Tratamento de canal radicular em sessão única: crença vs. Ciência São Paulo: Artes Médicas, 2000: 29-57.

Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LAB, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigation solution. *J Endod*. 1999 Mar;25(3):167-71.

Leonardo, M.R. Preparo biomecânico dos canais radiculares In: *Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos*. São Paulo: Artes Médicas, 2005; 1(13): 450-487.

Lessa FC, Aranha AM, Nogueira I, Giro EM, Hebling J, Costa CA. Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *J Appl Oral Sci*. 2010 Feb;18(1):50-8.

Lin SK, Wang C, Huang S, Lee J, Chiang C, Lan W, et al. Induction of dental pulp fibroblast matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene expression by interleukin-1<sub>α</sub> and tumor necrosis factor- $\alpha$  through a prostaglandin-dependent pathway. *J Endod*. 2001;27(3):185-9.

Loisa, P. et al. Anti-inflammatory cytokine response and the development of multiple organ failure in severe sepsis. *Acta Anaesthesiol scand* 2003; 47: 319-25

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

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

Love RM. Enterococcus faecalis – a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001; 34:341-5

Madhubala, M.M.; Srinivasan, N.; Ahamed S.; Comparative evaluation of propolis and triantibiotic mixture as an intracanal medicament. *JOE* 2011; 37(9).

Maekawa LE. Avaliação dos extratos de própolis e de gengibre como medicação intracanal sobre microrganismos e endotoxinas em canais radiculares [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP; 2010.90p.

Maekawa LE. Avaliação *in vitro* da ação de substâncias químicas auxiliares e medicações intracanaís sobre *Escherichia coli* e sua endotoxina em canais radiculares [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP; 2007.106p.

Manzur A, Gonzalez AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. *J Endod* 2007; 33:114–8.

Marcinkiewicz J, Czajkowska B, Grabowska A, Kasproicz A, Kociszewska B. Differential effects of chlorination of bacteria on their capacity to generate NO, TNF-alpha and IL-6 in macrophages. *Immunology* 1994; 83(4):611-6.

Martin MP, Pillegi R. A quantitative analysis of propolis: a promising new storage media following avulsion. *Dent Traumatol.* 2004 Apr;20(2):85-89.

Mattison GD; Haddix JE; Kehoe JC; Progulske-Fox A. The effect of *Eikenella corrodens* endotoxin on periapical bone. *J Endod.* 1987; 13(12): 559-65

McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999 Jan;12(1):147-79.

Menezes H.; Alvarez J.M.; Almeida E. Mouseearedema modulation by different propolis ethanol extracts. *Arzn.* 1999; 49:705-707

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

Michelotto, A L C; Andrade B M; Silva Junior, A; Sydney, GB – Clorexidina na terapia endodôntica *RSBO* 2008; 5, (1).

Molina FP, Majewski M, Perrela FA, Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge AOC. Própolis, sálvia, calêndula e mamona – atividade antifúngica de extratos naturais sobre cepas de *Candida albicans*. *Cienc Odontol Bras.* 2008 Abr./Jun;11(2):86-93.

Molina, F.P. Associação de *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Escherichia coli* em canais radiculares e avaliação dos efeitos de extratos naturais sobre os microrganismos e endotoxinas s.n; 2008. 107 p. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal [São José dos Campos] - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos.

Monteiro ASF, Macedo LGS, Macedo NL, Feitosa FA, Toyoshima T. Biocompatibility of a chlorhexidine local delivery system in a subcutaneous mouse model. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(2):278-84.

Morath S, Geyer A, Spreitzer I, Hermann C, Hartung T. Structural decomposition and heterogeneity of commercial lipoteichoic acid preparations. *Infect Immun* 2002; 70:938–44.

Mullany LC, Darmstadt GL, Khatry SK, Katz J, LeClerq SC, Shrestha S et al. Topical applications of chlorhexidine to the umbilical cord for prevention of omphalitis and neonatal mortality in southern nepal: a community-based, cluster-randomized trial. *Lancet* 2006;367:910-918.

Mundy GR. Inflammatory mediators and the destruction of bone. *J Periodont Res* 1991;26:213-7.

Murakami Y, Hanazawa S, Tanaka S, Iwahashi H, Yamamoto Y, Fujisawa S. A possible mechanism of maxillofacial abscess formation: involvement of *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide via the expression of inflammatory cytokines. *Oral Microbiol Immunol*. 2001; 16(6): 321-5.

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

Oberholzer, A. *et al*. Cytokine signaling: regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med* [S. I.] 2000; 28: 3-12.

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

Oliveira GG Avaliação da resposta inflamatória em tecido conjuntivo de ratos frente ao uso de diferentes soluções irrigadoras [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

Oliveira LD, Carvalho CAT, Carvalho AS, Alves JS, Valera MC, Jorge AOC. Efficacy of Endodontic Treatment for Endotoxin Reduction in Primarily Infected Root Canals and Evaluation of Cytotoxic Effects JOE 2012; 8

Oliveira LD, Carvalho CAT, Valera MC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Efetividade *in vitro* de diferentes agentes irrigantes na neutralização de endotoxinas em canais radiculares. Pesq Odontol Bras.2005;19:166.

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

Oliveira, L.A.; Barbosa, S.V. The Reaction of Dental Pulp to Escherichia coli lipopolysaccharide and *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid. Braz J. of Micro. 2003 34:179-181

Onawunmi GO, Ogunlana EO. A study of the antibacterial activity of the essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citrates*). Int J Crude Drug Res 1986; 24:64-8

Onçag O, Cogulu D, Uzel A, Sorkun K. Efficacy of propolis as na intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. Gen Dent. 2006 Sep-Oct;54(5):319-22.

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

Oppenheim, J. J. Cytokines: past, present, and future. Int J Hematol 2001. 74, (1): 3-8.

Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. Endod Dent Traumatol 1990; 6:142-9

Ozan F, Polat ZA, Er K.; Ozan U; Deger O. Effect of Propolis on Survival of Periodontal Ligament Cells: New Storage Media for Avulsed Teeth. JOE 2007; 33(5).

Ozturk, F; Cerci,M. The effect of propolis extract in experimental chemical corneal injury. Opht Res. 2000; 32: 13-18

Park YK et al. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. Current Microbiol. 1998; 36:24-8.

Park, E. H. Kim, S.H. Park, SS Anti-inflammatory activity of propolis. Arch. of Phar. Res. 1996; 19: 337- 341.

Pécora, J.D. et al. Estudo sobre o shelf-life do hipoclorito de sódio a 5%. Braz Endod J. 1997; 2(1):43-45.

Pécora JD, Souza Neto MD, Estrela C. Soluções auxiliares do preparo do canal radicular. Endodontia: princípios biológicos e mecânicos. São Paulo: Artes Médicas, 1999, cap.16, p. 553-569.

Petersen, A.M.; Pedersen, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. J. App. Physiol 2005; 98:1154-1162.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferras CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza Filho FJ. Microorganisms from canals of root – filled teeth with periapical lesions. Int Endod J 2003; 36 (1):111.

Portenier I, Haapasalo H, Ørstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M (Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. *Journal of Endodontics* 2000; 28:634–7.

Prso IB, Kocjan W, Simic H, Brumini G, Pezelj-Ribaric S, Borcic J, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 in human periapical lesions. Mediators of Inflammation 2007, Article ID 38210: 1-4.

Revel M. Host defense against infections and inflammations: role of the multifunctional IL-6/IFN- $\beta$ 2 cytoquine. *Experientia* 1989;45:549-57.

Reyes, C. S. *et al.* Role of cytokines (interleukin-1 $\beta$ ; 6; 8; tumour necrosis factor- $\alpha$ , and soluble receptor of interleukin-2) and C-reactive protein in the diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatr* 2003; 92: 221-7.

Reynolds JEF; editor. *Martindale The extra pharmacopeia*. 29th ed. London: Royal Pharmaceutical Society; 1989.

Rocas IN, Hulsmann M, Siqueira JF Jr. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *J Endod* 2008; 34:926 –31.

Rocas IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315–20.

Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. *J Endod*. 2011 Feb;37(2):143-50.

Rölla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res*. 1975;54.

Romagnani, S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* 2006; 36, (11): 1357-66.

Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K, Conn F. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. Oct. 2004; 98(4): 488-92

Ruff ML, McClanahan SB, Babel BS. In vitro antifungal efficacy of four irrigants as a final rinse. *J Endod*. 2006;32(4):331-3.

Sabir A, Tabbu CR, Agustiono P, Sosroseno W. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. *J Oral Sci.* 2005 Sep;47(3):135-8.

Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J Endod.* 1994;20(3):127-9.

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

Scazzocchio F, D'Auria FD, Alessandrini D, Pantanella F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol Res.* 2005;151(4):327-33.

Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. tribute to Dr. Herbert Schilder. *J Endod.* 2006; 32(4):293-5

Schein B. e Schilder H. 1975 – Endotoxin content in endodontally involved teeth. *Journal of Endodontics.* 1975; 1(1).

Segers P, Speekenbrink RG, Ubbink DT, Ogtrop MLv, Mol BA. Prevention of nosocomial infection in cardiac surgery by decontamination of the nasopharynx and oropharynx with chlorhexidine gluconate. A randomized controlled trial. *JAMA* 2006;296:2460-2466.

Seltzer S, Farber PA. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78(5): 634-45.

Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J.* 2006;39(11):878-85.

Sheeja K, Kuttan G. *Andrographis paniculata* downregulates proinflammatory cytokine production and augments cell mediated immune response in metastatic tumor-bearing mice. Asian Pacific J Cancer Prev. 2010;11:723-9.

Shih MF, Cheng YD, Shen CR, Cherng JY. A molecular pharmacology study into the anti-inflammatory actions of *Euphorbia hirta* L. on the LPS-induced RAW 264.7 cells through selective iNOS protein inhibition. J Nat Med. 2010;64:330-5.

Shih, SE, Marshall, JF, Rosen S. The bactericidal efficiency of sodium hypochlorite as an endodontic irrigant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1970;29(4):613-19.

Silva BM, Tomazinho SF, Anele JA, Leonardi DP. A ação do hidróxido de cálcio frente ao *Enterococcus faecalis* nos casos de periodontite apical secundária Rev. Odonto 2010 ;18(36):95-105

Silva FB, Almeida JM, Souza SMG. Natural medicaments in endodontics:a comparative study of anti-inflammatory action. Braz Oral Res. 2004;18(2):174-9.

Silva L, Nelson Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. J Endod. 2002; 28(2):94-8

Simões CC, Araújo DB, Araújo RPC. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. Brazi Jour of Pharm. 2008;18(1):84-89.

Simões W, Sampaio JMP, Debelian GJ Verificação da tolerância tecidual e poder bactericida do hipoclorito de sódio a 0,5% e 1% usados na clínica odontológica. Rev Paul Odontol 1989;11(4):35-8.

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

Siqueira Jr JF; Rôças IN; Favieri A; Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2,5% and 5,25% sodium hypochlorite. *J Endod* 2000; 26(6): 331-4

Soares JÁ, Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Ito IY. Ação anti-séptica e reparadora da associação hidróxido de cálcio e clorexidina em dentes de cães com lesões periapicais. *Pesq Odontol Bras.* 2003; 17:104

Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis.* 2004;10:311-8.

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

Sugiyama A, Arakaki R, Ohnishi T, Arakaki N, Daikuhara Y, Takada H. Lipoteichoic acid and interleukin 1 stimulate synergistically production of hepatocyte growth factor (scatter factor) in human gingival fibroblasts in culture. *Infect. Immun.* 1996; 64, (4):1426-1431.

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

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

Svec TA, Harrison JW. Chemomechanical removal of pulpal and dentinal debris with sodium hypochlorite and hydrogen peroxide vs normal saline solution. *J Endod.* 1977 Feb;3(2):49-53.

Swerts MSO, Costa AMDD, Firini JE 2005. Associação de clorexidina e própolis atuando na inibição da aderência de *Streptococcus* spp. Rev. Inter. de Perio. Clínica 2: 10-16.

Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. Int Endod J. 1998;31(5):311-25.

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

Tanomaru-Filho M, Polisel-Neto A, Leonardo MR, Silva LA, JM, Ito IY. Methods of experimental induction of periapical inflammation. Microbiological and radiographic evaluation. Int Endod J. 2005 Jul;38(7):477- 82.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Controle do crescimento microbiano. In:Microbiologia 2000 6 ed. Porto Alegre: Artmed;. p.181-206.

Valera MC, Rego JM, Jorge AOC. Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on *Candida albicans* in root canals. J Endod. 2001;27(6):401-8.

Valera MC, Rosa JA, Maekawa LE, Oliveira LD, Carvalho CA, Koga-Ito CY, et al. Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010; 70-74.

Valera MC, Silva KC, Maekawa LE, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Camargo CH. Capacidade de dissolução tecidual do hipoclorito de sódio em diferentes concentrações. Rev. ABO nac 2006; 14(4): 237-241.

Valera MC, Silva KC, Maekawa LE, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Camargo CH, et al. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. J Appl Oral Sci. 2009 Nov-Dec;17(6):55-9.

Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper, J. Receptors, mediators and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock.: Clin. Microbiol. Rev. 2003; 16: 379-414

Vianna M.E. Atividade antimicrobiana de alguns medicamentos utilizados como irrigantes e medicações intracanaís. 2002. 293p. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica [Piracicaba]) - Universidade Estadual de Campinas.

Walker, A. A definitive and dependable therapy for pulpless teeth. J Amer Dent Assoc 1936; 23(2):1418- 1425.

Waltimo TMT, Orstavik D, Siren EK, Haapasalo MP. In vitro yeast infection of human dentin. J Endod. 2000;26(4):207-9.

Wan YY, Flavell RA. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. Immunol Rev 2006; 212:114-30.

Wang CS, Arnold RR, Trope M, Teixeira FB. Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacteria. J Endod. 2007 Nov;33(11):1283-9.

Wang CY, Stashenko P. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. Oral Microbiol Immunol. 1993; 8(1):50-6.

Watkins LR, Maier SF, Goehler LE. Cytokine-to-brain communication: A review & analysis of alternative mechanisms. Life Sci. 1995;57:1011-26.

White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. J Endod. 1997 Apr;23(4):229-31.

Yamasaki M, Nakane A, Kumazawa M, Hashioka K, Horiba N, Nakamura H. Endotoxin and gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. *J Endod.* 1992;18(10):501-4.

Yamashita, JC, Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Rossi MA, Silva LAB. Scanning electron microscopic study of the cleaning ability of chlorhexidine as a root canal irrigant. *Int. Endod.J.* 2003; 36:391-394

Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006;32(5):389-98.

Zehnder, M. et al. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94(6):756-762,.

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

## Anexos

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




UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

R. Pq. Francisco José dos Santos, 271 - St. São José -  
CEP 13208-970 - F. (12) 2445-9026  
E-mail: (12) 2445-9026 - f. (12) 2445-9026

---



**CERTIFICADO**  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Com Seres Humanos

---

**CERTIFICAMOS**, que o protocolo nº 023/2011-PH/CEP, referente ao Projeto intitulado "Eficácia do preparo biomecânico utilizando hipoclorito de sódio 1%, clorexidina gel 2% e extrato glicólico de própolis 12%, como substâncias químicas auxiliares sobre o ácido lipoteicóico de *Enterococcus faecalis*", sob a responsabilidade de **SARAH ALMEIDA COELHO DE OLIVEIRA**, tendo como orientador o Prof. Dr. **CLAUDIO ANTONIO TALGE CARVALHO**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, com seres humanos, conforme, Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 18 de maio de 2011.




---

Profa. Adjunta **JANETE DIAS ALMEIDA**  
Coordenadora