



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Faculdade de Odontologia

ALESSANDRA SVERBERI CARVALHO

**ESTUDO *IN VIVO* DA AÇÃO DO TRATAMENTO
ENDODÔNTICO SOBRE ENDOTOXINAS BACTERIANAS EM
CANALIS RADICULARES COM POLPA NECROSADA E
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS**



2010

ALESSANDRA SVERBERI CARVALHO

**ESTUDO *IN VIVO* DA AÇÃO DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO
SOBRE ENDOTOXINAS BACTERIANAS EM CANAIS RADICULARES
COM POLPA NECROSADA E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS
CITOTÓXICOS DO CONTEÚDO DO CANAL RADICULAR**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho

São José dos Campos

2010

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; 2008.

R618e Carvalho, Alessandra Sverberi
Estudo in vivo da ação do tratamento endodôntico sobre endotoxinas bacterianas em canais radiculares com polpa necrosada e avaliação dos efeitos citotóxicos. / Alessandra Sverberi Carvalho : [s.n.], 2010. 151f. : Il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2010.
Orientador: Prof. Dr. Claudio Antonio Talge Carvalho.

1.Endotoxinas. 2. Necrose pulpar. 3. Hipoclorito de sódio. 4. Polimixina B. 5.Hidróxido de cálcio. 6.Citocinas. II. Universidade Estadual Paulista. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia 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, 04 de setembro de 2010.

Assinatura:



Email: alesverberi@uol.com.br

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof. Adj. João Eduardo Gomes Filho

Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof. Dr. Renato Mito Palo

Profa. Adj. Marcia Carneiro Valera

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Dedicatória

Este trabalho é dedicado a todos aqueles que me permitem, a cada dia, ter uma nova descoberta...

A Deus, meu Primordial Orientador, que guia meus passos e orienta meus caminhos!

A meus pais, Paulo César Reis Carvalho e Sheila Sverberi Carvalho, por terem me despertado a curiosidade para a vida, mostrando-me que nela, o que realmente importa é a educação que se adquire, o respeito que se divide e o amor que se cultiva.

Obrigada por terem ouvido minhas lamentações nos momentos de cansaço, por enxugarem minhas lágrimas nos momentos de tristeza, pela mão estendida nas horas em que pensava em desistir, e por dividirem comigo um sorriso nos momentos de alegria.

Se hoje eu cheguei até aqui foi porque, antes de qualquer outra pessoa, vocês acreditaram em mim!

Amo vocês!

Aos meus irmãos Benedito, Rosylaine e César Augusto, por terer tornado minha infância tão feliz e por me ajudarem a manter essa felicidade na vida adulta. Nós quatro, em algum momento, encobrimos a travessura do outro implicitamente dizendo: “estamos juntos nessa!” As travessuras infelizmente acabaram, mas eu continuo tranqüila porque sei que continuamos juntos nessa... E em todos os momentos de nossas vidas!

À minha avó Rosina de Moraes Sverberi (in memoriam), por ter me enviado geneticamente o dom da paciência e, principalmente, por ter me permitido acreditar que é possível ser bom!
Você partiu minha avozinha, mas os exemplos e os valores que recebi de ti são eternos! Saudades!

Ao meu enteado, Henrique Paixão Borges Campos, por me permitir compreender o quanto é bonito ser “mãe”! E por também ter me acolhido em seu coração com tanto carinho! Amo-te muito meu “quase filhote”!

Ao meu noivo, Paulo Borges Campos, que me fez compreender Mário Quintana!...

“O amor só é lindo quando encontramos alguém que nos transforme no melhor que podemos ser!”.

Com você eu posso e consigo ser cada dia melhor!

Obrigada pelo companheirismo, pelo carinho, pela compreensão tão necessária e presente no dia-a-dia.

Ao seu lado descobri que a felicidade é algo simples, não inatingível como eu imaginei um dia; e que o amor é algo que pode ser concreto, real e essencial!

Amo-te imensamente e te amarei por todos os meus dias!

Agradecimento especial

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho, pelo incentivo à minha carreira, pela agradável orientação e principalmente pela amizade.

Obrigada por compreender-me como pessoa e como profissional, e pela confiança em meu trabalho!

Há uma frase de Paulo Freire, grande educador brasileiro, que diz que “A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura e da alegria!”

*Tal frase expressa claramente a impressão que tenho de você!
Obrigada por me ensinar a alegria da busca e a aprender com alegria!
Minha admiração!*

À amiga e informal co-orientadora Profa Dra Luciane Dias de Oliveira, pelas essenciais orientações, ensinamentos e ajuda na confecção e realização deste trabalho.

*Você é para mim um exemplo de mulher-esposa-mãe-pesquisadora!
Obrigada pelo incentivo e pela amizade!*

À Profa Adj. Marcia Carneiro Valera, por ter me guardado no coração como uma eterna orientada!

*Sinto-me honrada e privilegiada por ser sua aluna!
Guardo por ti professora um imenso carinho como aluna, e um enorme respeito e admiração pela mulher, profissional e docente dedicada que és!
Obrigada por acreditar em mim e em meu trabalho!*

*Às amigas do Curso de Doutorado em Endodontia, Lilian Eiko Maekawa e
Paula Elaine Cardoso.*

*Tenho certeza que a amizade que cultivamos será eterna, por tudo o que
vivemos e crescemos juntas!*

*Ainda que a vida nos destine caminhos variados, o bem-querer e o
carinho que cultivamos, para sempre, nos manterá ligadas pelo laço da
amizade! Adoro vocês!*

*À amiga Polyana das Graças Figueiredo Vilela, pela ajuda essencial na
realização da parte laboratorial deste trabalho.*

*Obrigada pela paciência e ajuda no laboratório, mas principalmente,
obrigada por sua amizade que hoje é tão essencial em minha vida!*

Agradecimentos

É grande o número de pessoas a quem devo agradecer, o que me torna uma pessoa de muita sorte!...

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, meu refúgio do conhecimento, pela minha formação profissional e pela acolhida durante os cursos de Graduação, Mestrado e Doutorado.

Ao diretor Prof. Dr. José Roberto Rodrigues e ao Vice-diretor Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli.

Ao Curso de Pós-graduação, sob a coordenação de Prof. Dr. Clóvis Pagani durante grande parte de meu doutoramento e, atualmente sob a coordenação da Profa Adj. Marcia Carneiro Valera.

Às secretárias do Curso de pós-graduação Erena, Rosemary, Maria Aparecida e Lilian, pelas informações e ajuda durante o curso de Doutorado.

Aos professores da Disciplina de Endodontia: Profa Adj Marcia Carneiro Valera, Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo, Prof. Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho, Profa Dra Ana Paula Martins Gomes e, aos colaboradores, Profa Dra Simone Helena de Oliveira e Prof. Dr. Renato Mito Palo, pelos ensinamentos na clínica diária, pelo agradável convívio e por todo conhecimento compartilhado no dia-a-dia.

Aos colegas do curso de Doutorado em Odontologia Restauradora, disciplina de Dentística: Ana Carolina Botta, Daniel Maranha da Rocha, Fernanda Brandão Mollica e João Maurício Ferraz da Silva, pelo

agradável convívio. Tenho um enorme carinho e uma grande admiração por cada um de vocês!

Às minhas amigas Juliana Paiva Castro Ferreira, Patrícia Regina de Oliveira, Patrícia Takahama e Yadira Rachel Passos, por serem pessoas tão especiais em minha vida!

Às amigas Carla Sayuri Shibata, Carolina Ferraz Ribeiro, Karine Tenório Landim, Lia Alves da Cunha, Paula Carolina Komori e Viviane Cigagna Moreno, pela amizade e por manterem acesa a união da 44ª turma de formandos da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (formandos 2001).

Ao amigo Jonatas Rafael de Oliveira, mestrando em Microbiologia e Imunologia, pelo Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, pelo auxílio durante a realização dos ensaios imunoenzimáticos. Trabalhar com você Jonatas foi uma agradável surpresa pra mim. Trabalhar ao seu lado é garantia de seriedade aliada à alegria.

Ao ex- aluno de graduação, meu co-orientado de Iniciação Científica, Rodrigo Volpe, por ter me auxiliado durante a realização desta tese, acompanhando-me durante grande parte da realização da mesma.

Às amigas Mariana Figueiredo Diehl e Lilian Polidoro Caires, pela colaboração durante a fase clínica deste trabalho. A ajuda de vocês foi essencial! Muito obrigada!

À amiga Profa Dra Simone Helena Gonçalves de Oliveira, pela amizade e confiança em mim depositada. Sou muito grata pela oportunidade em exercer a docência ao seu lado. A cada dia admiro-te mais! Muito obrigada!

Ao professores da antiga Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Dr. Antonio Braulino de Melo Filho, Prof. Dr. Dimas Renó de Lima, Prof. Dr. Eduardo Galera e Prof. João Carlos Bacigalupo. Reconheço que os anos passados na Clínica Integrada, ao lado de cada um de vocês, foram os anos em que obtive meu maior crescimento clínico-profissional e docente. Vocês entregaram a Endodontia de sua disciplina em minhas mãos demonstrando grande confiança em meu trabalho. Espero ter correspondido às suas expectativas e agradeço imensamente por todo o aprendizado adquirido!

Ao Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, em especial à Disciplina de Microbiologia e Imunologia e ao Professor Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge, pelo apoio e por cederem o Laboratório de Cultura Celular para a realização da parte laboratorial desta tese.

Ao Prof. Dr. José Benedito de Oliveira Amorim, pelo exemplo de amizade, competência e profissionalismo. Minha admiração!

À Rosângela, secretária do Departamento de Odontologia Restauradora, por estar sempre disposta a ajudar e contribuir com nosso trabalho.

Às técnicas do Departamento de Odontologia Restauradora Josiana e Fernanda, pela agradável companhia, pelos adoráveis e descontraí bate-papos e, principalmente, pela ajuda indispensável durante a realização da parte clínica e experimental desta tese.

À querida Dona Marinete, pelo Bom Dia acalorado de todas as manhãs! Pelo aroma do cafezinho matinal! Pelas palavras de carinho que acabam por tornar nosso dia mais alegre! Seu jeitinho de mãezona ficará pra sempre guardado em minha memória Dona Marinete! Obrigada por tudo!

*A Carlos Alberto Guedes, pela colaboração e esclarecimentos
relacionados às Agências de Fomento.*

*A todos os pacientes que participaram desta pesquisa! Sem a presença
deles este trabalho não seria realizado! Meus sinceros agradecimentos!*

*À FAPESP, pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste
trabalho e por aceitar-me como pesquisadora desde a iniciação científica.
Com a ajuda da FAPESP posso dizer que me foi dada a oportunidade de
praticar a Ciência, energia que me move e me ajuda a encontrar
respostas às tantas dúvidas de minha mente inquieta.*

*Enfim, agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram
na execução deste trabalho e na construção de, quem sabe, uma
professora-aprendiz!*

MUITO OBRIGADA!

“Se um dia você tiver que escolher entre o mundo e o amor, lembre-se: Se escolher o mundo poderá ficar sem amor, mas se você escolher o amor, com ele conquistará o mundo.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1 Endotoxina (Lipopolissacarídeo).....	25
2.2 Produção de citocinas.....	36
2.3 Solução irrigadora e/ou medicação intracanal.....	46
3 PROPOSIÇÃO.....	57
4 MATERIAL E MÉTODO.....	58
4.1 Seleção dos pacientes.....	58
4.2 Coleta de dados clínicos.....	59
4.3 Preparo dos canais radiculares – Grupos experimentais.....	59
4.4 Coletas do conteúdo do canal radicular.....	67
4.5 Quantificação de endotoxinas (LPS) pelo teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de Limulus (LAL).....	68
4.6 Avaliação dos efeitos citotóxicos do conteúdo do canal radicular – produção de citocinas em macrófagos.....	71
4.6.1 Cultura Celular.....	71
4.6.2 Viabilidade da cultura de células.....	72
4.6.3 Ativação celular	73
4.6.4 Teste imunoenzimático (ELISA) para quantificar citocinas.....	75
5. RESULTADOS.....	81
5.1. Resultados para quantificação de endotoxinas.....	81
5.1.1 Correlação entre sintomatologia dolorosa e quantidade de endotoxinas.....	91
5.2 Resultados para produção de citocinas por macrófagos.....	93

5.2.1 Produção de TNF- α	93
5.2.2 Produção de IL-1 β	101
5.3 – Teste de correlação (Pearson).....	108
6 DISCUSSÃO.....	111
6.1 Da metodologia.....	111
6.2 Dos resultados.....	122
6.2.1 Endotoxinas.....	122
6.2.2 Citocinas.....	129
7 CONCLUSÃO.....	135
8 REFERÊNCIAS.....	136
ANEXO A.....	146
ANEXO B.....	147
ABSTRACT.....	149

Carvalho AS. Estudo *in vivo* da ação do tratamento endodôntico sobre endotoxinas bacterianas em canais radiculares com polpa necrosada e avaliação dos efeitos citotóxicos [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2010.

RESUMO

Em canais radiculares com polpa necrosada, a infecção é causada por diferentes bactérias, principalmente Gram-negativas anaeróbias facultativas e estritas, que, conseqüentemente, liberam diferentes endotoxinas durante sua duplicação ou morte celular. Os objetivos deste estudo foram: a) avaliar *in vivo* as quantidades de endotoxinas em canais radiculares com polpa necrosada, antes da realização do tratamento endodôntico; b) avaliar a efetividade do preparo biomecânico utilizando diferentes associações de agentes irrigantes [hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5%; NaOCl 2,5% + hidróxido de cálcio 0,14% e NaOCl 2,5% + polimixina B] sobre endotoxinas em canais radiculares; c) avaliar a ação da medicação intracanal (clorexidina gel 2% + hidróxido de cálcio) sobre endotoxinas; d) avaliar, durante todo o tratamento endodôntico, a produção de citocinas por macrófagos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares. Foram selecionados 33 dentes com necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente e, imediatamente após o isolamento absoluto e acesso ao canal radicular foi realizada a primeira coleta. Os terços cervical e médio dos canais foram preparados com instrumentação oscilatória utilizando-se como solução irrigadora o hipoclorito de sódio 2,5% e para o preparo manual do terço apical os canais foram divididos em 3 grupos (n=11): G1) NaOCl 2,5%; G2) NaOCl 2,5% + água de cal (0,14%); G3) NaOCl 2,5% + polimixina B. Após o preparo biomecânico foi realizada a segunda coleta e, após a aplicação do EDTA, a terceira coleta. A quarta coleta foi realizada após 14 dias de medicação intracanal com pasta de clorexidina gel 2% + hidróxido de cálcio. Para todas as coletas foi realizada a quantificação de endotoxinas pelo teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL) e avaliação dos efeitos citotóxicos pela produção de citocinas (IL-1 β , TNF- α) em cultura de macrófagos. Para a quantificação de endotoxinas, foi localizada diferença estatística significativa (Testes Kruskal-Wallis e Dunn, $p < 0,05$) entre os grupos G1 e G3 para o percentual de redução entre a primeira e a segunda coletas, com G3 apresentando-se mais eficaz. Para a produção de citocinas foram

utilizados os testes estatísticos ANOVA 2 fatores e Tukey ($p < 0,05$). Para a produção de TNF- α , foram encontradas diferenças estatísticas significantes tanto para os grupos quanto para as coletas avaliadas. Entre as coletas, maior produção desta citocina foi obtida na primeira e na quarta coletas, diferindo estatisticamente da segunda e terceira coletas. Entre os grupos, a maior produção de TNF- α foi encontrada no grupo do NaOCl 2,5% (G1), diferindo estatisticamente dos demais grupos. Por sua vez, a produção de IL-1 β apresentou diferenças apenas entre as coletas, com a primeira coleta diferindo estatisticamente das demais. Entre os grupos, há uma correlação positiva (Teste de Pearson), o que confirma que um aumento na produção de endotoxinas provoca também um aumento na produção de citocinas.

Palavras-chave: endotoxinas, necrose da polpa dentária, hipoclorito de sódio, polimixina B, hidróxido de cálcio; citocinas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α = Alfa

β = Beta

$^{\circ}\text{C}$ = Graus Celsius

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ = Hidróxido de Cálcio

CD14 = Receptor de superfície de monócitos e macrófagos

CLX = Clorexidina

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium (meio de cultura)

EDTA = Ácido Etileno Diamino Tetracético

ELISA = Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay

EU = Unidade de Endotoxina

γ = Gama

HDL = Lipoproteína de Alta Densidade

HMA = Ácido Hidroxitetraacético

IL = Interleucina

LAL = Lisado de Amebócito de Limulus

LDL = Lipoproteína de Baixa Densidade

LPS = Lipopolissacarídeo

LTA = Ácido Lipoteicóico

MIC = Medicação Intracanal

μg = Micrograma

μL = Microlitro

mg = Miligrama

mL = Mililitro

mm = Milímetro

MTT = (3-(4,5-Dimetiltiazol -2yl) – 2,5 Difenil Brometo de Tetrazolina)

NaOCl = Hipoclorito de Sódio

ng = Nanograma

nm = Nanômetro

NO = Óxido Nítrico

PBS = Solução Salina Fosfatada (Phosphate buffered saline)

% = Percentual

pg = Picograma

rpm = rotações por minuto

TGF = Fator de Crescimento (Transforming growth factor)

TNF = Fator de Necrose Tumoral

UFC = Unidade Formadora de Colônia

1 INTRODUÇÃO

As bactérias e seus produtos têm um papel essencial na patogênese das doenças pulpares e periapicais (Leonardo et al., 2004). Canais radiculares portadores de necrose pulpar e lesão periapical crônica têm predominância de microrganismos anaeróbios, particularmente Gram-negativos que, além de gerarem produtos tóxicos, contêm endotoxinas em sua parede celular (Dahlén e Bergenholtz, 1980; Dahlén et al., 1981; Horiba et al., 1990; Nelson Filho et al., 2002; Schein e Schilder, 2006).

Jacinto et al., 2003, em análise da microbiota de canais radiculares infectados, de dentes sintomáticos a assintomáticos, encontraram predominância de anaeróbios obrigatórios em 74% do total de espécies isoladas, sendo que seus resultados apresentaram uma correlação positiva entre estes e o relato de dor, sensibilidade à percussão e abscesso.

A consciência de que a simples eliminação bacteriana não é suficiente para o sucesso do tratamento endodôntico é muito importante. Bactérias gram-negativas, maioria da microbiota de canais infectados, liberam uma substância altamente resistente após a morte ou multiplicação celular denominada endotoxina, responsável por efeitos biológicos relevantes, que levam a uma reação inflamatória (Khabbaz et al., 2000) e reabsorção dos tecidos mineralizados (Dahlén et al., 1981; Leonardo et al., 2004).

Embora os termos lipopolissacarídeo (LPS) e endotoxinas sejam usados como sinônimos, Siqueira e Rôças (2007) recomendam que o termo endotoxina refira-se ao complexo macromolecular composto por LPS, proteínas e fosfolipídeos.

O LPS é uma molécula composta por uma porção polissacarídica hidrofílica, subdividida em uma cadeia específica O-polissacarídica conhecida como antígeno-O e um núcleo oligossacarídico; e um componente glicolipídico hidrofóbico denominado lipídio-A. O lipídio-A está inserido na parede celular das bactérias Gram-negativas, enquanto as porções do núcleo e do antígeno-O encontram-se externamente à superfície bacteriana.

É importante ressaltar que o LPS não apresenta toxicidade quando incorporado à membrana bacteriana, a liberação do lipídio-A durante a morte ou multiplicação bacteriana é que confere a toxicidade à sua molécula. Uma vez liberado, o lipídio-A exposto recruta as células de defesa e iniciam-se os eventos biológicos (Siqueira Jr e Rôças, 2007).

Entre todos os animais, os humanos são os mais sensíveis às endotoxinas, com conseqüências sobre tecidos essencialmente importantes. As endotoxinas de bactérias vitais ou não vitais, completas ou fragmentadas, agem sobre macrófagos, neutrófilos e fibroblastos, levando à produção de grande número de mediadores químicos inflamatórios, como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1), IL-5, IL-8 e prostaglandinas, sendo que alguns destes podem estimular a reabsorção óssea (Pezelj-Ribaric et al., 2007; Queiroz et al., 2008; Gazivoda et al., 2009). Além disso, LPS é citotóxico e age como um potente estimulador e produtor de óxido nítrico (Leonardo et al., 2004).

Assim, o tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar e reação periapical crônica, deve ter como objetivo não só a eliminação dos microrganismos, mas também a inativação de suas endotoxinas e demais produtos tóxicos.

Sabe-se que o objetivo principal do preparo biomecânico é promover a limpeza e a desinfecção do sistema de canais radiculares, associado à preservação da sanificação obtida pela utilização de substâncias químicas auxiliares, medicação intracanal e cimentos

obturadores. Entretanto, é possível que, mesmo após a remoção dos microrganismos, endotoxinas, capazes de induzir ou manter lesões periapicais, permaneçam no sistema de canais radiculares predispondo o tratamento endodôntico ao insucesso (Leonardo, 2005).

O hipoclorito de sódio é a solução irrigadora mais utilizada em endodontia principalmente no tratamento de dentes com polpa infectada, devido a sua baixa tensão superficial, capacidade de dissolver matéria orgânica, e ações desodorizante, alvejante, lubrificante e antimicrobiana (Jeansonne & White, 1994; Menezes et al., 2004; Ringel et al., 1982; Tanomaru et al., 2005), entretanto, é tóxico para os tecidos periapicais (Önçag et al., 2003), principalmente em altas concentrações, além de não apresentar atividade significativa sobre endotoxinas (Oliveira et al., 2007).

Ringel et al., 1982, realizaram um estudo microbiológico para avaliar a atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio 2,5% e da clorexidina 2%, encontrando maior efetividade da solução de hipoclorito de sódio 2,5%, como agente antimicrobiano, quando utilizada como irrigante no tratamento de dentes necrosados.

Outros autores avaliaram a efetividade da solução de hipoclorito de sódio sobre endotoxinas bacterianas, como Butler et al., 1982, que investigando a efetividade *in vitro* de três concentrações diferentes de NaOCl (0,5%; 2,7%; 5,2%) na neutralização de dois tipos de endotoxina (*Escherichia coli* e *Salmonella typhosa*) encontrou resultados que indicaram que as três concentrações foram igualmente efetivas em neutralizar as amostras de endotoxina (100 ng/mL), embora os autores admitiram que a metodologia empregada apresentou algumas falhas e que novos estudos deveriam ser realizados a fim de analisar a ação do hipoclorito de sódio sobre LPS.

Também Buck et al., 2001, avaliaram o efeito do hipoclorito de sódio 2,6%, clorexidina 0,12%, EDTA 15% e suspensão aquosa de hidróxido de cálcio 24,6 mg/mL, água apirogênica e etanol

95% na degradação do LPS, além de associações com estas soluções: NaOCl 2,6% mais clorexidina 0,12%; clorexidina 0,12%, e NaOCl 2,6% mais etanol 95%. A neutralização da endotoxina foi quantificada pela liberação de ácidos graxos livres. Os resultados mostraram que o hipoclorito de sódio, a água, o EDTA, o etanol e a clorexidina mais hipoclorito de sódio demonstraram pequena ou nenhuma degradação da endotoxina. Entretanto, o hidróxido de cálcio e a associação clorexidina, hipoclorito de sódio e etanol detoxificaram moléculas do LPS pela hidrólise de ligações éster das cadeias de ácidos graxos do lipídio A.

O hidróxido de cálcio tem sido amplamente utilizado como medicação intracanal devido às suas propriedades antimicrobianas (Leonardo, 2005), capacidade de induzir a mineralização (Leonardo, 2005) e principalmente efetiva ação sobre LPS (Leonardo et al., 2004; Nelson Filho et al., 2002; Oliveira et al., 2005; Safavi & Nichols, 1994 e 1995; Silva et al., 2004; Tanomaru Filho et al., 2002).

Safavi e Nichols, 1993, relataram que, *in vitro*, o hidróxido de cálcio hidroliza o lipídio-A, componente tóxico da endotoxina, e concluíram que após a hidrólise deste lipídio, seu agente tóxico é convertido em ácidos graxos e amino açúcares que não apresentam toxicidade. Barthel et al., 1997, também observaram que o hidróxido de cálcio detoxifica o LPS bacteriano *in vitro*.

A associação hidróxido de cálcio e clorexidina 2% é atualmente utilizada como medicação intracanal com promissoras perspectivas (Menezes et al., 2004; Soares et al., 2003). Estudos mostram que esta associação apresenta satisfatória atividade antimicrobiana e reparadora, além da efetividade sobre endotoxinas presentes no canal radicular (Soares et al., 2003). Isso deve-se principalmente à associação das propriedades satisfatórias apresentadas tanto pela clorexidina quanto pelo hidróxido de cálcio. Dentre as propriedades da clorexidina devem ser ressaltadas sua excelente

capacidade de ação sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sua substantividade em dentina por até 12 semanas e sua biocompatibilidade aos tecidos periapicais (Mohammadi e Abbott, 2009).

A clorexidina é uma guanidina sintética bicatiônica. É uma molécula hidrofóbica e lipofílica carregada positivamente que interage com os fosfolípidos e os lipopolissacarídeos da membrana celular das bactérias, sendo capaz de penetrar nas células através de algum tipo de mecanismo de transporte ativo ou passivo. Sua eficácia se dá por causa da interação da carga positiva de sua molécula com a carga negativa dos grupos fosfato das paredes da célula microbiana, alterando assim o equilíbrio osmótico das células. Isso aumenta a permeabilidade da parede celular, que permite que a molécula de CLX penetre nas bactérias. A CLX é uma base estável como um sal (Mohammadi e Abbott, 2009). Em sua maior concentração (2%), a clorexidina é bactericida porque provoca a precipitação do conteúdo do citoplasma, resultando na morte celular. (Gomes et al., 2009).

A polimixina B é um antibiótico polipeptídico catiônico que age primariamente na parede celular de bactérias Gram-negativas, levando a mudanças rápidas na permeabilidade da membrana citoplasmática causando a morte celular (Evans et al., 1999). Além da atividade antimicrobiana, a polimixina B é capaz de neutralizar endotoxinas, bloqueando alguns efeitos biológicos causados por estas (Craig et al., 1974; Morrison e Jacobs, 1976), podendo ser utilizada como medicação intracanal, sendo eficiente em neutralizar LPS em canais radiculares (Oliveira et al., 2005).

Em estudo realizado por Hong et al., 2004, a polimixina B inibiu a síntese de IL-1 α e TNF- α por macrófagos estimulados por LPS, além de ter reduzido o tamanho de lesões periapicais induzidas em ratos em cerca de 80%.

A importância da eliminação de microrganismos e seus produtos do interior do sistema de canais radiculares em relação ao sucesso do tratamento endodôntico justificam a busca constante de medicamentos capazes de eliminar estes microrganismos. Uma vez que bactérias Gram-negativas estão presentes em canais radiculares, com conseqüente liberação de endotoxinas, com potente ação citotóxica durante sua duplicação ou morte celular, levando a uma reação inflamatória, imunológica e reabsorção óssea periapical, faz-se necessário o estudo de substâncias químicas utilizadas durante a terapia endodôntica que possam eliminar estes microrganismos e neutralizar estas substâncias flogísticas.

No sangue e nos tecidos, as endotoxinas ligam-se ao receptor CD14 na superfície de monócitos e macrófagos, e estas células ativadas secretam interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), superóxido (O_2^-), óxido nítrico, interferons α , β e γ , e moléculas lipídicas como o fator ativador de plaquetas e as prostaglandinas (Janeway, 2001). Estes fatores são fundamentais no desenvolvimento de reabsorção óssea periapical (Wang & Stashenko, 1993). Dessa forma, estudos têm sugerido que as endotoxinas são os principais fatores etiológicos envolvidos na patogênese da inflamação pulpar e periapical (Dwyer & Torabinejad, 1981; Barthel et al., 1997; Murakami et al., 2001; Nelson-Filho et al., 2002; Silva et al., 2002; Tanomaru et al., 2003; Hong et al., 2004; Silva et al., 2004).

Desta forma, a realização de trabalho *in vivo*, com material microbiológico coletado diretamente de pacientes que apresentem dentes com necrose pulpar, torna-se cientificamente relevante, complementando trabalhos científicos realizados *in vitro*, tanto para quantificação de endotoxinas bacterianas (Haight-Ponce et al., 1999; Horiba et al., 1990; Nissan et al., 1995), quanto para avaliação dos efeitos citotóxicos do conteúdo do canal radicular, como indução da produção de

citocinas por macrófagos (Marcinkiewicz et al., 1994, Queiroz et al., 2008, Gazivoda et al., 2009).

Frente a todas essas considerações, tornou-se importante verificar *in vivo* os níveis de endotoxinas, bem como a produção de citocinas (TNF- α e IL-1 β) por macrófagos ativados com endotoxinas, de canais radiculares com polpa necrosada e lesão periapical visível radiograficamente, antes da realização do tratamento endodôntico, após o preparo biomecânico com diferentes combinações de agentes irrigantes e após a medicação intracanal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Endotoxina (Lipopolissacarídeo)

Dahlén e Bergeholtz, 1980, avaliaram a atividade da endotoxina em dentes com necrose pulpar. Foram coletadas amostras de endotoxina de 13 dentes com necrose pulpar e o método escolhido para quantificação foi do lisado de amebócito de limulus. Microorganismos gram-negativos como *Bacteroides oralis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium necrophorum* e *Veillonella parvulla*, foram cultivados para obtenção de endotoxina. O lipopolissacarídeo foi extraído com fenol 45% à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras bacterianas foram purificadas com ultracentrifugação, tratadas com RNase e DNase e finalmente liofilizadas. Duas amostras foram utilizadas como referência, o lipopolissacarídeo da *Salmonella typhi* e a endotoxina de referência da *E. coli*. Na sequência, as amostras foram diluídas para leitura do LPS através do teste de limulus. OS resultados detectaram viabilidade bacteriana nas amostras dos canais radiculares, para diferentes bactérias anaeróbicas gram-negativas, com diferentes níveis de exsudato inflamatório. Os autores concluíram também que a atividade endotóxica dos canais radiculares está relacionada com a presença e o número de bactérias gram-negativas no canal radicular.

Horiba et al., em 1990, estudaram a distribuição da endotoxina na parede dentinária de canais radiculares infectados. Amostras das paredes radiculares desde a superfície pulpar do canal até o lado cementário foram preparadas por um método abrasivo. Para tanto, utilizaram 30 dentes humanos recém-extraídos (5 dentes sadios e 25

dentos com canais radiculares infectados). As coroas foram desprezadas e as raízes seccionadas ao meio, no sentido longitudinal. Em seguida, foram novamente seccionadas verticalmente de forma a obter uma espessura de 1 mm. Foi realizada outra secção, no sentido transversal, também com 1 mm de espessura, obtendo assim, um bloco de raiz com área aproximada de 1 mm². Um método abrasivo foi utilizado para obter uma série de pó de dentina, de cada espécime, progressivamente da dentina da superfície pulpar até o cemento. Após a medida da quantidade de pó de todos os espécimes, foi acrescentado 1 mL de água destilada apirogênica ao pó. A endotoxina foi extraída com ácido cítrico e a quantidade mensurada por um método colorimétrico. A quantidade de endotoxina foi significativamente maior nos dentes com canais radiculares infectados do que nos dentes sadios em todas as camadas. Nos canais radiculares infectados, a quantidade de endotoxina foi significativamente maior nas amostras de dentina próximas da superfície pulpar, até 300 µm, do que em amostras de 301 a 800 µm.

Nissan et al., em 1995, verificaram *in vitro* a penetração da endotoxina na dentina de dentes humanos. Foram preparadas 5 cavidades Classe I com 0,5 mm de espessura de parede pulpar. Foi introduzido 0,1 mL de endotoxina na concentração de 100 µg/mL no interior da cavidade oclusal e 0,1 mL de água apirogênica foi adicionada na câmara pulpar. Foi removido 0,1 mL das amostras da câmara pulpar após 15 e 30 minutos e em intervalos de 30 minutos durante 5 horas. Uma amostra final foi coletada 24 h após o início do experimento. A presença de endotoxina foi determinada pelo método do lisado do amebócito de *Limulus*. Em quatro espécimes, o aparecimento inicial de endotoxina na câmara pulpar variou de 15 minutos a 4h30 minutos. Em um espécime nenhuma endotoxina foi detectada na câmara pulpar durante o período testado (24h). Os resultados indicaram que a endotoxina foi capaz de penetrar 0,5 mm de dentina em um curto período de tempo.

Haight-Ponce et al., 1999, avaliaram através do teste de limulus, a atividade da endotoxina de *Escherichia coli* de dentina pré-tratada com hipoclorito de sódio 10% e peróxido de hidrogênio 3%. Para o estudo foram utilizados vinte dentes humanos recentemente extraídos e armazenados em formalina 10%. O estudo foi realizado nos períodos de 30, 10 e 1 minuto. A endotoxina foi diluída até a solução de 100 ng/mL. Um pó de dentina foi suspenso em uma concentração de 34 µg/mL de proteína. O teste de lisado de amebócito de limulus foi usado para determinar a quantidade de endotoxina presente, medida pelo leitor de microplacas. Os níveis de atividade de endotoxina foi significativamente menor nas dentinas tratadas com hipoclorito de sódio 10%, quando comparadas às tratadas com peróxido de hidrogênio 3% nos intervalos a 1 e 10 minutos. A atividade da endotoxina foi menor no período de 30 minutos.

Khabbaz et al., em 2000, realizaram um estudo *in vivo* para determinar a presença de endotoxinas em lesões cariosas de dentes sintomáticos (pulpite irreversível) e assintomáticos (pulpite irreversível); e quantificar a endotoxina presente e associar a presença de endotoxinas com a dor aguda derivada de pulpites irreversíveis. Os grupos foram divididos em, G1: 9 dentes com pulpite irreversível; G2: 11 dentes com pulpite reversível e G3: 4 dentes hígidos. Nos dentes com lesões cariosas foram coletadas duas amostras. A primeira amostra foi coletada da camada superficial da cárie e a segunda amostra de uma camada mais profunda. Os testes foram realizados pelo teste cromogênico do Lisado do amebócito de *Limulus*. Os resultados mostraram que todas as amostras coletadas das lesões cariosas apresentaram endotoxina, entretanto, a quantidade de endotoxina foi significativamente maior na superfície da lesão, tanto nos dentes sintomáticos como nos assintomáticos. No grupo 3 (dentes hígidos) não foi detectada endotoxina. A quantidade de endotoxina também foi significativamente maior nos dentes sintomáticos.

Buck et al., 2001, avaliaram o efeito de irrigantes endodônticos e do hidróxido de cálcio sobre lipopolissacarídeos (LPS, endotoxinas). As soluções irrigadoras utilizadas foram as comumente utilizadas em endodontia, incluindo NaOCl 2,6%, clorexidina 0,12%, EDTA 15% em suspensão aquosa 82 mg/mL (RC Prep), etanol 95% e água apirogênica (controle), além da associação de irrigantes como clorexidina clorada e um mix de partes iguais de clorexidina 0,12%, hipoclorito de sódio 2,6% e etanol 95%. Foram realizados testes de espectrometria e cromatografia de íons, com quantificação do ácido 3-hidroxitetradecanóico (3-HMA), molécula resultante do lipídio A. Como a porção de lipídio A do LPS é a maior responsável por sua atividade, a análise dos subprodutos dos ácidos gordurosos foi considerada relevante pelos autores. A cada solução irrigadora ou associação testada foi misturada uma solução aquosa contendo LPS por 30 minutos. Como o hidróxido de cálcio é utilizado por períodos mais longos como medicação, a este foi também aplicado LPS nos períodos de 1, 2 e 5 dias. A inativação do LPS foi medida pela quantificação de ácidos gordurosos livres liberados. A água, o EDTA, o etanol, a clorexidina 0,12%, a clorexidina clorada e o hipoclorito de sódio sozinho alcançaram pequenos índices de LPS. Em longo prazo, assim como em exposição de 30 minutos às misturas alcalinas de clorexidina, etanol e hipoclorito de sódio, as moléculas de LPS perderam sua toxicidade por hidrólise de suas cadeias de ácidos gordurosos do lipídio A.

Khabbaz et al., 2001, estudaram a presença de endotoxina em dentes humanos cariados e vitais, e sua associação com a dor pulpar. As amostras de tecido pulpar foram coletadas de 28 dentes cariados (15 sintomáticos e 13 assintomáticos), pertencentes a 28 diferentes pacientes. Foram também coletadas amostras pulpares de 5 dentes não cariados com indicação de exodontia por motivos ortodônticos (controle). Foram coletadas amostras iguais de tecido pulpar em todos os casos, aproximadamente 8 mg. A extração da endotoxina foi realizada

com o uso de água fenolada. A análise e a quantificação da endotoxina foi obtida pelo teste do lisado de amebócito de limulus e os dados analisados estatisticamente. Os resultados mostraram a presença de endotoxina em todos os tecidos pulparens provenientes de dentes cariados. Em dentes isentos de cárie (controle) não foi detectada endotoxina. A presença de endotoxina foi significativamente maior no grupo de dentes sintomáticos. Os autores concluem que a presença de endotoxina no tecido pulpar de todos os dentes cariados mostra que ela pode ter um importante papel na patogênese das doenças pulparens. Como um nível significativamente maior de endotoxina foi detectado em polpas de dentes sintomáticos, é provável que os níveis de endotoxina estejam diretamente relacionados com a dor.

Nelson Filho et al., 2002, realizaram uma avaliação radiográfica do efeito da endotoxina mais hidróxido de cálcio nos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães. Foram utilizados os segundos, terceiros e quartos pré-molares superiores e inferiores de três cães. Vinte raízes foram utilizadas para cada grupo experimental (grupos 1 e 2) e 10 raízes para cada grupo controle (grupos 3 e 4). Após a remoção da polpa, os 60 pré-molares foram divididos entre os quatro grupos e foram obturados com endotoxina bacteriana no grupo 1, com endotoxina bacteriana mais hidróxido de cálcio no grupo 2, com solução salina no grupo 3, e lesões periapicais foram induzidas com a ausência de tratamento no grupo 4, por um período de 30 dias. A análise radiográfica após esse período mostrou presença de lesões periapicais semelhantes nos grupos 1 e 4. A lâmina dura permaneceu intacta nos grupos 2 e 3. O LPS causa lesões periapicais visíveis radiograficamente, no entanto, na presença de hidróxido de cálcio essa endotoxina é inibida.

Silva et al., 2002, avaliaram, *in vivo*, o efeito do hidróxido de cálcio sobre endotoxinas bacterianas. Os autores realizaram análise histopatológica de tecidos periapicais de dentes de cães que receberam endotoxina bacteriana, associadas ou não ao hidróxido de cálcio.

Removidas as polpas dos 60 pré-molares, os dentes foram divididos em quatro grupos: grupo 1- dentes obturados com endotoxina bacteriana; grupo 2- obturação com endotoxina bacteriana e hidróxido de cálcio; grupo 3- preenchimento dos canais com solução salina; grupo 4- lesão periapical induzida pela falta de tratamento. Trinta dias após os tratamentos os cães foram sacrificados e os dentes preparados histologicamente. O infiltrado inflamatório, a espessura do ligamento periodontal e a presença de áreas de reabsorção foram semelhantes nos grupos 1 e 4. Os grupos 2 e 3 foram semelhantes entre si. Os autores concluem que a endotoxina bacteriana causa lesão periapical e que o hidróxido de cálcio inibe os lipopolissacarídeos *in vivo*.

Tang et al., 2002, estudaram a infiltração de endotoxinas por materiais retrobturadores. Cento e quatro dentes unirradiculados humanos foram usados neste experimento e os 3 mm apicais de cada raiz foram removidos perpendicularmente ao longo eixo do dente. Os dentes foram incluídos em dispositivos compostos por reservatórios superiores e inferiores. Apenas o ápice radicular seccionado permanece em contato com o meio de cultura e na porção coronária da raiz foi inoculado LPS. Os materiais retrobturadores utilizados foram o Super-EBA, o amálgama, o IRM e o MTA, sendo retrobturados 23 dentes em cada grupo. Uma semana após a obturação essas raízes foram inseridas nos reservatórios para receberem a endotoxina. O estudo usou o teste do lisado de amebócito de limulus para verificar a presença de endotoxina e, em seguida foi avaliada a capacidade de selamento de cada material. De acordo com os resultados encontrados pelos autores, o MTA foi o material que permitiu menor infiltração de endotoxina, quando comparado ao IRM e ao amálgama, nos períodos de 1, 2, 6 e 12 semanas. Nos períodos de 2 e 12 semanas, infiltrou menos que o Super – EBA.

Silva et al., 2004, realizaram um estudo histológico avaliando a efetividade do preparo biomecânico dos canais radiculares com auxílio de diferentes soluções irrigadoras em dentes de cães

obturados com LPS após pulpectomia. Participaram da pesquisa seis cães com idade entre 12 e 18 meses, perfazendo um total de 120 raízes que foram divididas em 6 grupos de 20 dentes cada. Num primeiro momento, os animais foram submetidos a tratamento endodôntico utilizando-se solução salina fisiológica durante a instrumentação sendo, em seguida, os canais preenchidos com uma solução composta por soro fisiológico e LPS. Os dentes foram selados com óxido de zinco e eugenol e após 10 dias os animais foram novamente submetidos a tratamento. Neste momento, os 120 canais radiculares foram divididos em 6 grupos de 20 dentes cada e irrigados com 3.6 mL das seguintes soluções: grupo 1- nenhuma irrigação, o LPS permaneceu no canal; grupo 2- solução salina fisiológica; grupo 3- hipoclorito de sódio 1%; grupo 4- hipoclorito de sódio 2,5%; grupo 5- hipoclorito de sódio 5%; grupo 6- digluconato de clorexidina 2%. O preparo biomecânico foi finalizado e os acessos coronários foram realizados com ionômero de vidro como base e amálgama. Os animais foram sacrificados após 60 dias. Os dentes foram preparados para análise histopatológica e os seguintes parâmetros foram utilizados para análise: a) intensidade do infiltrado inflamatório: grau 1- leve; grau 2- moderado; grau 3- severo; b) infiltrado inflamatório: grau 1- agudo; grau 2- crônico; c) espessura do ligamento periodontal: grau 1- normal ou ligeiramente aumentado; grau 2- moderadamente aumentado; grau 3- severamente aumentado; d) reabsorção cementária: grau 1- ausente; grau 2- presente; e) reabsorção dentinária: grau 1- ausente; grau 2- presente; f) reabsorção óssea: grau 1- ausente; grau 2- presente. A análise foi realizada por um único examinador e os resultados foram submetidos a análise estatística não paramétrica de Mann-Whitney. O infiltrado inflamatório foi estatisticamente menos intenso nos grupos cujos canais foram irrigados com hipoclorito de sódio 5% e clorexidina 2%, e nenhuma solução irrigadora foi capaz de eliminar completamente os efeitos do LPS.

Jacinto et al., 2005, realizaram um estudo para quantificar a concentração de endotoxina em canais radiculares necrosados e investigaram a possível relação entre a concentração de endotoxina e os sinais e sintomas endodônticos. Foram coletadas amostras pulpares de 50 pacientes submetidos a tratamento endodôntico por necrose do tecido pulpar. Cones de papel foram inseridos no canal radicular na profundidade do comprimento determinado radiograficamente. O procedimento foi repetido com cinco cones de papel. Solução salina apirogênica foi utilizada para transportar as amostras para o laboratório. Alíquotas de 100 µl foram utilizadas para cultivo microbiano e o restante foi congelado a - 30°C. O cultivo microbiano foi utilizado para determinar o número de unidades formadoras de colônia (UFC) presente em cada amostra. Para quantificação da endotoxina foi utilizado o teste do lisado de amebócito de limulus. A presença de UFC foi detectada em todas as amostras (média de 10^2 - 5×10^6). Amostras de casos sintomáticos alcançaram uma média de $8,7 \times 10^5$ de UFC, enquanto para dentes assintomáticos a média foi de 5×10^3 . A endotoxina também esteve presente em todas as amostras estudadas [média de 2390.0 - 22100.0 unidades de endotoxina EU/mL]. A concentração média de endotoxina nas amostras de pacientes com dor espontânea foi de $18540.0 \text{ EU mL}^{-1}$, enquanto em casos assintomáticos foi de $12030.0 \text{ EU mL}^{-1}$. Os casos assintomáticos apresentaram menores níveis de endotoxina (associação negativa). Uma associação positiva foi encontrada entre endotoxina e casos sintomáticos (dor espontânea, dor à percussão, dor à palpação, inchaço e exsudato purulento). Frente aos resultados, os autores concluíram que a endotoxina apresenta-se em maiores concentrações em canais radiculares de dentes sintomáticos, havendo uma correlação positiva entre a concentração da endotoxina encontrada nos canais radiculares e a presença de sinais e sintomas clínicos.

Schein and Schielder, 2006, realizaram o estudo com o objetivo de detectar e quantificar os níveis de endotoxina presentes nos canais radiculares de dentes com indicação endodôntica. Quarenta pacientes foram tratados e distribuídos entre 4 grupos clínicos e dois radiográficos. Os grupos clínicos foram: 1- dentes com polpa vital e assintomáticos; 2- dentes com polpa vital e apresentando sintomas clínicos; 3- dentes necrosados assintomáticos; 4- dentes necrosados com sintomas clínicos. Os grupos radiográficos foram: A- dentes com ausência de alterações periapicais; B- dentes com lesão periapical visíveis radiograficamente. A coleta das amostras foi realizada após isolamento absoluto dos dentes e realização da abertura coronária. Seringas estéreis foram utilizadas para preenchimento dos canais radiculares com 0,1 mL de solução salina apirogênica na câmara pulpar. Com a utilização de uma lima Kerr, o canal foi agitado 5 vezes com desbridamento apical e, com o uso de novas seringas, com pressão negativa, 0,1 mL do fluido foi aspirado do canal radicular. Cada amostra coletada foi levada a tubos de teste contendo 1 mL de solução salina apirogênica. As amostras foram aquecidas a 100°C por 30 segundos para desnaturação do conteúdo protéico, especialmente das globulinas e em seguida sonificadas por 10 segundos em baixa potência. As alíquotas de cada amostra foram processadas para quantificação de endotoxinas pelo teste do lisado de amebócito de limulus. Os resultados mostraram que dentes necrosados apresentam maiores concentrações de endotoxinas e que a concentração de endotoxina é maior em dentes com sintomatologia clínica.

Vianna et al., 2007, estudaram o efeito dos procedimentos endodônticos sobre endotoxinas e patógenos endodônticos. Com este objetivo, propuseram-se a determinar a quantidade de endotoxina e bactérias em canais radiculares necrosados antes e após o preparo biomecânico usando clorexidina gel (CLX) como substância química auxiliar, e após 7 dias de medicação intracanal. Foram utilizados neste estudo 24 dentes unirradiculados, que foram

preparados com clorexidina gel 2% e 3 diferentes medicações intracanal: Ca(OH)₂ pasta; CLX gel 2%; e Ca(OH)₂ + CLX gel 2%. O teste quantitativo do lisado de amebócito de limulus foi usado para medir os níveis de endotoxina. Técnicas aeróbias e anaeróbicas de isolamento e identificação bacterianas foram utilizadas para determinar a redução bacteriana pelas unidades formadoras de colônia (UFC). Os resultados mostraram presença de endotoxina e bactérias em 100% das amostras iniciais, com concentração de endotoxina variando de 62.93 a 214.56 EU/mL e UFC entre 4×10^5 e 2.6×10^6 . Após o preparo biomecânico a média de endotoxina reduziu 44,4%. Oito canais radiculares tiveram uma redução de 99,96% de bactérias (UFC). Após 7 dias de medicação intracanal, a concentração de endotoxina diminuiu apenas 1,4% quando comparado às amostras coletadas após o preparo biomecânico, e bactérias residuais foram encontradas nas análises de cultura em 13 casos. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as medicações utilizadas. Os autores concluem que relativamente altos valores de endotoxina ainda permanecem no canal radicular após o preparo biomecânico, apesar da maioria das bactérias serem eliminadas. Nenhuma melhora significativa foi encontrada após 7 dias de medicação.

Baik et al, 2008, avaliaram a inativação pelo hidróxido de cálcio do ácido lipoteicóico de *Enterococcus faecalis*, uma bactéria patogênica Gram-positiva, associada à periodontite apical refratária. Diferentemente das bactérias gram-negativas, as bactérias gram-positivas não expressam LPS, mas LTA (ácido lipoteicóico). O LTA é semelhante ao LPS em sua estrutura e propriedades imunológicas e está relacionado com a resposta inflamatória, formação de biofilme, e adesão ao dente por causa de sua atividade adsotiva à hidroxiapatita. Assim, os autores propuseram-se a avaliar se o hidróxido de cálcio pode inativar o LTA do *E. faecalis*, levando à perda ou diminuição da resposta inflamatória. Uma enzima imunoabsorvente ligada mostrou que a morte do *E. faecalis* pelo hidróxido de cálcio foi menos potente que a morte bacteriana estimulada

pela liberação do fator de necrose tumoral- α 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- α ($p < 0.05$). 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*.

Martinho e Gomes (2008) realizaram um estudo clínico para quantificar endotoxinas e bactérias cultiváveis em dentes com necrose pulpar e periodontite apical antes e após o preparo biomecânico com NaOCl 2,5%, correlacionando endotoxinas e bactérias cultiváveis com a presença de sintomatologia clínica. Foram selecionados vinte e quatro canais radiculares e as amostras foram coletadas antes e após o preparo biomecânico. Técnicas de cultura foram utilizadas para quantificar as unidades formadoras de colônia e, para quantificação de endotoxinas foi utilizado Teste do Lisado de Amebócito de Limulus (LAL). Lipopolissacarídeos e bactérias foram detectados em 100% das amostras iniciais, com uma média de concentração de 139 Eu/mL e $2,64 \times 10^6$ unidades formadoras de colônia (ufc) por mL, respectivamente. Altos níveis de LPS foram encontrados em dentes com sintomatologia clínica ($p < 0,05$). Após o preparo biomecânico, a média de redução de endotoxinas foi de 59,99% e a média de redução bacteriana de 99,78%. Tais resultados, segundo os autores, indicam que o preparo biomecânico com NaOCl 2,5% bastante efetivo sobre bactérias, mas menos efetivo sobre endotoxinas em canais radiculares infectados. Além disso, uma associação estatisticamente significativa foi encontrada entre os altos níveis de bactérias e endotoxinas e a sintomatologia clínica.

Gomes et al. (2009), conduziram um estudo clínico comparando a eficácia do preparo biomecânico com hipoclorito de sódio 2,5% e clorexidina gel 2% na eliminação de lipopolissacarídeos (LPS)

bacterianos em dentes com necrose pulpar e periodontite apical. As amostras foram obtidas de quarenta e quatro canais radiculares antes e após o preparo biomecânico. Os dentes foram aleatoriamente divididos em dois grupos: G1- NaOCl 2,5% (n=27) e G2- CLX gel 2% (n=27). O teste do Lisado de amebócito de limulus (LAL) foi usado para quantificar as endotoxinas colhidas nas amostras. Os resultados mostraram presença de endotoxinas em 100% das amostras investigadas, com uma média de 272 EU/mL em G1 e de 152,46 EU/mL em G2. Após o preparo biomecânico houve uma redução para 86 EU/mL em G1 e 85 EU/mL em G2, ocorrendo, portanto, uma maior redução no grupo do hipoclorito de sódio. Os autores concluem que nenhuma das duas substâncias utilizadas no preparo biomecânico foram efetivas na eliminação de endotoxinas.

2.2 Produção de citocinas

Wang e Stashenko, em 1993, estudaram o papel da interleucina-1 α (IL-1 α) na patogênese da destruição óssea periapical num modelo experimental em ratos. Esses animais tiveram seus canais expostos à cavidade oral para indução de lesão periapical. Extratos de tecidos das lesões inflamatórias ativas contendo altos níveis de atividade de reabsorção óssea foram avaliados. Pela cromatografia de filtração de gel dos extratos de lesões ativas, foi demonstrado que a maior atividade estava associada a moléculas de peso molecular de 30-60 kDa e 15-20 kDa, que são consistentes com citocinas envolvidas na reabsorção óssea como IL-1 α e Fator de Necrose Tumoral (TNF). A inibição com anticitocina específica demonstrou que a atividade de reabsorção das lesões ativas foi significativamente neutralizada por anti-IL-1 α , enquanto que anti-IL- β , anti-TNF- α e anti-TNF- β apresentaram apenas efeitos moderados.

Os extratos de lesões crônicas apresentaram baixa atividade de reabsorção, a qual também foi neutralizada apenas por anti-IL-1 α . Assim, os dados deste estudo indicaram que a reabsorção óssea estimulada por infecção bacteriana foi principalmente mediada por IL-1 α neste modelo.

Marcinkiewicz et al., 1994, ativaram macrófagos para indução da produção de óxido nítrico (NO). O NO é uma molécula tumoricida e agindo na defesa contra parasitas intracelulares. No entanto seu papel como fator obrigatório no combate às bactérias extracelulares é controverso. Os macrófagos são as células mais efetivas do sistema imune, responsável por um mecanismo de defesa não-específico em inflamações crônicas e agudas. Essas células agem simultaneamente com leucócitos polimorfonucleares, constituem a primeira linha de defesa contra a inflamação, sendo primordial para resposta imune. No presente estudo foram utilizados macrófagos adquiridos do tecido peritoneal de ratos murinos. As bactérias utilizadas foram o *Staphylococcus aureus*, *S.epidermidis* e *Escherichia coli*. Em alguns grupos, as bactérias foram pré-tratadas com ácido hipocloroso (HOCl), para substituir o sistema de cloração que promove a ativação de neutrófilos que age como um sistema bactericida *in vivo*. Altos níveis de NO, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) foram encontrados após a estimulação por todas as bactérias testadas sem cloração. Entretanto, após a cloração, bactérias Gram-positivas perderam sua capacidade de produzir NO e TNF- α , considerando que a fagocitose e a produção de IL-6 não foram afetadas pela cloração.

Barthel et al., 1997, estudaram a liberação do TNF- α por monócitos após a exposição do LPS da *Escherichia coli* ao tratamento com hidróxido de cálcio [Ca(OH) $_2$]. O lipopolissacarídeo (LPS), componente celular de bactérias Gram negativas, está relacionado com a patogênese das lesões periapicais resultantes de canais infectados e o Ca(OH) $_2$ tem sido um medicamento eficaz no combate a essas infecções, reduzindo a contaminação no interior do canal radicular. Acredita-se que o

efeito terapêutico do Ca(OH)_2 pode também ser resultado da inativação direta do LPS. Assim, os autores acima mencionados propuseram-se a investigar se o potencial tóxico de um LPS de *Escherichia coli* pode ser reduzido ou eliminado pelo Ca(OH)_2 . Para isso, quatro concentrações de LPS, variando de 1- 1000 ng/mL de água estéril foram incubadas em duplicata com 25 mg Ca(OH)_2 ou apenas com água. Foram coletados monócitos do sangue periférico de um doador saudável do sexo masculino por centrifugação e plaqueados a uma densidade específica. Esses monócitos aderentes adquiridos foram incubados por 4 dias a 37°C com 5% de CO_2 com 10% de soro autólogo. As diferentes concentrações de LPS foram adicionadas no quinto dia. Após 4 horas os sobrenadantes foram coletados e quantificados para TNF- α utilizando-se um kit comercial ELISA. A análise estatística ANOVA demonstrou que o Ca(OH)_2 é capaz de inibir a capacidade dos monócitos do sangue periférico humano de produzir TNF- α estimulados pelo LPS da *E. coli*.

Grunfeld et al., 1999, estudaram a inibição os efeitos tóxicos do ácido lipoteicóico (LTA) por lipoproteínas ativadas por macrófagos. Sabe-se que a regulação do metabolismo lipídico durante uma infecção é parte do sistema de defesa, como lipoproteínas neutralizando endotoxinas (LPS) e vírus. Infecções por bactérias gram-positivas também promovem alterações no metabolismo lipídico. Com isso, os autores propuseram-se a investigar se as lipoproteínas seriam capazes de inibir os efeitos tóxicos do ácido lipoteicóico (LTA), um fragmento de bactérias gram-positivas. As lipoproteínas foram obtidas do plasma sanguíneo obtido do sangue de doadores voluntários saudáveis. O LTA ou LPS e/ou as concentrações específicas de lipoproteínas foram incubadas a 37°C por 3 horas antes da adição das células RAW 264.7. O LTA também foi pré-incubado com polimixina B por 1 hora em temperatura ambiente. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços em meio DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino por 24 horas para, em seguida, serem ativadas com LPS ou LTA. Foram

utilizados os testes do lisado de amebócito de limulus para quantificação de endotoxinas e o teste ELISA para verificação da produção do TNF. Os resultados encontrados mostraram que os macrófagos da linhagem RAW 264.7 ativados por LTA estimularam a produção do fator de necrose tumoral (TNF), no entanto em quantidades inferiores às alcançadas pela ativação com LPS. Quando uma dose efetiva máxima de LTA foi misturada com lipoproteínas do plasma humano, a capacidade de produção macrofágica do TNF foi inibida. As lipoproteínas de alta densidade (HDL) e de baixa densidade (LDL), misturadas com as lipoproteínas do plasma humano, foram capazes de inibir a capacidade do LTA de ativar macrófagos. Assim, os autores concluem que as lipoproteínas podem impedir a ativação macrofágica tanto para microrganismos gram-negativos quanto para gram-positivos.

Segura et al., 1999, realizaram um estudo comparativo *in vitro* dos efeitos de dois irrigantes endodônticos, a clorexidina e o hipoclorito de sódio, na capacidade de aderência de macrófagos à superfícies plásticas. Os macrófagos foram obtidos do tecido peritoneal de ratos e resuspensos em meio RPMI-1640. Os ratos receberam injeções intraperitoneais (5 mL) de solução de caseína 6%. Após 4 dias, os animais foram mortos e a cavidade peritoneal foi lavada com 10 mL de NaOCl 0,9% gelada. O exsudado celular foi removido com uma seringa e centrifugado para obtenção das células utilizadas no estudo. Alíquotas de 180 µL de suspensão celular foram colocadas em tubos eppendorfs, para simular a aderência aos tecidos. As soluções de clorexidina 0,12% e de NaOCl 5,25% foram dissolvidas diretamente em meio RPMI até a diluição final de 1:10, 1:100 e 1:1000. O meio RPMI sozinho foi utilizado como grupo controle. A aderência foi avaliada após 5, 15 e 30 minutos de incubação a 37°C em estufa de CO₂. Após a remoção suave (5 segundos no vortex na posição 5) das células não aderentes, alíquotas de 10 µL de cada amostra foram obtidas e o número de macrófagos não aderentes foi contado em câmaras de Neubauer. O índice aderência foi calculado

através do resultado da seguinte equação: $100 - (\text{número de macrófagos não aderentes/mL} / \text{número inicial de macrófagos/mL}) \times 100$. O digluconato de clorexidina inibiu a capacidade de aderência de macrófagos em todas as condições avaliadas. Sabendo que a aderência ao substrato é a primeira fase da atividade fagocitária dos macrófagos, o digluconato de clorexidina poderia inibir a função inflamatória macrofágica e modular as reações nos tecidos periapicais inflamados.

Murakami et al., 2001, sugerem que o LPS do *Porphyromonas endodontalis* tem um importante papel na formação de abscessos via expressão de citocinas inflamatórias. Com isso, neste 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 (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- α e interleucina 1 β do material infectado foi realizada com a utilização de um kit ELISA. O material infectado induziu a expressão de TNF- α e interleucina 1 β . Um aumento significativo foi observado nos níveis de interleucina 1 β 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., 2002, quantificaram o conteúdo da interleucina 1 β 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 β 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 β nos fibroblastos de polpas inflamadas, além de uma síntese 80% maior de colágeno comparado aos fibroblastos de polpas saudáveis.

Kim et al., 2005, avaliaram a produção de óxido nítrico (NO) e indução de síntese dessa mesma substância, induzida pelo LPS da *Prevotella nigrescens*. O óxido nítrico é uma molécula bioativa produzida por células imunocompetentes, como os macrófagos, que age como uma molécula mensageira para vários processos fisiológicos e patológicos. A *Prevotella nigrescens* é um dos agentes causadores da doença periodontal e infecções endodônticas. Os autores verificaram a produção de óxido nítrico (NO) e indução de síntese dessa mesma substância, induzida pelo LPS da *Prevotella nigrescens*, utilizando macrófagos de roedores da linhagem RAW264.7. Os autores relatam que fica claro neste estudo que o LPS do *P. nigrescens* sozinho é capaz de induzir a síntese e a produção de NO em células RAW264.7. A capacidade do LPS do *P. nigrescens* de promover a produção de NO pode ser importante no desenvolvimento de lesões crônicas acompanhadas da destruição óssea tecidual observada na doença periodontal inflamatória e infecções endodônticas.

Pezelj-Ribaric et al., 2007, avaliaram os níveis de TNF- α em exudatos de tecidos periapicais de dentes com periodontite apical, além de avaliarem seu relacionamento com achados radiológicos. Os exudatos foram coletados dos canais radiculares de 60 dentes unirradiculados com auxílio de cones de papel absorvente e os pacientes divididos em 3 grupos, de acordo com seus aspectos clínicos e radiológicos: G1- 20 pacientes com dentes com diagnóstico de periodontite apical crônica, com dor intensa ou ausência de dor, e tamanho da lesão periapical < 1cm; G2- 20 pacientes com dentes com

diagnóstico de periodontite apical crônica, com dor intensa ou ausência de dor, e tamanho da lesão periapical > 1cm; G3- (controle) – 20 pacientes com sintomas de periodontite aguda acompanhada de dor muito intensa, necrose pulpar e espessamento do ligamento periodontal observado radiograficamente. A análise das amostras coletadas dos canais radiculares foram utilizadas para quantificação de TNF- α através do teste imunoenzimático ELISA e os resultados encontrados mostraram que houve um aumento significativo nos níveis de TNF- α de dentes com patologia periapical, das lesões menores para as maiores, o que estabelece um relacionamento entre as diferentes concentrações de TNF- α e diferentes imagens radiológicas.

Prso et al., 2007, avaliaram a presença de TNF- α e interleucina-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- α 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- α entre os grupos das lesões sintomáticas e assintomáticas. O mesmo ocorreu com as concentrações

de IL-6. Assim, os autores concluem 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- α e a IL-6 possuem um papel importante na patogênese da reabsorção óssea.

Queiroz et al., 2008, avaliaram a capacidade do hidróxido de cálcio em neutralizar o lipopolissacarídeo (LPS) de *Pseudomonas aeruginosa*, através de duas metodologias: liberação de óxido nítrico (NO) e TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos. Para o ensaio do NO, as células peritoneais foram expostas a uma solução de LPS e à suspensão LPS/hidróxido de cálcio em duas concentrações (50 mg/25 mg e 25 mg/25 mg). Após 8 horas de incubação, foi utilizado o reagente de Griess para quantificação do NO liberado. No ensaio do TNF- α , a solução de LPS foi usada na concentração de 25 mg/mL e o LPS/hidróxido de cálcio a 25 mg/25 mg. Após 24 horas, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta e os valores de absorvância obtidos. Os resultados encontrados mostraram que a presença do hidróxido de cálcio nas duas concentrações avaliadas reduziu significativamente a liberação de NO e TNF- α . Os autores concluem que o LPS bacteriano representa um forte estímulo para liberação destas citocinas, mas o hidróxido de cálcio é capaz de neutralizar esse efeito.

Silva et al., 2008, estudaram o efeito de uma pasta à base de hidróxido (Calen) associada ou não ao digluconato de clorexidina 0,4% em cultura de macrófagos da linhagem celular RAW 264.7. Foram avaliados a viabilidade celular através do teste de MTT, as propriedades imunoestimulantes pela dosagem de óxido nítrico (NO), e as propriedades antiinflamatórias pela dosagem de NO, TNF- α , e IL-1 α , após a exposição aos materiais acima citados. Os resultados para o teste de MTT demonstraram que nem o Ca(OH)₂ pasta (Calen), nem a pasta Calen associada à clorexidina ou o Ca(OH)₂ p.a. apresentaram citotoxicidade

sobre os macrófagos. Além disso, os autores encontraram baixa atividade imunológica da pasta Calen associada ou não à clorexidina 0,4% nas concentrações avaliadas ($p > 0,05$). A atividade antiinflamatória com inibição do óxido nítrico e citocinas (TNF- α , e IL-1 α) foi observada apenas com Ca(OH)₂ + clorexidina na maior concentração avaliada (25 μ g/mL). Assim, é possível concluir que a pasta Calen associada à clorexidina 0,4% não alterou a viabilidade celular ou suas propriedades imunológicas e antiinflamatórias. Além disso, a adição de clorexidina à pasta de Ca(OH)₂ não traz grandes benefícios frente aos parâmetros testados.

Gazivoda et al., 2009, propuseram-se a estudar a correlação entre as 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 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , além de citocinas imunorregulatórias como fator de crescimento beta (TGF- β) 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, IL-6 e IL-8, quando comparadas às lesões assintomáticas. Dentes com grandes lesões visíveis radiograficamente apresentavam baixa porcentagem de fagócitos mononucleares, altos percentagens de células T e níveis consideráveis de TNF- α , IL-6 e IL-10. Uma correlação negativa foi encontrada entre as concentrações de TGF- β e citocinas pró-inflamatórias. TGF- β 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.

Silva et al., 2009, estudaram a presença, localização, distribuição e concentração de algumas citocinas inflamatórias em polpas saudáveis e inflamadas, através de imunohistoquímica e teste ELISA. Vinte polpas, obtidas a partir de terceiros molares saudáveis (n = 10) e de pulpectomias (n = 10) foram utilizadas para o estudo, com metade de cada grupo usada para análise através de imuno-histoquímica e outra metade utilizada para extração de proteínas e testes de ELISA. Fibroblastos obtidos de polpas dentárias saudáveis foram estimulados ou não por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS), com a intenção de simular uma agressão em culturas de células, sendo analisados através do teste ELISA os níveis de IL-1 β e IL-8. De acordo com os resultados encontrados, os autores afirmam que, imunohistoquimicamente, as polpas inflamadas apresentaram-se fortemente marcadas para citocinas inflamatórias, enquanto as polpas saudáveis não apresentaram nenhuma marcação. O teste ELISA confirmou grande quantidade de ambas as citocinas, sendo que polpas de fibroblastos estimulados por LPS produziram maior quantidade de citocinas do que as células saudáveis do grupo controle. Assim, conclui-se que polpas inflamadas apresentam valores mais altos de IL-1 β e IL-8, quando comparadas à polpas saudáveis, e fibroblastos da polpa estimulados por LPS de bactérias produzem maiores níveis de IL-1 β e IL-8, quando comparados ao grupo controle.

2.3 Solução irrigadora e/ou medicação intracanal

Craig et al., 1974, estudaram a possibilidade de prevenção da reação generalizada de Shwartzman, através da inibição da endotoxina pelo uso localizado de polimixina B. A reação de Shwartzman é uma reação tóxica a endotoxinas bacterianas em que ocorre coagulação intravascular local ou sistêmica. O tratamento com múltiplas doses de polimixina B e colistimetase foi testado quanto à possível capacidade de seqüestrar nos tecidos, quantidade suficiente de antibiótico para neutralizar os efeitos da endotoxina em três modelos animais. Os animais receberam injeção intravenosa de endotoxina nos períodos de 24, 48 ou 72 horas após a última dose de antibiótico, quando era detectada uma quantidade mínima da droga no soro. O pré-tratamento com polimixina B foi bem sucedido na prevenção da reação generalizada de Shwartzman em coelhos e na redução da mortalidade em camundongos. Entretanto, grandes doses (20 mg/Kg por dia, durante 2 ou 4 dias) foram necessárias. A extensão para mais de 24 horas de intervalo entre a última dose de polimixina B e de endotoxina, provocou uma redução ou perda de proteção antibiótica. Os cães, também utilizados no estudo, não foram capazes de tolerar a alta dosagem de polimixina B. Doses mais baixas de polimixina B, não tóxicas para cães, não impediu o choque por endotoxina e conseqüente mortalidade. O pré-tratamento com colismetate foi ineficaz para todos os modelos animais.

Morrison e Jacobs, 1976, realizaram um estudo da literatura sobre a inibição do lipopolissacarídeo pela ativação do complemento sérico pela polimixina B. O complemento sérico consiste em um grupo de proteínas que facilitam as respostas imunológica e inflamatória. A chamada cascata do complemento refere-se a uma série de reações enzimáticas que acontecem no sangue. Há 9 componentes principais designados pelos símbolos C1 a C9. A cascata pode se iniciar

de várias maneiras, principalmente por complexos antígeno-anticorpo. Neste trabalho, os autores afirmam que o tratamento de lipopolisacarídeos bacterianos (isolados de Salmonella Minnesota R595 ou purificado do lipídio A) com o antibiótico polimixina B consegue anular a capacidade destas moléculas de ativar o complemento sérico.

Jeansonne & White, 1994, realizaram um estudo comparativo para avaliar a eficiência antimicrobiana de duas soluções irrigadoras, o gluconato de clorexidina 2% e o NaOCl 5,25%. Foram selecionados para o estudo canais de dentes unirradiculados, raízes distais de molares inferiores ou canais palatinos de molares superiores. Os dentes foram divididos aleatoriamente em 3 grupos, de acordo com a solução irrigante: 1- solução de gluconato de clorexidina 2%; 2- solução de hipoclorito de sódio 5,25% e; 3- solução salina fisiológica estéril. Espécimes microbianos foram cultivados em 10 mL de caldo tioglicolato e as culturas foram cultivadas a 37°C por 72 hs em uma incubadora anaeróbica. Após a remoção das polpas, estas foram levadas ao meio de cultura, constituindo a cultura antes da instrumentação. Em seguida, os canais radiculares foram instrumentados pela técnica coroa-ápice, utilizando-se 1 mL de irrigante a cada troca de lima e 3 mL de irrigante após a última lima utilizada. Os canais foram então secos com cones de papel e preenchidos, com ajuda de uma seringa, com caldo tioglicolato que, após a agitação sônica dos canais por 5 segundos, foi removido com uma seringa estéril e aplicado na superfície do ágar, constituindo a cultura pós-irrigação. A análise de variância, teste de comparação de Kruskal-Wallis, foi realizada para avaliar a diferença entre a atividade antimicrobiana e os diferentes irrigantes. Os resultados mostraram que tanto a irrigação com clorexidina, quanto com hipoclorito de sódio, reduzem significativamente o número de culturas bacterianas pós-irrigação, não havendo diferença significativa entre as duas soluções avaliadas.

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 concluem que o hipoclorito de sódio 0,5% provocou resposta inflamatória, enquanto a clorexidina 2% não levou a uma resposta inflamatória significativa.

Önçag et al., em 2003, compararam a atividade antimicrobiana e a toxicidade do NaOCl 5,25%, clorexidina 2% e da clorexidina 0,2% + cetrimide 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 h. O crescimento bacteriano foi avaliado após 5 min. da instrumentação e após 48 h. 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 h e 2 semanas. No estudo *in vitro*, os resultados mostraram que a clorexidina 2% e a clorexidina 0,2% + cetrimide 0,2% foram significativamente mais efetivas que o NaOCl 5,25% após 5 min., entretanto após 48 h, 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% + cetrimide 0,2% apresentaram reação inflamatória moderada, entretanto, após 48 h, houve uma diminuição dessa reação. Os autores concluíram que a clorexidina 2% e a clorexidina 0,2% + cetrimide 0,2% foram mais efetivos sobre *E. faecalis* e menos tóxicos que a solução de NaOCl 5,25%.

Tanomaru et al., 2003, avaliaram o efeito do preparo biomecânico com diferentes soluções irrigadoras e medicação à base de hidróxido de cálcio, em canais radiculares de cães contendo LPS. Cento e quarenta raízes de pré-molares de sete cães foram preenchidas com LPS de *Eschechrichia coli*, que permaneceram nos canais radiculares por 10 dias. Das raízes tratadas três foram perdidas durante o processamento histológico. Foram utilizadas como soluções irrigadoras durante o preparo biomecânico: Grupo 1- hipoclorito de sódio 1% (n=20); Grupo 2- hipoclorito de sódio 2,5% (n=19); Grupo 3- hipoclorito de sódio 5% (n=19); Grupo 4- digluconato de clorexidina 2% (n=20); Grupo 5- solução salina fisiológica (n=19). No grupo 6 (n=20), a solução de LPS permaneceu no canal radicular durante todo experimento e no grupo 7 (n=20), após o preparo biomecânico com solução salina, os canais foram preenchidos com hidróxido de cálcio (controle). Após 60 dias os animais foram sacrificados e os seguintes parâmetros de alterações periapicais foram avaliados: a) infiltrado inflamatório; b) espessamento do ligamento periodontal; c) reabsorção cementária; e, d) reabsorção óssea. Escores foram atribuídos e os dados foram analisados estatisticamente através dos testes de Kruskal-Wallis e Dunn ($p < 0,05$). A análise histopatológica mostrou que os grupos 1 e 4 apresentaram maior infiltrado inflamatório, aumento da espessura do ligamento periodontal, e maiores reabsorções óssea e cementária, quando comparados ao grupo 7 que recebeu hidróxido de cálcio como medicação intracanal. Dessa forma, os autores concluem que o preparo biomecânico com as soluções irrigadoras

avaliadas não inativa os efeitos da endotoxina bacteriana, mas o hidróxido de cálcio parece inativar os efeitos induzidos pela endotoxina *in vivo*.

Basrani et al., 2004, estudaram as propriedades físicas e químicas da clorexidina e do hidróxido de cálcio em medicações intracanaís. As propriedades avaliadas foram o pH, o ângulo de contato, a radiopacidade, o tempo de trabalho e a viscosidade da clorexidina (CLX) e de medicações contendo hidróxido de cálcio $[Ca(OH)_2]$ em diferentes concentrações: CLX 2%, CLX 0,2%, $Ca(OH)_2$ 40% + CLX 0,2%, $Ca(OH)_2$ 40%, controle (metilcelulose). O pH foi avaliado com o auxílio de um pHmetro; o ângulo de contato com o auxílio de um goniômetro; a radiopacidade e o tempo de trabalho foram calculados de acordo com as normas da International Organization for Standardization; e a viscosidade foi medida com o auxílio de um viscosímetro. De acordo com os resultados encontrados, a CLX não afetou o pH, a radiopacidade e o tempo de trabalho do hidróxido de cálcio em medicações intracanaís ($p < 0,05$). No entanto, o acréscimo da CLX diminuiu o ângulo de contato e aumentou a viscosidade do hidróxido de cálcio significativamente. Para que as medicações apresentem uma boa eficácia, é importante que estejam em contato com a dentina por um período de tempo, assim a diminuição do ângulo de contato seria prejudicial ao tratamento. A baixa viscosidade também é desejável para permitir melhor fluidez da medicação no interior dos canais radiculares, garantindo um alto coeficiente de penetração. Neste estudo, embora a combinação $Ca(OH)_2$ + CLX tenha mostrado uma alta viscosidade, esta ainda foi considerada dentro de uma faixa desejável. Assim, os autores concluíram que tanto a CLX, nas diferentes concentrações, quanto sua combinação com o hidróxido de cálcio, apresentaram propriedades físico-químicas satisfatórias para uso como medicação intracanal.

Menezes et al., 2004, avaliaram *in vitro* a efetividade do hipoclorito de sódio (NaOCl), clorexidina e 5 medicamentos intracanaís sobre microrganismos do canal radicular. Para realização deste estudo,

foram utilizados noventa e seis dentes unirradiculados humanos extraídos. Após a remoção das coroas, os canais foram preparados e as superfícies externas das raízes impermeabilizadas com resina epóxi. Após a esterilização, os dentes foram contaminados com *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*, e em seguida mantidos em estufa microbiológica a 37 ± 1 °C por 7 dias. A divisão dos grupos ocorreu de acordo com as soluções irrigadoras e medicações intracanal utilizadas: grupo 1- solução salina fisiológica e hidróxido de cálcio; grupo 2- solução salina fisiológica e paramonoclorofenolcanforado (PMCC); grupo 3- solução salina fisiológica e tricresol formalina; grupo 4- solução salina fisiológica e pasta de hidróxido de cálcio + PMCC; grupo 5- solução salina fisiológica + paramonoclorofenol furacin; grupo 6- NaOCl 2,5% sem medicação intracanal, e grupo 8- solução salina fisiológica sem medicação intracanal (controle). Foram coletadas amostras microbiológicas com cones de papel e as colônias bacterianas foram contadas. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA ($p=0,05$). Para *C. albicans*, os grupos 3 e 8 foram estatisticamente menos efetivos que os grupos 1, 2, 4 e 5. Para *E. faecalis*, os grupos 6 e 8 foram estatisticamente menos efetivos do que os grupos de 1 a 4 e 7. Os resultados encontrados permitiu aos autores concluir que a pasta de hidróxido de cálcio + PMCC foi a medicação intracanal mais eficaz na eliminação dos dois microrganismos estudados e que a solução de clorexidina 2% foi mais efetiva sobre *E. faecalis* do que o NaOCl 2,5%.

Oliveira et al., 2005, realizaram um estudo *in vitro* com objetivo de avaliar os efeitos do hidróxido de cálcio e da polimixina B em canais radiculares. Setenta e cinco incisivos superiores recém extraídos foram usados neste estudo. As coroas dos dentes foram seccionadas e as raízes padronizadas em 14mm. Todos os canais radiculares foram instrumentados até a lima Kerr nº 50 sob irrigação com hipoclorito de sódio 1% e esterilização com radiação gama-cobalto. Uma suspensão padronizada contendo endotoxina de *Escherichia coli* foi inoculada dentro

dos 60 canais radiculares. Os espécimes foram então aleatoriamente divididos em 5 grupos (n=15), de acordo com a medicação intracanal utilizada: G1- hidróxido de cálcio; G2- polimixina B; G3- combinação de neomicina - polimixina B – hidrocortisona; G4- controle positivo (sem medicação intracanal); G5- controle negativo (sem endotoxina e sem medicação intracanal). Passados 7 dias, a quantidade de endotoxina foi medida pelo teste do lisado de amebócito de limulus e a produção de anticorpos pela cultura de linfócitos B (teste ELISA). Os grupos 1, 2 e 5 apresentaram os melhores resultados pelo teste do lisado de amebócito de limulus e foi significativamente diferente dos grupos 3 e 4 ($p < 0,05$). O estímulo da produção de anticorpos em cultura celular pelos grupos 1 e 6 foi menor e estatisticamente diferente dos grupos 2, 3, 4 e 5 ($p < 0,05$). Os grupos 2 e 5 produziram um pequeno aumento na produção de anticorpos em relação aos grupos 1 e 6. Os grupos 3 e 4 tiveram um aumento significativo na produção de anticorpos. Com estes resultados, os autores concluem que o hidróxido de cálcio e a polimixina B como medicação intracanal inibiram a toxicidade da endotoxina nos canais radiculares e alteraram as propriedades do LPS estimulando a produção de anticorpos por linfócitos B. A combinação neomicina- polimixina B- hidrocortisona não foi capaz de eliminar a endotoxina.

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*). Foi utilizada a técnica de difusão em ágar pelo método de poço. 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.

Soares et al., 2006, avaliaram a eficácia anti-séptica da instrumentação rotatória associada às pastas à base de hidróxido de

cálcio [Ca(OH)₂] contendo diferentes veículos e anti-sépticos. Foram experimentalmente induzidas lesões periapicais crônicas em 72 canais radiculares de pré-molares de 4 cães e, sob controlada assepsia, após amostras microbiológicas iniciais (A1), fez-se a instrumentação com o sistema ProFile, utilizando-se o hipoclorito de sódio a 5,25% como irrigante, seguido de medicação intracanal. Em função das pastas utilizadas obtiveram-se 4 grupos: grupo 1- pasta Calen, grupo 2- Calen+PMCC, grupo 3- Ca(OH)₂ p.a.+ solução anestésica e grupo 4- Ca(OH)₂ p.a.+ solução de digluconato de clorexidina a 2%. Após 21 dias as pastas foram removidas, permanecendo os canais radiculares vazios. Após 96 horas a segunda amostragem microbiológica (A2) foi obtida. O número de unidades formadoras de colônias de microrganismos (UFC) e a incidência de culturas positivas antes e após cada tratamento foram analisados pelo teste de Wilcoxon enquanto a influência dos diferentes tratamentos na infecção intracanal foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5,0%. Verificaram-se nas amostras A1 elevadas quantidades de anaeróbios obrigatórios, facultativos e estreptococos do grupo viridans em 100% dos canais radiculares. Nas amostras A2, todos os tratamentos proporcionaram significativa redução do número de UFC e de culturas positivas (p<0.05), mas somente nos grupos 3 e 4 foram alcançados 100,0% dos canais radiculares livres de microrganismos. Os autores concluem que a instrumentação automatizada coadjuvada pela solução de hipoclorito de sódio a 5,25% associada à medicação intracanal proporcionaram drástica redução ou eliminação da microbiota intracanal, cujo desempenho não foi influenciado pela natureza do veículo ou do anti-séptico acrescido ao hidróxido de cálcio p.a.

Ballal et al., 2007, estudaram a ação antimicrobiana de uma pasta de hidróxido de cálcio, da clorexidina gel 2% e da combinação destes sobre patógenos endodônticos (*Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*). A inoculação dos microrganismos foi realizada em placas de

cultura em ágar dextrose Sabouraud e em ágar sangue. As placas foram contaminadas e então preenchidas com pasta de hidróxido de cálcio, clorexidina gel 2% e com a combinação destes. As placas de ágar foram mantidas *overnight* em incubação a 37°C e as zonas de inibição foram examinadas após 24 e 72 horas. Os resultados encontrados sugeriram que a clorexidina gel 2% sozinha foi mais efetiva do que a pasta de hidróxido de cálcio sozinha ou em combinação com a CLX gel 2%, sobre ambos os microrganismos testados, embora o hidróxido de cálcio tenha apresentado melhor ação antifúngica sobre *Candida albicans* após 24 horas. Assim, os autores concluíram que, em tratamentos endodônticos, a clorexidina gel 2% pode ser uma alternativa mais efetiva como medicação intracanal do que a pasta de hidróxido de cálcio, ou mesmo a combinação dessas duas substâncias.

Manzur et al., 2007, realizaram clinicamente um estudo para quantificação de dentes com periodontite apical em dois diferentes momentos, após a instrumentação e após o uso de diferentes medicações intracanaís. Participaram do estudo 33 pacientes que apresentassem resposta negativa aos testes de sensibilidade pulpar e radiolusência periapical visível radiograficamente. Todos os tratamentos foram realizados em duas sessões, com intervalos de uma semana. As primeiras coletas (S1) foram obtidas logo após a abertura coronária, com auxílio de cones de papel. Após a realização da instrumentação dos canais radiculares, com uso do hipoclorito de sódio 1% como solução irrigadora, foram coletadas novas amostras bacteriológicas (S2). Terminada essa etapa, os pacientes foram aleatoriamente divididos em 3 grupos, de acordo com a medicação intracanal utilizada: Grupo A – Ca(OH)_2 misturado com solução salina estéril; Grupo B – clorexidina gel 2% e; Grupo C – hidróxido de cálcio misturado com clorexidina líquida 2%. As terceiras coletas foram obtidas após a remoção das medicações (S3), que permaneceram por uma semana no interior dos canais radiculares. Todas as coletas foram realizadas com a colocação de cones

de papel no interior dos canais radiculares. As amostras bacteriológicas coletadas foram avaliadas para crescimento bacteriano, observado pela turbidez e crescimento em Agar, e contagem de unidades formadoras de colônia (CFU) viáveis. O crescimento bacteriano e as unidades formadoras de colônia diminuíram significativamente de S1 para S2. As diferenças no crescimento de S2 para S3 não foram estatisticamente significantes para todos os grupos avaliados. Assim, os autores concluem que a eficácia antimicrobiana do hidróxido de cálcio, da clorexidina, e da associação entre eles, foi semelhante.

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. Os resultados foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis/Dunn e ANOVA/Tukey. 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., 2010, avaliaram a ação de medicações intracanaís sobre *Escherichia coli* e endotoxinas. Quarenta e oito canais radiculares foram contaminados *in vitro* com *E. coli* e, em seguida, instrumentados com solução glicólica de própolis e divididos entre os grupos de acordo com a medicação intracanal utilizada: Ca(OH)_2 , polimixina B ou Ca(OH)_2 + clorexidina gel 2%. 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. Os autores concluem que apenas as medicações intracanaís foram capazes de reduzir os níveis de endotoxinas nos canais radiculares e, a maior eficácia foi observada nas medicações contendo hidróxido de cálcio.

3 PROPOSIÇÃO

Considerando que as endotoxinas representam um importante agente etiológico envolvido na patogênese das lesões periapicais, e que as bactérias Gram-negativas liberam endotoxinas durante sua duplicação ou morte celular, os objetivos desta pesquisa foram:

a) avaliar *in vivo* os níveis de endotoxinas em canais radiculares com polpa necrosada e lesão periapical visível radiograficamente, antes da realização do tratamento endodôntico;

b) avaliar a efetividade do preparo biomecânico utilizando diferentes associações de agentes irrigantes: hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% + polimixina B; NaOCl 2,5% + hidróxido de cálcio (0,14%) e NaOCl 2,5% (controle) sobre endotoxinas em canais radiculares;

c) avaliar a ação da medicação intracanal (clorexidina gel 2% + hidróxido de cálcio) sobre endotoxinas em canais radiculares com polpa necrosada;

d) quantificar, durante todo o tratamento endodôntico, a produção de citocinas (IL-1 β e TNF- α) por macrófagos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares.

4. MATERIAL E MÉTODO

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP (023/2008-PH/CEP) – (Anexo A).

4.1 Seleção dos pacientes

Participaram desta pesquisa 33 pacientes, maiores de 18 anos, da clínica de Endodontia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP. Para inclusão neste estudo, os pacientes deveriam apresentar dentes unirradiculados com necrose pulpar e lesão periapicalvisível radiograficamente.

O diagnóstico de necrose pulpar e lesão periapical foi realizado por exame clínico minucioso, que compreendia testes de sensibilidade pulpar ao frio, testes de percussão, palpação apical e exame radiográfico. Foram excluídos pacientes que tivessem recebido terapia antibiótica nos últimos três meses, dentes com bolsas periodontais superiores a 4 mm e portadores de lesões endo-periodontais. Assim, os dentes incluídos na pesquisa deveriam apresentar estrutura dentária remanescente suficiente para permitir adequado isolamento absoluto.

Os pacientes que efetivamente participaram deste estudo, o fizeram após o preenchimento e assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B), instrumento pelo qual foram informados acerca de sua contribuição para o referido estudo. Os pacientes autorizaram a utilização dos dados a serem obtidos, além de serem informados de outras implicações legais de ordem geral.

Assim, foram selecionados 33 dentes unirradiculados (incisivos superiores, caninos superiores e inferiores e premolares

inferiores) que, após a realização dos testes de sensibilidade pulpar e exame radiográfico, apresentaram diagnóstico de necrose pulpar com lesão periapical visível radiograficamente.

4.2 Coleta de dados clínicos

Formulários específicos (fichas clínicas) foram devidamente preenchidos, contendo idade, gênero e o histórico minucioso do paciente (anamnese).

Com relação ao dente, foi verificada a presença de cárie, dor espontânea, dor à percussão, dor à palpação, história prévia de dor, situação periodontal, presença de fístula, edema e abscesso.

Foi verificado também o tamanho da lesão periapical em radiografias realizadas com posicionador radiográfico. Após acesso aos canais radiculares, a situação interna do canal foi avaliada, como presença de exsudato (claro, purulento ou hemorrágico), presença de restos de tecido pulpar ou canal seco.

Todas estas informações adicionais coletadas podem contribuir com a discussão dos resultados obtidos.

4.3 Preparo dos canais radiculares – Grupos experimentais

Os tratamentos endodônticos seguiram rigorosamente um protocolo técnico previamente estabelecido. Para tanto, foi inicialmente realizado o isolamento absoluto, utilizando-se grampo, lençol de borracha e cimento de fosfato de zinco na interface dente/lençol/grampo, a fim de impedir qualquer tipo de contaminação por

saliva e impedir a passagem de substâncias utilizadas na irrigação do canal radicular para a cavidade bucal. A anti-sepsia do campo operatório foi realizada com peróxido de hidrogênio (30%) (Terapêutica Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP, Brasil) por 30 segundos, seguido de solução de hipoclorito de sódio 2,5% (Terapêutica Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP, Brasil) por mais 30 segundos. Após, foi realizada a neutralização da solução de hipoclorito de sódio com tiosulfato de sódio 5% estéril (Terapêutica Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP, Brasil) [Jacinto et al., 2005; Jacinto et al., 2006; Vianna et al., 2006; Schirrmeister et al., 2007; Vianna et al., 2007].

O acesso à cavidade pulpar e remoção de teto e demais interferências foi realizado com a utilização de brocas estéreis apirogênicas em alta rotação sob irrigação com solução fisiológica estéril apirogênica (Aster Produtos Médicos Ltda, Sorocaba, SP, Brasil). Para obtenção da primeira amostra (1ª coleta) do conteúdo do canal radicular, os canais foram preenchidos com solução fisiológica estéril apirogênica, o qual sofreu agitação com auxílio de uma lima K15 por 1 minuto e, por fim, foi aspirada com auxílio de seringa e agulha tipo insulina (Injex, São Paulo, Brasil). Este procedimento se repetiu até obtenção do volume final de 100 µL. Esta primeira amostra foi coletada imediatamente após a abertura coronária e antes da utilização de qualquer solução com atividade antimicrobiana.

Após a primeira coleta, os terços cervical e médio dos canais radiculares foram preparados utilizando-se a técnica coroa-ápice com uso de instrumentos oscilatórios (Figuras 1A, 1B e 2) (Endo-Eze – Ultradent Endodontics – USA). As limas do sistema Endo-Eze foram adaptadas ao contra-ângulo Endo-Eze, em um micro-motor (Kavo do Brasil Ltda, Joinville, SC, Brasil), e o preparo então realizado com movimentos de rotação alternada de 30 graus para cada lado. A cada troca de lima do sistema oscilatório, um instrumento manual, lima K 15

(Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland), foi utilizado (Figura 3). As limas e todos os demais instrumentais e materiais utilizados na pesquisa receberam esterilização com radiação gama Co60 (20 Kgy por 6 horas) para eliminação de endotoxinas pré-existentes.

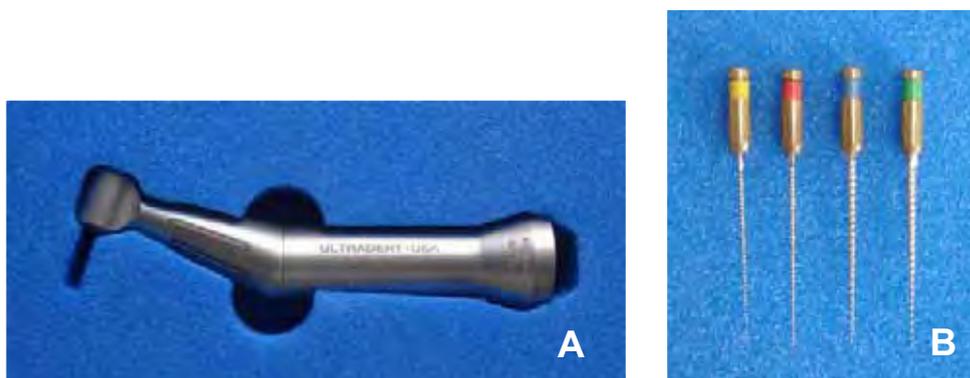


Figura 1 – Instrumentos oscilatórios Endo-Eze (1A – Contra-ângulo Endo Eze; 1B- limas do sistema Endo-Eze).



Figura 2 - Preparo coroa-ápice com a utilização de limas do sistema Endo-Eze.

Assim, tendo como referência a radiografia para diagnóstico, o comprimento provisório de trabalho ou pré-odontométrico (CPO = comprimento aparente radiográfico subtraído em 3 mm) foi

estabelecido. Com uma lima tipo Kerr nº 10 (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switserland) foi feita a exploração inicial para localizar a luz do canal e, em seguida, utilizado o instrumento 13/060 do sistema Endo-Eze, com objetivo de remover interferências cervicais, usando os mesmos princípios do “crown down pressureless technique”, sempre tendo como medida limitadora o CPO. Em seguida, um instrumento manual (lima K15) foi levado ao canal para verificar a manutenção da luz do mesmo.



Figura 3 - Recapitulação com lima Kerr 15 a cada troca de instrumento oscilatório.

Na seqüência, um instrumento oscilatório 13/045, sem pressão apical, foi utilizado com o objetivo de continuar removendo interferências, variando a conicidade do canal e progredindo em direção apical, sempre mantendo como medida limitadora o CPO. Este passo foi seguido da lima manual K15 (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switserland), instrumento oscilatório 13/035, lima manual K15 e instrumento oscilatório 10/025, até atingir o CPO.

Durante todo o preparo dos terços cervical e médio do canal radicular, a solução de hipoclorito de sódio 2,5% (Terapêutica

Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP, Brasil) foi escolhida como solução irrigadora, renovada a cada troca de instrumento.

Ao atingir o CPO, foi colocado um instrumento manual para realização da odontometria (Figura 4). Após a obtenção do comprimento do dente, realizou-se o preparo apical (0,5 a 1 mm aquém do ápice radiográfico) com a utilização de 4 limas manuais tipo Kerr (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland).

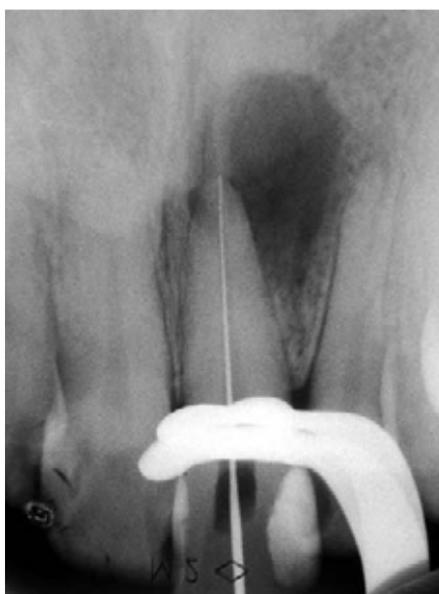


Figura 4 - Modelo radiográfico da realização da odontometria para obtenção do comprimento de trabalho.

Assim, de acordo com a associação de substâncias químicas auxiliares utilizadas durante o preparo apical, os dentes foram divididos em 3 grupos experimentais (n=11):

G1) solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% (Terapêutica Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP, Brasil);

G2) NaOCl 2,5% (Terapêutica Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP, Brasil), seguido de água de cal (Ca(OH)_2 0,14%);

G3) NaOCl 2,5% (Terapêutica Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP, Brasil) seguido de polimixina B (Ophtalmos Fórmulas Oficiais Ltda, São Paulo, SP, Brasil) [Quadro 1].

Quadro 1 – Divisão dos grupos experimentais.

Grupos/ tratamento	IRRIGAÇÃO	MEDICAÇÃO
G1 (n=11)	NaOCl 2,5%	clorexidina gel 2% + Ca(OH) ₂
G2 (n=11)	NaOCl 2,5% / água de cal (Ca(OH) ₂ 0,14%)	clorexidina gel 2% + Ca(OH) ₂
G3 (n=11)	NaOCl 2,5% / polimixina B	clorexidina gel 2% + Ca(OH) ₂

No grupo G1, para as quatro limas usadas na confecção do batente apical, foi utilizada solução de hipoclorito de sódio 2,5%, renovada a cada troca de lima.

Desta forma, no grupo G2, para as duas primeiras limas usadas na confecção do batente apical, foi utilizada solução de hipoclorito de sódio 2,5%. Em seguida, para as duas últimas limas, foram utilizados 5 mL de água de cal (Ca(OH)₂ 0,14%) como agente irrigante, com a finalidade de promover uma possível neutralização de endotoxinas após a morte das bactérias Gram-negativas. Após a última lima, os canais foram novamente preenchidos com água de cal (Ca(OH)₂ 0,14%), que sofreu agitação por 3 minutos (lima K 25 - Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland), antes da irrigação final com solução fisiológica apirogênica (Aster Produtos Médicos Ltda, Sorocaba, SP, Brasil).

No grupo G3, para as duas primeiras limas usadas na confecção do batente apical, foi utilizada solução de hipoclorito de sódio 2,5%. Em seguida, para as duas últimas limas, foi utilizada polimixina B (Ophtalmos Fórmulas Oficiais Ltda, São Paulo, Brasil) como agente

irrigante, também com a finalidade de promover uma possível neutralização de endotoxinas após a morte das bactérias Gram-negativas. A cada troca de lima, os canais eram irrigados com 5 mL de solução salina fisiológica apirogênica. Após a última lima, os canais foram novamente preenchidos com polimixina B, agitados por 3 minutos (lima K 25) antes da irrigação final com solução fisiológica apirogênica (Aster Produtos Médicos Ltda, Sorocaba, SP, Brasil).

Após o término do preparo biomecânico, em todos os canais radiculares foi realizada uma irrigação final com 5 mL de solução fisiológica estéril e apirogênica (Aster Produtos Médicos Ltda, Sorocaba, SP, Brasil) e, em seguida, foi realizada a segunda coleta do conteúdo do canal radicular, conforme descrito no item 5.4.

Todos os canais radiculares foram inundados com EDTA (Asfer Indústria Química Ltda, São Caetano do Sul, SP, Brasil) a 17%, o qual foi agitado com uma lima por 3 minutos e removido com 5 mL de solução fisiológica estéril e apirogênica (Aster Produtos Médicos Ltda, Sorocaba, SP, Brasil). Após a aplicação do EDTA para remoção da *smear layer*, efetuou-se a terceira coleta do canal radicular.

Na sequência, os canais foram secos com cones de papel absorvente (estéril e apirogênico) de tamanho compatível ao canal radicular, e preenchidos com medicação intracanal.

Uma pasta de clorexidina gel a 2% (Terapêutica Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP, Brasil) associada ao hidróxido de cálcio p.a. (proporções iguais em volume) foi a medicação intracanal de escolha para uso em todos os grupos desta pesquisa (Quadro 1). A medicação foi levada aos canais radiculares com a utilização de espiral Lentulo apirogênico (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switserland), em baixa rotação (Figura 5A e 5B). Em seguida, foram realizadas tomadas radiográficas periapicais para confirmar o completo preenchimento dos canais radiculares pela

medicação. A restauração provisória dos dentes foi realizada com cimento de ionômero de vidro (CIV).

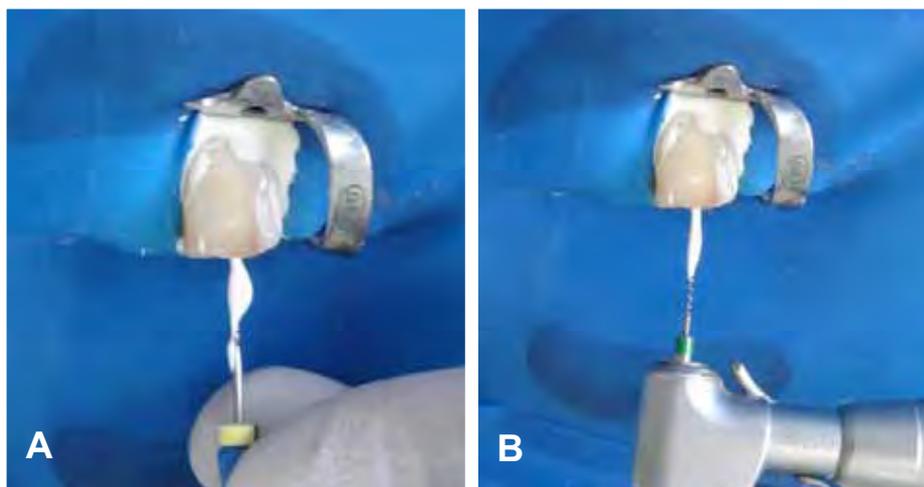


Figura 5 – Preenchimento do canal com medicação à base de hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% (A – colocação do curativo com auxílio de limas endodônticas; B – complementação do preenchimento do canal com espiral lentulo).

Após 14 dias de permanência da medicação (MIC), novo isolamento absoluto foi realizado. A restauração provisória (CIV) foi retirada com auxílio de alta rotação e os canais radiculares receberam irrigação com 10 mL de solução salina fisiológica apirogênica (Aster Produtos Médicos Ltda, Sorocaba, SP, Brasil) para remoção da medicação intracanal. Em seguida, foi realizada a quarta e última coleta do conteúdo dos canais (Quadro 2).

Quadro 2 – Coletas dos canais radiculares.

Coletas	Momento da realização das coletas
1 ^a	Imediatamente após abertura coronária
2 ^a	Após preparo biomecânico (antes da remoção da <i>smear layer</i>)
3 ^a	Após aplicação do EDTA
4 ^a	Após remoção da medicação intracanal (MIC)

Para finalização do tratamento endodôntico, todos os canais radiculares foram obturados com cones de guta-percha (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland) e cimento AH Plus (Dentsply/Maillefer SA, Ballaigues, Switzerland), pela técnica da condensação lateral ativa. A obturação foi realizada somente quando constatada ausência de sintomatologia, bem como de exsudato, sangramento e odor.

Após o término do tratamento endodôntico, os dentes foram encaminhados para realização de tratamentos restauradores definitivos. Os casos serão preservados por um período de 2 anos para verificação do sucesso do tratamento.

4.4 Coletas do conteúdo do canal radicular

Foram realizadas 4 coletas dos canais radiculares: 1^a) imediatamente após abertura coronária; 2^a) após preparo biomecânico; 3^a) após aplicação do EDTA; 4^a) após remoção da medicação intracanal (Quadro 2).

Todas as coletas do conteúdo do canal radicular foram realizadas da seguinte forma: canais inundados com solução fisiológica estéril e apirogênica (Aster Produtos Médicos Ltda, Sorocaba, SP, Brasil), agitada por 1 minuto com uma lima estéril e apirogênica e aspiração com auxílio de seringa e agulha tipo insulina (Injex, São Paulo, Brasil). Este procedimento foi repetido até completar o volume final da amostra de 100 μL . As amostras coletadas foram transferidas para microtubos de polipropileno tipo Eppendorf contendo 900 μL de água estéril e apirogênica. Todas as amostras foram utilizadas para quantificação de endotoxinas e para avaliação dos efeitos citotóxicos (produção de citocinas) em cultura de macrófagos.

4.5 Quantificação de endotoxinas (LPS) pelo teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL)

Para todas as coletas dos canais radiculares, o teste escolhido para verificar a presença de endotoxinas foi o teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (análise quantitativa).

O *Limulus* é constituído por um lisado dos amebócitos circulantes de um caranguejo ferradura (*Limulus polyphemus*) que, quando exposto a quantidade pequena de endotoxina, aumenta sua opacidade bem como sua viscosidade, tornando-se um gel duro (Levin & Bang, 1968). Estes autores demonstraram que a formação do coágulo era resultado de uma reação enzimática entre a endotoxina e uma proteína coagulável presente na circulação do amebócito de *Limulus*. Assim, pelo método QCL cinético do LAL, a endotoxina da bactéria Gram-negativa catalisa a ativação de uma pré-enzima em enzima. A enzima ativada

catalisa a clivagem do substrato sintético Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNa em peptídeo (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg) e p-nitroanilina (pNa), de coloração amarela. A pNa transformada durante a reação é medida fotometricamente a 405 nm, continuamente, durante o período de incubação (37°C). A concentração de endotoxina da amostra é calculada a partir de seu tempo de reação por comparação ao tempo de reação das soluções-padrão contendo quantidades conhecidas de endotoxina.

Nos dias das coletas, foram realizadas diluições da endotoxina padrão de *E. coli* (Cambrex Bio Science, MD, USA) em diferentes concentrações que representam os padrões de comparação das amostras (curva-padrão). Para cada amostra, foi realizado um controle positivo (amostra do conteúdo do canal radicular adicionada de uma quantidade conhecida de endotoxina), para verificar a presença ou não de interferentes.

Em uma microplaca apirogênica de 96 poços, foram adicionados 100µL de água apirogênica (branco da reação), os padrões de endotoxina, as amostras coletadas dos canais radiculares e os controles positivos. Os testes foram realizados em quadruplicata. A placa foi então incubada no leitor cinético QCL (Cambrex Bio Science, MD, USA) a 37±1°C por 10 min, o qual está acoplado a um microcomputador com *software* Wink QCL específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios. A seguir, foram adicionados em cada poço da placa 100 µL do reagente cinético cromogênico do LAL (Sigma Chemical Company, St Louis, USA), com uma micropipeta de 8 canais e ponteiras apirogênicas (Figura 7). Após o início do ensaio cinético, o *software* da leitora de microplacas monitorou, de forma contínua durante todo o ensaio, a absorbância a 405 nm em cada poço da microplaca. O leitor determinou o tempo necessário para aumentar a absorbância de cada poço a 0,200 unidades de absorbância, denominado tempo de reação. O *software* Wink QCL automaticamente calculou uma correlação linear

log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Os parâmetros da curva-padrão foram impressos no relatório.



Figura 7– Preparo para realização do teste para quantificação de endotoxina; colocação do reagente cinético cromogênico (LAL).

Os resultados deste teste foram avaliados estatisticamente pela análise de variância ANOVA, com nível de significância de 5%, e pelo teste de Tukey, para os valores reais de endotoxinas encontrados.

A análise do percentual de redução entre as coletas foi realizada através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn (5%).

4.6 Avaliação dos efeitos citotóxicos do conteúdo do canal radicular – produção de citocinas em macrófagos

4.6.1 Cultura Celular

Uma linhagem de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) obtida do banco de células da Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM, Rio de Janeiro, RJ) foi mantida em meio DMEM (LGCBio, São Paulo, SP, Brasil) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen do Brasil, São Paulo, SP) (Figura 8). O meio de cultura era trocado a cada 2 dias e as células permaneceram em estufa a 37°C com 5% de CO₂ (Figura 9).

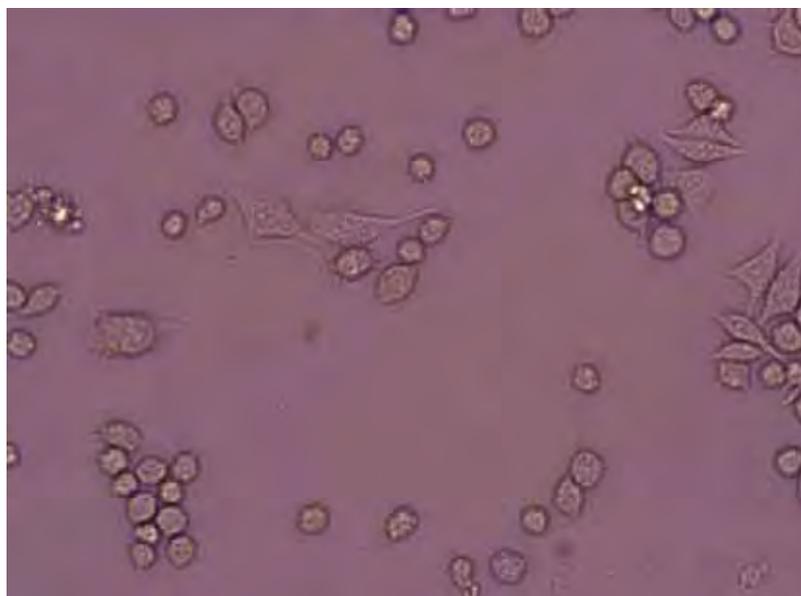


Figura 8 – Macrófagos de camundongo (RAW 264.7) em meio DMEM enriquecido com soro fetal bovino (aumento 200x).



Figura 9 – Estufa utilizada para crescimento celular (A). Temperatura de 37°C e concentração de CO₂ de 5% (B).

4.6.2 Viabilidade da cultura de células

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão utilizando azul de tripan e contagem das células viáveis em câmara de Neubauer (Figura 10). Para realização dos testes, foram colocadas 10⁵ células viáveis em cada poço da placa de polistireno de 24 poços (Corning Costar Cell Culture Plates, Cole Parmer, Canada), acrescentado de meio DMEM enriquecido com soro fetal bovino até a obtenção de um volume final de 500 µL.

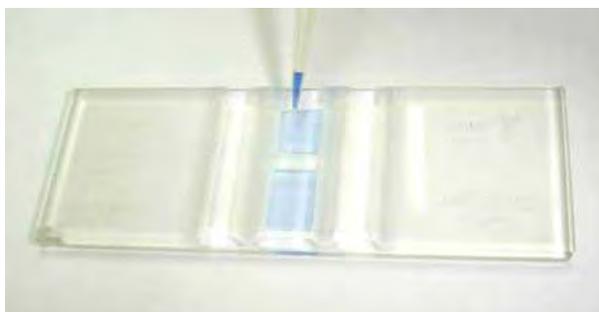


Figura 10– Preparo da câmara de Neubauer para contagem, em microscópio de luz invertida, das células viáveis.

Previamente à contagem, as células foram removidas dos frascos de crescimento celular com o auxílio de um varredor de células (TPP, Switzerland) (Figura 11A) e colocadas em um tubo falcon para centrifugação a 9000 rpm por 5 minutos. Após esse período, observou-se no tubo a aglomeração das células “pelet” em uma única superfície (Figura 11B).

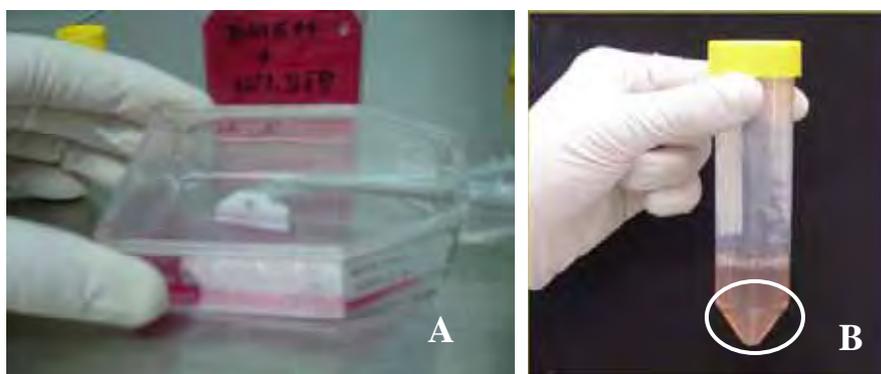


Figura 11 – (A) Remoção celular para utilização no experimento; (B) Formação de aglomerado celular (“pelet” após centrifugação).

4.6.3 Ativação celular

Após distribuição das células nos poços (Figura 12), estas permaneceram em estufa a 37°C por 4 horas para adequada aderência dos macrófagos.

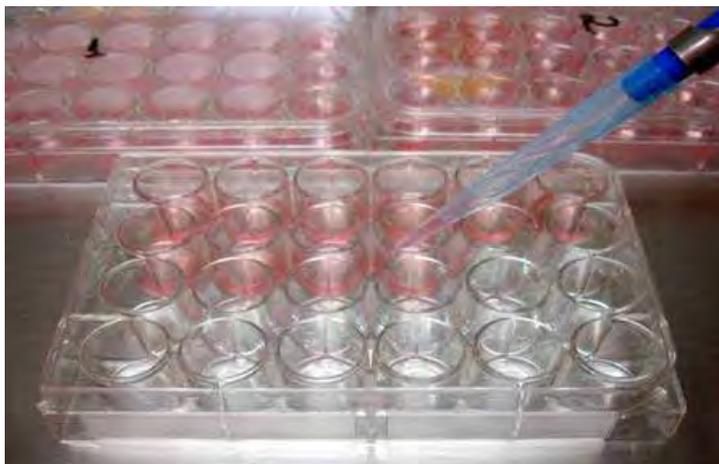


Figura 12– Distribuição das células nas microplacas de 24 poços.

Passado esse período, as células foram ativadas com as amostras coletadas dos canais radiculares (Figura 13) e as placas contendo as células ativadas permaneceram em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por um período de 24 horas, período suficiente para desencadear uma resposta imunológica celular às endotoxinas, com conseqüente liberação de mediadores químicos inflamatórios.

Nesta fase da pesquisa, foram realizados dois grupos controles (positivo e negativo). No grupo controle positivo (G4), as células foram ativadas com uma concentração conhecida de endotoxina (10 EU/mL), e no grupo controle negativo (G5), as células foram distribuídas nos poços sem, no entanto, receberem nenhuma ativação por coletas ou endotoxinas.

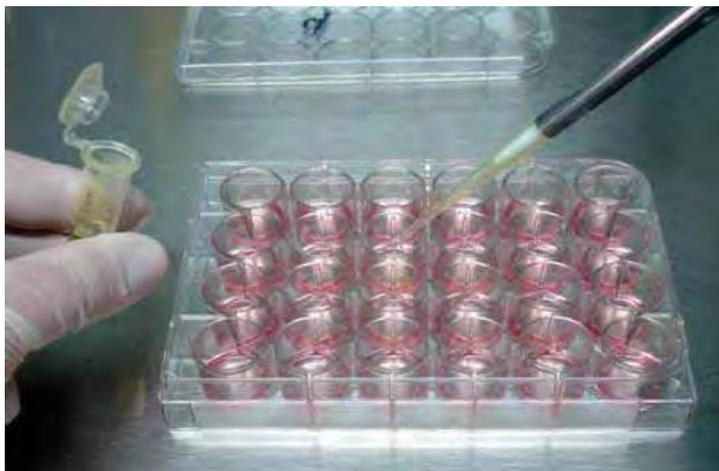


Figura 13 – Ativação das células com as coletas obtidas do conteúdo dos canais radiculares.

Após 24 horas, os sobrenadantes foram removidos e congelados em freezer convencional.

As amostras congeladas foram submetidas à detecção e quantificação de citocinas (IL-1 β e TNF- α) pelo teste imunoenzimático (ELISA).

4.6.4 Teste imunoenzimático (ELISA) para quantificar citocinas

A produção de TNF- α e IL-1 β foi avaliada por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) utilizando os Kits DuoSet® ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, USA) (Figura 14). Assim, placas de microtitulação de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com anticorpos de detecção anti-IL-1 β ou anti-TNF- α de camundongo (R&D Systems INC, Marquette, NE) [Figura 15] e mantidas *overnight* em temperatura ambiente.



Figura 14- Kit e Reagentes utilizados para quantificação de citocinas - Kit DuoSet® ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, USA)

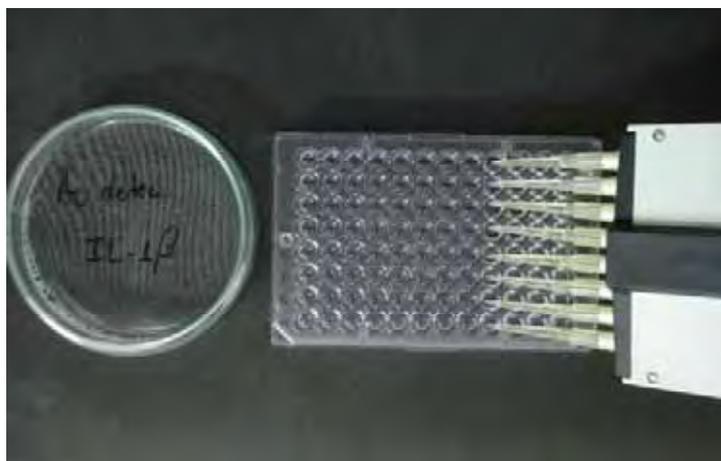


Figura 15 – Sensibilização da placa com anticorpo de detecção anti-IL-1 β .

No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS contendo Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com soro albumina bovina (BSA, 0,1%) por 1 h a 37°C. Após, as placas foram lavadas com PBS-T e receberam os sobrenadantes da cultura de células (100 μ L por poço)

[Figura 16] e os padrões das citocinas com concentrações conhecidas (curva-padrão) [Figura 17].

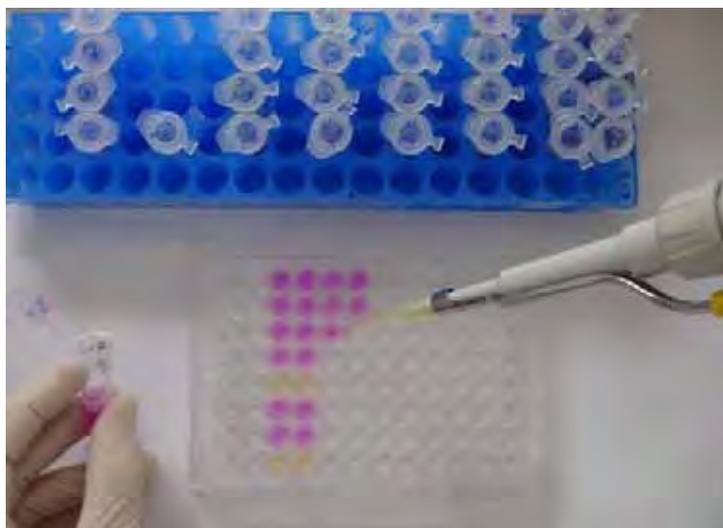


Figura 16– Distribuição dos sobrenadantes obtidos da cultura de células (100 μ L/poço).



Figura 17– Distribuição dos padrões das citocinas (curva-padrão).

Os testes foram realizados em duplicata. Após incubação a 37°C por duas horas, as placas foram novamente lavadas (PBS-T) e,

em seguida, receberam anticorpos de captura anti-IL-1 β ou anti-TNF- α marcados com biotina (100 μ L por poço).

Após duas horas de incubação, as placas foram novamente lavadas e foi adicionada estreptavidina conjugada com peroxidase (R&D Systems), mantidas por 20 minutos ao abrigo da luz (Figura 18).

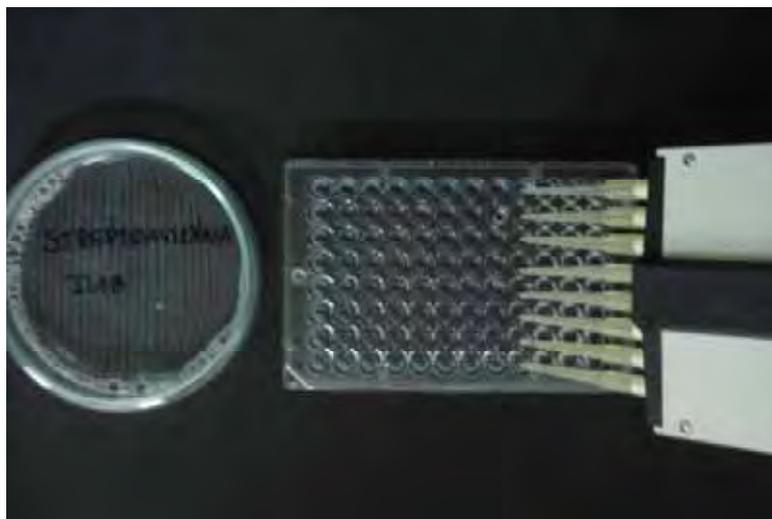


Figura 18– Distribuição da estreptavidina conjugada com peroxidase (100 μ L por poço).

Passados 20 minutos, a reação foi revelada com solução de substrato cromogênico que contém Reagente A (peróxido de hidrogênio) e Reagente B (tetrametilbenzidina) (R&D Systems) [Figura 19] e, após 20 minutos, a reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 2N (Figura 20).

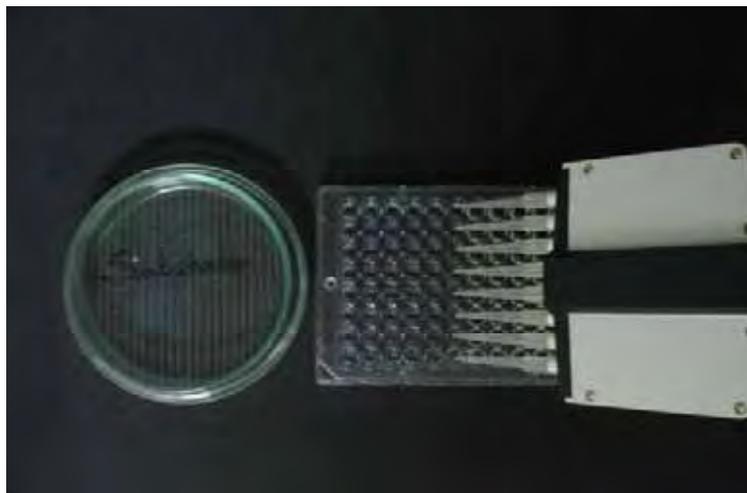


Figura 19– Revelação da reação com substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio.

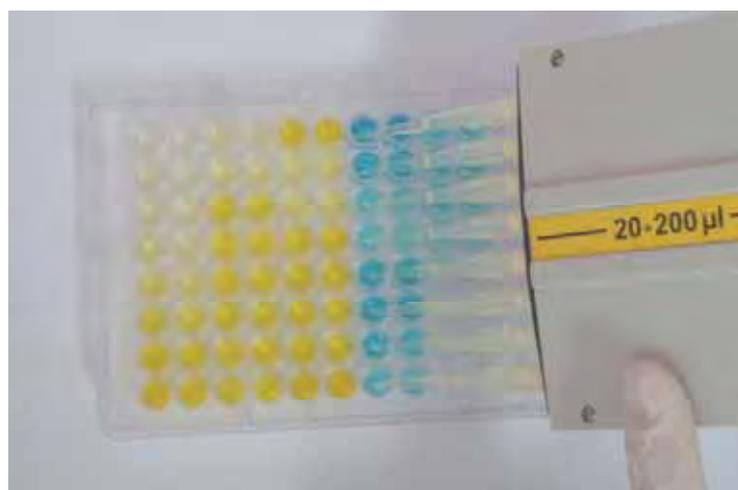


Figura 20 – Bloqueio da reação com ácido sulfúrico. Alteração de cor da reação após aplicação do ácido.

As densidades ópticas (DO) foram lidas no leitor de microplacas (Biotek) (Figura 21) com comprimento de onda de 450 nm e posteriormente convertidas em concentração (pg/mL) de TNF- α e IL-1 β com utilização do programa GraphPad Prism 4.0.



Figura 21– Placa posicionada no leitor de microplacas para obtenção das densidades ópticas das amostras.

Os resultados foram analisados estatisticamente, pela análise de variância ANOVA, com nível de significância de 5%, e pelo teste de Tukey.

Uma análise complementar (Teste de Pearson) foi realizada para verificar uma possível correlação entre os níveis de endotoxinas e citocinas encontrados.

5. RESULTADOS

5.1. Resultados para quantificação de endotoxinas

Os valores da quantidade de endotoxinas (EU/mL) presentes nas quatro coletas dos canais radiculares dos pacientes dos grupos G1, G2 e G3 estão representados nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 1– Valores de endotoxinas (EU/mL) obtidos nos canais radiculares de pacientes do grupo G1* (n=11), antes e após os tratamentos.

Pacientes	1ª coleta (inicial)	2ª coleta (após PBM)	3ª coleta (após EDTA)	4ª coleta (após MIC)
1	211	13,3	7,14	62
2	3020	2700	428	69,8
3	2080	2100	37,7	210
4	24,3	47,6	47,3	7,3
5	218	32,6	20,3	14,9
6	93,4	891	205	88,5
7	31,6	16	31,8	13,3
8	34,8	26,2	4,72	8,44
9	50000	6680	1070	618
10	440	217	183	6,49
11	472	174	45,4	142

*G1: irrigação com NaOCl 2,5%; Medicação intracanal (MIC): pasta de Ca(OH)₂ + clorexidina gel 2%

Tabela 2– Valores de endotoxinas (EU/mL) obtidos nos canais radiculares de pacientes do grupo G2* (n=11), antes e após os tratamentos.

Pacientes	1ª coleta (inicial)	2ª coleta (após PBM)	3ª coleta (após EDTA)	4ª coleta (após MIC)
12	4360	342	612	152
13	1010	160	289	131
14	8830	337	229	501
15	766	471	479	20,5
16	1430	7,45	4,38	25,9
17	46,5	22	55,3	9,88
18	188	26,2	37,1	24,5
19	18,8	12,8	14	5,57
20	10,5	30,1	22,3	18,1
21	336	84,5	108	35,5
22	68,1	8,14	17,2	13,1

*G2: irrigação com NaOCl 2,5% + água de cal; Medicação intracanal (MIC): pasta de Ca(OH)₂ + clorexidina gel 2%

Tabela 3– Valores de endotoxinas (EU/mL) obtidos nos canais radiculares de pacientes do grupo G3* (n=11), antes e após os tratamentos.

Pacientes	1ª coleta (inicial)	2ª coleta (após PBM)	3ª coleta (após EDTA)	4ª coleta (após MIC)
23	36,1	31,4	28,4	12,2
24	4480	27,2	38,2	10,6
25	511	15,5	7,71	52,5
26	802	32,5	16,5	41,9
27	2710	63,2	8,69	19,9
28	73,6	42,1	43,5	3,95
29	1370	5,82	20,7	9
30	7,93	5,82	19,5	7,37
31	1110	9,31	77,4	596
32	898	290	140	89,3
33	791	7,65	15,2	4,85

*G3: irrigação com NaOCl 2,5% + polimixina B; Medicação intracanal (MIC): pasta de Ca(OH)₂ + clorexidina gel 2%

A estatística descritiva para os valores reais de endotoxinas (EU/mL) encontrados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4– Estatística descritiva para quantidade de endotoxinas (EU/mL) obtidas nas 4 coletas (1^a, 2^a, 3^a e 4^a coletas) de cada grupo (G1- NaOCl 2,5%; G2- NaOCl 2,5% + Água de cal; G3- NaOCl 2,5% + Polimixina B).

Variáveis	N	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Maximo
1 ^a coleta G1	11	5147,5	14908	24,000	50000
2 ^a coleta G1	11	1172,4	2051,3	13,000	6680,0
3 ^a coleta G1	11	188,82	319,13	4,000	1070,0
4 ^a coleta G1	11	112,45	179,98	6,000	618,00
1 ^a coleta G2	11	1551,1	2726,2	10,000	8830,0
2 ^a coleta G2	11	136,27	168,25	7,000	471,00
3 ^a coleta G2	11	169,64	209,87	4,000	612,00
4 ^a coleta G2	11	84,818	146,82	5,000	501,00
1 ^a coleta G3	11	1162,5	1341,6	7,000	4480,0
2 ^a coleta G3	11	47,818	82,341	5,000	290,00
3 ^a coleta G3	11	37,364	39,503	7,000	140,00
4 ^a coleta G3	11	76,545	174,31	3,000	596,00

Pode-se verificar que todos os grupos apresentaram uma alta média de endotoxinas na primeira coleta, ocorrendo uma diminuição gradativa durante o tratamento. Exceção encontrada no Grupo 3, em que se observa um aumento da média de endotoxinas da 3^a para 4^a coleta.

Aplicando-se o teste de análise de variância (ANOVA) dois fatores (coletas e soluções irrigadoras), é possível observar na Tabela 5 que o valor de p foi maior que 0,05 tanto na comparação entre

grupos quanto na comparação entre coletas, o que caracteriza igualdade entre os grupos sob o ponto de vista estatístico.

Tabela 5 – ANOVA de medidas repetidas para os dados obtidos (1^a, 2^a, 3^a e 4^a coletas dos grupos G1, G2 e G3).

Efeito	GI	SQ	QM	F	P
Grupos	2	46135930	23067965	1,17	0,313
Coletas	3	144558970	48186323	2,45	0,067
Interação	6	68829355	11471559	0,58	0,743
Erro	120	2359527049	19662725		
Total	131	2619051305			

Como o objetivo principal da realização do teste de endotoxinas neste trabalho foi avaliar a efetividade das soluções irrigadoras (G1: NaOCl 2,5%; G2: NaOCl 2,5% + água de cal; G3: NaOCl 2,5% + Polimixina B), a comparação entre o percentual de redução encontrado para cada paciente após a instrumentação (da primeira para a segunda coletas), nos dará uma melhor visualização dos resultados obtidos para as soluções irrigadoras avaliadas.

Para a obtenção dos percentuais de redução encontrados entre a primeira e a segunda coletas, foi realizada a seguinte equação matemática:

$$2^{\text{a}} \text{ coleta} \times 100 / 1^{\text{a}} \text{ coleta} = \% \text{ correspondente à } 2^{\text{a}} \text{ coleta}$$

$$100 - (\% \text{ correspondente à } 2^{\text{a}} \text{ coleta}) = \% \text{ de redução EU/mL da } 1^{\text{a}} \text{ para a } 2^{\text{a}} \text{ coleta}$$

Com isso, foram encontrados os valores apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8. O valor 0 representa casos em que não houve nenhuma redução no percentual de endotoxinas da 1ª para 2ª coletas, podendo inclusive ter ocorrido um aumento da concentração.

Tabela 6. Percentuais de redução encontradas, da 1ª para 2ª coleta, para cada paciente no Grupo 1 (NaOCl 2,5%).

Pacientes	% de redução EU/mL da 1ª para 2ª coleta
1	93,7%
2	10,6%
3	0
4	0
5	85,05%
6	0
7	49,37%
8	24,71%
9	86,64%
10	50,68%
11	63,14%

Tabela 7. Percentuais de redução encontradas, da 1ª para 2ª coleta, para cada paciente no Grupo 2 (NaOCl 2,5% + água de cal).

Pacientes	% de redução EU/mL da 1ª para 2ª coletas
12	92,16%
13	84,16%
14	96,18%
15	38,52%
16	99,48%
17	52,69%
18	86,06%
19	31,92%
20	0
21	74,85%
22	88,05%

Tabela 8. Percentuais de redução encontradas, da 1ª para 2ª coleta, para cada paciente no Grupo 3 (NaOCl 2,5% + Polimixina B).

Pacientes	% de redução EU/mL da 1ª para a 2ª coleta
23	13,02%
24	99,39%
25	96,97%
26	95,95%
27	97,67%
28	42,8%
29	99,58%
30	26,61%
31	99,16%
32	67,71%
33	99,04%

A estatística descritiva dos valores de redução estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9. Estatística descritiva dos percentuais de redução, 1ª para 2ª coletas, encontrados nos grupos 1, 2 e 3 (G1- NaOCl 2,5%; G2- NaOCl 2,5% + Água de cal; G3- NaOCl 2,5% + Polimixina B).

Variáveis	N	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
G1	11	42,172	36,976	0,0000	93,700
G2	11	67,643	32,300	0,0000	99,480
G3	11	76,173	33,248	13,020	99,580

Os percentuais de redução encontrados nos grupos, da 1ª para 2ª coletas, foram submetidos ao teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Na presença de diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) foi aplicado o teste de Dunn, a fim de localizar as diferenças encontradas.

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis apontou um $p = 0,0228$ para o percentual de redução entre a 1ª e a 2ª coletas, o que confirma a presença de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Assim, a aplicação do teste de Dunn localizou a diferença entre os grupos 1 e 3 (Quadro 3).

Quadro 3. Resultados encontrados no Teste de Dunn, para o percentual de redução da 1ª para a 2ª coletas.

Variáveis	Medianas	Grupos Homogêneos*
G3	22.182	A
G2	17.591	AB
G1	11.227	B

*letras diferentes representam grupos diferentes estatisticamente

Propusemo-nos também a avaliar o tratamento endodôntico como um todo, analisando a efetividade do uso de medicação intracanal por um período de 14 dias. Assim, foi avaliado também o percentual de redução encontrado da 1ª para a 4ª coletas, para cada paciente participante da pesquisa.

Para a obtenção dos percentuais de redução encontrados entre a primeira e a quarta coletas, foi aplicado o mesmo modelo de equação matemática:

$$4^{\text{a}} \text{ coleta} \times 100 / 1^{\text{a}} \text{ coleta} = \% \text{ correspondente à } 4^{\text{a}} \text{ coleta}$$

$$100 - (\% \text{ correspondente à } 4^{\text{a}} \text{ coleta}) = \% \text{ de redução (EU/mL) da } 1^{\text{a}} \text{ para a } 4^{\text{a}} \text{ coletas}$$

Com isso, foram encontrados os valores apresentados nas Tabelas 10, 11 e 12. O valor 0 representa casos em que não houve nenhuma redução na porcentagem de endotoxinas da 1ª para 4ª coletas, podendo inclusive ter ocorrido um aumento da concentração.

Tabela 10. Percentuais de redução encontradas, da 1ª para 4ª coletas, para cada paciente no Grupo 1 (NaOCl 2,5%).

Pacientes (G1)	% de redução EU/mL da 1ª para a 4ª coleta
1	70,62%
2	97,69%
3	89,91%
4	70,0%
5	93,17%
6	5,3%
7	57,92%
8	75,75%
9	98,76%
10	98,52%
11	69,92%

Tabela 11. Percentuais de redução encontradas, da 1ª para 4ª coletas, para cada paciente no Grupo 2 (NaOCl 2,5% + água de cal).

Pacientes (G2)	% de redução EU/mL da 1ª para a 4ª coleta
12	96,52%
13	87,03%
14	94,33%
15	97,33%
16	98,19%
17	78,75%
18	86,97%
19	70,38%
20	0
21	89,44%
22	80,77%

Tabela 12. Percentuais de redução encontradas, da 1ª para 4ª coletas, para cada paciente no Grupo 3 (NaOCl 2,5% + Polimixina B).

Pacientes (G3)	% de redução EU/mL da 1ª para a 4ª coleta
23	66,21%
24	99,76%
25	89,72%
26	94,78%
27	99,27%
28	94,64%
29	99,35%
30	7,07%
31	46,31%
32	90,06%
33	99,39%

A estatística descritiva dos valores de redução estão apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13. Estatística descritiva dos percentuais de redução, da 1ª para 4ª coletas, encontrados nos grupos 1, 2 e 3.

Variáveis	N	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
G1	11	75,233	27,212	5,3000	98,760
G2	11	79,974	27,913	0,0000	98,190
G3	11	80,596	29,632	7,0700	99,760

Os percentuais de redução encontrados nos grupos, da 1ª para 4ª coletas, foram submetidos ao teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis apontou um $p = 0,4475$ ($p > 0,05$) para o percentual de redução entre a 1ª e a 4ª coletas, o que garante a ausência de diferenças estatísticas significantes entre os grupos.

5.1.1 Correlação entre sintomatologia dolorosa e quantidade de endotoxinas

Todas as características clínicas observadas e relatadas pelos pacientes participantes da pesquisa no primeiro dia de consulta, bem como no decorrer do tratamento, foram devidamente anotadas em seus respectivos prontuários odontológicos.

Tal cuidado permitiu a observação e correlação de algumas características relevantes naqueles pacientes que apresentaram altos índices de endotoxinas na coleta inicial realizada imediatamente após a abertura coronária (Quadro 4).

Quadro 4. Sinais clínicos apresentados pelos pacientes que apresentaram alta concentração de endotoxina na primeira coleta.

	Pacientes	Sintomatologia clínica
G1	2	Histórico prévio de dor. Dente aberto.
	3	Ausência de dor. Fístula persistente que regrediu após o tratamento.
	9	Histórico de abscesso. No momento do tratamento apresentava um processo crônico com fístula.
G2	12	Histórico prévio de dor e edema. Durante tratamento ausência de dor.
	13	Histórico prévio de dor. Presença de edema.
	14	Histórico prévio de dor. Dente aberto.
	16	Histórico prévio de dor. Dente aberto.
G3	24	Mobilidade. Alteração de cor e cárie. Sem sintomatologia.
	27	Mobilidade. Ausência de dor.

É possível observar que uma parte dos pacientes citados acima, que apresentavam uma quantidade elevada de endotoxinas na primeira coleta, relatou ter apresentado dor em algum momento da evolução do processo patológico de seus dentes.

No momento do atendimento e da realização da primeira coleta, todos esses pacientes apresentavam-se sem sintomatologia dolorosa.

Outros pacientes que não relataram história prévia de dor, mas apresentaram altos índices de endotoxinas na primeira coleta, apresentaram-se para tratamento com os dentes abertos e, conseqüentemente, com o canal radicular exposto ao meio bucal.

5.2 Resultados para produção de citocinas por macrófagos

5.2.1 Produção de TNF- α

Os valores da quantidade de TNF- α produzida por macrófagos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares dos pacientes dos grupos G1, G2 e G3 estão representados nas Tabelas 14, 15 e 16, respectivamente.

Tabela 14– Valores médios de TNF- α (pg/mL) produzido por macrófagos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares dos pacientes do Grupo 1*.

Pacientes	1ª coleta (inicial)	2ª coleta (após PBM)	3ª coleta (após EDTA)	4ª coleta (após MIC)
1	2424,6	722,9	845	2625,7
2	19387,1	19336,9	19353,1	16462
3	22571,8	15186,5	882,3	15069,2
4	19546	1737,6	1821,6	422,3
5	9167	996,9	674,7	2685,3
6	7506,8	18732,5	3311,2	16798,3
7	19374,6	1949,1	1401,3	42600
8	8260	1297,2	868,6	1010,9
9	21564,7	6465,6	5723,7	9531,3
10	1845,3	403,1	519,4	470,4
11	6694,6	1232,1	566,7	483,1

*G1: irrigação com NaOCl 2,5%; Medicação intracanal (MIC): pasta de Ca(OH)₂ + clorexidina gel 2%

Tabela 15– Valores médios de TNF- α (pg/mL) produzido por macrófagos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares dos pacientes do Grupo 2*.

Pacientes	1ª coleta (inicial)	2ª coleta (após PBM)	3ª coleta (após EDTA)	4ª coleta (após MIC)
12	10579,7	1323,2	2397,4	13180
13	19896,3	513,9	1400,8	973,1
14	13294,3	6720,5	16023,4	9344,7
15	17410,6	1044,7	1219,1	900,7
16	16089,1	1327,5	2139,1	22,4
17	2100,3	97,2	1182,9	412,2
18	5699,1	1591,8	1707,4	575
19	13470,5	1138,6	1040,6	396,1
20	680,7	706,2	1148,8	276,6
21	3979	544,9	766,4	148,6
22	1792,2	354	212,7	694,6

*G2: irrigação com NaOCl 2,5% + água de cal; Medicação intracanal (MIC): pasta de Ca(OH)₂ + clorexidina gel 2%

Tabela 16– Valores médios de TNF- α (pg/mL) produzido por macrófagos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares dos pacientes do Grupo 3*.

Pacientes	1ª coleta (inicial)	2ª coleta (após PBM)	3ª coleta (após EDTA)	4ª coleta (após MIC)
23	1945,2	471,3	476,1	385,4
24	19749	961,1	605,9	464,2
25	19169,8	794,1	624,6	464,2
26	3795,1	662,1	752,5	518,9
27	768,7	6343,3	471,3	1372,7
28	7117,7	471,3	523,6	267,7
29	14229,6	1304,1	1582,1	753,2
30	3104,1	1101,8	1051,7	3104
31	13731,8	1279,6	1875,6	1379,6
32	9586,1	12901,5	7005,1	7421,4
33	15825,4	1746,7	1215,3	956,6

*G3: irrigação com NaOCl 2,5% + polimixina B; Medicação intracanal (MIC): pasta de Ca(OH)₂ + clorexidina gel 2%

Dois grupos controles (positivo e negativo) foram realizados neste momento da pesquisa. No grupo controle positivo as células foram ativadas com uma concentração conhecida de endotoxina (10 EU/mL) e, no grupo controle negativo, as células não receberam ativação por coletas ou endotoxinas.

Os valores encontrados nos grupos controle positivo (G4) e negativo (G5) estão representados na Tabela 17.

Tabela 17- Quantidade de TNF- α (pg/mL) produzida pelos grupos controle (G4- positivo e G5- negativo) após a ativação celular dos macrófagos.

Poços de cultura	Controle positivo (G4)*	Controle negativo (G5)**
1	6074,65	78,27
2	5644,08	79,04
3	6624,4	69,4
4	2797,08	64,57
5	3688,91	45,94
6	4348,32	39,27
7	5028,18	30,08
8	4621,22	52,06
9	4244,35	41,87
10	4498,98	55,51
11	4776,07	85,65

*G4: quantidade de TNF- α (pg/mL) produzida pela ativação celular com concentração de endotoxina de 10 EU/mL; **G5: quantidade de TNF- α (pg/mL) produzida com a ausência de ativação celular com endotoxina.

A estatística descritiva para os valores de TNF- α produzida por macrófagos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares dos pacientes dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 estão representados na Tabela 18.

Tabela 18- Média e desvio-padrão da produção de TNF- α (pg/mL) por macrófagos nas 4 coletas de cada grupo avaliado (G1- NaOCl 2,5%; G2- NaOCl 2,5% + água de cal; G3- NaOCl 2,5% + polimixina B) e nos grupos controle positivo e negativo.

Variáveis	N	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo
1 ^a coleta G1	11	12547,0	7941,3	1845	22571
2 ^a coleta G1	11	6186,8	7667,0	403	19936
3 ^a coleta G1	11	3269,4	5561,0	519	19353
4 ^a coleta G1	11	9832,3	12799	422	42600
1 ^a coleta G2	11	9544,4	6944,4	680	19896
2 ^a coleta G2	11	1396,1	1825,9	97	6720
3 ^a coleta G2	11	2657,5	4473,9	212	16023
4 ^a coleta G2	11	2447,3	2447,3	22	13180
1 ^a coleta G3	11	9910,7	9910,7	768	19749
2 ^a coleta G3	11	2548,5	2548,5	471	12901
3 ^a coleta G3	11	1470,8	1470,8	471	7005
4 ^a coleta G3	11	1553,0	1553,0	267	7421
G4	11	4759	1076,0	2797	6624
G5	11	583,3	183,5	300,8	856,5

Aplicando-se o teste de análise de variância (ANOVA) dois fatores (coletas e soluções irrigadoras), é possível observar na Tabela 19 que o valor de p foi menor que 0,05 tanto na comparação entre grupos quanto na comparação entre coletas, o que caracteriza a presença de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Tabela 19 – ANOVA de medidas repetidas para os dados referentes à produção de TNF- α por macrófagos (1^a, 2^a, 3^a e 4^a coletas dos grupos G1, G2 e G3).

Efeito	GI	SQ	QM	F	P
Grupos	2	475679987	237839993	5,05	0,000*
Coletas	3	1356821037	452273679	13	0,000*
Interação	6	194760037	32460006	0,81	0,562
Erro	120	4794706805	39955890		
Total	131	6821967866			

*p<0,05

Ao aplicar o Teste de Tukey para confirmar e localizar as diferenças estatísticas entre as coletas (Tabela 20) foi possível observar que, a 1^a e a 4^a coletas, considerando todos os grupos avaliados, diferem estatisticamente da segunda e terceira coletas.

Tabela 20– Resultados obtidos pelo Teste de Tukey, para produção de TNF- α , confirmando a hipótese de desigualdade entre as coletas (p<0,05).

Coletas	Média (pg/mL)	Grupos homogêneos*
Primeira	10677	A
Quarta	4611	A
Segunda	3377	B
Terceira	2466	B

*letras diferentes representam grupos diferentes estatisticamente

Aplicando-se novamente o Teste de Tukey, agora para confirmação e localização das diferenças estatísticas entre os grupos (Tabela 21), foi possível observar que o grupo 1 (NaOCl 2,5%) difere estatisticamente dos grupos 2 (NaOCl 2,5% + água de cal) e 3 (NaOCl 2,5% + Polimixina B).

Tabela 21– Resultados obtidos pelo Teste de Tukey confirmando a hipótese de desigualdade entre os grupos ($p < 0,05$), referente à produção de TNF- α por macrófagos.

Grupos	Média (pg/mL)	Grupos homogêneos*
G1 (NaOCl 2,5%)	7966,2	A
G2 (NaOCl 2,5%+ água de cal)	4011,3	B
G3 (NaOCl 2,5% + Polimixina B)	3870,7	B

*letras diferentes representam grupos diferentes estatisticamente.

Considerando-se todos os grupos e coletas estudados, bem como os grupos controle realizados, a aplicação do Teste ANOVA mostrou um valor de $p=0,000$, o que garante a existência de diferenças entre as condições experimentais estudadas. Para localização das diferenças estatísticas, foi novamente aplicado o teste de Tukey, e os resultados encontrados encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22– Resultados obtidos pelo Teste de Tukey confirmando a hipótese de desigualdade entre todas as condições experimentais ($p < 0,05$), referente à produção de TNF- α por macrófagos (pg/mL).

Variáveis	Média (pg/mL)	Grupos Homogêneos
1 ^a coleta G1	12577	A
1 ^a coleta G3	9911,1	AB
4 ^a coleta G1	9832,6	ABC
1 ^a coleta G2	9544,7	ABCD
2 ^a coleta G1	6187,3	ABCDE
G4 (controle +)	4758,7	ABCDE
3 ^a coleta G1	3269,8	BCDE
3 ^a coleta G2	2658,1	BCDE
2 ^a coleta G3	2548,8	BCDE
4 ^a coleta G2	2447,6	BCDE
4 ^a coleta G3	1553,4	BCDE
3 ^a coleta G3	1471,3	CDE
2 ^a coleta G2	1396,6	CDE
G5 (controle -)	583,33	E

***letras diferentes representam grupos diferentes estatisticamente.** (G1- NaOCl 2,5%; G2- NaOCl 2,5% + água de cal; G3- NaOCl 2,5% + Polimixina B; G4- controle positivo; G5- controle negativo).

5.2.2 Produção de IL-1 β

Os valores da quantidade de IL-1 β (pg/mL) produzida por macrófagos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares dos pacientes dos grupos G1, G2 e G3 estão representados nas Tabelas 23, 24 e 25, respectivamente.

Tabela 23– Valores médios de IL-1 β (pg/mL) produzido por macrófagos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares dos pacientes do Grupo 1*.

Pacientes	1 ^a coleta (inicial)	2 ^a coleta (após PBM)	3 ^a coleta (após EDTA)	4 ^a coleta (após MIC)
1	0	0	2,11	0
2	60,06	0	3,28	48,51
3	0,68	0	0	11,11
4	0	0	0	3,67
5	0	7,19	1,46	0
6	5,49	0	1,59	0
7	47,43	12,81	0	0
8	6,15	4,58	0	0
9	150,51	0	4,32	50,51
10	0	1,51	0	0
11	0	0	0,51	0,4

*G1: irrigação com NaOCl 2,5%; Medicação intracanal (MIC): pasta de Ca(OH)₂ + clorexidina gel 2%

Tabela 24– Valores médios de IL-1 β (pg/mL) produzida por macrófagos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares dos pacientes do Grupo 2*.

Pacientes	1ª coleta (inicial)	2ª coleta (após PBM)	3ª coleta (após EDTA)	4ª coleta (após MIC)
12	686,91	0	4,26	89,51
13	22,69	1,82	0	0,9
14	621,71	0,8	174,02	68,85
15	26,32	8,14	0,81	2,43
16	6,08	3,95	5,88	0,91
17	6,8	0	0,09	0
18	10,93	0,19	2,73	5,17
19	21,41	5,17	1,61	1,11
20	0	0,14	0	0,03
21	318,77	0	0,6	38,24
22	1,51	0,94	0	0,14

*G2: irrigação com NaOCl 2,5% + água de cal; Medicação intracanal (MIC): pasta de Ca(OH)₂ + clorexidina gel 2%

Tabela 25– Valores médios de IL-1 β (pg/mL) produzido por macrófagos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares dos pacientes do Grupo 3*.

Pacientes	1 ^a coleta (inicial)	2 ^a coleta (após PBM)	3 ^a coleta (após EDTA)	4 ^a coleta (após MIC)
23	0	0	1,17	0,6
24	23,01	0	0	0,03
25	0	0	0,83	0
26	0	0	0,26	0
27	0,26	0,94	0,14	0,14
28	0,26	0,37	0,49	36,51
29	175,53	0	0,03	0
30	1,58	0	1,43	44,04
31	148,01	0	0	193,49
32	0	0	1,58	0
33	1,43	0	0	0

*G3: irrigação com NaOCl 2,5% + polimixina B; Medicação intracanal (MIC): pasta de Ca(OH)₂ + clorexidina gel 2%

Os valores encontrados nos grupos controle positivo (G4) e negativo (G5) estão representados na Tabela 26.

Tabela 26- Quantidade de IL-1 β (pg/mL) produzida pelos grupos controle (G4- positivo e G5- negativo) após a ativação celular dos macrófagos.

Poços de cultura	Controle positivo (G4)*	Controle negativo (G5)
1	8,22	0
2	8,22	0
3	7,46	0
4	19,64	0
5	23,55	0
6	20,42	0
7	21,21	0
8	11,99	0
9	13,12	0
10	15,42	0
11	17,73	0

*G4: quantidade de IL-1 β (pg/mL) produzida pela ativação celular com concentração de endotoxina de 10 EU/mL; *G5: quantidade de IL-1 β (pg/mL) produzida com a ausência de ativação celular com endotoxina.

A estatística descritiva para os valores de IL-1 β (pg/mL), produzida pela estimulação de macrófagos com as amostras coletadas dos canais radiculares, nos grupos estudados estão representados na Tabela 27.

Tabela 27- Média e desvio-padrão da produção de IL-1 β (pg/mL) por macrófagos nas 4 coletas de cada grupo avaliado (G1- NaOCl 2,5%; G2- NaOCl 2,5% + água de cal; G3- NaOCl 2,5% + polimixina B, G4- controle positivo e G5 – controle negativo

Variáveis	N	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo
1ª coleta G1	11	24,364	46,734	0,0	150,0
2ª coleta G1	11	2,1818	3,9703	0,0	12,0
3ª coleta G1	11	1,0000	1,4142	0,0	4,0
4ª coleta G1	11	10,182	19,477	0,0	50,0
1ª coleta G2	11	156,09	262,89	0,0	686,0
2ª coleta G2	11	1,5455	2,6968	0,0	8,0
3ª coleta G2	11	16,909	52,131	0,0	174,0
4ª coleta G2	11	18,455	32,051	0,0	89,0
1ª coleta G3	11	31,636	64,846	0,0	175,0
2ª coleta G3	11	0,0	0,0	0,0	0,0
3ª coleta G3	11	0,2727	0,4671	0,0	1,0
4ª coleta G3	11	24,818	58,057	0,0	193,0
G4	11	15,18	5,76	7,46	23,55
G5	11	0	0	0	0

Aplicando-se o teste de análise de variância (ANOVA) dois fatores (coletas e soluções irrigadoras), foi possível observar (Tabela 28) que o valor de p foi menor que 0,05 apenas na comparação entre coletas, confirmando a presença de diferença estatística significativa.

Entre os grupos, o valor de p foi igual a 0,06, o que caracteriza igualdade estatística.

Tabela 28 – ANOVA de medidas repetidas para os dados referentes à produção de IL-1 β por macrófagos (1^a, 2^a, 3^a e 4^a coletas dos grupos G1, G2 e G3).

Efeito	GI	SQ	QM	F	P
Grupos	2	39941	19970,6	2,88	0,060
Coleta	3	101142	33714,1	4,87	0,003*
Interação	6	84529	14088,1	2,03	0,066
Erro	120	831363	6928,0		
Total	131	1056975			

*p<0,05

Ao aplicar o Teste de Tukey para confirmar e localizar as diferenças estatísticas entre as coletas (Tabela 29) foi possível observar que, a primeira coleta encontra-se em situação de semelhança estatística com a quarta coleta, mas difere estatisticamente da segunda e terceira coletas.

Tabela 29– Resultados obtidos pelo Teste de Tukey confirmando a hipótese de desigualdade entre as coletas (p<0,05), para produção de IL-1 β por macrófagos.

Coletas	Média (pg/mL)	Grupos homogêneos*
Primeira	70,697	A
Quarta	17,818	AB
Segunda	6,061	B
Terceira	1,242	B

*letras diferentes representam grupos diferentes estatisticamente

Considerando-se todos os grupos e coletas estudados, além dos grupos controle, a aplicação do Teste ANOVA para produção de IL-1 β mostrou um valor de $p=0,0007$, o que confirma a existência de diferenças entre as condições experimentais estudadas. Para localização das diferenças estatísticas, foi aplicado o teste de Tukey (Tabela 30).

Tabela 30– Resultados obtidos pelo Teste de Tukey confirmando a hipótese de desigualdade entre todas as condições experimentais ($p<0,05$), referente à produção de IL-1 β por macrófagos (pg/mL).

Variáveis	Média (pg/mL)	Grupos Homogêneos
1 ^a coleta G2	156,09	A
1 ^a coleta G3	31,636	B
4 ^a coleta G3	24,818	B
1 ^a coleta G1	24,364	B
4 ^a coleta G2	18,455	B
3 ^a coleta G2	16,909	B
G4	14,727	B
4 ^a coleta G1	10,182	B
2 ^a coleta G1	2,1818	B
2 ^a coleta G2	1,5455	B
3 ^a coleta G1	1,000	B
3 ^a coleta G3	0,2727	B
2 ^a coleta G3	0,000	B
G5	0,000	B

***letras diferentes representam grupos diferentes estatisticamente.** (G1- NaOCl 2,5%; G2- NaOCl 2,5% + água de cal; G3- NaOCl 2,5% + Polimixina B; G4- controle positivo; G5- controle negativo).

5.3 – Teste de correlação (Pearson)

Para avaliar possível correlação entre os valores obtidos para endotoxinas, fator de necrose tumoral- α e interleucina 1 β , foi realizada uma análise estatística complementar denominada Teste de Pearson.

Para a análise de uma provável correlação, o procedimento mais usado é a correlação expressa por um coeficiente. Este coeficiente é zero quando duas variáveis são absolutamente independentes entre si, ou seja, não existe nenhuma relação entre elas. Pode assumir um valor máximo de +1,00, quando a associação for positiva, ou assumir um valor mínimo de -1,00, quando a associação for negativa.

A aplicação do teste de Pearson visa analisar se alterações na concentração de endotoxina estão correlacionadas com modificações na concentração de citocinas, de forma diretamente proporcional, caracterizando uma correlação positiva, ou de forma inversamente proporcional, caracterizando uma correlação negativa.

Os resultados encontrados no teste de correlação, para os grupos estudados, são apresentados no Quadro 5.

Quadro 5- Resultados encontrados para o teste de correlação de Pearson (r), comparando os valores obtidos para endotoxinas com os encontrados para TNF- α e IL-1 β entre os grupos.

		NaOCl 2,5%	NaOCl 2,5% + Água de cal	NaOCl 2,5% + Polimixina B
		EU/mL TNF	EU/mL TNF	EU/mL TNF
r	TNF α	0,260	TNF α 0,433	TNF α 0,584
p		0,088	0,003	0,000
r	IL1 β	0,826 0,347	IL1 β 0,846 0,405	IL1 β 0,268 0,291
p		0,000 0,021	0,000 0,006	0,078 0,056

Os valores de r encontrados para os grupos foram positivos, o que confirma que um aumento na produção de endotoxinas provoca também um aumento na produção das citocinas. A maior correlação foi obtida entre endotoxinas e produção de IL-1 β nos grupos do NaOCl 2,5% ($r = 0,826$) e do NaOCl 2,5% associado à água de cal ($r = 0,846$), que apresentaram valores de r mais próximos de 1.

No grupo do NaOCl 2,5% associado à Polimixina B (G3) verifica-se uma correlação média entre a concentração de endotoxinas e a produção de TNF- α , com um valor de r igual a 0,584.

Os resultados encontrados no teste de correlação, para as coletas realizadas durante o tratamento endodôntico, estão representados no Quadro 6.

Quadro 6- Resultados encontrados para o teste de correlação de Pearson (r), comparando os valores obtidos para endotoxinas com os encontrados para TNF- α e IL-1 β entre as coletas.

		1ª coleta		2ª coleta	
		EU/mL	TNF	EU/mL	TNF
r	TNF α	0,325		TNF α	0,474
P		0,065			0,005
r	IL1 β	0,233	0,094	IL1 β	-0,120 -0,174
P		0,193	0,601		0,505 0,333

		3ª coleta		4ª coleta	
		EU/mL	TNF	EU/mL	TNF
r	TNF α	0,407		TNF α	0,159
P		0,019			0,005
r	IL1 β	0,101	0,596	IL1 β	0,722 0,089
P		0,576	0,000		0,000 0,621

Considerando os dados obtidos entre as coletas dos canais radiculares, a maior correlação ocorreu entre a concentração de endotoxinas e a de IL-1 β na 4^a coleta, com $r = 0,722$.

Na 2^a coleta, a correlação entre a concentração de endotoxinas e a produção de IL-1 β , bem como entre as concentrações das duas citocinas, foi negativa, pronunciando alterações de valores de forma inversamente proporcional.

6 DISCUSSÃO

6.1 Da metodologia

A seleção dos pacientes participantes da pesquisa baseia-se em critérios utilizados em pesquisas anteriores realizadas na disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, bem como em trabalhos da literatura que também adquiriram amostras de canais radiculares de dentes necrosados (Jacinto et al., 2003; Jacinto et al., 2005; Pezelj-Ribaric et al, 2007; Siqueira Jr et al., 2007; Vianna et al., 2007; Martinho et al., 2008; Gazivoda et al., 2009; Gomes et al., 2009). Tanto nesta pesquisa, quanto nos trabalhos citados acima, foram selecionados pacientes que apresentassem dentes com diagnóstico de necrose pulpar com lesão periapical visível radiograficamente, comprovados através de exames clínicos e radiográficos.

Foram excluídos pacientes que tivessem recebido terapia antibiótica nos últimos três meses, garantindo assim a ausência de ação de qualquer agente antimicrobiano sobre a microbiota presente nos canais radiculares (Pezelj-Ribaric et al, 2007; Martinho et al., 2008; Gazivoda et al., 2009).

Também foram excluídos dentes que apresentassem envolvimento periodontal associado à necrose pulpar, visto que a doença periodontal apresenta uma microbiota específica que poderia elevar os níveis de endotoxinas encontrados nos canais radiculares. De acordo com Agarwal et al., patógenos periodontais possuem alta capacidade de ativar monócitos e induzir secreção de citocinas, logo o fluido gengival de pacientes com bolsas periodontais contém elevados níveis de IL-1 β , IL-6

e TNF- α , sugerindo que essas citocinas estão intimamente envolvidas na patogênese da infecção periodontal. Tanto a IL-1 β quanto o TNF- α são citocinas avaliadas neste trabalho, logo, a presença de bolsas periodontais nos dentes avaliados poderia promover uma elevação nos níveis de endotoxina e, conseqüentemente, de citocinas, o que interferiria nos resultados da presente pesquisa.

Cuidado especial foi tomado durante o isolamento absoluto dos dentes que receberiam tratamento endodôntico para garantir a anti-sepsia do meio externo envolvendo dente, grampo e lençol de borracha. Baseado em outros trabalhos da literatura que realizaram coletas *in vivo* diretamente dos canais radiculares, a anti-sepsia do campo operatório foi realizada com peróxido de hidrogênio 30% por 30 segundos, seguido de solução de hipoclorito de sódio 2,5% por mais 30 segundos e, por fim, a neutralização da solução de hipoclorito de sódio foi realizada com solução de tiosulfato de sódio 5% estéril (Jacinto et al., 2005; Jacinto et al., 2006; Vianna et al., 2006; Schirrmeister et al., 2007; Vianna et al., 2007; Gomes et al., 2009).

As limas e todos os demais instrumentais e materiais utilizados nesta pesquisa receberam esterilização com radiação gama Co60 (20 Kgy por 6 horas) para eliminação de endotoxinas pré-existentes (Czako et al., 1983). De acordo com informações fornecidas pela EMBRARAD, empresa responsável pela realização deste tipo de esterilização no estado de SP (CBE Embrarad, Cotia, SP), o processo de esterilização e descontaminação por energia ionizante, consiste na exposição dos produtos à ação de ondas eletromagnéticas curtas, geradas a partir de fontes seladas de Cobalto 60 que, ao encontrarem organismos vivos presentes no produto em tratamento, provocam o rompimento de seu DNA, levando-os à falência ou à incapacidade de reprodução. Dado o elevado poder de penetração das ondas eletromagnéticas, os organismos vivos podem ser alcançados onde quer que eles estejam, sejam em embalagens lacradas ou em produtos

acondicionados das mais variadas formas. Essa característica garante a eficácia do processo. A principal vantagem deste tipo de esterilização é sua alta efetividade na eliminação microbiana. Como desvantagens devem ser citados o custo elevado.

A escolha das soluções irrigadoras, e associações, utilizadas neste estudo foi baseada em diversos trabalhos na literatura que comprovam a eficácia destes agentes irrigantes durante a instrumentação (Holland et al., 1981; Ringel et al., 1982; Buttler et al., 1982; Barthel et al., 1997; Evans et al., 1999; Buck et al., 2001; Menezes et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Oliveira et al., 2007; Siqueira Jr et al., 2007; Martinho et al., 2008; Gomes et al., 2009).

O hipoclorito de sódio é o composto químico mais utilizado como solução irrigadora em Endodontia. Possui capacidade de alterar bioquimicamente o metabolismo celular e de formar cloraminas que interferem no metabolismo celular, além de suas ações oxidativa, inativando de forma irreversível as enzimas bacterianas, e degradativa, agindo sobre lipídios e ácidos graxos (Estrela et al., 2002). Sabe-se que o aumento da concentração da solução de hipoclorito de sódio é diretamente proporcional ao efeito antimicrobiano e à capacidade de dissolução tecidual, e inversamente proporcional à sua compatibilidade biológica (Estrela et al., 2002; Ringel et al., 1982; Vianna et al., 2004).

Siqueira Jr et al., 2007, encontraram uma porcentagem de redução bacteriana superior a 95% na maioria das coletas clínicas realizadas após o preparo biomecânico com NaOCl 2,5% ou com clorexidina gel 2%.

Também Jeansonne e White, 1994, realizando um estudo comparativo para avaliar a eficiência antimicrobiana do hipoclorito de sódio 5,25% e da solução de clorexidina 2%, encontraram resultados satisfatórios para ambas as soluções, com ausência de diferenças significativas entre elas. Uma elevada redução de culturas bacterianas pós-irrigação foi encontrada na totalidade dos casos avaliados.

Apesar de sua comprovada eficiência na eliminação bacteriana, trabalhos relatam uma pequena ou ausente eficácia do NaOCl na neutralização de endotoxinas (Gomes et al., 2009; Tanomaru et al. 2003).

Martinho e Gomes, 2008, em trabalho de pesquisa de quantificação de endotoxinas e cultivo de microrganismos de bactérias de canais radiculares infectados, antes e após o preparo biomecânico com hipoclorito de sódio 2,5%, encontraram uma redução efetiva sobre o crescimento bacteriano, mas pouco efetiva sobre as endotoxinas dos canais radiculares.

Com isso, foi proposto neste estudo associar o NaOCl de sódio a substâncias com efetividade comprovada sobre LPS, tentando compensar sua principal falha como irrigante de canais radiculares.

Um dos compostos químicos escolhidos para ser utilizado durante a irrigação, associado ao NaOCl 2,5%, foi o hidróxido de cálcio $[Ca(OH)_2]$, na forma de água de cal (Oliveira et al., 2007).

O hidróxido de cálcio desempenha um importante papel na Endodontia, principalmente por sua capacidade de induzir a formação de tecido mineralizado, além de seu reconhecido efeito antimicrobiano sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, comumente encontradas em canais radiculares infectados (Silva et al., 2002; Oliveira et al. 2005; Ballal et al., 2007). Seu elevado pH (entre 11 e 12.5) possui um efeito destrutivo sobre a membrana celular bacteriana e sua estrutura protéica (Ballal et al., 2007). Sua atividade antimicrobiana está relacionada à liberação de íons hidroxila em meio aquoso, que são altamente oxidantes e mostram extrema reatividade com muitas biomoléculas (Sathorn et al., 2007), além de detoxificar o LPS pela hidrólise de ácidos graxos da molécula de lipídio A (Baik et al., 2008).

É preciso reafirmar, no entanto, que apenas a eliminação das bactérias do interior dos canais radiculares não é suficiente para a garantia de sucesso do tratamento endodôntico, sendo essencial uma

efetiva eliminação do LPS, que permanece ativo mesmo após a morte bacteriana.

Um trabalho *in vivo* realizado em dentes de cães por Silva et al., 2004, demonstrou que após 30 dias, mesmo na ausência de bactérias, a presença da endotoxina nos canais radiculares foi capaz de induzir reações periapicais visíveis radiograficamente, com intenso infiltrado inflamatório, aumento na espessura do ligamento periodontal e reabsorção de cimento e osso alveolar.

Safavi e Nichols, 1994, e Barthel et al., 1997, demonstraram que o Ca(OH)_2 altera algumas propriedades biológicas do LPS bacteriano, como sua capacidade de estimular prostaglandina E_2 e $\text{TNF-}\alpha$ produzidos por monócitos.

De forma semelhante, Queiroz et al., 2008, avaliando a capacidade do Ca(OH)_2 de neutralizar o LPS através da produção de óxido nítrico (NO) e de $\text{TNF-}\alpha$, encontraram que a presença do Ca(OH)_2 reduziu significativamente a liberação dessas citocinas. Dessa forma, os autores concluíram que o LPS bacteriano representa um forte estímulo para liberação dessas citocinas, mas o hidróxido de cálcio é capaz de neutralizar esse efeito.

Outro composto químico escolhido para ser utilizado durante a irrigação, associado ao NaOCl 2,5%, foi a polimixina B (PMB) (Oliveira et al. 2007). A polimixina B é um peptídeo catiônico com potente ação sobre endotoxina (Oliveira et al., 2005). Sua ligação com o lipídeo A, porção tóxica e aniônica da molécula de LPS, inibe a maior parte de suas atividades (Hong et al., 2004). Em modelos animais, a PMB inibe a coagulação intravascular induzida pelo LPS, a inibição do sistema complemento, a reação generalizada de Shwartzman (reação tóxica à endotoxina bacteriana, com indução de coagulação intravascular local ou sistêmica), a produção de interferon gama, $\text{TNF-}\alpha$ e interleucina-1 por macrófagos ativados por LPS, além de prevenir choques endotóxicos

(Craig et al.,1974; Morrison e Jacobs,1976; Holland et.,1981; Oliveira et al., 2005 e 2007).

De acordo com Morrison e Jacobs, 1976, a interação lipídeo A – Polimixina B, resulta em um aumento do peso molecular global da molécula de LPS, além da diminuição da densidade. Além disso, essa interação forma uma complexo molecular altamente estável.

Em estudo realizado por Hong et al. (2004) a polimixina B inibiu a síntese de IL-1 α e TNF α por macrófagos ativados por LPS. Além disso, a administração de polimixina B reduziu o tamanho das lesões ósseas localizadas no periápice de dentes de ratos que apresentavam lesões periapicais induzidas pela inoculação de LPS em seus canais.

Oliveira et al., 2007, encontraram resultados promissores para o uso de polimixina B e de hidróxido de cálcio como irrigantes endodônticos (*in vitro*). Os resultados encontrados pelos autores mostraram que a irrigação dos canais radiculares com solução de hidróxido de cálcio 0,14% ou com polimixina B reduziram significativamente os níveis de endotoxinas nos canais radiculares em comparação às outras soluções testadas (hipoclorito de sódio e clorexidina), permanecendo apenas uma pequena quantidade de LPS nas coletas após a instrumentação.

Baseada na pesquisa citada anteriormente e como complemento à mesma, este trabalho propôs avaliar o uso dessas soluções realizando coletas *in vivo*, diretamente dos canais de pacientes que apresentaram dentes com diagnóstico de necrose pulpar com lesão periapical visível radiograficamente. Dessas coletas foram quantificadas tanto os níveis de endotoxinas, quanto de citocinas produzidas por macrófagos ativados pelo LPS presente nas coletas realizadas.

Para obtenção das amostras (coletas do conteúdo do canal radicular), os canais foram preenchidos com solução fisiológica estéril apirogênica. Esse conteúdo foi agitado com auxílio de uma lima

K15 por 1 minuto e, por fim, aspirado com auxílio de seringa e agulha tipo insulina (Injex, São Paulo, Brasil). Este procedimento se repetiu até obtenção do volume final de 100 μ L (Oliveira et al., 2005; Oliveira et al., 2007; Maekawa et al., 2010).

Essa forma de coleta é diferente da maioria dos trabalhos com coletas *in vivo* encontrados na literatura, que utilizam a colocação de cones de papel estéreis, normalmente de calibre #25 no comprimento total do canal por 1 minuto, com repetições desse procedimento de 3 a 5 vezes por coleta (Ringel et al., 1982; Jacinto et al., 2003; Jacinto et al., 2005; Manzur et al., 2007; Pezelj-Ribaric et al., 2007; Prso et al., 2007; Siqueira Jr et al., 2007; Vianna et al., 2007; Martinho et al., 2008; Gazivoda et al., 2009). No entanto, na presente pesquisa foi realizada uma nova alternativa para coleta microbiológica dos canais radiculares por acreditar que a colocação de um cone de papel de calibre #25 nem sempre chega ao terço apical no momento da realização da primeira coleta, momento este em que o dente ainda não foi submetido à instrumentação e, principalmente, por ser o cone de papel um possível interferente (barreira) para a coleta de endotoxinas, uma vez que não se sabe se a endotoxina do canal radicular que será absorvida pelo cone de papel se desprenderá facilmente após agitações, o que poderia levar a falsos resultados.

Assim, acreditamos que a agitação da solução inserida no interior do canal radicular ressuspende um maior número de microrganismos e, conseqüentemente, de endotoxinas nas amostras coletadas em todas as fases do tratamento.

A primeira coleta, realizada no momento da abertura coronária, fornece a quantidade total de endotoxinas encontrada inicialmente no dente, sem a ação de qualquer agente antimicrobiano, servindo como parâmetro de comparação para as demais coletas.

A segunda coleta, semelhantemente a outros trabalhos da literatura que realizaram coletas clínicas (Manzur et al., 2007; Siqueira

Jr et al., 2007; Vianna et al., 2007; Martinho et al., 2008), foi realizada imediatamente após o preparo biomecânico, almejando a análise da ação das soluções irrigadoras utilizadas durante a instrumentação sobre LPS.

A terceira coleta, realizada logo após o preenchimento do canal radicular com EDTA por 3 minutos, foi realizada tendo em vista a curiosidade quanto à presença ou ausência de propriedade antimicrobiana e sobre endotoxinas dessa substância.

Maekawa et al., 2009, através um estudo para avaliação da ação antimicrobiana de um EDTA gel, comparando-o ao hipoclorito de sódio 2,5%, sobre amostras clínicas de *Candida albicans* e método de diluição em caldo, encontraram que o gel de EDTA foi capaz de inibir todas as cepas clínicas a partir da diluição de 0,75%.

Estudos complementares precisam ser realizados para verificação da efetividade antimicrobiana do EDTA sobre a variedade de microrganismos presentes nos canais radiculares de dentes necrosados. Por sua vez, Clark-Holke et al., 2003, sugerem que a importância do uso do EDTA está na relação da presença de *smear layer* com a propagação bacteriana. Segundo trabalho realizado por esses autores, quando a *smear layer* é mantida, a propagação bacteriana para o periápice é maior do que nos casos em que essa camada é removida. Assim, a remoção da *smear layer* pelo EDTA 17% (3 minutos) reduz significativamente a infiltração de bactérias ao longo dos canais radiculares.

A quarta e última coleta realizada neste trabalho, ocorreu após 14 dias de medicação com pasta de hidróxido de cálcio associado à clorexidina gel 2%, com o objetivo de se verificar a ocorrência de uma redução ainda maior nos níveis de endotoxinas após o período preconizado de 14 dias de medicação (Leonardo et al., 2005).

A clorexidina é uma molécula catiônica que tem sido amplamente utilizada em Endodontia. Sua estrutura catiônica lhe proporciona uma característica importante denominada substantividade. Os íons carregados positivamente liberados pela CLX podem fixar-se à

dentina e prevenir a colonização de microorganismos na superfície da mesma por um tempo prolongado, mesmo após o período realmente utilizado (Mohammadi e Abbot, 2009).

Embora não seja capaz de promover a inativação do LPS ou de dissolver tecidos orgânicos, a CLX, além de possuir substantividade, possui também biocompatibilidade, baixa toxicidade, amplo espectro de ação antimicrobiana sobre bactérias aeróbias, anaeróbias, Gram-positivas, Gram-negativas, leveduras e fungos (Basrani et al., 2004; Ballal et al., 2007; Silva et al., 2008).

Acredita-se que a associação do hidróxido de cálcio com a clorexidina possa resultar em maior atividade antimicrobiana do que o hidróxido de cálcio sozinho, o que garantiria grandes benefícios no tratamento de dentes com necrose pulpar e periodontite apical (Manzur et al., 2007; Vianna et al., 2007; Silva et al., 2008).

Os métodos escolhidos para análise das coletas dos canais radiculares obtidas durante o tratamento endodôntico dos pacientes participantes da pesquisa foram o teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de limulus (LAL) para quantificação de endotoxinas e o teste imunoenzimático (ELISA) para quantificação das citocinas.

O teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* foi escolhido para quantificar os níveis de endotoxinas devido à sua grande sensibilidade para detecção de mínimas quantidades de endotoxina (Haight-Ponce et al., 1999; Khabbaz et al., 2000 e 2001; Oliveira et al., 2005 e 2007; Jacinto et al., 2005; Martinho et al., 2008; Schein e Schilder, 2006; Gomes et al., 2009; Maekawa et al., 2010).

O uso do lisado de amebócito de *Limulus* para detecção de endotoxinas foi preconizado por Bang (1956), que observou que uma infecção por bactérias Gram-negativas no caranguejo ferradura *Limulus polyphemus*, resultava em uma fatal coagulação intravascular. Mais tarde, em 1964, Levin e Bang demonstraram que essa coagulação intravascular

é resultante de uma reação entre a endotoxina e uma proteína presente na circulação desses animais. Seguindo seus trabalhos, Levin e Bang, em 1968, prepararam um lisado dos amebócitos circulantes no sangue do *Limulus polyphemus*, que é extremamente sensível à presença de endotoxinas.

Para que as citocinas pudessem ser produzidas e posteriormente quantificadas, macrófagos de camundongos da linhagem RAW 264.7 foram ativados com as coletas obtidas durante o tratamento endodôntico. Os macrófagos foram escolhidos devido ao seu papel essencial nos processos inflamatório e de cicatrização (Queiroz et al., 2008).

Silva et al., 2008, comprovaram que, na presença de diferentes estímulos, como o LPS bacteriano ou mesmo materiais odontológicos, os macrófagos são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 α , IL-1 β , TNF- α e IL-6, que estão envolvidas no desenvolvimento, manutenção e cicatrização das lesões periapicais.

Com relação à importância das citocinas escolhidas para análise neste trabalho, deve ser ressaltado que essas citocinas (IL-1 β e TNF- α), entre outras, não apenas orientam a resposta imune, recrutando células de defesa, mas também causam significativa destruição tecidual pela indução de colagenase por fibroblastos e ativação de osteoclastos, sendo válido ressaltar que a mesma quantidade de LPS produzirá quantidades diferentes de IL-1 β e de TNF- α , com a primeira sendo produzida em menor quantidade (Agarwal et al., 1995).

O TNF- α é uma citocina que estimula a reabsorção óssea, a síntese de prostaglandinas, e a produção de proteases por diversos tipos de células, incluindo fibroblastos e osteoblastos (Prso et al., 2007; Pezelj-Ribaric et al., 2007).

Por sua vez, a IL-1 β tem como principal papel, em baixas concentrações, mediar a inflamação local. Em altas concentrações possui efeitos endócrinos (Silva et al., 2009).

De acordo com Gazivoda et al., 2009, na patogênese da lesão periapical, os níveis de TNF- α , mas não de IL-1 β , são altos em lesões de tamanhos maiores, o que, segundo os autores, sugere que a IL-1 β , sozinha, não é responsável pela progressão da lesão. Somado a isso, a alta secreção de TNF- α em lesões grandes pode estar associada às diferentes composições do infiltrado inflamatório.

Resultados semelhantes foram encontrados por Pezelj-Ribaric et al., 2007, com altas concentrações de TNF- α detectadas em lesões periapicais com grandes áreas de radioluscência e baixas concentrações em lesões periapicais com pequenas áreas de radioluscência.

O teste ELISA (do inglês "Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay) se baseia nas reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. A técnica utiliza a união Antígeno/Anticorpo (Ag/AC) imobilizado em placa, e anticorpo conjugado a uma enzima específica para a análise em teste a qual, após agir sobre seu substrato em presença de substância cromógena, amplifica a detecção da interação Ag/AC através da formação de cor (descrição do fabricante - R&D Systems, Minneapolis, USA).

O complexo estreptavidina-biotina é formado pela ligação de uma molécula de estreptavidina com várias de biotina associadas a uma enzima, à peroxidase ou à fosfatase alcalina, que tem como função a conversão de um cromógeno incolor num produto final que pode conferir diversas cores aos anticorpos marcados. Cada molécula de estreptavidina contém 4 sítios de ligação para a biotina, sendo a biotina uma molécula facilmente conjugável com anticorpos e enzimas (González et al., 1997).

A utilização do método ELISA neste trabalho deve-se, principalmente, pela sua alta sensibilidade e especificidade, com alto grau de confiabilidade como ensaio quantitativo.

6.2 Dos resultados

6.2.1 Endotoxinas

Os microrganismos e seus produtos têm papel essencial no desenvolvimento da necrose pulpar e lesões periapicais. Estudos mostram que essas infecções são polimicrobianas, com prevalência de bactérias anaeróbias, incluindo espécies Gram-negativas e também espécies Gram-positivas (Siqueira Jr e Rôças, 2007). Entretanto, microrganismos facultativos são considerados as espécies mais resistentes da cavidade oral, e os principais causadores de falhas nos tratamentos endodônticos (Dahlén e Bergenholtz, 1980; Vianna et al., 2004).

A grande quantidade de microrganismos Gram-negativos é responsável pela liberação do LPS presente nos canais radiculares necrosados, visto que as paredes celulares desse grupo de bactérias contêm endotoxina, macromolécula composta por um complexo de lipopolissacarídeos (LPS). A molécula de LPS é liberada durante a morte e multiplicação bacteriana, causando efeitos biológicos que levam a uma reação inflamatória e reabsorção óssea periapical (Khabbaz et al., 2000).

Entre as etapas do tratamento endodôntico que envolvem o controle da infecção, o preparo biomecânico assume um importante papel na desinfecção dos canais radiculares. Instrumentos e irrigantes agem primeiramente no canal principal, área mais volumosa do sistema de canais e, conseqüentemente, eliminam grande número de células bacterianas. Somado aos efeitos mecânicos exercidos pelos instrumentos e pelos movimentos de irrigação e aspiração, o uso de substâncias antimicrobianas na irrigação é necessário para a eliminação das bactérias (Siqueira et al., 2007).

Analisando os números reais obtidos na quantificação de endotoxinas neste estudo, foram observadas diminuições nas

quantidades das primeiras para as segundas coletas e das primeiras para as quartas coletas em todos os grupos estudados, o que demonstra a existência de alguma efetividade das soluções irrigadoras associadas ao preparo biomecânico, bem como da medicação intracanal utilizada, sobre endotoxinas.

Para facilitar a visualização dos resultados, com relação aos efeitos do uso das soluções irrigadoras e da medicação intracanal sobre as endotoxinas presentes nos canais radiculares, optou-se por avaliar o percentual de redução, usando como parâmetro de comparação os valores obtidos nas primeiras coletas.

As médias de redução das primeiras para as segundas coletas (após o preparo biomecânico) foram de 42,17% para o grupo do NaOCl 2,5% utilizado sozinho; 67,64% para o grupo do NaOCl 2,5% associado à água de cal; e de 76,17% para o grupo do NaOCl 2,5% associado à Polimixina B.

O valor médio de redução encontrado para o grupo do NaOCl 2,5% sozinho neste trabalho foi mediano (42,17%), um pouco inferior aos valores encontrados por Gomes et al, 2009, que encontraram um percentual de redução de 57,98% de endotoxinas após a utilização da mesma solução irrigadora e por Martinho e Gomes, 2008, que encontraram um percentual de redução de 59,99%. Provavelmente esta redução de endotoxinas ocorreu devido ao ato de instrumentar, irrigar e aspirar, e não devido à ação do NaOCl sobre LPS, como também foi observado por Martinho e Gomes (2008) e Gomes et al. (2009).

Estes dados permitem-nos considerar que o NaOCl 2,5% utilizado sozinho durante o preparo biomecânico é pouco efetivo sobre as endotoxinas presentes nos canais radiculares infectados, embora trabalhos demonstrem que apresenta excelente capacidade de redução e eliminação bacteriana (Vianna et al., 2004; Tannomaru et al., 2005; Siqueira Jr et al., 2007; Martinho e Gomes, 2008).

Em Silva et al., 2004, foi realizado um estudo *in vivo*, com análise histológica dos efeitos de algumas soluções irrigadoras após a inoculação de endotoxinas em dentes de cães. Os resultados encontrados para o grupo que recebeu tratamento endodôntico com a utilização do NaOCl 2,5%, foram semelhantes aos encontrados no grupo que não recebeu nenhum tratamento, apenas com inoculação de LPS. Foram encontrados moderado/severo infiltrado inflamatório, reabsorção cementária, reabsorção óssea ativa, áreas de necrose, intensa proliferação vascular, considerável número de osteoclastos e ausência de osteoblastos. É importante ressaltar que os dentes permaneceram selados por 60 dias sem nenhuma medicação intracanal, o que facilitaria a presença de endotoxinas viáveis nos túbulos dentinários após a instrumentação.

Os resultados encontrados nos trabalhos citados acima, bem como os encontrados nesta pesquisa, leva-nos a acreditar que o NaOCl 2,5% apresenta falhas na eliminação de endotoxinas que, permanecendo no sistema de canais radiculares pode prejudicar o sucesso do tratamento endodôntico.

Visando melhorar a efetividade do preparo biomecânico, optou-se na presente pesquisa por associar o NaOCl à água de cal e à polimixina B, compostos que apresentam comprovada ação sobre endotoxinas (Silva et al., 2002; Haenni et al., 2003; Tanomaru et al., 2003; Hong et al., 2004; Oliveira et al., 2005 e 2007).

Os resultados encontrados para a associação NaOCl/água de cal foi de um percentual de redução da primeira para a segunda coletas de 67,64% e para a associação NaOCl/polimixina B de 76,17%, demonstrando uma melhora da efetividade da irrigação para ambas as associações, embora apenas o grupo da associação NaOCl/polimixina B tenha se apresentado diferente significativamente do NaOCl sozinho.

Não foram encontrados trabalhos na literatura que fizessem referência ao uso da associação do NaOCl com a água de cal sobre endotoxinas.

O uso do hidróxido de cálcio em solução de água apirogênica (água de cal 0,14%), bem como da polimixina B, utilizados como irrigantes, foi relatado por Oliveira et al. (2007) em pesquisa realizada *in vitro*. Os autores avaliaram a detoxificação da endotoxina pelo teste cinético de *Limulus* e pela produção de anticorpos por linfócitos B e os resultados apontaram que o hidróxido de cálcio e a polimixina B apresentaram excelente efeito sobre a eliminação das endotoxinas. Além disso, o uso desses irrigantes alterou as propriedades do LPS, impedindo a produção de anticorpos por linfócitos B. Embora uma diminuição nos níveis de endotoxina tenha sido encontrada com o uso das associações citadas, em comparação ao hipoclorito sozinho, uma pequena quantidade de endotoxina permaneceu nos canais radiculares após o preparo biomecânico. A presença desse remanescente de endotoxina provavelmente ocorreu porque o hidróxido de cálcio e a polimixina B, embora seja efetivos sobre LPS, não penetram o suficiente nos túbulos dentinários para eliminar o remanescente presente nas porções mais profundas, quando usada como agentes irrigantes.

Safavi e Nichols, 1993, mostraram que o tratamento do LPS com hidróxido de cálcio libera elevada quantidade de ácidos graxos pela hidrólise das ligações éster das cadeias lipídicas do LPS bacteriano. Assim, o tratamento com hidróxido de cálcio detoxificaria o LPS, inibindo seus efeitos patológicos na ativação celular, sob mediadores inflamatórios e indução de lesões periapicais em animais (Safavi e Nichols, 1994; Barthel et al., 1997; Nelson Filho et al., 2002; Silva et al., 2002). A detoxificação do LPS pelo hidróxido de cálcio pode ser um dos mecanismos pelo qual este agente exerça seus efeitos benéficos na endodontia.

A efetividade da polimixina B sobre endotoxinas apresentada neste trabalho está de acordo com outros trabalhos relatados na literatura (Craig et al., 1974; Morrison e Jacobs, 1976; Hong et al., 2004; Oliveira et al., 2005 e 2007).

Hong et al. (2004) verificaram que a administração sistêmica da polimixina B em ratos reduziu o tamanho das lesões periapicais em cerca de 80%. De acordo com estes autores, a polimixina B é um peptídeo catiônico com potente atividade antioxidante. Sua molécula liga-se ao lipídeo A, carregado negativamente, alterando a conformação tridimensional da molécula de LPS.

Semelhantemente, Craig et al. (1974) afirmaram que a polimixina B forma complexos com a endotoxina através de interações eletrostáticas e hidrofóbicas, confirmando a hipótese de atração da carga negativa da molécula de lipídeo A com a carga positiva da polimixina.

No atual estudo, o grupo da polimixina B associada ao NaOCl 2,5% apresentou o maior percentual de redução dos índices de endotoxinas (76,17%), da primeira para a segunda coletas, diferindo estatisticamente do hipoclorito de sódio sozinho, o que confirma o resultado alcançado por Oliveira et al., 2005, que também encontraram maior efetividade da polimixina B (utilizada como medicação intracanal) sobre os demais grupos estudados (hidróxido de cálcio e combinação neomicina-polimixina B- hidrocortisona).

Os resultados alcançados pelo grupo da Polimixina-B possibilita afirmar que o uso associado do hipoclorito de sódio a este medicamento pode ser uma alternativa viável para uso em canais radiculares.

Existem trabalhos na literatura que avaliam a biocompatibilidade do Otosporin (polimixina B + neomicina + hidrocortisona), medicamento muito utilizado em Endodontia, mas o uso isolado da polimixina B é pouco divulgado. Holland et al., 1981, avaliando tecidos periapicais de dentes de cães após sobreinstrumentação,

verificaram que o Otosporin levado em contato com os tecidos agredidos por 7 dias, promoveu a diminuição da reação inflamatória, evidenciando rapidamente o processo de reparo.

Com base nos resultados encontrados para eliminação de endotoxinas após o preparo biomecânico, que confirmam a hipótese de permanência da mesma no sistema de canais radiculares após a instrumentação, aumenta a curiosidade com relação à necessidade do uso de medicação intracanal complementar ao tratamento. Será que o uso de medicação intracanal garantiria um maior percentual de redução de endotoxinas no sistema de canais radiculares, ou apenas o preparo biomecânico associado a um eficiente irrigante seria suficiente para garantir o sucesso do tratamento?

Os resultados do presente estudo mostraram que o percentual de redução alcançado do início ao final do tratamento foi mais eficaz na eliminação de endotoxinas, o que permite-nos defender o uso de medicação intracanal em casos de necrose pulpar. A medicação utilizada, pasta de hidróxido de cálcio associada à clorexidina gel 2%, foi escolhida com base em trabalhos da literatura que comprovam a eficácia da mesma sobre microrganismos e endotoxinas (Soares et al., 200; Ballal et al., 2007; Manzur et al., 2007; Vianna et al., 2007; Silva et al., 2008; Maekawa et al., 2010).

As médias dos percentuais de redução encontradas do início ao final do tratamento (das coletas iniciais para as coletas realizadas logo após a remoção da medicação intracanal) foram de 75,23% para o grupo em que se utilizou apenas a solução de hipoclorito de sódio durante a instrumentação; de 79,97% para o grupo do hipoclorito associado à água de cal; e de 80,59% para o grupo do hipoclorito de sódio associado à polimixina B.

É possível notar que, comparados os percentuais alcançados após a segunda coleta, as médias de redução obtidas após o uso da medicação intracanal foram superiores. Em alguns pacientes,

principalmente entre os participantes do grupo da polimixina B, o índice de redução de endotoxinas aproximou-se de 100% ao final do tratamento. Acredita-se que o uso da medicação intracanal desempenhe adequada ação antimicrobiana também por permanecer em contato com os tecidos e por se difundir através destes (Basrani et al., 2004). Sendo assim, a medicação utilizada alia as propriedades antimicrobianas de ambos os componentes, e a ação do hidróxido de cálcio sobre endotoxinas, à substantividade da clorexidina (Silva et al., 2002; Basrani et al., 2004; Vianna et al., 2007; Mohammadi e Abbott, 2009).

De acordo com um trabalho de revisão de literatura realizado por Mohammadi e Abbott, em 2009, a CLX pode ser considerada uma boa alternativa para uso como medicação intracanal, utilizada sozinha ou associada a outros medicamentos. A CLX é uma molécula hidrofóbica e lipofílica. Sua dissociação resulta em íons carregados positivamente que interagem com os fosfolípidos e os lipopolissacarídeos das membranas celulares bacterianas, carregados negativamente, penetrando nas células através de algum mecanismo de transporte ativo ou passivo. Sua eficácia é devida à interação das cargas positivas da molécula e as cargas negativas dos grupos fosfato das paredes celulares bacterianas, alterando assim o equilíbrio osmótico celular. Em concentrações mais altas, como a utilizada em nosso trabalho (2%), a CLX é bactericida e a precipitação do conteúdo citoplasmático resulta em morte celular. Contudo, a utilização da clorexidina associada ao hidróxido de cálcio possibilitou importante redução de endotoxinas no presente estudo, sendo interessante sua utilização como medicação intracanal em canais radiculares com polpa necrosada e lesão periapical.

6.2.2 Citocinas

Periapicopatias de origem pulpar desenvolvem-se principalmente em resposta a irritantes microbianos presentes no sistema de canais radiculares. Componentes da parede celular bacteriana reagem com monócitos, macrófagos, bem como com fibroblastos, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8 (Pezelj-Ribaric et al., 2007).

Entre todas as citocinas, o TNF- α e a IL-1 β , através de suas múltiplas atividades, possuem um papel especialmente importante nas reações inflamatórias (Murakami et al., 2001). Alguns trabalhos (Wang & Stashenko, 1993; Barthel et al., 1997; e Pezelj-Ribaric et al., 2007) têm mostrado que essas citocinas estão presentes em níveis significantes nas lesões periapicais de humanos e de modelos experimentais em animais.

É sabido que o TNF- α leva à reabsorção óssea através da ativação dos osteoclastos e estimulação da secreção de enzimas proteolíticas, ativador plasminogênico e metaloproteinases da matriz, que são responsáveis pela destruição da matriz extracelular do tecido ósseo (Prso et al., 2007; Pezelj-Ribaric et al., 2007). Por sua vez, a IL-1 β tem sua função diretamente relacionada com a síntese de colágeno (Barkhoradar et al., 2002; Silva et al., 2009). Em baixas concentrações, a principal função da IL-1 β é mediar o local da inflamação e, em altas concentrações, possui efeitos endócrinos (Silva et al., 2009).

De acordo com Agarwal et al., 1995, tanto o TNF- α quanto a IL-1 β estimulam a síntese de colágeno e a proliferação de fibroblastos, contribuindo e, possivelmente assegurando, o reparo periapical. Neste mesmo trabalho, no qual os autores quantificaram a expressão relativa de cada citocina, foi demonstrado que o grau de ativação de monócitos depende da especificidade do LPS. O fato de um único LPS induzir diferentes níveis de citocinas indica que uma mesma quantidade de

endotoxina poderá induzir a produção de citocinas de forma diferente, o que pôde ser observado no presente estudo.

Também foi possível observar na atual pesquisa, que os níveis de IL-1 β obtidos foram sensivelmente menores do que os níveis alcançados para o TNF- α . De acordo com Agarwal et al. (1995), isso pode ser explicado porque a IL-1 β é uma citocina que pode permanecer associada à célula, exercendo sua atividade de forma localizada, como em células endoteliais, fibroblastos e outras células dos sistema imunológico. Assim, os baixos níveis destas citocinas nos sobrenadantes recolhidos para análise podem refletir apenas uma parte do total de citocinas sintetizadas pelos macrófagos.

Outra explicação para os baixos níveis de IL-1 β , pode ser obtida através de uma pesquisa realizada por Hong et al. (2004). Utilizando uma linhagem celular de macrófagos de ratos (J774) diferente da utilizada neste estudo, baixos níveis de IL-1 β foram obtidos em comparação aos níveis de TNF- α . Segundo este autor, seu trabalho somado a outros encontrados na literatura, excluem o papel da IL-1 β da patogênese das lesões periapicais em ratos.

De fato, pesquisas que utilizam polpas humanas inflamadas para cultura celular e posterior quantificação de citocinas, como em Barkhordar et al., 2002 e Silva et al., 2009, os níveis de IL-1 β são proporcionais à outras citocinas avaliadas.

Gazivoda et al., 2009, afirmaram em seu trabalho, que o papel da IL-1 β e TNF- α na patogênese da lesão periapical é diferente. Seus resultados mostram que os níveis de TNF- α , mas não de IL-1 β , são maiores em lesões de grande tamanho, suportando a hipótese e sugerindo que a IL-1 β sozinha provavelmente não é responsável pela progressão da lesão. Além disso, a maior secreção de TNF- α nas lesões de grande extensão pode estar associada às diferenças de composição do infiltrado celular.

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que a produção de citocinas foi maior na primeira coleta, realizada imediatamente após a abertura coronária dos dentes com necrose pulpar e lesão periapical, demonstrando maior efeito citotóxico na presença de maiores quantidades de endotoxinas. Tanto para o TNF- α quanto para a IL-1 β , a primeira e a quarta coletas foram semelhantes estatisticamente.

Observando-se os valores reais alcançados, e considerando as coletas realizadas em todos os grupos, é possível notar que as citocinas quantificadas nas segundas e terceiras coletas diminuíram gradativamente em comparação às primeiras coletas. No entanto, após a utilização da medicação intracanal por um período de 14 dias, um novo aumento na quantidade de citocinas foi observado. Estatisticamente, esse aumento não foi significativo para a quantificação de endotoxinas, mas apresentou significância para ambas as citocinas.

Esse aumento na concentração de endotoxinas e conseqüente elevação dos níveis de citocinas após o uso de medicação à base de hidróxido de cálcio, também foi observado por Barthel et al. (1997). Este autor sugere que elevadas concentrações de endotoxinas têm capacidade de esgotar os efeitos inibitórios do hidróxido de cálcio, além de considerar que a inativação do LPS pelo hidróxido de cálcio é reversível, permitindo às bactérias recuperarem seu potencial inflamatório.

Embora uma atenção especial tenha sido dada ao selamento dos dentes durante o período de medicação, com a utilização de cimento de ionômero de vidro, e observação da integridade do mesmo no retorno após o período de 14 dias, a possibilidade de infiltração coronária e recontaminação também podem ser consideradas. Tal fato leva-nos a questionar uma provável necessidade de novas trocas de medicação como medida preventiva em casos de dentes com necrose pulpar, ou ainda, a preservação dos casos por até 2 anos. Esse acompanhamento provavelmente irá fornecer informações a respeito da relação entre a presença de pequenas quantidades de endotoxinas nos

canais radiculares no momento da obturação e o sucesso do tratamento endodôntico com reparação da reabsorção óssea periapical. Não há relatos na literatura sobre a quantidade de endotoxina necessária para manter a lesão no periápice e prejudicar o tratamento endodôntico.

Analisando separadamente as médias obtidas em cada coleta, dentro de cada grupo avaliado, observa-se que no Grupo 1 (NaOCl 2,5%) ocorreu um aumento significativo da produção de citocinas na quarta coleta, comparadas às coletas anteriores. No Grupo 2 (NaOCl 2,5% + água de cal), comparado também à segunda e terceira coletas, embora em proporções menores, esse aumento também é observado. O Grupo 3 (NaOCl 2,5% + polimixina B) foi o grupo mais homogêneo, embora também tenha ocorrido um elevação para os níveis de IL-1 β , comparado à segunda e terceira coletas.

Considerando-se o principal objetivo deste estudo, que visa comparar a efetividade das diferentes associações de soluções irrigadoras, pode-se dizer que a quantidade de citocinas encontradas logo após o preparo biomecânico (2^a coleta) foi significativamente menor do que as concentrações obtidas inicialmente (1^a coleta) em todos os grupos estudados. No entanto, diferenças significantes foram encontradas apenas para a produção de TNF- α . Os melhores resultados, com menor produção de TNF- α , foram alcançados pelo grupo da associação NaOCl 2,5% + polimixina B (G3), seguido pela associação NaOCl 2,5% + água de cal. Estes dois grupos diferiram estatisticamente do grupo do NaOCl 2,5% utilizado sozinho, que apresentou os maiores índices de produção desta citocina.

Este resultado é coerente com os obtidos para produção de endotoxinas. O grupo da associação NaOCl 2,5% + Polimixina B foi o que apresentou os menores índices de endotoxinas após a instrumentação, o que confirma a capacidade inibidora de LPS da polimixina B. Embora para IL-1 β não tenham sido localizadas diferenças estatísticas entre os diferentes grupos, a coleta realizada logo após o

preparo biomecânico com utilização de polimixina B apresentou média zero para produção de interleucina, assemelhando-se ao grupo controle negativo, no qual os macrófagos não receberam ativação por endotoxina.

Uma pesquisa realizada por Hong et al. (2004) mostrou que a polimixina B aboliu a síntese de IL-1 α e TNF- α em macrófagos ativados por LPS. Também Oliveira et al. (2005 e 2007) encontraram redução significativa nos níveis de endotoxinas após a utilização da polimixina B, tanto para a utilização deste como agente irrigante (Oliveira et al., 2007), quanto para sua utilização como medicação intracanal (Oliveira et al., 2005).

A somatória dos resultados deste estudo aos resultados encontrados na literatura leva-nos a acreditar na polimixina B como uma alternativa para uso em Endodontia. Este antibiótico polipeptídico cíclico catiônico tem seu uso, já há bastante tempo, difundido na medicina para casos de infecções bacterianas (Craig et al., 1974; Morrison e Jacobs, 1975), no entanto, em Odontologia há poucos relatos da utilização desta substância em condições patológicas microbianas.

O uso da associação NaOCl 2,5% + água de cal também apresentou resultados satisfatórios para a produção de citocinas, comportando-se de forma semelhante à associação NaOCl 2,5% + polimixina B para a produção de TNF- α e diferente estatisticamente do NaOCl 2,5% utilizado sozinho.

A escolha para o uso do hidróxido de cálcio, tanto para uso como irrigante quanto para uso como medicação, baseia-se em trabalhos da literatura que comprovam a ação deste composto químico sobre endotoxinas. Safavi e Nichols (1993) reportaram que, *in vitro*, o hidróxido de cálcio provoca a hidrólise do lipídio A, componente tóxico da endotoxina. Além disso, os autores concluíram que após a hidrólise do lipídio A, seu potente agente tóxico é convertido em ácidos graxos e amino açúcares que não são tóxicos.

Também Barthel et al. (1997) avaliando a capacidade de neutralização do hidróxido de cálcio através da atividade biológica das endotoxinas de *Escherichia coli* pela quantificação de TNF- α liberada por monócitos humanos, concluíram que o hidróxido de cálcio neutralizou o LPS bacteriano *in vitro*.

De fato, a análise dos resultados apresentados nesta pesquisa comprova que o uso do hidróxido de cálcio como irrigante na forma de água de cal, diminuiu a quantidade de TNF- α presente nos sobrenadantes das culturas celulares de macrófagos, comportando-se de forma diferente estatisticamente e superior ao hipoclorito de sódio 2,5%. Tal diferença entre os grupos não foi observada para a produção de IL-1 β que, conforme discutido anteriormente, apresentou níveis bem menores do que o TNF- α . No entanto, é importante reafirmar que, em baixas concentrações, a IL-1 β possui um papel fundamental da mediação local da inflamação (Silva et al., 2009).

Os resultados inferiores obtidos para o uso do hipoclorito de sódio 2,5% sozinho levantam a dúvida quanto à sua efetividade sobre LPS. Embora tenha ocorrido uma diminuição significativa nos níveis de endotoxinas e citocinas após o preparo biomecânico com esta solução, é notável que o uso das associações foi significativamente superior, o que leva-nos a acreditar e defender o uso das associações aqui propostas.

7 CONCLUSÃO

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

- A) Os níveis de endotoxinas e citocinas em canais radiculares com polpa necrosada e lesão periapical visível radiograficamente são bastante elevados;
- B) A associação NaOCl 2,5% + polimixina B foi a mais eficaz na eliminação de endotoxinas e conseqüentemente na diminuição da produção de citocinas, seguido pela associação NaOCl 2,5% + água de cal. O uso do NaOCl 2,5% foi inferior às demais associações utilizadas;
- C) O uso da medicação intracanal (hidróxido de cálcio + clorexidina 2%) não foi efetivo em diminuir, de forma significativa, os índices de endotoxinas;
- D) A produção de citocinas foi superior nas coletas com maiores quantidades de endotoxinas, com maiores índices obtidos nas coletas realizadas imediatamente após a abertura coronária e, os menores índices obtidos logo após o preparo biomecânico dos canais radiculares;
- E) A quantidade de endotoxinas e a produção de citocinas apresentam correlação positiva.

8 REFERÊNCIAS*

Agarwal S, Piesco NP, Johns LP, Riccelli AE. Differential expression of IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. J Dent Res. 1995; 74(4):1057-65.

Baik JE, Kum KY, Yun CH, LeeJK, Lee K, Kim KK, Han SH. Calcium hydroxide inactives lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2008, 34(11):1355-9.

Ballal V, Kundabala M, Acharya S, Ballal M. Antimicrobial action of calcium hydroxide, chlorhexidine and their combination on endodontic pathogens. Australian Dental J. 2007; 52(2):118-21.

Bang FB. A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. Bull Johns Hopkins Hosp 1956; 98:325-51.

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

Basrani B, Ghanem A, Tjäderhane L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. J Endod, 2004; 30(6):413-17.

Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. Int Endod J. 1997; 30(3):155-9.

* 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

Buck RA, Cai J, Eleazer PD, Staat RH, Hurst HE. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. *J Endod.* 2001;27(5):325-7.

Buttler TK, Crawford JJ. The detoxifying effect of varying concentrations of sodium hypochlorite on endotoxins. *J Endod.* 1982;8(2):59-66.

Clark-Holke D, Drake D, Walton R, Rivera E, Guthmiller JM. Bacterial penetration through canals of endodontically treated teeth in the presence or absence of the smear layer. *J Dent* 2003; 31:275-81.

Craig WA, Turner JH, Kunin CM. Prevention of the generalized Shwartzman reaction and endotoxin lethality by polymyxin B localized in tissues. *Infect Immun.* 1974;10(2):287-92.

Czako G, Elin RJ, Hochstein D, Tsai CM. Physical and biological properties of US standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. *Infection and Immunity* 1983; 41(1):190-6.

Dahlén G, Bergenholtz G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *J Dent Res.* 1980;59(6):1033-40.

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

Dwyer TG, Torabinejad M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat. *J Endod.* 1981; 7(1):31-5.

Evans ME, Feola DJ, Rapp RP. Polymixin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *Ann Pharmacother.* 1999; 33(9):960-7.

Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002; 13(2):113-7.

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.

Gomes BPFA, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2,5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod.* 2009; 35(10):1350-53.

González M, Bagatolli LA, Echabe I, Arrondo JRL, Argaraña CE, Cantor CR, Fidelio GD. Interaction of biotina with streptavidin. *The Journal of Biological Chemistry* 1997;272(17):11288-94.

Grunfeld C, Marshall M, Shigenaga JK, Moser AH, Tobias P, Feingold KR. Lipoproteins inhibit macrophage activation by lipotheichoic acid. *J Lipid Res.* 1999; 40(2): 245-52.

Haenni S, Schmidlin PR, Mueller B, Sener B, Zehnder M. Chemical and antimicrobial properties of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Int Endod J.* 2003;36:100-105.

Haight-Ponce E, Endo H, Horiuch H. Endotoxin activity measured by limulus assay. *Endod Dent Traumatol.* 1999;15(3):109-12.

Holland R, Nery M, Souza V, Mello W, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA. The effect of corticosteroid-antibiotic dressing in the behaviour of the periapical tissue of dogs teeth after overinstrumentation. *Rev Odont UNESP* 1981;10(1/2):21-5.

Hong Z, Jiang Z, Liangxi W, Guofu D, Ping L, Yongling L, Wendong P, Minghai W. Chloroquine protects mice from challenge with CpG ODN and LPS by decreasing proinflammatory cytokine release. *Int Immunopharmacol.* 2004; 4(2):223-34.

Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, Chen CS, Lin LD, Wang JS. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med.* 2004; 33:162-9.

Horiba N, Maekawa Y, Matsumoto T, Nakamura H. A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. *J Endod.* 1990;16(7):331-4.

Jacinto RC, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18:285-92.

Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HA, Ferraz CC, Zaia AA, Souza Filho FJ. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Phorphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. *Int Endod J.* 2006;39(1):62-70.

Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol.* 2005; 54(Pt 8):777-83.

Janeway Jr CA. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect.* 2001; 3(13):1167-71.

Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod.* 1994 Jun; 20(6): 276-78.

Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in caries: association with pulpal pain. *Int Endod J.* 2000;33(2):132-7.

Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91:587-93.

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.

Leonardo MR. Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos. São Paulo: Artes Médicas; 2005.

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

Levin J, Bang FB. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1964; 115:265-74.

Levin J, Bang FB. Clottable protein in *Limulus*; its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb Diath Haemorrh* 1968;19(1):186-97.

Maekawa LE, Carvalho AS, Cardoso PE, Xavier ACC, Oliveira LD, Kogalito CY. Atividade antimicrobiana de um EDTA gel associado a peróxido de hidrogênio sobre cepas clínicas de *Candida albicans*. *Cien Odontol Bras* 2009; 12(2):57-60.

Manzur A, González AM, Pozoz 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(2):114-18.

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.

Martinho FC, Gomes BP. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2,5% sodium hypochlorite. *J Endod*. 2008; 34(3):268-72.

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

Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Intern Endod J*. 2009;42:288-302.

Mohammadi Z, Abbott PV. Antimicrobial substantivity of canal irrigants and medicaments: a review. *Austr Endod J*. 2009;35:131-9.

Morrison DC, Jacobs DM. Inhibition of LPS-initiated activation of serum complement by polymyxin B. *Infect Immun*. 1976;13(1):298-301.

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.

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

Nissan R, Segal H, Pashley D, Stevens R, Trowbridge. Ability of bacterial endotoxin to diffuse through human dentin. *J Endod*. 1995;21(2):62- 4.

Oliveira LD, Leão MVP, Carvalho CAT, Camargo CHR, Valera MC, Jorge AOC. et al. *In vitro* effects of calcium hydroxide and polymix B on endotoxins in root canals. *J Dent*. 2005;33(2):107-14.

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

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.

Pezelj-Ribaric S, Magasic K, Prpic J, Miletic I, Karlovic Z. Tumor necrosis factor-alpha in periapical tissue exudates of teeth with apical periodontitis. *Mediators of inflammation* 2007, vol. 2007, Article ID 69416: 1-4.

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, vol. 2007, Article ID 38210: 1-4.

Queiroz CES, Pappen FG, Lia RC, Zanin FP, Leonardo RT, Carlos IZ. Ca(OH)₂ action on TNF-alpha and NO release in macrophage culture stimulated by *Pseudomonas aeruginosa* LPS. *Rev odonto ciênc.* 2008; 23(3):225-28.

Ringel AM, Patterson SS, Newton CW, Miller CH, Mulhern JM. In vivo evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. *J Endod.* 1982 May; 8(5): 201-4.

Robertson D, Smith AJ. The microbiology of the acute dental abscess. *J Med Microbiol.* 2009;58(155-62).

Safavi KE, Nichols FC. Effects of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod.* 1993;19(2):76-9.

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

Sathorn C, Parashos P, Messer H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* 2007; 40:2-10.

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

Schirrmeister JF, Liebenow AL, Braun G, Wittmer A, Hellwig E, Al-Ahmad A. Detection and eradication of microorganisms in root-filled teeth associated with periradicular lesions: an in vivo study. *J Endod.* 2007;33(5):536-40.

Segura JJ, Jiménez-Rubio A, Guerrero JM, Calvo JR. Comparative effects of two endodontic irrigants, chlorhexidine digluconate and sodium hypochlorite, on macrophage adhesion to plastic surfaces. *J Endod.* 1999; 25(4):243-6.

Sena NT, Gomes BPFA, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J.* 2006;39:878-85.

Silva ACO, Faria MR, Fontes A, Campos MS, Cavalcanti BN. Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17(5):527-32.

Silva LAB, Leonardo MR, Assed S, Tanomaru Filho M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. *Braz Dent J.* 2004; 15(2):109-114.

Silva LAB, 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.

Silva RA, Leonardo MR, da Silva LA, Faccioli LH, de Medeiros AI. Effect of a calcium hydroxide-based paste associated to chlorhexidine on RAW 264.7 macrophage cell line culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 106(5):e44-51.

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

Siqueira Jr JF, Rôças IN, Paiva SSM, Guimarães-Pinto T, Magalhães KM, Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical

periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104(1):122-30.

Skucaite N, Peciuliene V, Maciulskiene V. Microbial infection and its control in cases of symptomatic apical periodontitis: a review. *Medicina (Kaunas)* 2009;45(5):343-50.

Soares JA, Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Ito IY. Elimination of intracanal infection in dogs' teeth with induced periapical lesions after rotatory instrumentation: influence of different calcium hydroxide pastes. *J Appl Oral Sci.* 2006; 14(3):172-7.

Tang HM, Torabinejad M, Kettering JD. Leakage evaluation of root end filling materials using endotoxin. *J Endod.* 2002; 28(1):5-7.

Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LAB. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J.* 2003; 36(11):733-9.

Tanomaru JMG, Rodrigues VMT, Tanomaru Filho M, Spolidorio DMP, Ito IY. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras empregadas em Endodontia. *Rev Paul Odontol.* 2005;27(1):38-40.

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

Valera MC, Rosa JA, Maekawa LE, Oliveira LD, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110:e70-e74.

Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97:79-84.

Vianna ME, Horz HP, Gomes BPFA, Conrads G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemico-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J.* 2006;39(6):484-92.

Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(6): 411-8.

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

ANEXO A – Comitê de ética em pesquisa

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Jd. São Dimas
CEP 12201-970 - F. (12) 3947-9028
Fax (12) 3947-9010 - suely@fojca.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **023/2008-PH/CEP**, sobre “ **Estudo in vivo da ação do tratamento endodôntico sobre endotoxinas bacterianas em canais radiculares com polpa necrosada e avaliação dos efeitos citotóxicos**”, sob a responsabilidade de **ALESSANDRA SVERBERI CARVALHO**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo 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, 13 de maio de 2008.

Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro(a) Senhor(a)

Eu, Cláudio Antonio Talge Carvalho, Professor Doutor da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, portadora do CPF 407.872.573-20, estabelecido à Avenida Eng. Francisco José Longo, 777, na cidade de São José dos Campos-SP, telefone para contato (12) 3947 9048, sou responsável pela pesquisa cujo título é **“Estudo *in vivo* da ação do tratamento endodôntico sobre endotoxinas e metaloproteinases da matriz em canais radiculares com polpa necrosada e avaliação dos efeitos citotóxicos”**.

Os objetivos deste estudo serão: a) avaliar *in vivo* as quantidades de endotoxinas, MMP-1 e MMP-8 em canais radiculares com polpa necrosada, antes da realização do tratamento endodôntico; b) avaliar os efeitos do preparo biomecânico utilizando diferentes associações de agentes irrigantes (NaOCl 2,5% + hidróxido de cálcio (0,14%), NaOCl 2,5% + polimixina B e NaOCl 2,5% - controle) sobre endotoxinas, MMP-1 e MMP-8 em canais radiculares; c) avaliar a ação da medicação intracanal (clorexidina gel 2% + hidróxido de cálcio) sobre endotoxinas, MMP-1 e MMP-8 em canais radiculares com polpa necrosada; d) avaliar, durante todo o tratamento endodôntico, a produção de citocinas por macrófagos estimulados pelas amostras coletadas dos canais radiculares.

Se houver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contacto com o Comitê de Ética (CEP) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, situada na Av. Engº Francisco José Longo, 777 – CEP 12245000, em São José dos Campos-SP, fone 012-3947-9076, e-mail janete@fosjc.unesp.br e comunique-se com a Coordenadora Profa.Dra. JANETE DIAS ALMEIDA. Informo que será garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela Colaboração.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

NOME/RESPONSÁVEL _____

RG _____

CPF _____

Endereço completo:- _____

Assinatura Responsável

Assinatura Pesquisador

Carvalho AS. *In vivo* action of endodontic treatment on bacterial endotoxins in necrotic root canals and evaluation of cytokines [thesis]. Sao Jose dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – São Paulo State University, 2010.

ABSTRACT

In radicular canals with necrotic pulp, infection is caused by several bacterium, mainly by the facultative anaerobic and strict Gram-negative, which, afterwards, release various endotoxins throughout its duplication or cellular death. This analysis aims at: a) evaluate in vivo the endotoxin amount in radicular canals with necrotic pulp, prior to endodontic treatment; b) evaluate the effects of biomechanical preparation using various associations of irrigating agents (sodium hypochlorite 2.5% + polymyxin B; sodium hypochlorite 2.5% + calcium hydroxide (0.14%) and sodium hypochlorite 2.5% on endotoxins in radicular canals; c) evaluate the intracanal gauge (2% chlorhexidine gel + calcium hydroxide) on endotoxins; d) evaluate, throughout the entire endodontic treatment, the macrophages cytokine output stimulated by the collected samples in radicular canals. 33 teeth, from various patients with necrotic pulp and periapical lesion visible on x-ray, were selected. The first sampling was performed immediately after the complete isolation and access into radicular canal. The cervical e medium thirds of the canals were prepared by using sodium hypochlorite 2.5% irrigating solution, and for the manual preparation of the apical third, the canals were divided into 3 groups (n=11): G1) sodium hypochlorite 2.5%; G2) sodium hypochlorite 2.5% + limewater (0.14%); G3) sodium hypochlorite 2.5% + polymyxin B. The second sampling was performed after the biomechanical preparation, and the third was performed 3 minutes after the EDTA was applied. The fourth sampling was performed after 14 days on intracanal medication of chlorhexidine gel 2% paste + calcium hydroxide. To all the samplings, endotoxin quantification was performed, using the Limulus amoebocyte lysate (LAL) chromogenic kinetic test, and evaluating citotoxic effects due to the production of cytokines (IL-1 β , TNF- α) in macrophage cultures. A significant estatistical difference between the groups G1 and G3 was detected (Kruskall-Wallis and Dunn tests, $p < 0.05$) in relation to the percentage reduction between the first and second samplings, with G3 being the most effective, and with greatest potential to decrease the endotoxins after the biomechanical preparation. In relation to the cytokines production, the statistical tests ANOVA 2 factors and Tukey were performed ($p < 0.05$). In relation to TNF- α production, significant estatistical differences were detected in the groups as well as in the evaluated

samplings. Among the samplings, the largest production of this cytokine was obtained during the first and fourth samplings, statically differing from the second and third sampling. Among the groups, the greatest TNF- α production was found in the sodium hypochlorite 2.5% group (G1), statically differing from the other groups. On the other hand, IL-1 β production presented differences only among the samplings, with the first sampling differing statically from the others. An additional estatistical analysis was performed in order to analyze the possible correlation between endotoxins and cytokines concentration (Pearson Test). There is a positive correlation among the groups, which confirms that an increase in the endotoxin output also creates an increase in the cytokines production.

Keywords: *endotoxin, dental pulp necrosis, sodium hypochlorite, polymyxin B, calcium hydroxide; cytokines.*