



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

CLÁUDIA LUÍSA RIBEIRO FERREIRA

**AÇÃO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO 2,5% E MEDICAÇÃO
INTRACANAL COM AGITAÇÃO ULTRASSÔNICA SOBRE MICRO-
ORGANISMOS E ÁCIDO LIPOTEICÓICO EM CANAIS
RADICULARES**

2017

CLÁUDIA LUÍSA RIBEIRO FERREIRA

**AÇÃO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO 2,5% E MEDICAÇÃO INTRACANAL COM
AGITAÇÃO ULTRASSÔNICA SOBRE MICRO-ORGANISMOS E ÁCIDO
LIPOTEICÓICO EM CANAIS RADICULARES**

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

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Antonio Talge de Carvalho

São José dos Campos

2017

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2017]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

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

Ferreira, Cláudia Luísa Ribeiro

Ação do hipoclorito de sódio 2,5% e medicação intracanal com agitação ultrassônica sobre microorganismos e ácido lipoteicóico em canais radiculares / Cláudia Luísa Ribeiro Ferreira. - São José dos Campos : [s.n.], 2017. 79 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2017.

Orientador: Cláudio Antonio Talge Carvalho.

1. Toxinas bacterianas. 2. Hipoclorito de sódio. 3. Hidróxido de cálcio. 4. Terapia ultrassônica. I. Carvalho, Cláudio Antonio Talge, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho (Orientador)

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

Prof. Dr. Frederico Canato Martinho

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

Profa. Dra. Renata Amadei Nicolau

Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP)
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 02 de fevereiro de 2017.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais **Maria Goretti** e **José Milton** pelo apoio incondicional durante toda minha trajetória, pelas palavras de incentivo nas horas das dificuldades, pela educação e por todo amor que me foi dado, sem vocês nada disso seria possível e é por vocês que sempre corro atrás pra ser melhor.

Às minhas irmãs **Carol** e **Míriam** que sempre estiveram presentes em minha vida, obrigada por todo carinho, amor e amizade.

Ao meu noivo **Guilherme** que foi meu grande companheiro nessa caminhada, abdicou também de muitos finais de semana pra se fazer presente em cada momento. Obrigada pela paciência e apoio, você tornou toda trajetória mais leve.

Devo à vocês todas as minhas conquistas!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador **Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho** que enfrentou as dificuldades junto a mim e não mediu esforços para que esse trabalho fosse concluído. Obrigada por toda atenção.

À minha querida **Prof. Dra. Renata Amadei Nicolau** que foi minha grande incentivadora, sempre admirei como professora, orientadora e como pessoa, e que tem um coração enorme. Me acolheu com tanto carinho quando eu ainda nem sabia o que era uma iniciação científica e me apresentou a esse mundo fascinante, foi você que despertou em mim a vontade de conhecer um pouquinho mais do mundo acadêmico; pode ter certeza, se não fosse você nada disso estaria acontecendo na minha vida. Tenho muito orgulho de ter sido sua aluna e orientada de Iniciação Científica e levo você como minha referência por onde eu passo.

À **Profa. Tit. Márcia Carneiro Valera** pela oportunidade de compartilhar seus conhecimentos clínicos e científicos, pela atenção, estímulo, dedicação e exemplo. Te admiro demais pela forma em que leva seus conhecimentos aos alunos, sem medir esforços e abrindo mão as vezes de seu tempo livre pra nos ensinar ainda mais. Muito obrigada por tudo, tenho certeza que sou uma endodontista muito melhor depois de ser sido sua aluna.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que é meu guia, é Nele que eu encontro forças pra continuar quando tudo parece tão difícil. Sei que sem minha fé e Sua presença tão viva em minha vida, nada seria possível.

Ao Instituto de Ciências e Tecnologia (ICT) de São José dos Campos - Universidade Estadual Paulista (Unesp), através de seu **Diretor Prof. Dr. Estevão Tomomitsu Kimpara**, onde eu criei as minhas raízes durante esses dois anos.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, na pessoa do **Coordenador Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges**.

Ao **Prof. Assist. Dr. Frederico Canato Martinho** que tão prontamente aceitou meu convite para fazer parte da banca. Obrigada pelos ensinamentos e por esse ano dividido no laboratório da graduação, bastou te conhecer mais um pouco para que não restassem dúvidas de que queria o senhor fazendo parte deste momento.

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

À **Prof. Dra. Flávia Goulart da Rosa Cardoso**, pela ajuda despendida; sempre que me sentia insegura era à você que eu recorria. Saiba que tenho um carinho e admiração enormes por você.

Ao **Mestre Felipe Oliveira** por toda ajuda laboratorial e na estatística, sem sua ajuda as coisas seriam ainda mais difíceis, tenho certeza!

À minha colega de turma e amiga **Fernanda Pelegrini** que se tornou uma

companheira inseparável desde o início do curso. Compartilhamos momentos de dificuldades, uma dando sempre apoio a outra e muitos momentos de alegria, descontração e desabafos. Obrigada por ter caminhado junto a mim esses dois anos.

Às minhas queridas colegas de turma e amigas **Cássia Cestari e Daiana Cavalli**, por terem sido tão companheiras e por terem nos salvado emprestando materiais tantas vezes. Vou levar vocês no meu coração pro resto da vida.

À querida **Rayana Khoury** que chegou depois, mas não foi menos importante, pois sua ajuda com o inglês foi fundamental pra concretização deste sonho. Obrigada por nos contagiar com sua alegria.

Aos meus colegas, alunos do curso em Odontologia Restauradora, especialidade Endodontia, **Esteban, Alessandra e Diego** pela amizade e companheirismo.

À aluna de graduação e Iniciação Científica **Laiana**, que nos ajudou demais no laboratório. A vitória também é sua.

À **Prof. Dra. Luciane Dias de Oliveira** pelos ensinamentos e por todo suporte na pesquisa. A senhora foi peça fundamental para que tudo desse certo.

À **Capes** pela concessão de bolsa de mestrado.

As técnicas de laboratório, **Josiana Maria Alves Carneiro e Fernanda Brito**, pelo suporte nos trabalhos realizados.

Aos **secretários da Pós-Graduação** pela ajuda sempre que solicitada e informações prestadas.

À **Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP)**, Faculdade de Ciências da Saúde. Tenho muito orgulho de ter me formado por esta instituição.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

“O próprio Senhor irá à sua frente e estará com você; ele nunca o deixará, nunca o abandonará. Não tenha medo!

Não se desanime!”

(Deuteronômio 31:8)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Microbiologia das infecções endodônticas	19
2.2 Endotoxinas	22
2.3 Ácido Lipoteicóico (LTA)	25
2.4 Hipoclorito de sódio	28
2.5 Hidróxido de cálcio.....	30
2.6 Agitação ultrassônica	33
3 PROPOSIÇÃO	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Preparo dos espécimes	38
4.2 Contaminação dos espécimes	39
4.3 Preparo Biomecânico.....	41
4.5 Coletas do conteúdo do canal radicular.....	43
4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana (UFC/mL).....	45
4.7 Detecção e quantificação do ácido lipoteicóico	45
4.8 Análise estatística	47
5 RESULTADO	48
6 DISCUSSÃO	58
6.1 Discussão do tema.....	59
6.2 Discussão da Metodologia	60
6.3 Discussão dos Resultados	64
7 CONCLUSÃO	66

REFERÊNCIAS*	67
ANEXO.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Disposição dos espécimes após padronização.....	39
Figura 2 - Equipamento espectrofotômetro.....	40
Figura 3 - Disposição dos materiais na câmara de fluxo laminar para instrumentação dos espécimes.....	41
Figura 4 - Diagrama de distribuição dos grupos.....	43
Figura 5 - Representação da coleta dos micro-organismos.....	44
Figura 6 - Reação revelada utilizando tetrametilbenzidina (TMB). Após, foram adicionados em cada poço da placa solução stop (ácido sulfúrico 2 N).....	46
Figura 7 - Leitor de microplacas (Biotek).....	46
Figura 8 – Redução de <i>E. faecalis</i> e <i>E. coli</i> (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G1.....	48
Figura 9 - Redução de <i>E. faecalis</i> e <i>E. coli</i> (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G2.....	49
Figura 10 - Redução de <i>E. faecalis</i> e <i>E. coli</i> (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G3.....	49
Figura 11 - Redução de <i>E. faecalis</i> e <i>E. coli</i> (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G4.....	50
Figura 12 - Redução de <i>E. faecalis</i> e <i>E. coli</i> (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G5.....	50
Figura 13 - Redução de <i>E. faecalis</i> e <i>E. coli</i> (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G6.....	51
Figura 14 - Redução de <i>E. faecalis</i> e <i>E. coli</i> (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G7.....	51
Figura 15 - Redução de <i>E. faecalis</i> e <i>E. coli</i> (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G8.....	52

Figura 16 – Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) comparando a coleta de confirmação (1ª coleta) (n=80) com a coleta logo após o PBM sob agitação (n=40) ou não do NaOCl 2,5% (n=40).....	53
Figura 17 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G1.....	54
Figura 18 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G2.....	54
Figura 19 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G3.....	55
Figura 20 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G4.....	55
Figura 21 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G5.....	56
Figura 22 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G6.....	57
Figura 23 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) nos diferentes tempos de coleta, no G8.....	57
Figura 24 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G8.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Infusão de cérebro e coração
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio
EDTA	Etileno-diamina-tetra-acético
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Ácido lipoteicóico
MIC	Medicação intracanal
NaOCl	Hipoclorito de sódio
UFC	Unidades formadoras de colônias
PBM	Preparo biomecânico
PUI	Irrigação de ultrassônica passiva
SCR	Sistema de canais radiculares
TCFC	Tomografia computadorizada de feixe cônico
TMB	Tetrametilbenzidina

Ferreira CLR. Ação do hipoclorito de sódio 2,5% e medicação intracanal com agitação ultrassônica sobre micro-organismos e ácido lipoteicóico em canais radiculares [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar a eficácia do hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% e medicação intra-canal (MIC) com hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) agitados com ultrassom ou não, sobre, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e ácido lipoteicóico (LTA). Foram utilizados 80 dentes unirradiculares que foram instrumentados usando lima R40 do sistema Reciproc irrigados com 40 mL de NaOCl. Em seguida, os dentes foram aleatoriamente distribuídos em 8 grupos, de acordo com o protocolo de limpeza final e MIC: G1- agitação ultrassônica do NaOCl e MIC 7 dias, G2- agitação ultrassônica do NaOCl e MIC 14 dias, G3- agitação ultrassônica do NaOCl e sem agitação da MIC 7 dias, G4- agitação ultrassônica do NaOCl e sem agitação da MIC 14 dias, G5– sem agitação ultrassônica do NaOCl e com agitação da MIC 7 dias, G6– sem agitação ultrassônica do NaOCl e com agitação da MIC 14 dias, G7– sem agitação ultrassônica do NaOCl e MIC 7 dias e G8– sem agitação ultrassônica do NaOCl e MIC 14 dias. Foi feita a contagem de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) e quantificação de LTA. Todos os dados foram analisados estatisticamente. Os resultados mostraram uma diminuição de micro-organismos imediatamente após o PBM (preparo biomecânico) ($p < 0,001$). Nenhum protocolo empregado foi eficiente na completa eliminação de LTA. Pode-se concluir que em todos os grupos após o PBM houve redução/eliminação dos MO (micro-organismos), mas nenhum método testado foi eficiente para detoxificar completamente o LTA.

Palavras-chave: Toxinas bacterianas. Hipoclorito de sódio. Hidróxido de cálcio. Terapia ultrassônica.

Ferreira CLR. Action of sodium hypochlorite 2.5% and intracanal medication with ultrasonic agitation on microorganisms and their toxins in root canals [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the efficacy of 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl) and intracanal medications using calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) associated with ultrasound on *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and lipoteichoic acid (LTA). 80 single-rooted teeth were used that were instrumented using R40 file from the Reciproc system irrigated with 40 mL of NaOCl. Then, the teeth were randomly divided in 8 groups, according to the final cleansing protocol and intracanal medication period: G1- Ultrasonic activation of both NaOCl and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (7 days); G2 - Ultrasonic activation of NaOCl and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (14 days); G3 - Ultrasonic activation of NaOCl and no activation of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (7 days); G4- Ultrasonic activation of NaOCl and no activation of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (14 days); G5- no ultrasonic activation of NaOCl and ultrasonic activation of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (7 days); G6- no ultrasonic agitation of NaOCl and ultrasonic agitation of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (14 days); G7- no ultrasonic activation of NaOCl and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (7 days) and G8- no ultrasonic activation of either NaOCl and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (14 days). Culture techniques determined the colony-forming units (CFU) and the LTA was quantified. Data obtained was analyzed statistically. The results showed a decrease in microorganisms immediately after biomechanical preparation ($p < 0.001$). After biomechanical preparation a reduction/elimination of microorganisms was detected in all groups, however All groups after PBM there was reduction / elimination of MO, but none of the protocols tested were able to completely eliminate the LTA.

Keywords: Bacterial toxins. Sodium hypochlorite. Calcium hydroxide. Ultrasonic therapy.

1 INTRODUÇÃO

Na endodontia o grande obstáculo existente é a presença de micro-organismos no sistema de canais radiculares (SCR).

Nas infecções endodônticas primárias e secundárias existe a presença de micro-organismos aeróbios, anaeróbios estritos e facultativos. Sabe-se que nas infecções endodônticas primárias a predominância é das bactérias Gram-negativas (Sundqvist, 1992; Gomes et al., 2006a; Mohammadi, 2008), cujo seu principal fator de virulência é a endotoxina (LPS) que apresentam efeitos citotóxicos, podendo induzir e manter alterações pulpares e periapicais (Schein, Schilder, 1975; Fabricius et al., 1982; Martinho et al., 2010; Mohammadi, 2011).

Certos de que as infecções endodônticas e suas complicações advêm da combinação de alguns fatores como a capacidade de defesa do hospedeiro, número de micro-organismos presentes e a virulência apresentada por estes micro-organismos (Siqueira JF, Rôças, 2008), a realização de um tratamento endodôntico de sucesso deve incluir tanto a eliminação dos micro-organismos presentes, quanto a neutralização e/ou inativação dos fatores de virulência (Martinho, Gomes, 2008; Martinho et al., 2010; Oliveira et al., 2012; Vera et al., 2012).

Embora sabendo-se da predominância das bactérias Gram-negativas nas infecções endodônticas primárias, a presença de bactérias Gram-positivas também está comprovada (Xavier, 2011; Tian et al., 2013; Ferreira et al., 2015), indo além, onde alguns estudos já comprovaram que em casos de infecções secundárias ou persistentes, as bactérias Gram-positivas são predominantes (Narayanan, Vaishnavi, 2010; Ferreira et al., 2015).

Sabendo-se da presença desses micro-organismos, torna-se fundamental o estudo dos fatores de virulência dos mesmos. Dentre estes fatores, pode-se destacar o ácido lipoteicóico (LTA), o qual é considerado o correspondente Gram-positivo das endotoxinas (Su et al., 2006), sendo semelhantes tanto na estrutura quando nas respostas imunológicas geradas no hospedeiro (Baik et al., 2008).

O LTA presente na parede celular das bactérias Gram-positivas é formado pela ligação de poliglicerofosfatos e ácidos graxos e sabe-se que esta substância está envolvida na resposta inflamatória (Baik et al., 2008), na formação do biofilme

(Fabretti et al., 2006), além de possuir a capacidade de se aderir ao dente através de sua atividade adsortiva à hidroxiapatita, o que permite sua penetração nos túbulos dentinários (Han et al., 2006; Lee et al., 2009).

Alguns estudos demonstram que o LTA é capaz de ativar as células de defesa do hospedeiro, como macrófagos, induzindo a liberação de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Van Amersfoort et al., 2003; Wang CS et al., 2007; de Souza LF et al., 2008; Lima SM et al., 2015). Esta capacidade de influenciar a resposta imunológica é espécie dependente, e a ativação é gerada através de sinalização via receptor TLR-2 (Van Amersfoort et al., 2003; Wang JE et al., 2003).

Com o intuito de reduzir os micro-organismos e seus subprodutos, o preparo biomecânico com o auxílio de substâncias irrigadoras que tenham ação antimicrobiana é de extrema importância para que haja a eliminação desses micro-organismos e consequentemente o sucesso no tratamento endodôntico. O hipoclorito de sódio é a substância de maior escolha por apresentar inúmeras vantagens como ação antimicrobiana, dissolução de matéria orgânica, efeito clareador (Luz, 2013).

Estudos mostram que a utilização do hipoclorito de sódio é eficaz na redução dos micro-organismos e que sua concentração também influencia na ação antimicrobiana e maior penetração nos túbulos dentinários (Wong, Cheung, 2014; Cullen et al., 2015). Ele tem propriedades antissépticas devido à formação de ácido hipocloroso e liberação de cloro, que é um bactericida muito ativo, então a sua eficácia depende da concentração de ácido hipocloroso em solução não dissociada (Torabinejad, Walton, 2009).

Apesar de haver uma redução de micro-organismos com a irrigação adequada dos sistemas de canais radiculares, a redução de toxinas é bem menos expressiva, cerca de metade é reduzida quando se faz a instrumentação convencional (Martinho, Gomes, 2008; Martinho et al., 2010) e quase absoluta através da instrumentação com sistemas rotatórios de NiTi (Martinho et al., 2010).

Mesmo com um PBM convencional bem realizado, a redução das toxinas ainda não é suficiente, por esse motivo, faz-se necessário abrir mão de outros meios de eliminação, como a utilização de medicação intracanal durante o tratamento endodôntico (Xavier et al., 2013; Ferreira et al., 2015).

O uso da medicação intracanal é importante para o maior índice de eliminação de micro-organismos e toxinas, sendo que a medicação intracanal mais indicada para a neutralização de toxinas é o hidróxido de cálcio. Dentre suas diversas propriedades, pode-se destacar: capacidade de indução de mineralização, propriedades antimicrobianas e efetiva ação sobre LPS (Safavi et al., 1994; Nelson-Filho et al., 2002). Por promover a hidrólise da porção lipídica da toxina e neutralizando parcialmente seus efeitos biológicos, o hidróxido de cálcio possui ação efetiva sobre as bactérias (Safavi, Nichols, 1994; de Oliveira et al., 2005).

Na busca por novas alternativas de tratamento, novos meios de potencializar a limpeza dos canais estão sendo empregados, como agitação da solução irrigadora e da medicação com ultrassom (Ayranci et al., 2016).

A ativação passiva com ultrassom tem sido sugerida como um meio para melhorar o desbridamento do canal, sua desinfecção e posterior melhora na vedação do canal (Plotino et al., 2007). Além do desbridamento, o ultrassom mostra ter bons efeitos mecânicos, como a remoção de maior parte de *smear layer* quando comparados a preparos sem o uso de ultrassom (Layton et al., 2015). O acúmulo de detritos produzidos por processos mecânicos na instrumentação das áreas de difícil acesso pode ser prevenida pela agitação ultrassônica da solução irrigadora mesmo durante a fase de preparação (Paqué et al., 2011).

Diante do exposto, a proposta desta pesquisa foi analisar a eficácia do hipoclorito de sódio a 2,5% e medicação intra-canal com hidróxido de cálcio agitados ou não com ultrassom, sobre *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* e se a agitação final é efetiva sobre o ácido lipoteicóico (LTA).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiologia das infecções endodônticas

Takehashi et al. (1965) realizou um estudo com ratos *germ-free* e convencionais, observando que após 14 dias no grupo convencional os dentes estavam com o tecido pulpar totalmente necrosado, com presença de tecido inflamatório crônico e formação de abscesso na região periapical. Em contrapartida nos ratos do grupo *germ-free* não foi observado necrose pulpar e formação de abscesso, apenas um pequeno infiltrado inflamatório, concluindo que os micro-organismos estão ligados diretamente à etiologia das alterações pulpares e periapicais.

Em um estudo clássico, Sundqvist (1976) avaliou microbiologicamente 32 canais de dentes unirradiculares para identificar micro-organismos anaeróbios estritos. Todos os dentes avaliados apresentavam necrose pulpar por trauma. As bactérias foram isoladas dos espécimes que a lesão periapical era visível radiograficamente, havendo uma correlação positiva entre o tamanho da lesão periapical e o número de espécies bacterianas presentes nos canais radiculares. As bactérias anaeróbias estritas representaram cerca de 90% de toda microbiota isolada, tendo uma correlação positiva entre sintomatologia e um maior número de bactérias encontradas no canal. Os resultados mostraram o papel fundamental dos micro-organismos na etiologia e desenvolvimento das lesões periapicais.

Apesar de várias pesquisas já terem sido realizadas, a microbiota do sistema de canais radiculares (SCR) é sempre muito estudada, pois várias espécies de micro-organismos são encontradas por pesquisas com métodos de identificação diferentes.

Na infecção endodôntica a microbiota é muito variada, como organismos aeróbios, anaeróbios estritos, anaeróbios facultativos e os fungos, mas sabe-se que nas infecções primárias a predominância é das bactérias Gram-negativas (Sundqvist, 1992; Gomes et al., 2006b; Mohammadi, 2008), mas a presença de bactérias Gram-positivas também já é comprovada (Chung, 2011; Xavier, 2011).

As bactérias e a seus fatores de virulência são os principais agentes para o surgimento da periodontite apical pós-tratamento podendo sobreviver a procedimentos biomecânicos ou invadir o canal através de uma infiltração coronária atingindo a obturação do canal radicular. Culturas bacterianas e estudos moleculares confirmam que *Enterococcus faecalis* é uma das mais prevalentes bactérias encontradas no canal radicular após o tratamento endodôntico (Pinheiro et al., 2003; Endo et al., 2014).

Estudo realizado por Gomes et al. (2006a) envolvendo 50 dentes com infecção endodôntica primária e 50 dentes com infecção endodôntica persistente, demonstrou por meio de cultura microbiológica a presença de *Enterococcus faecalis* em 42% dos casos.

Enterococcus faecalis pode sobreviver no canal radicular como organismo único, sem o suporte de outras espécies, e representar um problema para o sucesso do tratamento. Este gênero oferece resistência a várias substâncias antimicrobianas e ainda pode se favorecer por alterações no ecossistema do canal radicular e instituir uma infecção persistente (Oliveira et al., 2007a). *E. faecalis* pode invadir os túbulos dentinários em profundidade e, com isso, é provável que as células no interior dos túbulos dentinários que consigam sobreviver à instrumentação biomecânica e medicação intracanal possam colonizar os túbulos e reinfetar os canais radiculares obturados (Berber et al., 2006).

Um estudo de Roças e Siqueira (2011), avaliou através de testes moleculares a prevalência de *E. faecalis* em infecções endodônticas e sua associação com doenças perirradiculares. Os resultados deste estudo indicaram que *E. faecalis* é significativamente mais associado a casos assintomáticos de infecções endodônticas primárias do que com os sintomáticos. Além disso, a incidência de *E. faecalis* foi mais elevada em casos de insucesso do que em infecções primárias.

Estudo realizado por Xavier (2011) avaliou a microbiota presente em canais radiculares com infecção endodôntica primária e presença de lesão periapical e ação de diferentes substâncias químicas auxiliares. Por meio do teste de reação em cadeia polimerase foram detectados diferentes micro-organismos Gram-positivos na coleta iniciam com: *Filifactor alocis*, *Parvimonas micra* e *Enterococcus faecalis*. Indicando que cerca de 6,7% dos casos apresentam *Enterococcus faecalis*.

Em relação a incidência desse tipo de bactéria e infecções secundárias, estudo realizado por Endo et al. (2011) avaliando microbiota e níveis de endotoxinas presente em canais com insucesso endodôntico determinou, com testes bioquímicos e de reação em cadeia polimerase, a presença de *Enterococcus faecalis* em 57% dos casos e prevalência de bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas.

Enterococcus faecalis nestas infecções endodônticas secundárias ou persistentes deve-se, entre outros fatores, a sua capacidade de penetração em túbulos dentinários e a sua capacidade de impedir a liberação de enzimas hidrolíticas pelas células polimorfonucleares do hospedeiro (Rocas et al., 2011).

Além disso, *E. faecalis* possui fatores de virulência que podem estar associados a diferentes estágios da infecção endodôntica e à inflamação periapical, como: produção de substância de agregação, adesinas de superfície, produção extracelular de superóxido, enzimas líticas gelatinase e hialuronidase, e o ácido lipoteicóico (Kayaoglu, Orstavik, 2004).

Pelo empenho nos estudos da microbiota envolvida na patologia endodôntica, hoje já se sabe compreender melhor os micro-organismos envolvidos e isso trouxe a vantagem de poder otimizar o tratamento endodôntico, modificando os planos de tratamentos já instituídos e conseqüentemente ser mais eficaz no combate a esses micro-organismos. O grande desafio dos novos estudos está sendo de descobrir mais a fundo as características desses organismos mais resistentes a esse meio endodôntico e como fazer para eliminá-los.

As lesões traumáticas e as lesões cariosas são as principais vias de infecção do tecido pulpar. Uma vez reconhecida a presença de micro-organismos e seus subprodutos nos túbulos dentinários, um processo imuno-inflamatório é arquitetado neste tecido. As espécies bacterianas que inicialmente penetram o tecido dentinário são as anaeróbias facultativas, como aquelas pertencentes aos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* e micro-organismos filamentosos (Siqueira JF Jr., 2001). Dependendo do grau e intensidade da invasão bacteriana e do processo inflamatório, o tecido pulpar pode se tornar necrótico, propiciando assim a invasão do espaço pulpar pelos micro-organismos. Na dinâmica de uma infecção endodôntica, anaeróbios estritos são invasores secundários. Nos estágios iniciais, bactérias anaeróbias facultativas estão em maior percentual. Em, aproximadamente,

sete dias após o estabelecimento da infecção, 50% da microbiota já é composta por anaeróbios obrigatórios. Em três meses, a proporção desses anaeróbios pode chegar a 85% e, em seis meses, 90% (Fabricius et al., 1982).

Ferreira et al., 2015 em um estudo clínico teve como objetivo determinar o perfil microbiológico resistente a diferentes medicações intracanais em infecções endodônticas primárias, utilizando tanto a cultura microbiológica quanto a técnica de hibridação DNA-DNA. Foram utilizados vinte canais radiculares infectados e depois instrumentados antes de serem divididos aleatoriamente em 2 grupos de acordo com as medicações intracanais: hidróxido de cálcio ($\text{Ca} [\text{OH}]_2$) ou $\text{Ca} (\text{OH})_2$ + clorexidina (CHX). As amostras foram coletadas antes e após os procedimentos do canal radicular, que consistiu em submetê-los à cultura microbiológica e processá-los para hibridação DNA-DNA. Puderam concluir que o uso de $\text{Ca} (\text{OH})_2$ associado a CHX como medicação intracanal mostrou melhores resultados agindo em micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, embora tal ação para erradicar enterococos também deve ser buscada.

As doenças infecciosas representam uma categoria de interações que envolvem um hospedeiro frente a micro-organismos com potenciais colonizadores e patogênicos (Socransky, Haffajee, 2005). Em certas situações, tais micro-organismos podem invadir locais normalmente estéreis do nosso organismo, como o tecido pulpar, tornando-se assim micro-organismos oportunistas. O grau de patogenicidade de tais micro-organismos é denominado virulência, que é a capacidade de um micro-organismo produzir formas graves da doença. Relaciona-se com a produção de toxinas e à sua capacidade de multiplicação no organismo parasitado (Baik et al., 2011).

2.2 Endotoxinas (LPS)

Pode-se verificar que as bactérias Gram-negativas têm grande importância na infecção primária dos canais radiculares, participando efetivamente na indução das alterações pulpares e periapicais.

Schein e Schilder (1975) relataram que os dentes com polpas necróticas contêm maiores níveis de endotoxinas. Foi realizado um estudo clínico, para quantificar e detectar os níveis de endotoxina. O estudo foi com 40 pacientes onde eram submetidos à terapia endodôntica. Os resultados, mostraram que níveis de endotoxinas eram maiores em dentes sintomáticos do que em dentes assintomáticos, maiores em dentes com polpas necrosadas comparados com polpas vitais, e também maiores quantidades em dentes que com lesões periapicais.

Schonfeld et al. (1982) mostraram que a presença de endotoxinas nas lesões endodônticas está altamente correlacionada com lesões granulomatosas. A endotoxina, mais corretamente chamadas de lipopolissacarídeo (LPS), é um componente do envelope celular de bactérias Gram-negativas. Esta molécula é um potente mediador de inflamação que é igualmente ativa após a morte da célula bacteriana. Estas células Gram-negativas podem mesmo ser fagocitadas pelos macrófagos e, em seguida, serem lançadas com maior toxicidade.

A endotoxina é considerada como um dos principais fatores etiológicos envolvidos na patogênese e na manutenção da inflamação periapical, incluindo reabsorção óssea (Dwyer, Torabinejad, 1981; Jacinto et al., 2006). A endotoxina causa importantes efeitos biológicos inflamatórios, como ativação do sistema complemento, quimiotaxia de polimorfonucleares, indução de febre, leucopenia, hipotensão e choque, coagulação intravascular, ativação policlonal de linfócitos B e produção de anticorpos não-específicos (Oliveira et al., 2007b). Além disso, LPS ativa macrófagos, induzindo a síntese e liberação de mediadores da resposta inflamatória (prostaglandinas e leucotrienos) e citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF- γ) e interleucinas (IL-1 e IL-1 β) (Rogers et al., 2007).

As endotoxinas são moléculas estáveis ao calor compostas de polissacarídeos (açúcares polimerizados), lipídios (complexos contendo ácidos graxos) e proteínas. O LPS é composto por três segmentos covalentemente ligados: o Lipídio A, o Core e o Antígeno O. O Lipídio A é a região da molécula de endotoxina responsável por seus efeitos tóxicos (Rietschel, Brade, 1992).

Safavi e Nichols (1994) realizaram um estudo onde o objetivo era investigar se o tratamento com hidróxido de cálcio alterava sua ação biológica sobre LPS, onde era medido pela secreção de prostaglandina E₂. Culturas de células de monócitos foram estimuladas com LPS ou LPS tratado com hidróxido de cálcio.

Sobrenadantes de cultura foram analisados quanto ao teor de prostaglandina E₂ utilizando cromatografia gasosa - espectrometria de massa. A prostaglandina E₂ foi identificada nos sobrenadantes de monócitos estimuladas por LPS, mas não nos que estimuladas com LPS tratados com hidróxido de cálcio. Concluiu-se que o tratamento com hidróxido de cálcio pode alterar as propriedades biológicas dos LPS bacterianos.

Oliveira et al. (2012) realizaram um estudo clínico onde teve por objetivo investigar os efeitos do tratamento endodôntico utilizando diferentes irrigantes sobre endotoxinas em canais radiculares com necrose pulpar e periodontite apical e para avaliar os efeitos citotóxicos. Foram então selecionados trinta e seis canais radiculares. As amostras foram coletadas antes (S1) e após a instrumentação (S2). Os canais foram divididos em 3 grupos (n = 12) de acordo com a combinação utilizada irrigante: CLX + LW - gel de clorexidina 2%+ hidróxido de cálcio (água de cal 0,14%); CLX + PmB - clorexidina + polimixina B; CLX (controle), clorexidina + salina. A terceira amostra (S3) foi realizada após a ácido etilenodiaminotetracético e S4 após medicação intracanal (CLX + hidróxido de cálcio durante 14 dias). A combinação de CLX e limewater como irrigante foi o mais eficaz na redução de endotoxinas em canais radiculares e medicação intracanal foi importante para neutralizar os efeitos citotóxicos.

Diversos efeitos inflamatórios podem ser notados nas endotoxinas. O LPS induz prostaglandinas, leucotrienos, fator ativador de plaquetas, complemento 3A e 5A, e interleucina-1 entre outros. A ativação destes mediadores provoca um aumento da permeabilidade vascular, marginação dos neutrófilos nas células endoteliais, a quimiotaxia de neutrófilos, liberação de collagenase, ativação dos linfócitos, e entre outros efeitos biológicos, incluindo a reabsorção óssea e formação de granulomas crônicos (Dwyer, Torabinejad, 1981; Morrison, Ryan, 1987; Andrukhov et al., 2014).

Estudos envolvendo a quantificação de endotoxinas em dentes com necrose pulpar e lesão periapical, assim como estudos após o preparo biomecânico, mostram a eficácia dos procedimentos endodônticos na redução e/ou eliminação do conteúdo endotóxico (Oliveira et al., 2007a; Valera et al., 2014).

Cardoso et al. (2015) realizou um estudo em que correlacionava os níveis de endotoxinas de dentes com infecção endodôntica primária com sinais e sintomas

com o volume da destruição óssea periapical via TCFC (tomografia computadorizada de feixe cônico). Os resultados obtidos puderam provar que os níveis de endotoxinas encontrados nas infecções endodônticas estão relacionados tanto com o volume de destruição óssea periapical, quanto com a presença de sintomatologia dolorosa antes do tratamento.

Cardoso et al. (2016) realizou um estudo clínico investigando e quantificando as bactérias cultiváveis e seus níveis de endotoxinas na infecção endodôntica persistente, determinando sua antigenicidade contra macrófagos e fibroblastos pela secreção de IL-1 β e TNF- α e avaliando sua relação com características clínicas e radiográficas. Os achados do estudo revelaram a presença de espécies de bactérias Gram-negativas na infecção endodôntica persistente, com suas endotoxinas relacionadas com a severidade da destruição óssea e o desenvolvimento de sintomatologia. Além disso, áreas maiores de destruição óssea estavam relacionadas a níveis mais elevados de IL-1 β e TNF- α secretados por macrófagos e fibroblastos.

2.3 Ácido Lipoteicóico (LTA)

Outro componente, agora da parede celular de bactérias Gram-positivas, o ácido lipoteicóico (LTA) é considerado um importante fator de virulência envolvido em alterações pulpares e periapicais. Mesmo após a morte bacteriana, LTA persiste no canal radicular por longos períodos de tempo, as quais podem causar inflamação crônica (Seltzer, Farber, 1994).

Enterococcus são cocos Gram-positivos, e devido à suas características morfológicas e genéticas, eles podem resistir a procedimento intracanal e antibióticos sistêmicos, mesmo em condições ecológicas de estresse (Medeiros et al., 2014). O mecanismo de resistência do *E. faecalis* resulta da sua mudanças de fisiologia ou estrutura na célula bacteriana, que é uma estratégia de sobrevivência ao ataque por agentes antimicrobianos (Endo et al., 2014). Enterococcus spp. adquiriu determinantes genéticos que conferem resistência a várias classes de antibióticos, incluindo a clindamicina, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, e, mais

recentemente, a vancomicina (Endo et al., 2014; Gomes et al., 2011). Embora a incidência de cepas resistentes seja mais pronunciada em infecções hospitalares ou sistêmicas, os estudos usando infecções bacterianas isolados de endodontia têm mostrado a emergência de bactérias resistentes, em especial em procedimentos convencionais utilizados em procedimentos dentários (Gomes et al., 2011). Embora os antibióticos sistêmicos não sejam normalmente usados no tratamento de infecções associadas a lesões periapicais crônicas, em casos de pacientes com *flare-up* ou em risco de desenvolvimento de endocardite bacteriana, estes tornam-se um auxiliar importante na endodontia, sendo utilizado em regimes profiláticos (Endo et al., 2014).

O *Enterococcus faecalis* participa do processo das infecções endodônticas primárias e secundárias, portanto na parede celular dessas bactérias se encontra LTA que possui uma estrutura anfipática, ou seja, moléculas que apresentam a característica de possuírem uma região hidrofílica (solúvel em meio aquoso), e uma região hidrofóbica (insolúvel em água, porém solúvel em lipídios e solventes orgânicos), sendo formado por ligação de poliglicerofosfatos e ácidos graxos (Wicken, Knox, 1975) e estando envolvida na resposta inflamatória, síndrome séptica, formação de biofilme e adesão ao dente (Fabretti et al., 2006; Han et al., 2006; Baik et al., 2008; Lee et al., 2009). Este polímero de glicerofosfato ou ribitolfosfato covalentemente ligado ao glicolípido na membrana citoplasmática e projetando-se através da camada de peptidoglicano, é considerado essencial ao crescimento bacteriano (Van Amersfoort et al., 2003, Siqueira JF, Rôças, 2007).

LTA é um importante fator de virulência da bactéria Gram-positiva que é lançado durante a multiplicação bacteriana, principalmente após sua lise por lisozima, peptídeos bactericidas catiônicos, fosfolipase A, catepsinas, ou antibióticos beta-lactâmicos (Ginsburg, 2002). O LTA tem propriedades patogênicas semelhantes aos LPS de bactérias Gram-negativas (Ginsburg, 2002; Hahn, Liewehr, 2007; Siqueira JF, Rôças, 2007). No entanto, o LTA se difere na perda em termos de estrutura e gene de transcrição (Ryu et al., 2009).

LTA pode iniciar uma série de reações por ligação a receptores específicos (CD14 e toll-like2) ou por eventos não específicos (fosfolipídios da membrana; a ativação sistema do complemento; liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral alfa, interleucina [IL] -1-B, IL-6, IL-8, e prostaglandina

E2 (PGE₂); regulação da angiogênese e liberação de hidrolases, proteases e de oxigênio reativo e regulação, recrutamento e ativação de neutrófilos (Ginsburg, 2002; Costa et al., 2003; Kayaoglu, Ørstavik, 2004; Siqueira JF, Rôças, 2007).

Os macrófagos derivados de monócitos podem ser ativados em 2 perfis, M1 e M2, no local da infecção. Macrófagos M1 podem desenvolver função antimicrobiana e anti-tumoral, enquanto que os macrófagos M2 estão relacionados com a proliferação celular e reparação de tecidos (Mills et al., 2012). A evidência sugere que a indução da destruição óssea ocorre após ativação de células osteoclásticas (Teixeira-Salum et al., 2010). A diferenciação de osteoclastos pode ser afetada por diferentes estímulos da citocina produzidos por células imunocompetentes em periodontite apical (Handal et al., 2009). Portanto, o macrófago de ativação M1 pode ser envolvido com a interleucina (IL) -6, IL-12, e fator de necrose tumoral (TNF) α , ao passo que a produção de IL-10 está envolvida com a ativação M2 (Vogel et al., 2014).

Baik et al. (2008) realizou um estudo com LTA proveniente de *E.faecalis*, avaliou a sua capacidade de estimulação de macrófagos (RAW 264.7), o qual produziu elevados níveis de fator de crescimento (TNF- α) e de óxido nítrico. O estudo ainda relata que o LTA estimula o receptor TLR2, mas não o TLR4 (receptor estimulado pelas endotoxinas) e conclui que os resultados indicam que o LTA é parcialmente responsável pelas respostas inflamatórias geradas pelo *E.faecalis*.

Tian et al. (2013) realizou um estudo para examinar o efeito do LTA, um importante fator de virulência de *E. faecalis*, sobre a apoptose de osteoblastos. Evidenciando que o LTA de *E. faecalis* pode inibir a proliferação e induzir apoptose de células MG63 de osteoblastos humanos.

Lima SM et al. (2015) avaliaram a expressão de mediadores inflamatórios produzidos por antígenos de 264,7 células mortas RAW de *Candida albicans* e *E. faecalis* na presença de calor (HK). Culturas de células RAW foram estimuladas com ambos os antígenos na presença ou ausência de interferon recombinante (rIFN) γ . Parâmetros da viabilidade celular, a produção de óxido nítrico (NO), bem como a síntese de interleucina (IL) -1 α , IL-6, IL-10, IL-12, proteína-1 quimiotático de monócitos, e fator de necrose tumoral (TNF) α foram analisados. Puderam constatar que o conhecimento em relação ao mecanismo de acolhimento de resposta a micro-organismos que perpetuam a infecção endodôntica e as lesões perirradiculares pode

contribuir para a otimização da terapia endodôntica. Os mediadores inflamatórios mencionados e fatores de virulência envolvidos no insucesso endodôntico podem orientar a progressão da lesão e também serem alvos no desenvolvimento de desinfetantes e agentes imunomoduladores.

Barbosa-Ribeiro et al. (2016a) realizou um estudo para investigar a prevalência de fatores de virulência e os fatores antimicrobianos resistentes a *Enterococcus faecalis*, que foram isolados de dentes com falha do tratamento endodôntico. Concluiu-se que *E. faecalis* isolados de infecções endodônticas persistentes mostraram resistência intermediária / total a vários agentes antimicrobianos, sendo a amoxicilina + clavulanato o agente mais eficaz. Além disso, as estirpes mostraram diferentes padrões de detecção de genes de virulência.

Em outro estudo, Barbosa-Ribeiro et al. (2016b) quantificou os níveis de LTA e bactérias cultiváveis nas diferentes fases do retratamento endodôntico. Também investigou a presença de micro-organismos Gram-positivos antes e depois do PBM e MIC. As taxas de redução das bactérias foram maiores que o LTA. Além disso, micro-organismos Gram-positivos estavam presentes em todas as fases do retratamento endodôntico.

Deste modo, sabendo-se que o LTA possui um papel importante nas afecções endodônticas, faz-se necessário o estudo de formas de eliminação/inativação desta substância, de forma a se elevar os índices de sucesso do tratamento endodôntico.

2.4 Hipoclorito de sódio

Em 1820, Labarraque em suas experimentações, obteve Hipoclorito de Sódio (NaOCl) em concentração de 2,5% e utilizou para a desinfecção de feridas. Em 1915, o químico Inglês Henry Dakin (1915) recomendou a utilização de uma solução de hipoclorito de sódio (0,5% - 0,6%) para irrigar feridas infectadas, pois observou que a cicatrização com a solução de Labarraque ocorria muito lentamente e que isso acontecia em decorrência da alta concentração da solução que causava injúria aos tecidos. A partir de então, começou-se a pesquisar a solução para outros fins.

Em 1917, Barret implantou o uso de NaClO para irrigação dos canais radiculares. Foi quando Walker (1936) utilizou pela primeira vez a solução de NaOCl a 5% para este fim. Hoje as concentrações de NaClO já são amplamente conhecidas e variadas (0,5%, 1%, 2,5% e 5,25%) e é aplicada dependendo da indicação.

A solução de NaOCl é bastante utilizada, pois apresenta características como: dissolução de tecido orgânico, clareador, ação antimicrobiana (Pelczar et al., 1980; Zehnder, 2006).

O NaOCl é utilizado durante a fase de instrumentação para aumentar máximo possível o seu tempo de ação no interior do canal sem ser quimicamente alterado pela presença de outras substâncias (Beus et al., 2012; Rossi-Fedele et al., 2012). A sua eficácia tem sido demonstrada que dependem da sua concentração, da temperatura, do pH da solução de armazenamento e condições (Beus et al., 2012; Cullen et al., 2015). Soluções aquecidas (45-60 °C) e concentrações mais elevadas (5-6%) têm demonstrado maiores propriedades de dissolução de tecido (Zehnder, 2006). A concentração maior de hipoclorito mostra ter também uma maior penetração nos túbulos, eliminando maior quantidade de bactérias dos canais radiculares (Wong, Cheung, 2014). No entanto, quanto maior for a concentração, mais grave é a reação potencial que pode acontecer se o irrigante inadvertidamente for forçado para dentro dos tecidos periapicais (Mehdipour et al., 2007; Rossi-Fedele et al., 2012). Para reduzir este risco, o uso de agulhas endodontia especialmente concebidos e uma técnica de injeção sem pressão são recomendadas (Kishen, 2010).

A principal desvantagem de NaOCl é a sua incapacidade para remover a porção inorgânica de camada de esfregaço. Por esta razão, recomenda-se a utilização para finalização da irrigação o EDTA (etileno-diamina-tetra-acético) (Zehnder, 2006). EDTA tem a capacidade de decompor o componente inorgânico de detritos intracanal e é geralmente utilizado a uma concentração de 17%. EDTA parece reduzir a atividade antibacteriana e de hipoclorito de solvente e por isso estes dois líquidos não deve ser no canal ao mesmo tempo (Clarkson et al., 2011). Por esta razão, durante a preparação mecânica lavagem abundante e frequente com hipoclorito de sódio é utilizado, enquanto o EDTA é utilizado, no final da fase de

preparação para remover completamente a camada de detritos inorgânicos e esfregação de as paredes do canal.

A eficácia antimicrobiana do hipoclorito de sódio, com base no seu pH elevado, é semelhante ao mecanismo de ação do hidróxido de cálcio. O pH elevado do NaOCl interfere na integridade da membrana citoplasmática bacteriana, com uma inibição irreversível, ocorrendo modificações biossintéticas enzimáticas no metabolismo celular e a degradação observada em fosfolípido da peroxidação lipídica.

Um estudo com 50 dentes unirradiculares com periodontite apical, foram preparados usando instrumentos rotatórios BioRaCe (FKG Dentária, La Chaux-de-Fonds, Suíça) e irrigação com NaOCl 2,5% (n = 25) ou CHX 2% (n = 25). Para comparação da eficácia da irrigação o DNA das amostras clínicas foi extraído, e a redução dos níveis de bactérias totais e estreptococos foram avaliados. Todas as amostras foram positivas para a presença de bactérias. Após o PBM usando NaOCl 2,5% ou CHX2%, 44% e 40% dos canais radiculares ainda tinha apresentava as bactérias detectáveis, respectivamente e concluíram que mesmo com o PBM e irrigação, bactérias ainda persistiam nos canais radiculares (Rôças et al., 2016).

2.5 Hidróxido de cálcio

Mesmo com a irrigação com o hipoclorito de sódio e EDTA para a tentativa do combate dos micro-organismos e eliminação da camada de esfregação do canal radicular, respectivamente, muitas vezes organismos mais resistentes ainda persistem e podem causar uma recolonização naquele meio. Em casos de necrose pulpar e/ou lesão periapicais muitas vezes se faz necessário o uso de uma medicação intracanal para tentativa de eliminação desses micro-organismos mais resistentes (de Souza CA et al., 2005).

A introdução do hidróxido de cálcio ocorreu em 1930 por Hermann e a partir de então começou uma nova época no campo da odontologia (Stanley, Pameijer, 1985). O sucesso clínico com este material é atribuído principalmente ao seu pH alcalino e da sua capacidade de dissociar rapidamente em íons hidroxila e íons

cálcio (Siqueira JF, 2001). Tronstad et al. (1981), demonstraram a difusão de íons cálcio através da dentina com a superfície externa. Estes íons são radicais livres extremamente oxidantes que apresentam reatividade com biomoléculas (Siqueira JF, 2001). Seus efeitos letais em células bacterianas seriam, provavelmente, devido a danos na membrana citoplasmática, desnaturação de proteínas e/ou danos ao DNA (Mohammadi, 2011). Apesar de não elevada, esta capacidade antimicrobiana é relatada na literatura.

Safavi e Nichols (1994) demonstraram que o Ca(OH)_2 tem a capacidade de hidrolisar a porção lipídica do LPS bacteriano, promovendo sua degradação, além de alterar as propriedades biológicas. Entretanto, o Ca(OH)_2 tem se mostrado ineficaz contra *E. faecalis* (Gomes et al., 2009), pois esse micro-organismo tem a capacidade de sobreviver em canais radiculares sozinho e sem auxílio de outra bactéria (Siren et al., 1997), assim como em um ambiente com baixa disponibilidade de nutrientes.

O Ca(OH)_2 tem sido utilizado em várias situações clínicas e é mantido dentro do canal para diferentes períodos de tempo que variam de 7 dias como medicação intracanal e de 6 a 24 meses para induzir a apicificação (Kleier, Barr, 1991). A eficácia antibacteriana de hidróxido de cálcio pode ser dependente no veículo usado (Cwikla et al., 2005).

Em um estudo *in vitro*, foi analisada a ação da irrigação com hipoclorito de sódio 1% associada a medicações intracanaís de hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% durante 14 dias sobre *E. faecalis* e *C. albicans*. Todas as medicações intracanaís testadas foram eficientes em reduzir micro-organismos após o PBM, sendo que a associação do Ca(OH)_2 + CLX apresentou melhores resultados. Assim, é possível que esta associação possa combinar a atividade antimicrobiana da CLX à potente ação mineralizadora e neutralizadora de endotoxinas do Ca(OH)_2 (Valera et al., 2009).

Estudo de Baik et al. (2011) avaliou a efetividade do hidróxido de cálcio sobre o ácido lipoteicoico presente na parede celular do *E. faecalis*. Através de um pré-tratamento do LTA com o hidróxido de cálcio foi possível anular a capacidade do LTA ativar a liberação de fator de necrose tumoral por parte dos macrófagos. Os autores sugerem que o hidróxido de cálcio pode inibir a toxicidade do LTA, promovendo uma diminuição da resposta inflamatória.

Saber e EL-Hady (2012) desenvolveram biofilme maduro de *E. faecalis*, no interior de canais radiculares e testaram sua susceptibilidade à algumas medicações intracanaís. Cento e quarenta e oito pré-molares inferiores uniradiculares humanos foram instrumentados com Protaper universal, utilizando-se NaOCl 2,5% como substância química auxiliar. Em seguida, os dentes foram inoculados com suspensão de *E. faecalis* e permaneceram incubados por 30 dias, havendo a troca do caldo a cada 72 h. Os dentes foram divididos em cinco grupos de acordo com a medicação intracanal a ser utilizada: amoxicilina e clavulanato, ciprofloxacina, clindamicina, doxiciclina e pasta de hidróxido de cálcio. As medicações permaneceram por uma semana no interior dos canais radiculares. Amostras bacterianas foram coletadas e plaqueadas para posterior contagem de unidade formadora de colônias (UFC). A observação em microscópio eletrônico de varredura confirmou o crescimento do biofilme bacteriano. Notou-se que todos os agentes quimioterapêuticos foram superiores ao hidróxido de cálcio em eliminar o biofilme, tendo destaque para a amoxicilina com clavulanato, ciprofloxacina e clindamicina. Assim, a utilização de agentes antimicrobianos pode ser benéfica em casos de periodontite apical resistente, mas apenas após a realização de teste microbiológico para saber qual o antimicrobiano apropriado.

Estudo realizado *in vivo* demonstrou, através de contagem microbiana e quantificação de endotoxinas presentes em amostras obtidas de 40 canais radiculares, que a o hidróxido de cálcio associado ao propilenoglicol é efetivo na neutralização de endotoxinas e importante durante o tratamento endodôntico (Xavier et al., 2013).

Valera et al. (2014) avaliaram o efeito do extrato glicólico de gengibre como medicação intracanal associado ou não ao Ca(OH)_2 sobre micro-organismos e endotoxinas em 48 dentes humanos extraídos. Os espécimes foram divididos em 4 grupos de acordo com a medicação intracanal: Ca(OH)_2 , extrato glicólico de gengibre 20% (GEN), associação de Ca(OH)_2 + GEN (3ª coleta), solução salina (grupo controle). Os resultados mostram que todas as medicações contribuíram para eliminação de micro-organismos e redução significativa de endotoxinas, sendo que os melhores resultados foram encontrados na medicação de Ca(OH)_2 .

Barbosa-Ribeiro et al. (2016a), realizou um estudo utilizando dentes uniradiculares contaminados, em que foram necessários o retratamento

endodôntico, estes foram aleatoriamente distribuídos em 2 grupos de acordo com a substância química usada: grupo CHX gel 2%, e o grupo hipoclorito de sódio 6% (NaOCl) e medicados com hidróxido de cálcio. Amostras do canal radicular foram coletadas e após 30 dias de medicação intra-canal com hidróxido de cálcio+ CHX gel 2% e foi feita outra coleta. Concluíram que as taxas de redução das bactérias eram maiores do que as do LTA. Além disso, os micro-organismos gram-positivos estavam presentes em todas as fases do tratamento endodôntico.

2.6 Agitação ultrassônica

O ultrassom foi inicialmente utilizado nas décadas de 1940 e 1950. Basicamente, a técnica consistia na conversão da energia elétrica em energia mecânica sob a forma de vibração. Por meio de uma pequena ponta, vibrando em torno de 29.000 Hz, fluía um abrasivo de óxido de alumínio, resultando em corte rápido da estrutura dentária (Shafer et al., 1985).

A ativação ultrassônica do hipoclorito de sódio ainda permanece o padrão ouro e nos estudos é usada como controle na comparação aos demais sistemas que empregam agitação mecânica (Plotino et al., 2016).

Para ser eficiente a solução irrigadora deve tocar em todas as paredes do canal, sendo isso muito mais difícil utilizando somente a irrigação convencional (Villas-Boas MH et al., 2011). O ultrassom é utilizado ajudando a solução irrigadora a tocar mais ao longo das paredes do canal, fazendo com que a mesma penetre mais nos túbulos e conseqüentemente trazendo uma melhor eficiência da ação da solução (Gu et al., 2009).

O ultrassom é utilizado na endodontia normalmente em uma frequência entre 25 e 40 kHz. A eficácia do ultrassom na irrigação é determinada pela sua capacidade de produzir “cavitação” e “transmissão acústica”. A cavitação é minimizada e emitida para ponta do instrumento utilizado, enquanto que o efeito da transmissão acústica é mais significativo. O ultrassom cria bolhas de pressão positiva e negativa nas moléculas do líquido com as quais entram em contato. Eles tornam-se instáveis e, em seguida, elas entram em colapso e causam uma implosão

semelhante a um vácuo de descompressão. Explodindo e implodindo eles liberam impacto energético responsável para o seu efeito detergente. Tem sido demonstrado que ativação ultrassônica de hipoclorito de sódio, consideravelmente, aumenta a eficácia de limpeza do canal radicular. Além disso, aumenta significativamente o fluxo de líquido e melhora tanto o solvente antibacteriano e capacidades o efeito de remoção de detritos orgânicos e inorgânicos desde as paredes do canal radicular (Plotino et al., 2007).

A ativação ultrassônica do NaOCl a partir de 30 s a 1 min, sendo 3 ciclos de 10-20 s (com renovação constante do irrigante), mostra ser um tempo suficiente para obter um canal limpo no final do PBM (Plotino et al., 2007). O ultrassom mostra ser menos eficaz para aumentar a atividade do EDTA, mas mesmo assim pode contribuir para uma melhorar a remoção da camada de esfregaço (Cameron, 1995; Plotino et al., 2007).

O acúmulo de detritos produzidos por processos mecânicos na instrumentação das áreas de difícil acesso pode ser prevenido pela ativação ultrassônica da solução irrigadora mesmo durante a fase de preparação (Paqué et al., 2011). Portanto, o uso de irrigação contínua com ultrassom pode ser vantajoso.

Em um estudo utilizando diferentes tipos de irrigação com agitação (irrigação com seringa convencional, ativação manual dinâmica com cone guta-percha, a irrigação com agitação ultrassônica contínua e irrigação com pressão apical negativa foram testados em 20 canais radiculares de ex vivo em com um sulco padronizado, cheio de detritos na porção apical de uma parede do canal. A agitação ultrassônica mostrou ser significativamente melhor do que todas as outras técnicas testadas neste estudo ($p < 0,001$). Concluindo que PUI foi a técnica mais eficaz em remover restos de dentina das irregularidades apicais (Jiang et al., 2012).

Akçay et al., (2016) realizaram um estudo com cento e cinquenta e seis dentes extraídos foram divididos em quatro grupos de acordo com o tipo de cimento obturador ($n=39$): AH Plus, iRoot SP, MTA Fillapex e GF vedação biológica. Cada grupo era ainda subdividido aleatoriamente em três grupos de acordo com o protocolo final de irrigação ($n=13$): agulha convencional irrigação (CI), fluxo de fótons induzido por foto-acústica (Photon-Induced Photoacoustic Streaming) (PIPS) e irrigação de ultrassônica passiva (PUI). Pôde-se observar então que, a área de penetração do cimento obturador nos túbulos dentinários foi significativamente

afetados pela seleção do cimento obturador e o procedimento de irrigação final e que o uso de Root com PIPS ou PUI mostrou-se mais vantajoso quanto a penetração do cimento nos túbulos dentinários.

Almeida (2016) realizou um estudo utilizando vinte e quatro ratos que tiveram o incisivo superior direito extraído e deixado em bancada por uma hora. Em seguida, foram removidos: papila dentária, polpa dentária e ligamento periodontal. Os dentes foram imersos em solução de fluoreto de sódio fosfato acidulado a 2%. Na sequência os canais radiculares foram secos e os animais divididos em quatro grupos experimentais: Grupo Ca(OH)_2 , Grupo Ca(OH)_2 seguido da agitação ultrassônica, Grupo Ca(OH)_2 e própole, Grupo Ca(OH)_2 e própole seguido da agitação ultrassônica. Após a colocação do curativo, foi confeccionado um plug apical de MTA. Os alvéolos foram irrigados com soro fisiológico e os dentes reimplantados. Puderam concluir que o uso da MIC com hidróxido de cálcio associado à própole a 10% seguido da agitação ultrassônica não se mostrou mais efetivo que o Ca(OH)_2 no processo de reparo do reimplante tardio de dentes de rato.

Muitos estudos ainda são feitos para aperfeiçoar as técnicas de remoção da camada de smear layer do interior dos canais. Keles et al. (2016) estudaram noventa caninos inferiores com raiz em forma oval. Foi realizado o retratamento dos espécimes com o R-Endo retratamento. As amostras foram divididas aleatoriamente em seis grupos ($n = 15$). Os grupos foram divididos de acordo com a técnica de agitação: R-Endo com irrigação convencional, com arquivo auto-ajustável, com irrigação de ultrassônica passiva, R-Endo + Er: YAG, R-Endo + PIPS e R-Endo + Nd: YAG. Em comparação com o grupo de irrigação convencional (R-Endo + CI), todos os outros grupos foram mais bem sucedidos na redução da camada de detritos ($P < 0,05$). A menor quantidade de magma residual e detritos foi detectada no Er: YAG grupo ($P < 0,05$). O uso adicional de diferentes métodos de agitação contribui para a remoção de detritos e lama dentinária seguinte obturação do canal radicular remoção com instrumentos rotatórios; No entanto, nenhuma das técnicas testadas tornar paredes dos canais radiculares completamente livre de smear layer ou detritos.

Atualmente a utilização do ultrassom é feita na agitação da solução irrigadora de escolha e para remoção do Ca(OH)_2 , poucos trabalhos ainda utiliza-o para a

agitação da MIC, portanto mais estudos para comprovação de sua eficiência conjunto a uma medicação deverão ser feitos.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da solução de hipoclorito de sódio 2,5% e medicação intra-canal com hidróxido de cálcio agitados ou não com ultrassom, sobre *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e ácido lipoteicóico (LTA) no sistema de canais radiculares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa – Plataforma Brasil – e obteve aprovação, sob o número de parecer 1.504.995 (ANEXO A).

4.1 Preparo dos espécimes

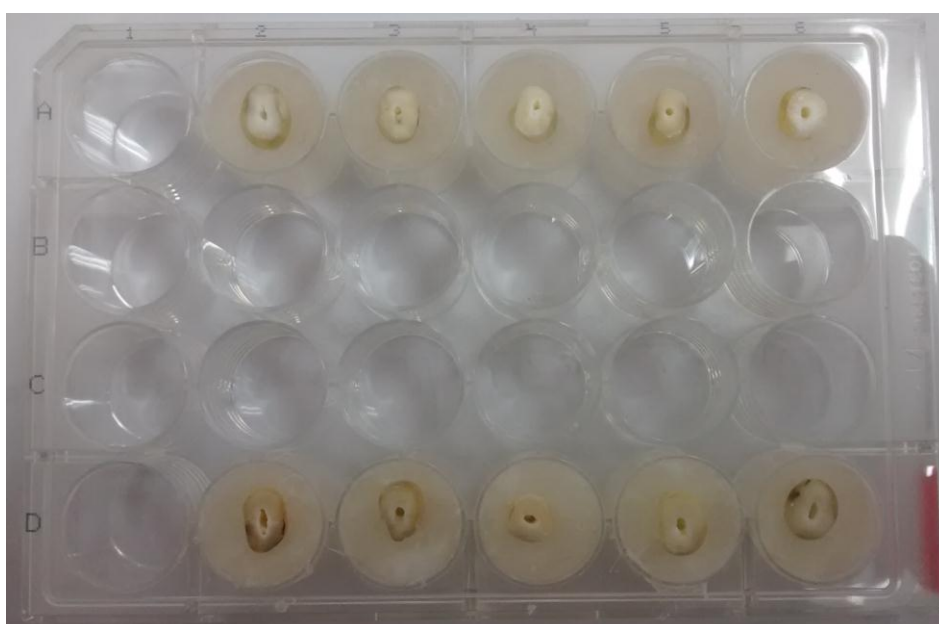
Foram selecionados 80 dentes unirradiculares humanos, que após a exodontia foram limpos e acondicionados em solução salina fisiológica até o momento de sua utilização. A seleção dos dentes foi feita baseada nas dimensões e similaridade, morfologia da raiz. As coroas foram seccionadas com disco de carborundum, para que se obtivesse a padronização do comprimento dos espécimes em $16 \pm 0,5$ mm. Foi realizada a exploração inicial dos canais radiculares com lima kerr #15 em toda extensão do dente. Em seguida, foi realizada a instrumentação com lima endodôntica reciprocante R25 do sistema (VDW, Munich, Germany). Durante todo o processo de instrumentação reciprocante, foi realizado o preparo do terço cervical, médio e apical, sendo que os canais foram irrigados com 3 ml de solução salina fisiológica a cada terço do canal.

Os espécimes foram vedados na região apical com resina fotopolimerizável Z-100 (3M ESPE, Dental Products, Saint Paul, USA), seguindo o protocolo de condicionamento com ácido fosfórico 37% (Vigodent SA Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), aplicação do adesivo Single Bond (3M ESPE, Dental Products, Saint Paul, USA) e aplicação da resina fotopolimerizável, que foi fotoativada por 40 s e em seguida as raízes foram impermeabilizadas externamente com uma camada de adesivo epóxi (Brascola, São Paulo, SP, Brasil), exceto a região da abertura cervical.

A distribuição dos dentes foi feita aleatoriamente em 8 placas de cultura de 24 poços (Costar, New York, NY, USA), com 10 dentes em cada e fixados com resina acrílica quimicamente ativada (Dencor Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo,

SP, Brasil) (Figura 1). As placas foram tampadas e embaladas. Todos os materiais, instrumentais e as placas utilizadas foram enviadas para esterilização por radiação gama com cobalto 60 (20 KGy por 6 h), realizada pela EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiação, Cotia, SP, Brasil), para neutralizar toxinas pré-existentes (Csako et al., 1983).

Figura 1 - Disposição dos espécimes após padronização



Legenda: Dentes dispostos na placa de cultura de células de 24 poços após padronização dos espécimes para facilitar o manuseio e instrumentação dos mesmos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Contaminação dos espécimes

Os espécimes foram contaminados utilizando-se os micro-organismos *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Foi realizada a verificação da pureza das cepas, sendo utilizados meios seletivos para crescimento de cada micro-organismo e também foi realizada a coloração de Gram e avaliação microscópica. Após esta verificação, os micro-organismos foram

semeados em placas de Petri contendo ágar infusão-cérebro-coração (BHI Agar) (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) para *E. faecalis* e *E. coli*. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h (*E. coli*) e 48 h (*E. faecalis*). A partir do crescimento nas placas, foram preparadas suspensões em solução salina fisiológica estéril e apirogênico (Segmenta, Ribeirão Preto, SP, Brasil) contendo 10^6 céls/mL que foram comprovadas pela leitura em espectrofotômetro (Figura 2). Em ambiente estéril, câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda. – Campinas, SP, Brasil), os canais radiculares foram contaminados com 10 µl da suspensão de *E. coli* e 10 µl de caldo BHI (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia). Na entrada dos canais foi colocada uma bolinha de algodão apirogênica embebida em caldo BHI. Os espécimes foram mantidos em estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em umidade relativa, por 7 dias, sendo que a cada 2 dias, foi adicionado caldo BHI no interior dos canais radiculares. Após 7 dias, foram adicionados aos canais radiculares 10 µl da suspensão de *E. faecalis* e 10 µl de caldo BHI. Na entrada dos canais foi colocada uma bolinha de algodão apirogênica embebida em caldo BHI. Os espécimes foram mantidos em estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, em umidade relativa, por 21 dias, sendo que a cada 2 dias, foi adicionado meio de cultura (caldo BHI) no interior dos canais radiculares até o preenchimento completo dos mesmos com o auxílio de seringas tipo insulina de 1 mL (Injex Indústrias Cirúrgicas Ltda., Ourinhos, SP, Brasil). Após 28 dias de incubação, foi realizada coleta de todos os espécimes para confirmação da contaminação (item 4.5) dos canais radiculares.

Figura 2 - Equipamento espectrofotômetro



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Preparo Biomecânico

Após a confirmação da contaminação todos os espécimes foram submetidos a técnica de instrumentação utilizando o Sistema Reciproc R40 (VDW, Munich, Germany), seguindo orientações do fabricante. Utilizou-se apenas uma lima do sistema reciprocante em cada espécime. Todos os dentes foram instrumentados com uma lima R40. A irrigação foi feita com hipoclorito de sódio 2,5%. Foi realizado preparo biomecânico utilizando a lima R40 nos terços cervical, médio e apical. Após preparo do terço cervical, o canal foi irrigado com 5 mL de NaOCl 2,5% em cada terço no momento do PBM (terço cervical, médio e apical) e 5 mL a cada 20 s da agitação ultrassônica (3 tempos de 20 s); para finalizar, o canal foi irrigado com 10 mL de NaOCl 2,5% totalizando 40 mL por canal radicular. Os canais que não foram agitados com ultrassom também foram irrigados com 40 mL de NaOCl 2,5% , sendo que no momento de agitação a solução era colocada e deixada no interior do canal o mesmo tempo dos grupos com agitação ultrassônica. Todos os espécimes foram tratados com EDTA (Biodinâmica, Ibiporã - Paraná – Brasil) por 3 min após o PBM e irrigados com 3 mL de solução salina fisiológica. Após PBM, os espécimes foram divididos em 8 grupos experimentais, de acordo com o método de limpeza final e MIC com UltraCal (Ultradent do Brasil Produtos Odontológicos Ltda, Indaiatuba, SP – Brasil). Os procedimentos experimentais foram realizados em fluxo laminar (Figura 3).

Figura 3 - Disposição dos materiais na câmara de fluxo laminar para instrumentação dos espécimes



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Divisão dos grupos experimentais

Os grupos foram divididos de acordo com as diferentes formas de tratamento como ilustra a Figura 4.

Grupo 1- PBM auxiliado pela agitação final com ultrassom, os canais das amostras foram preenchidos com UltraCal e agitada com ultrassom durante o último minuto, utilizando-se uma ponta de aço inoxidável E1-Irrisonic (Helse, Santa Rosa do Viterbo, Brasil) de 0,10 mm de diâmetro no comprimento de trabalho, com 10% da potência e por fim a abertura de acesso foi vedada e a MIC deixada agir por 7 dias.

Grupo 2 - PBM auxiliado pela agitação final com ultrassom, os canais das amostras foram preenchidos com UltraCal e agitada com ultrassom durante o último minuto, utilizando-se uma ponta de aço inoxidável E1-Irrisonic (Helse, Santa Rosa do Viterbo, Brasil) de 0,10 mm de diâmetro no comprimento de trabalho, com 10% da potência e por fim a abertura de acesso foi vedada e a MIC deixada agir por 14 dias.

Grupo 3 - PBM auxiliado pela agitação final com ultrassom durante o último minuto, utilizando-se uma ponta de aço inoxidável E1-Irrisonic (Helse, Santa Rosa do Viterbo, Brasil) de 0,10 mm de diâmetro no comprimento de trabalho, com 10% da potência, os canais das amostras foram preenchidos com UltraCal, e por fim a abertura de acesso foi vedada e a MIC deixada agir por 7 dias.

Grupo 4 - PBM auxiliado pela agitação final com ultrassom durante o último minuto, utilizando-se uma ponta de aço inoxidável E1-Irrisonic (Helse, Santa Rosa do Viterbo, Brasil) de 0,10 mm de diâmetro no comprimento de trabalho, com 10% da potência, os canais das amostras foram preenchidos com UltraCal, e por fim a abertura de acesso foi vedada e a MIC deixada agir por 14 dias.

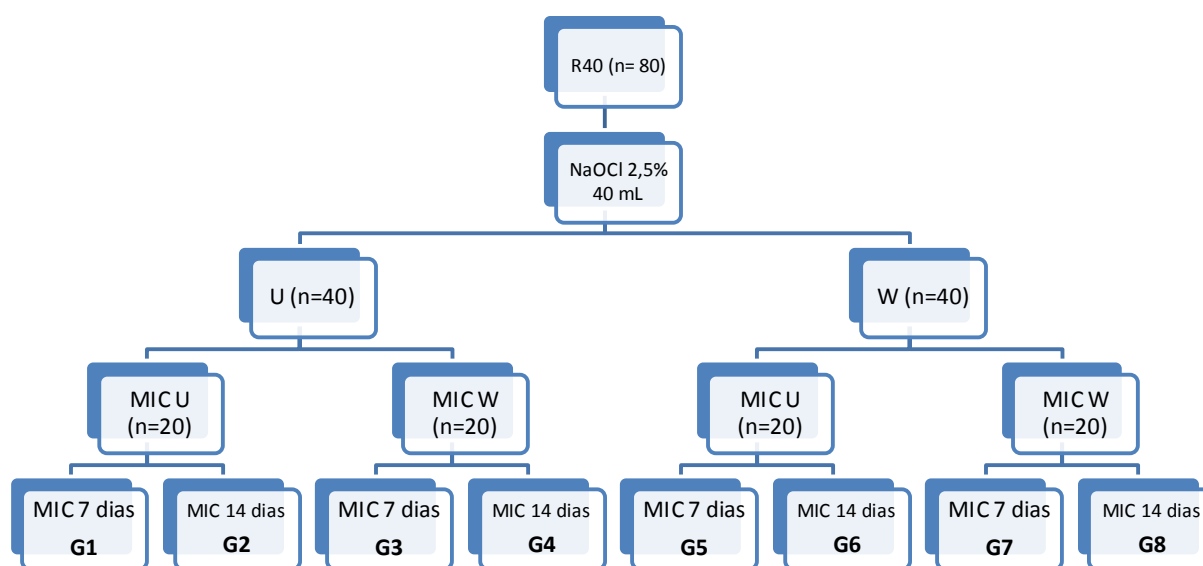
Grupo 5 - PBM convencional, os canais das amostras foram preenchidos com UltraCal e agitada com ultrassom durante o último minuto, utilizando-se uma ponta de aço inoxidável E1-Irrisonic (Helse, Santa Rosa do Viterbo, Brasil) de 0,10 mm de diâmetro no comprimento de trabalho, com 10% da potência e por fim a abertura de acesso foi vedada e a MIC deixada agir por 7 dias.

Grupo 6 - PBM convencional, os canais das amostras foram preenchidos com UltraCal e agitada com ultrassom durante o último minuto, utilizando-se uma ponta de aço inoxidável E1-Irrisonic (Helse, Santa Rosa do Viterbo, Brasil) de 0,10 mm de diâmetro no comprimento de trabalho, com 10% da potência e por fim a abertura de acesso foi vedada e a MIC deixada agir por 14 dias.

Grupo 7 - PBM convencional, os canais das amostras foram preenchidos com UltraCal, e por fim a abertura de acesso foi vedada e a MIC deixada agir por 7 dias.

Grupo 8 - PBM convencional, os canais das amostras foram preenchidos com UltraCal, e por fim a abertura de acesso foi vedada e a MIC deixada agir por 14 dias.

Figura 4 - Diagrama de distribuição dos grupos



Legenda: R40 – lima utilizada para preparo dos espécimes; n – número de espécimes; U – com agitação ultrassom; W – sem agitação ultrassom; HC – MIC com hidróxido de cálcio.

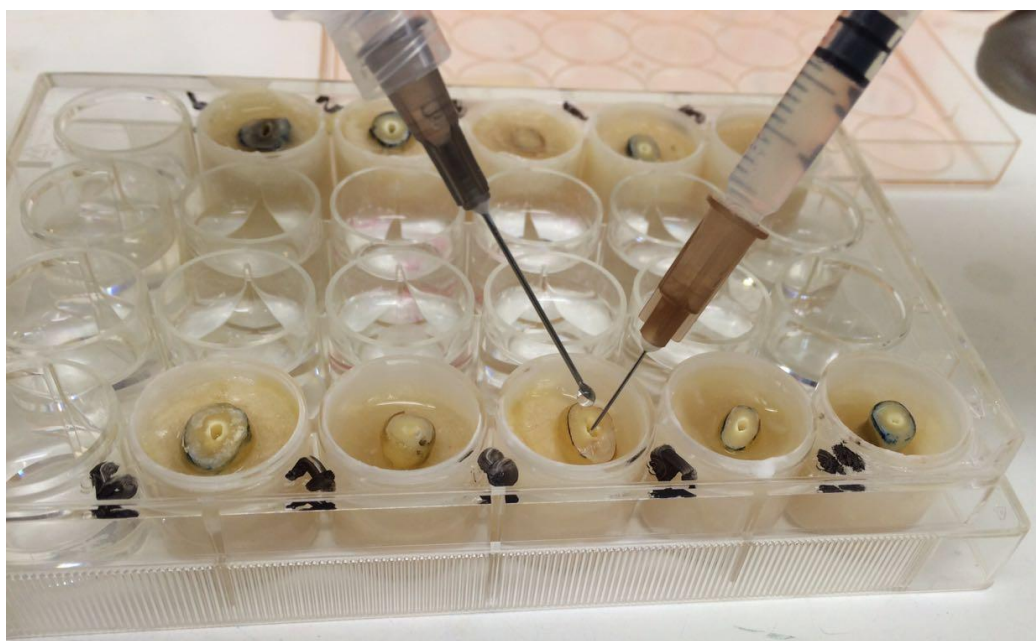
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Coletas do conteúdo do canal radicular

Todas as coletas dos canais radiculares, coleta de confirmação (1), coleta imediatamente após a instrumentação (2), coleta imediatamente após a aplicação do

EDTA 17% (3), coleta após 7 e 14 dias de MIC (4), foram realizadas da mesma forma: os canais foram preenchidos com solução salina fisiológica apirogênica com o auxílio de seringas de 1mL, esta solução foi agitada com auxílio da agulha e o conteúdo do canal radicular foi coletado com auxílio de outra seringa de 1 mL. Este procedimento foi realizado até completar a quantidade de 100 µl coletados do canal radicular (Figura 5), os quais foram transferidos para microtubos de centrifugação de 1,5 ml (tipo eppendorf) (Axygen, Union City, USA) contendo 900 µl de solução salina fisiológica apirogênica.

Figura 5 - Representação da coleta dos micro-organismos



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para todas as amostras coletadas, foram realizados testes para verificação da atividade microbiana e quantificação de LTA nos canais radiculares.

4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana (UFC/mL)

Para determinar a atividade antimicrobiana, foram realizadas diluições seriadas das amostras coletadas do canal radicular e alíquotas de 30 µl de cada amostra foi semeada (técnica da gota – 10 µl cada gota), em dois diferentes meios de cultura, seletivo para cada micro-organismo: ágar *Enterococcosel* (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD 21152, USA) para *E. faecalis* e ágar *MacConkey* (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) para *E. coli*. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 24 h, para determinação de UFC/ml. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) de *E. faecalis* e *E. coli* remanescentes no canal radicular.

4.7 Detecção e quantificação do ácido lipoteicóico

Para realizar a detecção e quantificação de ácido lipoteicóico (LTA), placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-LTA. As placas foram mantidas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS com 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS com 2 % de soro albumina bovina, BSA) por 1 h a temperatura ambiente. Após, foram lavadas com tampão de lavagem e receberam 100 µL das amostras coletadas dos canais radiculares e 100 µL dos padrões de LTA com concentrações conhecidas (curva-padrão). Os testes foram realizados em duplicata e as placas foram mantidas 2 h a temperatura ambiente. Após, as placas foram novamente lavadas e foram acrescentados 100µL de anticorpo anti-LTA. As placas foram mantidas por 1 h em temperatura ambiente. Após lavagem, foram acrescentados 100 µL de anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase. Após 1 h em temperatura ambiente, as placas foram lavadas e a reação foi revelada utilizando tetrametilbenzidina (TMB). Após, foram adicionados em cada poço da placa solução

stop (ácido sulfúrico 2N) (Figura 6) e as densidades ópticas (DO) foram lidas no leitor de microplacas (Biotek) com comprimento de onda de 450 nm (Figura 7).

Figura 6 - Reação revelada utilizando tetrametilbenzidina (TMB). Após, foram adicionados em cada poço da placa solução *stop* (ácido sulfúrico 2 N)



Legenda: Solução azul - Reação revelada utilizando tetrametilbenzidina (TMB). Solução amarela - Após, foram adicionados em cada poço da placa solução *stop* (ácido sulfúrico 2 N).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 - Leitor de microplacas (Biotek)



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.8 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn, com significância de 5%.

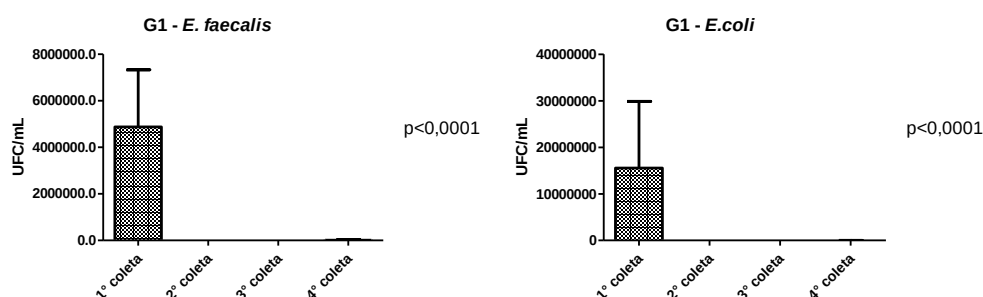
5 RESULTADO

5.1 Atividade Antimicrobiana (UFC/mL)

O crescimento microbiano foi verificado em 100% das amostras iniciais coletadas (1ª coleta), confirmando a presença de *E. faecalis* e *E. coli*, validando a metodologia proposta. As figuras 8 a 11 ilustram a média dos valores de UFC/mL nos diferentes grupos experimentais após coleta de confirmação (1ª coleta), após PBM (2ª coleta), após a remoção do EDTA (3ª coleta) e após o uso de MIC (4ª coleta).

Analisando as figuras 8, 9 e 10 (grupos G1, G2 e G3, respectivamente) é possível observar uma redução (UFC/mL) estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) de *E. faecalis* e *E. coli* da primeira coleta quando comparada com as demais coletas, evidenciando a efetividade do PBM realizado com sistema Reciproc e uso de NaOCl 2,5% como substância química auxiliar na eliminação de micro-organismos. No grupo G4 (Figura 11) o mesmo ocorreu para *E. faecalis*, porém para *E. coli* os níveis microbianos foram reduzidos gradativamente podendo ser observada sua completa eliminação após 14 dias da ação de MIC de Ca(OH)_2 .

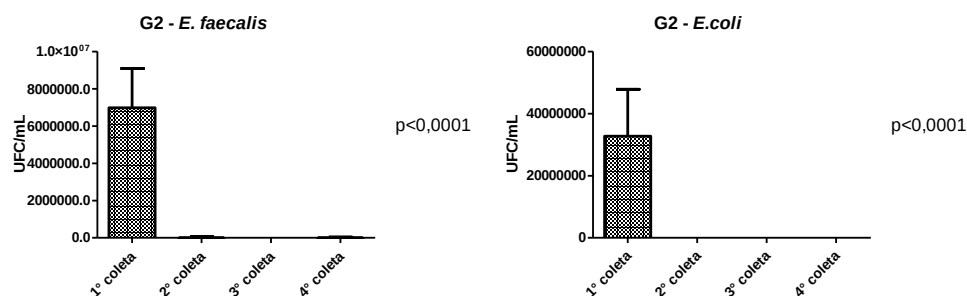
Figura 8 – Redução de *E. faecalis* e *E. coli* (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G1



Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC. G1 - PBM com agitação ultrassônica final, MIC por 7 dias com agitação ultrassônica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

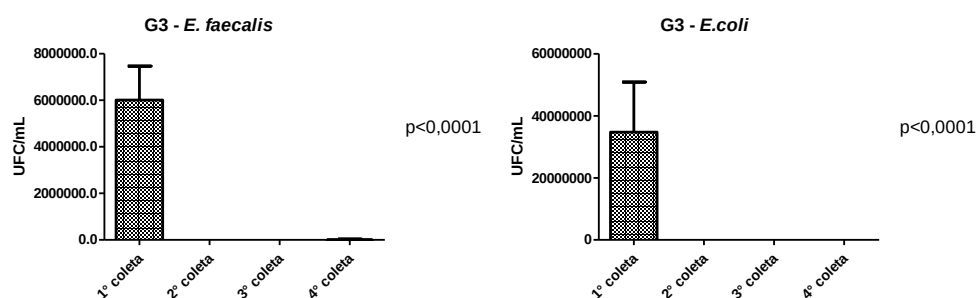
Figura 9 - Redução de *E. faecalis* e *E. coli* (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G2



Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC. G2 - PBM com agitação ultrassônica final, MIC por 14 dias com agitação ultrassônica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

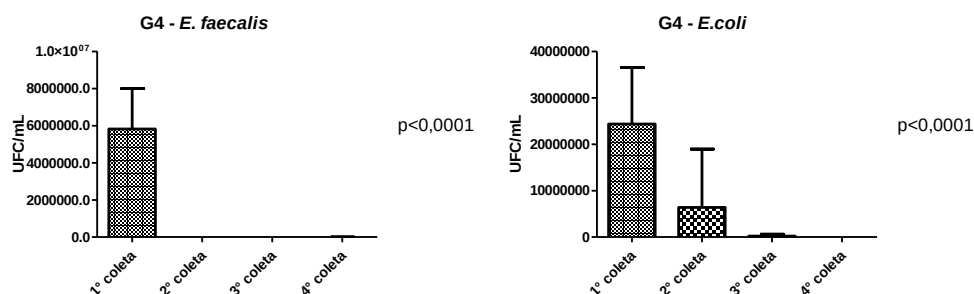
Figura 10 - Redução de *E. faecalis* e *E. coli* (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G3



Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC. G3 - PBM com agitação ultrassônica final, MIC por 7 dias sem agitação ultrassônica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 - Redução de *E. faecalis* e *E. coli* (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G4

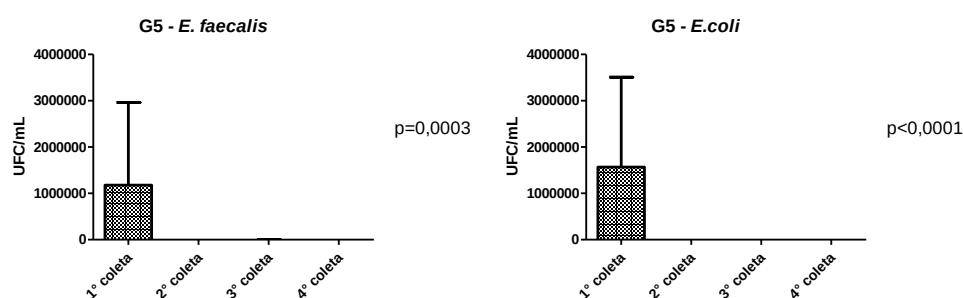


Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC. G4 - PBM com agitação ultrassônica final, MIC por 14 dias sem agitação ultrassônica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os grupos G5, G6, G7 e G8 (Figuras 12, 13, 14 e 15, respectivamente) demonstraram uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) de *E. faecalis* e *E. coli* da primeira para as demais coletas, sendo efetiva na eliminação de micro-organismos logo após o PBM. Vale ressaltar que nesses grupos não foi utilizada a agitação ultrassônica durante o PBM.

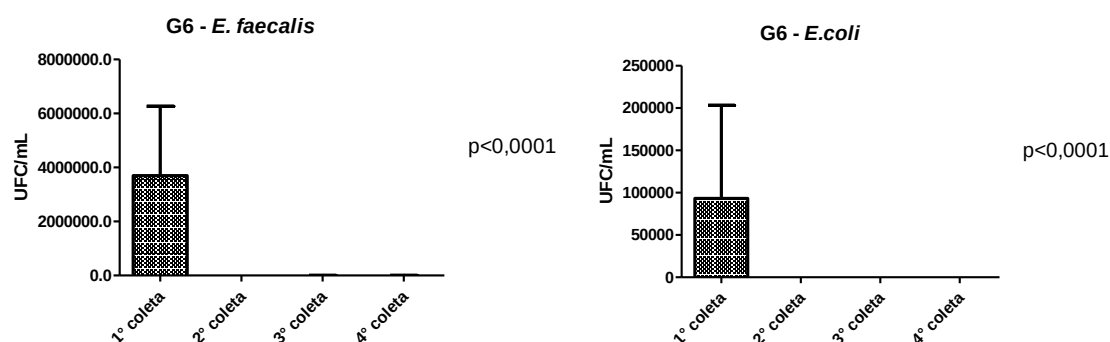
Figura 12 - Redução de *E. faecalis* e *E. coli* (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G5



Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC. G5 - PBM sem agitação ultrassônica final, MIC por 7 dias com agitação ultrassônica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

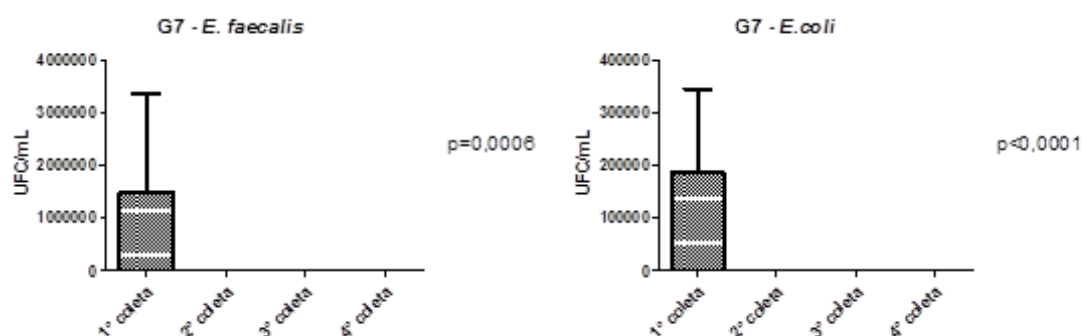
Figura 13 - Redução de *E. faecalis* e *E. coli* (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G6



Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC. G6 - PBM sem agitação ultrassônica final, MIC por 14 dias com agitação ultrassônica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

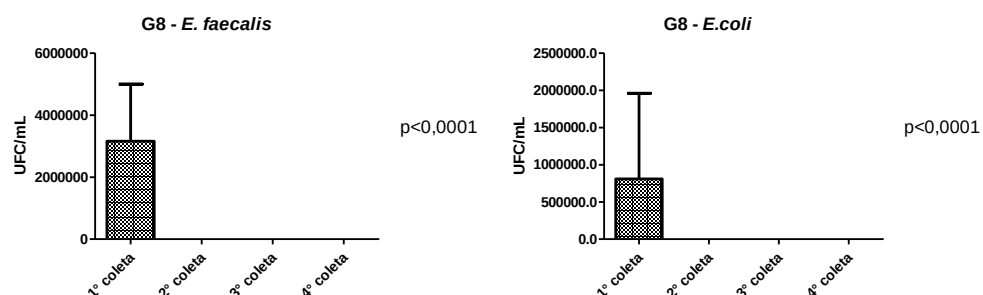
Figura 14 - Redução de *E. faecalis* e *E. coli* (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G7



Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC. G7 - PBM sem agitação ultrassônica final, MIC por 7 dias sem agitação ultrassônica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 - Redução de *E. faecalis* e *E. coli* (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G8



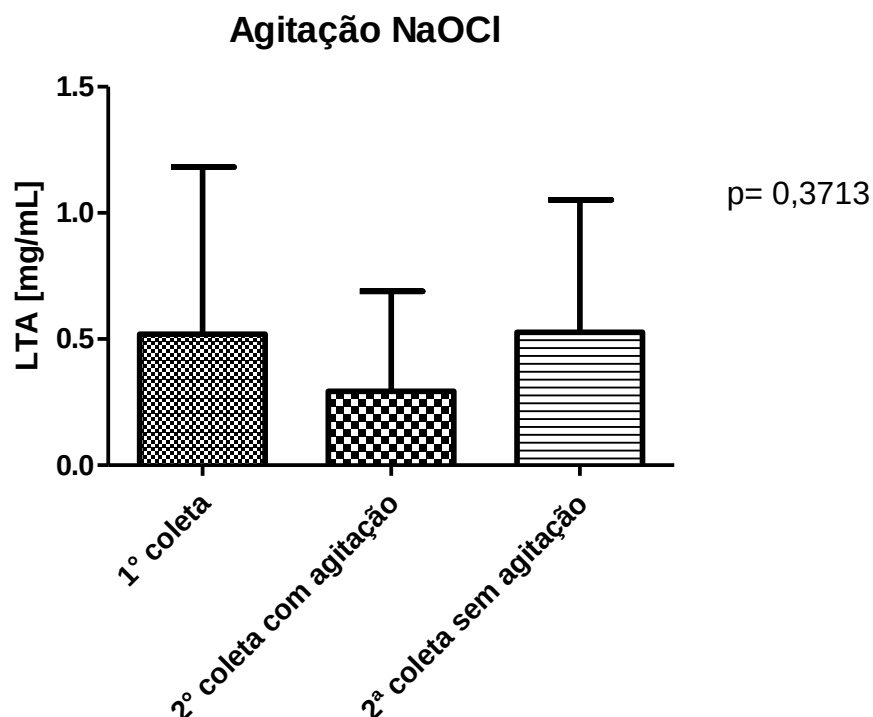
Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC. G8 - PBM sem agitação ultrassônica final, MIC por 14 dias sem agitação ultrassônica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Quantificação dos níveis de ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL)

Em relação a quantificação de ácido lipoteicóico (LTA), pôde-se notar que a variação entre os grupos referente a sua eliminação ou não durante cada coleta, não foi estatisticamente significativa em todos os grupos ($p > 0,05$) sendo o NaOCl 2,5% agitado ou não com ultrassom, como pode ser observado na figura 16.

Figura 16 – Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) comparando a coleta de confirmação (1ª coleta) (n=80) com a coleta logo após o PBM sob agitação (n=40) ou não do NaOCl 2,5% (n=40)



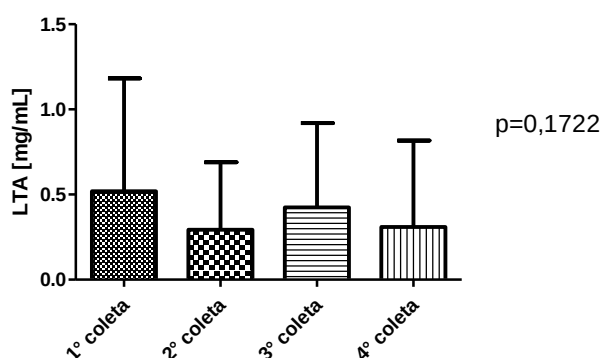
Fonte: Elaborado pelo autor.

Após o PBM todos os grupos receberam a MIC de Ca(OH)_2 , sendo que a variação nos níveis de LTA não foi estatisticamente significativa, independente do protocolo empregado ($p > 0,05$).

Todos os gráficos ilustram a confirmação da contaminação em cada grupo (1ª coleta) e a quantificação após o PBM com e sem agitação ultrassônica e aplicação do EDTA.

A figura 17 ilustra pequena redução dos níveis de LTA após a utilização de 7 dias de MIC de Ca(OH)_2 sob agitação com ultrassom, não havendo diferença significativa entre as coletas no G1 ($p = 0,1722$).

Figura 17 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G1

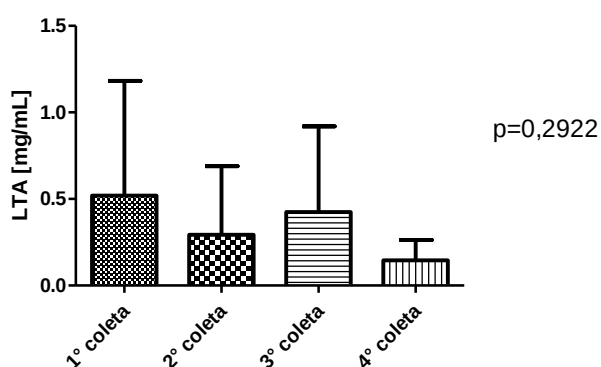


Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 18 representa o gráfico do G2, ilustrando a média de redução dos níveis de LTA no interior do SCR quando colocada a MIC sob agitação com ultrassom, por um período de 14 dias. Pode-se verificar que a diferença entre as coletas de G2 não foi significativa (p=0,2922).

Figura 18 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G2



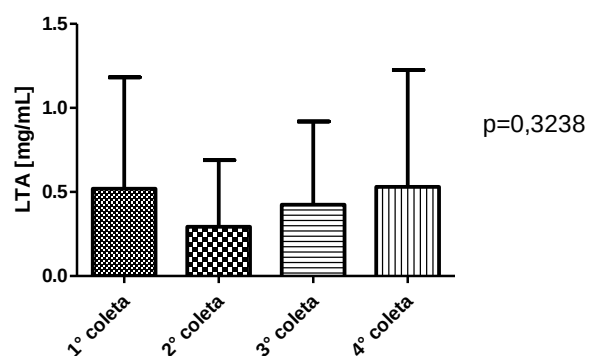
Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O gráfico representativo do G3 (Figura 19) ilustra o aumento dos níveis de LTA no interior do SCR quando colocada a MIC de Ca(OH)_2 sem agitação com

ultrassom, por período de 7 dias, porém sem diferença significativa entre as coletas ($p=0,3238$).

Figura 19 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G3

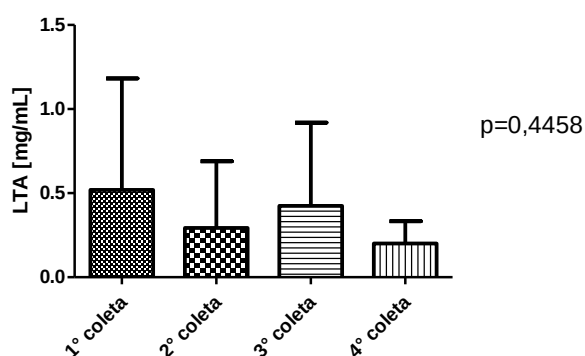


Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 20 ilustra a redução na quantidade de LTA no interior do SCR após a aplicação da MIC sem agitação com ultrassom, por período de 14 dias, no G4, não havendo diferença entre as coletas ($p=0,4458$).

Figura 20 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G4

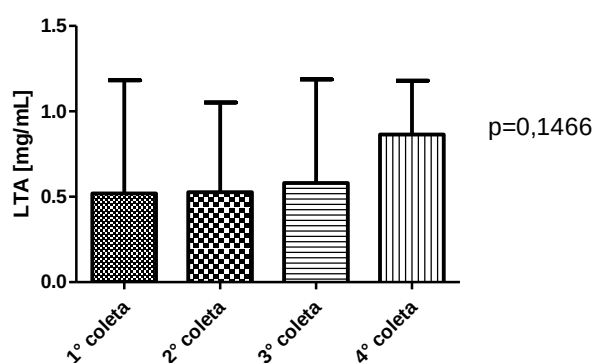


Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O gráfico representativo do G5 (Figura 21) ilustra o aumento na quantidade de LTA no SCR, sendo esta maior da que foi encontrada na coleta de confirmação quando colocada a MIC sob agitação com ultrassom, por período de 7 dias. No entanto, a diferença entre as coletas do G5 não foi significativa ($p=0,1466$).

Figura 21 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G5

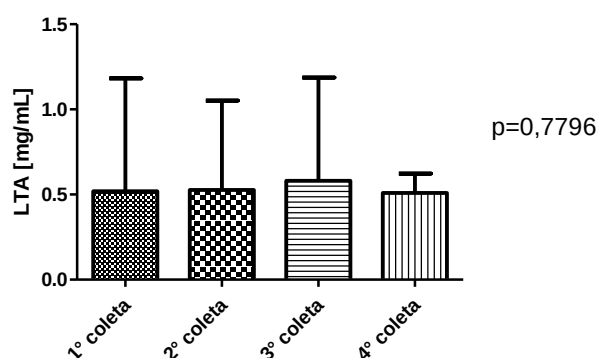


Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O gráfico representativo do G6 (Figura 22) ilustra os níveis de LTA no SCR que se manteve em mesmo nível mesmo quando colocada a MIC de Ca(OH)_2 sob agitação com ultrassom, por 14 dias. A diferença entre as coletas de G6 não foi significativa ($p=0,7796$).

Figura 22 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G6

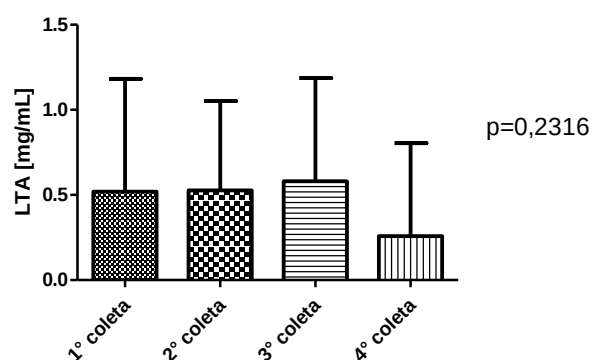


Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 23 ilustra os valores médios de redução dos níveis de LTA no SCR quando colocada a MIC sem agitação por 7 dias. A diferença entre as coletas de G7 não foi significativa (p=0,2316)

Figura 23 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) nos diferentes tempos de coleta, no G8



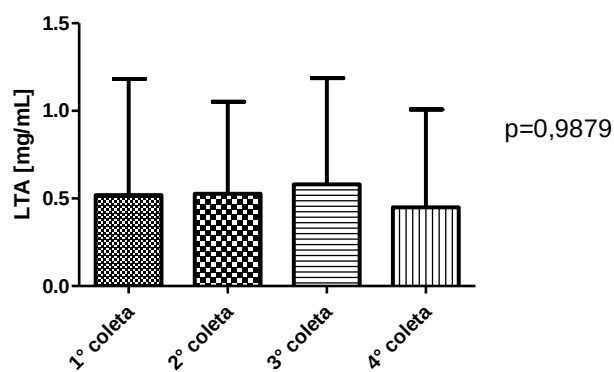
Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 24 evidencia a redução de ácido lipoteicóico do SCR que se manteve em um mesmo nível mesmo quando colocada a MIC de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sem agitação por

14 dias. Analisando o gráfico verifica-se que não houve diferença entre as coletas de G6 ($p=0,9879$).

Figura 24 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G8



Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

6.1 Discussão do tema

Sabe-se que a etapa de preparo biomecânico com abundante irrigação do sistema de canais radiculares são essenciais para o sucesso do tratamento endodôntico. Com o passar dos anos, a busca por novas técnicas com objetivo de otimizar o tratamento na eliminação de micro-organismos e seus produtos, criando alternativas para potencializar a ação das substâncias químicas auxiliares tem sido realizadas (Azim et al., 2016).

Para maior eficácia, a substância química auxiliar deve entrar em contato com todas as paredes do canal radicular, sendo muito mais difícil quando utilizado somente seringas e pontas de irrigação convencionais (Villas-Bôas MH et al., 2011). Desta forma, o ultrassom tem sido utilizado no intuito de favorecer o contato da substância química auxiliar com uma maior área da dentina do canal, com intuito que a mesma penetre em profundidade nos túbulos dentinários e consequentemente trazendo uma maior eficiência da ação da solução (Gu et al., 2009).

A ativação ultrassônica da substância química auxiliar, como o NaOCl, tem sido muito utilizada nos estudos, funcionando como controle na comparação aos demais sistemas que empregam agitação mecânica (Plotino et al., 2016). Outro fator importante é que a melhora na eficiência da limpeza dos canais radiculares já é considerado um avanço, mesmo que o terço apical não seja completamente limpo, já está provado que muitos detritos que poderiam permanecer naquela região são removidos com a agitação ultrassônica (Paqué et al., 2011).

Para alcançar maior sucesso na terapia endodôntica, atingindo maior sanificação do SCR, além de um eficiente PBM, o uso de uma medicação intracanal (MIC) é um passo quase que obrigatório na terapia endodôntica e, neste aspecto, o medicamento mais utilizado tem sido a pasta de Ca(OH)_2 associado com diferentes veículos. O mecanismo de ação do Ca(OH)_2 dá-se por meio da alcalinização da dentina, portanto o medicamento necessita penetrar nos túbulos dentinários, pois quanto maior a profundidade de penetração, melhor será seu efeito (Estrela,

Holland, 2003). Uma das formas de tentar aumentar a penetração do medicamento na dentina é por meio da agitação ultrassônica do mesmo, que permite maior difusão da MIC nos túbulos dentinários, promovendo uma potencialização em seu efeito (Duarte et al., 2012).

Neste estudo, foi utilizada a agitação da substância química auxiliar (NaOCl 2,5%) para avaliar a possível potencialização de uma solução irrigadora já consagrada por suas propriedades (Pelczar et al, 1980; Zehnder, 2006) e também da MIC de Ca(OH)_2 amplamente utilizada contra micro-organismos nos SCR (Bystrom et al., 1985; Valera et al., 2001).

Mesmo após a duplicação ou morte da bactéria, são liberadas suas toxinas, com grande potencial para causar o insucesso do tratamento endodôntico. O ácido lipoteicóico encontra-se presente na parede celular de bactérias Gram-positivas, sendo um de seus principais fatores de virulência, uma vez que está envolvido na resposta inflamatória, síndrome séptica, formação de biofilme e adesão da bactéria ao dente (Fabretti et al., 2006; Baik et al., 2008; Lee et al., 2009). Devido a sua importância no quadro das afecções endodônticas, tornou-se fundamental o estudo de formas de neutralização dessa substância, visto que o sucesso do tratamento pode estar relacionado tanto a completa remoção de micro-organismos do sistema de canais radiculares como também da detoxificação de seus produtos.

6.2 Discussão da Metodologia

Nas pesquisas *in vitro* com dentes extraídos tem sido bastante comum a utilização de dentes bovinos (Nakamichi et al., 1983) e estes são morfológica e histologicamente similares aos dentes humanos. Outra vantagem é a grande facilidade de se obter dentes em matadouros, o que é um grande facilitador no momento de se realizar uma pesquisa (Reeves et al., 1995). Por outro lado, Arends et al., (1989) verificaram que a dentina bovina é mais porosa que a dentina humana. A permeabilidade dentinária está presente tanto na dentina humana quanto na bovina, sendo que esta última apresenta ainda túbulos dentinários mais largos. Apesar de ser difícil a utilização de dentes humanos em pesquisas *in vitro* devido à

obtenção dos espécimes e de sua padronização, o presente estudo utilizou os espécimes de dentes humanos por apresentarem dimensões reais dos túbulos dentinários, eliminando assim essa variável.

Nesta pesquisa foram usados dentes unirradiculares humanos, que tiveram suas coroas seccionadas e desprezadas e, somente a porção radicular, com o tamanho dos espécimes padronizados em $16 \pm 0,5$ mm foram utilizadas (Maekawa et al., 2013; Valera et al., 2014). Para padronização do diâmetro do canal radicular, importante para a inoculação e cultivo dos micro-organismos, foi utilizado instrumento R25 do sistema Reciproc e posteriormente os espécimes receberam selamento na região apical com resina fotopolimerizável, para impedir o extravasamento do conteúdo do interior do canal. Depois de padronizados, os espécimes foram dispostos em placas de 24 poços e fixados com resina acrílica quimicamente ativada para facilitar o manuseio no momento da instrumentação (Oliveira et al., 2007b). Todo material utilizado na pesquisa foi previamente esterilizado por radiação gama cobalto 60, pela Empresa Brasileira de Radiação (EMBRARAD), pois de acordo com Csako et al. (1983), a radiação é capaz de neutralizar pirógenos previamente a execução da metodologia.

No presente estudo foi utilizado *E. faecalis*, um micro-organismo Gram-positivo, frequentemente encontrado em canais radiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical (Pinheiro et al., 2003) e em casos de insucesso do tratamento endodôntico (Cardoso et al., 2016). Apesar de *E. coli* (bactéria Gram-negativa) não ser uma bactéria muito comumente encontrada no interior de canais radiculares com polpa necrosada, os estudos de Siqueira JF et al. (2001) e Geibel et al. (2005) identificaram sua presença nos canais de dentes com necrose pulpar e presença de lesões periapicais.

Nesta pesquisa, os canais foram contaminados com *E. faecalis* e *E. coli* por 28 dias e após, realizou-se o PBM (Oliveira et al., 2007; Maekawa et al., 2013; Valera et al., 2015). Para o PBM foi utilizado a solução de NaOCl 2,5% devido a sua comprovada ação antimicrobiana (Boff, 2010; Roças et al., 2016; Roldi et al., 2009), dissolução de tecido orgânico e ação clareadora (Pelczar, 1980, Zehnder et al., 2006). em uma quantidade total de 40 mL (Benítez et al., 2014) sendo esta dividida em 5 mL em cada terço no momento do PBM (terço cervical, médio e apical) e 5 mL a cada 20 s da agitação ultrassônica (3 tempos de 20 s); para finalizar, o canal foi

irrigado com 10 mL de NaOCl 2,5%. Os canais que não foram agitados com ultrassom também foram irrigados com 40 mL de NaOCl 2,5% , sendo que no momento de agitação a solução era colocada e deixada no interior do canal o mesmo tempo dos grupos com agitação ultrassônica. Essa quantidade de solução irrigadora foi utilizada segundo estudo já realizado (Benítez et al., 2014), pois a lima única do sistema Reciproc produz grande quantidade de raspas de dentina, e seu tempo de trabalho dentro do canal é menor fazendo-se necessário uma irrigação abundante.

O PBM é um fator de extrema importância para diminuição/eliminação de micro-organismos do SCR. Apesar de haver grande redução de micro-organismos com a irrigação/instrumentação adequada, a redução de toxinas proveniente de micro-organismos é bem menos expressiva, cerca de metade é reduzida quando se utiliza a instrumentação manual (Martinho, Gomes, 2008; Martinho et al., 2010) e a redução é quase que absoluta através da instrumentação com sistemas rotatórios de NiTi (Martinho et al., 2010). No presente estudo foi utilizada a instrumentação reciprocante com lima R40, pois este sistema apresenta vantagens como: facilidade de utilização, tempo de preparo e segurança com relação ao risco de fratura quando comparado com outros sistemas como WaveOne, Mtwo e ProTaper (Motti, 2012).

Ao realizar o PBM do canal radicular nesta pesquisa, foi verificada diminuição significativa de micro-organismos presentes. Esta redução deve-se a ação mecânica dos instrumentos e as ações física e química do NaOCl, que ao entrar em contato com matéria orgânica, ou seja, com a célula bacteriana, forma ácido hipocloroso, que libera cloro nascente, o qual se liga ao grupamento amina (NH) dos aminoácidos, formando cloraminas, interferindo no metabolismo celular e inibindo a função enzimática bacteriana a partir de uma oxidação irreversível dos grupos SH (sulfidril) de enzimas bacterianas essenciais (Haapasalo et al., 2014). Esta redução se deve a ação conjunta do PBM e da solução de NaOCl, uma vez que Bystrom et al. (1985) demonstraram que a instrumentação manual por si só pode reduzir o número de bactérias presentes em canais radiculares somente em 50% necessitando assim, estar associada com o uso de soluções irrigadoras, já Martinho e Gomes (2008) obtiveram diminuição de micro-organismos anaeróbios em todas as amostras, mas eliminação somente em 5/24 casos, obtendo valores de eliminação de 20%. Os resultados do presente estudo foram superiores aos citados acima.

Provavelmente, isto se deve ao uso do NaOCl associado à instrumentos reciprocantes. Os instrumentos Reciproc são eficientes na limpeza de canais radiculares, devido ao seu “design”, uma vez que suas arestas de corte facilitam a eliminação de detritos do interior dos canais radiculares, com isto, melhora a ação da solução irrigadora utilizada durante o PBM. A movimentação inerente a esse sistema consiste na oscilação entre 150° no sentido anti-horário e 30° no sentido horário, segundo o fabricante (Villas-Boas RC et al., 2013).

Com relação a medicação intracanal, o Ca(OH)_2 é o curativo de demora mais utilizado mundialmente. Além de todas as suas propriedades tais como potente ação antimicrobiana, neutralizadora do pH ácido e indutora de mineralização (Leonardo et al., 2002), o Ca(OH)_2 também apresenta ação sobre toxinas (Safavi, Nichols, 1994; Tanomaru et al., 2003). O mecanismo de ação do Ca(OH)_2 dá-se por meio da alcalinização da dentina, portanto o medicamento necessita penetrar nos túbulos dentinários, pois quanto maior a profundidade de penetração, melhor a limpeza (Estrela, Holland, 2003). Uma das formas de aumentar essa penetração do medicamento na dentina é por meio da agitação ultrassônica, que permite maior difusão do curativo de demora nos túbulos, promovendo uma melhor limpeza (Duarte et al., 2012).

O Ca(OH)_2 tem sido utilizado em várias situações clínicas e é mantido dentro do canal para diferentes períodos de tempo que variam de 7 (Kleier, Barr, 1991) a 14 dias (Valera et al., 2009) como medicação intracanal e de 6 a 24 meses para induzir a apicificação (Kleier, Barr, 1991). O presente estudo mostrou que não houve diferença entre o tempo de MIC na tentativa de eliminar micro-organismos e toxinas presentes no sistema de canais radiculares.

A agitação do NaOCl 2,5% no presente estudo foi realizada em 3 tempos de 20 s renovando a solução em cada intervalo, pois segundo Plotino et al. (2007) que estudou a ativação ultrassônica do NaOCl a partir de 30 s a 1 min, sendo 3 ciclos de 10-20 s (com renovação constante do irrigante), mostrou ser um tempo suficiente para obter um canal limpo ao término do PBM. De acordo com mesmo autor, o ultrassom mostrou ser menos eficaz para aumentar a atividade do EDTA, mas mesmo assim pode contribuir para uma melhora sobre a remoção da camada de esfregaço (Plotino et al., 2007).

Um estudo testando influência da agitação ultrassônica na atividade antimicrobiana e penetrabilidade de pastas de Ca(OH)_2 mostrou que a agitação ultrassônica das pastas de Ca(OH)_2 aumentou sua atividade antimicrobiana e possibilitou maior penetração intratubular, com preenchimento de túbulos dentinários (Arias, 2013). Em nosso estudo, a agitação ultrassônica da MIC intracanal foi testada no intuito de analisar a possível potencialização da redução microbiana e difusão da MIC no SCR e também sobre LTA.

6.3 Discussão dos Resultados

Os resultados da contagem de UFC/mL demonstraram redução estatisticamente significativa logo após o PBM em comparação com a coleta de confirmação (1ª coleta). A solução de NaOCl apresenta capacidade de dissolver tecidos orgânicos quando em contato durante um tempo suficiente para sua ação. A sua eficácia tem sido demonstrada dependendo de sua concentração, temperatura, pH da solução e condições em que a solução é armazenada (Beus et al., 2012; Cullen et al., 2015). Nesta pesquisa não verificamos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos que receberam agitação ou não pelo ultrassom, sendo ambos os tratamentos eficientes e mostrando ainda a eficiência do NaOCl no PBM. O ultrassom parece ter vindo então para auxiliar na limpeza de um modo geral, mas sozinho não mostra eficiência e sim quando associado a uma solução desinfetante. Portanto, quando se fala em redução de micro-organismos, pode-se notar que a eficiência é mais relacionada a concentração, quantidade e tempo da substância química auxiliar em contato com o SCR, do que propriamente a agitação ultrassônica (Roldi et al., 2009). Utilizamos o NaOCl 2,5%, que possui eficácia comprovada nesta concentração como pode ser verificado nas pesquisas (Boff, 2010; Roças et al., 2016; Roldi et al., 2009).

Nossos resultado discordam dos obtidos por Roldi et al., (2009) que em um estudo utilizando a agitação do NaOCl 2,5% ou não, observaram que a utilização do ultrassom associado com a irrigação de NaOCl 2,5% foi mais eficiente que somente a irrigação, sendo que durante todo o processo de PBM foi utilizado 10 mL de

solução irrigadora. No presente estudo, a irrigação durante o PBM foi realizada com 40 mL de NaOCl 2,5%, podendo ser a diferença entre o volume da solução irrigadora uma justificativa para a maior eficiência na eliminação dos micro-organismos mesmo quando não agitados com o ultrassom.

A agitação da MIC tem sido estudada para tentar potencializar sua eficiência. Assim o presente estudo testou grupos com e sem agitação da MIC e variou o tempo de ação no interior do canal. Arias (2013) testou a influência da agitação ultrassônica na atividade antimicrobiana e penetrabilidade de pastas de Ca(OH)_2 e concluiu que a agitação ultrassônica das pastas de Ca(OH)_2 aumentou sua atividade antimicrobiana e possibilitou maior penetração intratubular, com preenchimento de túbulos dentinários.

Os resultados do presente estudo não concordam com os obtidos por Arias (2013), pois demonstraram que a agitação ou não da MIC não influenciou na redução de micro-organismos e LTA, corroborando com os resultados de Almeida (2016) que avaliou o efeito do uso da MIC de Ca(OH)_2 associado à própolis a 10% seguida da agitação ultrassônica em reimplante tardio de dentes de rato e concluiu que o uso do curativo intracanal de Ca(OH)_2 associado à própolis a 10% seguido da agitação ultrassônica não se mostrou mais efetivo que o Ca(OH)_2 puro no processo de reparo do reimplante tardio de dentes de rato.

Assim, sabendo-se que LTA induz liberação de diferentes citocinas pró inflamatórias e mediadores químicos (Zorko, Jerala, 2008; Finney et al., 2012), faz-se necessário mais estudos para promover a completa neutralização do LTA.

7 CONCLUSÃO

Diante da metodologia empregada podemos concluir que:

- a) O PBM usando NaOCl 2,5% com ou sem ativação ultrassônica foi eficaz na eliminação de *E. coli* e *E. faecalis* do sistema de canais radiculares;
- b) Com relação a detoxificação do LTA, tanto a utilização do NaOCl 2,5% ativado ou não por ultrassom quanto o emprego da MIC com Ca(OH)_2 ativado ou não por ultrassom não foram eficientes ao ponto de remover ou diminuir significativamente os níveis de LTA do sistema de canais radiculares.

REFERÊNCIAS*

- Akçay M, Arslan H, Durmus N, Mese M, Capar ID. Dentinal tubule penetration of AH Plus, iRoot SP, MTA fillapex, and guttaflow bioseal root canal sealers after different final irrigation procedures: A confocal microscopic study. *Lasers Surg Med.* 2016 Jan;48(1):70-6. doi: 10.1002/lsm.22446. PubMed PMID: 26774730.
- Almeida MM. Avaliação do hidróxido de cálcio associado própole com agitação ultrassônica como curativo intracanal em reimplante dentário tardio [dissertação]. Araçatuba (SP): Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (Unesp); 2016.
- Andrukhov O, Ertlschweiger S, Moritz A, Bantleon HP, Rausch-Fan X. Different effects of *P. gingivalis* LPS and *E. coli* LPS on the expression of interleukin-6 in human gingival fibroblasts. *Acta Odontol Scand.* 2014;72(5):337-45. doi: 10.3109/00016357.2013.834535. PubMed PMID: 24255960.
- Arends J, Christoffersen J, Ruben J, Jongebloed WL. Remineralization of bovine dentine in vitro. *Caries Res.* 1989; 23(5):309-14. PubMed PMID: 2766315.
- Arias MP. Influência da agitação ultrassônica na ação antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio e própolis [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (USP); 2013.
- Ayranci LB, Arslan H, Akçay M, Capar ID, Gok T, Saygili G. Effectiveness of laser-assisted irrigation and passive ultrasonic irrigation techniques on smear layer removal in middle and apical thirds. *Scanning.* 2016 Mar;38(2):121-7. doi: 10.1002/sca.21247. PubMed PMID: 26183211.
- Azim AA, Aksel H, Zhuang T, Mashtare T, Babu JP, Huang GT. Efficacy of 4 Irrigation protocols in killing bacteria colonized in dentinal tubules examined by a novel confocal laser scanning microscope analysis. *J Endod.* 2016;42(6):928-34. doi: 10.1016/j.joen.2016.03.009. PubMed PMID: 27130334 PMCID: PMC4884135.
- Baik JE, Jang KS, Kang SS, Yun CH, Lee K, Kim BG, et al. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* through deacylation of the lipid moiety. *J Endod.* 2011;37(2):191-6. doi: 10.1016/j.joen.2010. PubMed PMID: 21238801.
- Baik JE, Ryu YH, Han JY, Im J, Kum KY, Yun CH, et al. Lipoteichoic acid partially contributes to the inflammatory responses to *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2008;34(8):975-82. doi: 10.1016/j.joen.2008.05.005. PubMed PMID: 18634930.
- Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of *enterococcus faecalis* isolates from teeth with failure of the endodontic treatment. *J Endod.* 2016a Jul;42(7):1022-8. doi: 10.1016/j.joen.2016.03.015. Epub 2016 May 21. PubMed PMID: 27221594.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of lipoteichoic acid contents and cultivable bacteria at the different phases of the endodontic retreatment. J Endod. 2016b Apr;42(4):552-6. doi: 10.1016/j.joen.2016.01.002.

Benítez SR, Guelfand CS, Jiménez MM, Egea JJS. Root-canal disinfection of immature teeth. J Clin Exp Dent. 2014;6(4):e357-63.

Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vainna ME, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. Int Endod J. 2006;39:10-7. PubMed PMID: 16409323.

Beus C, Safavi K, Stratton J, Kaufman B. Comparison of the effect of two endodontic irrigation protocols on the elimination of bacteria from root canal system: a prospective, randomized clinical trial. J Endod. 2012;38(11):1479-83. doi: 10.1016/j.joen.2012.07.005. PubMed PMID: 23063221.

Boff TL. Análise histológica da capacidade de limpeza do terço apical de canais radiculares achatados com o uso passivo do ultrassom [monografia]. Passo Fundo (RS): Faculdade de Ingá – UNINGÁ. 2010.

Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. Endod Dent Traumatol. 1985 Oct;1(5):170-5. PubMed PMID: 3865763.

Cameron JA. The choice of irrigant during hand instrumentation and ultrasonic irrigation of the root canal: a scanning electron microscope study. Aust Dent J. 1995;40(2):85-90. PubMed PMID: 7786235.

Cardoso FG, Ferreira NS, Martinho FC, Nascimento GG, Manhães LR, Rocco MA, et al. Correlation between Volume of Apical Periodontitis Determined by Cone-beam Computed Tomography Analysis and Endotoxin Levels Found in Primary Root Canal Infection. J Endod. 2015;41(7):1015-9. doi: 10.1016/j.joen.2015.02.005. PubMed PMID: 25935504.

Cardoso FG, Chung A, Martinho FC, Camargo CH, Carvalho CA, Gomes BP, et al. Investigation of Bacterial Contents From Persistent Endodontic Infection and Evaluation of Their Inflammatory Potential. Braz Dent J. 2016;27:412-8. doi: 10.1590/0103-6440201600520. PubMed PMID: 27652703.

Chung A. Detecção de micro-organismos, quantificação de endotoxinas e ação in vivo do Zingiber officinale em dentes com necrose pulpar e lesão periapical [dissertação]. São José dos Campos (SP): Faculdade de Odontologia de São Jose dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

Clarkson RM, Podlich HM, Moule AJ. Influence of ethylenediaminetetraacetic acid on the active chlorine content of sodium hypochlorite solutions when mixed in various

proportions. *J Endod.* 2011;37:538-43. doi: 10.1016/j.joen.2011.01.018. PubMed PMID: 21419305.

Costa ED, de Souza-Filho FJ, Barbosa SV. Tissue reactions to a component of root canal system bacteria: lipoteichoic acid. *Braz Dent J.* 2003;14(2):95-8. PubMed PMID: 12964651.

Csako G, Elin RJ, Hochstein D, Tsai CH. Physical and biological properties of U.S. standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. *Infect Immun.* 1983 Jul;41(1):190-6. PubMed PMID: 6345389 PMCID: PMC264762.

Cullen JK, Wealleans JA, Kirkpatrick TC, Yaccino JM. The effect of 8.25% sodium hypochlorite on dental pulp dissolution and dentin flexural strength and modulus. *J Endod.* 2015;41(6):920-4. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.028. PubMed PMID: 25791075.

Cwikla SJ, Bélanger M, Giguère S, Progulske-Fox A, Vertucci FJ. Dentinal tubule disinfection using three calcium hydroxide formulations. *J Endod.* 2005;31(1):50-2. PubMed PMID: 15614007.

Dakin HD. On the use of certain antiseptic substances in the treatment of infected wounds. *Br Med J.* 1915;2(2852):318-20. PubMed PMID: 20767784.

de Oliveira LD, Carvalho CA, Valera MC, Koga-Ito CY, Jorge AO. Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules. *Braz Oral Res.* 2005;19(1):5-10. PubMed PMID: 16229349.

de Souza CA, Teles RP, Souto R, Chaves MA, Colombo AP. Endodontic therapy associate with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiologic evaluation by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. *J Endod.* 2005;31:79–83. PubMed PMID: 15671813.

de Souza LF, Jardim FR, Sauter IP, de Souza MM, Bernard EA. High glucose increases RAW 264.7 macrophages activation by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *Clin Chim Acta.* 2008 ;398(1-2):130-3. doi: 10.1016/j.cca.2008.09.007. PubMed PMID: 18824162.

Duarte MA, Balan NV, Zeferino MA, Vivan RR, Moraes CAH, Tanomaru Filho M, Ordinola-Zapata R, Moraes IG. Effect of ultrasonic activation on pH and calcium released by calcium hydroxide pastes in simulated external root resorption. *J Endod.* 2012;38:834-7. doi: 10.1016/j.joen.2012.03.005. PubMed PMID: 22595121.

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. PubMed PMID: 7012264.

Endo MS. Identificação de micro-organismos e quantificação de endotoxinas em canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical

[dissertação]. Campinas (SP): Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); 2011.

Endo MS, Signoretti FG, Kitayama VS, Marinho, AC; Martinho, FCanato; Gomes, BP. Culture and molecular detection of from patients with failure endodontic treatment and antimicrobial susceptibility of clinical isolates. *Enterococcus faecalis*. Braz Dent Sci. 2014;17(3):83-91.

Estrela C, Holland R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. J Appl Oral Sci. 2003;11:269-82. PubMed PMID: 21394401.

Fabretti F, Theilacker C, Baldassarri L, Kaczynski Z, Kropec A, Holst O, et al. Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. Infect Immun. 2006;74(7):4164-71. PubMed PMID: 16790791.

Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Möller AJ. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. Scand J Dent Res. 1982;90(2):134-44. PubMed PMID: 6951255.

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

Finney SJ, Leaver SK, Evans TW, Burke-Gaffney A. Differences in lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced cytokine/chemokine expression. Intensive Care Med. 2012;38(2):324-32.

Geibel MA, Schu B, Callaway AS, Gleissner C, Willershausen B. Polymerase chain reaction-based simultaneous detection of selected bacterial species associated with closed periapical lesions. Eur J Med Res. 2005 Aug;10(8):333-8. PubMed PMID: 16131474.

Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. Lancet Infect Dis. 2002;2(3):171-9. PubMed PMID: 11944187.

Gomes BP, Jacinto RC, Montagner F, Sousa EL, Ferraz CC.. Analysis of the antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from endodontic infections in Brazil during a period of nine years. J Endod. 2011;37:1058–62. doi: 10.1016/j.joen.2011.05.015, PubMed PMID: 21763894.

Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Molecular analysis of Filifactoralocis, Tannerella forsythia, and Treponema denticola associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. J Endod. 2006a;32(10):937-40. PubMed PMID: 16982268.

Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, et al. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent*. 2009;37(1):76-81. doi: 10.1016/j.jdent.2008.09.009. PubMed PMID: 18995944.

Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006b;102(2):247-53. PubMed PMID: 16876070.

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

Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br Dent J*. 2014 Mar;216(6):299-303.

Hahn CL, Liewehr FR. Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. *J Endod*. 2007;33(3):213-9. PubMed PMID: 17320699.

Han SH, Kim JH, Seo HS, Martin MH, Chung GH, Michalek SM, et al. Lipoteichoic acid-induced nitric oxide production depends on the activation of platelet-activating factor receptor and Jak2. *J Immunol*. 2006;176(1):573-9. PubMed PMID: 16365452.

Handal T, Caugant DA, Olsen I, Sunde PT. Bacterial diversity in persistent periapical lesions on root-filled teeth. *J Oral Microbiol*. 2009 May 21;1. doi: 10.3402/jom.v1i0.1946. PubMed PMID: 21523213.

Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza Filho FB. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. *Int Endod J*. 2006;39(1):62-70. PMID: 16409330.

Jiang LM, Lak B, Eijssvogels LM, Wesselink P, van der Sluis LW. Comparison of the cleaning efficacy of different final irrigation techniques. *J Endod*. 2012;38(6):838-41. doi: 10.1016/j.joen.2012.03.002. PubMed PMID: 22595122.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965 Sep;20:340-9. PubMed PMID: 14342926.

Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(5):308-20. PubMed PMID: 15470268.

Keles A, Kamalak A, Keskin C, Akçay M, Uzun İ. The efficacy of laser, ultrasound and self-adjustable file in removing smear layer debris from oval root canals following retreatment: a scanning electron microscopy study. *Aust Endod J*. 2016. doi: 10.1111/aej.12145. PubMed PMID: 26786709.

Kishen A. Advanced therapeutic options for endodontic biofilms. *Endod Topics*. 2010;22:99-123. doi: 10.1111/j.1601-1546.2012.00284.x.

Kleier DJ, Barr ES. A study of endodontically apexified teeth. *Endod Dent Traumatol*. 1991;7(3):112-7. PubMed PMID: 1685990.

Layton G, Wu W, Selvaganapathy PR, Friedman S, Kishen A. Fluid dynamics and biofilm removal generated by syringe-delivered and 2 ultrasonic-assisted irrigation methods: a novel experimental approach. *J Endod*. 2015;41(6):884-9. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.027. PubMed PMID: 25749254.

Lee JK, Baik JE, Yun CH, Lee K, Han SH, Lee W, et al. Chlorhexidine gluconate attenuates the ability of lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* to stimulate toll-like receptor 2. *J Endod*. 2009;35(2):212-5. doi: 10.1016/j.joen.2008.10.018. PubMed PMID: 19166775.

Leonardo MR, Silveira FF, Silva LA, Tanomaru Filho M, Utrilla LS. Calcium hydroxide root canal dressing. Histopathological evaluation of periapical repair at different time periods. *Braz Dent J*. 2002;13(1):17-22. PubMed PMID: 11870956.

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

Lima GA, Aguiar CM, Câmara AC, Alves LC, Santos FA, Nascimento AE. Comparison of smear layer removal using the Nd:YAG Laser, Ultrasound, ProTaper Universal System, and CanalBrush methods: An in vitro study. *J Endod*. 2015;41:400-4. doi: 10.1016/j.joen.2014.11.004. PubMed PMID: 25600669.

Lima SM, Sousa MG, Freire Mde S, de Almeida JA, Cantuária AP, Silva TA, et al. Immune Response Profile against Persistent Endodontic Pathogens *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* In Vitro. *J Endod*. 2015 Jul;41(7):1061-5. doi: 10.1016/j.joen.2015.02.016. PubMed PMID: 25845887.

Luz LB. Análise do pH e ação antimicrobiana de soluções e géis de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações [trabalho de conclusão de curso]. Porto Alegre (RS): Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2013.

Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CA, Camargo CH, Jorge AO. Effect of *Zingiber officinale* and propolis on microorganisms and endotoxins in root canals. *J Appl Oral Sci*. 2013 Jan-Feb;21(1):25-31. PubMed PMID: 23559108.

Martinho FC, Chiesa WM, Marinho AC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, et al. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. *J Endod*. 2010;36(11):1766-9. doi: 10.1016/j.joen.2010.08.019. PubMed PMID: 20951284.

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. doi: 10.1016/j.joen.2007.11.015. PubMed PMID: 18291273.

Medeiros AW, Pereira RI, Oliveira DV, Martins PD, d'Azevedo PA, Van der Sand S, et al. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. Braz J Microbiol. 2014;45:327-32. doi: 10.1590/S1517-83822014005000031. PubMed PMID: 24948952 PMCID: PMC4059318.

Mehdipour O, Kleier DJ, Averbach RE. Anatomy of sodium hypochlorite accidents. Compend Contin Educ Dent. 2007;28(10):544-6, 548, 550. PubMed PMID: 18018389.

Mills CD. M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. Crit Rev Immunol. 2012;32(6):463-88. PubMed PMID: 23428224.

Mohammadi Z. Endotoxin in endodontic infections: a review. J Calif Dent Assoc. 2011 Mar;39(3):152-5, 158-61. PubMed PMID: 21563594.

Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. Int Dent J. 2008;58(6):329-41. PubMed PMID: 19145794.

Morrison DC, Ryan JL. Endotoxins and disease mechanisms. Annu Rev Med. 1987;38:417-32. PubMed PMID: 3555304.

Nakamichi I, Iwaku M, Fusayama T. Bovine teeth as possible substitutes in the adhesion test. J Dent Res. 1983;62(10):1076-81. PubMed PMID: 6352757.

Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. J Conserv Dent. 2010;13(4):233-9. doi: 10.4103/0972-0707.73386. PubMed PMID: 21217951.

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

Oliveira LD, Carvalho CAT, Jorge AOC. Micro-organismos causadores de infecções pulpares e peripicais. In: Jorge AOC. Microbiologia bucal. 3. ed. São Paulo: Santos; 2007a. p. 127-42 (Cap.9).

Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, Koga-Ito CA, Valera MC. In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007b;104:135-42. doi: 10.1016/j.tripleo.2006.11.037. PubMed PMID: 17376712.

Oliveira LD, Carvalho CA, Carvalho AS, Alves Jde S, Valera MC, Jorge AO. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. J Endod. 2012 Aug;38(8):1053-7. doi: 10.1016/j.joen.2012.04.015. PubMed PMID: 22794204.

Paqué F, Boessler C, Zehnder M. Accumulated hard tissue debris levels in mesial roots of mandibular molars after sequential irrigation steps. *Int Endod J*. 2011;44(2):148-53. doi: 10.1111/j.1365-2591.2010.01823.x. PubMed PMID: 21083577.

Pelczar M, Reid R, Chan EC. *Microbiologia*. 2. ed. São Paulo: McGraw-Hill Ltda; 1980.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol*. 2003 Apr;18(2):100-3. PubMed PMID: 12654099.

Plotino G, Cortese T, Grande NM, Leonardi DP, Di Giorgio G, Testarelli L, et al. New Technologies to Improve Root Canal Disinfection. *Braz Dent J*. 2016 Feb;27(1):3-8. doi: 10.1590/0103-6440201600726. PubMed PMID: 27007337.

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

Reeves GW, Fitchie JG, Hembree Jr JH, Puckett AD. Microleakage of new dentin bonding systems using human and bovine teeth. *Oper Dent*. 1995;20(6):230-5. PubMed PMID: 8710704.

Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am*. 1992 Aug;267(2):54-61. PubMed PMID: 1641625.

Rôças IN, Provenzano JC, Neves MA, Siqueira JF. Disinfecting effects of rotary instrumentation with either 2.5% sodium hypochlorite or 2% chlorhexidine as the main irrigant: a randomized clinical study. *J Endod*. 2016;42(6):943-7. doi: 10.1016/j.joen.2016.03.019. PMID: 27142579.

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

Rogers JE, Coatney DD, Rossa C, Bronson P, Krieder JM, Giannobile WV, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2007;78(3):550-8. doi: 10.1902/jop.2007.060321. PMID: PMC2683373.

Roldi A, Gagno AS, Barroso J, Intra JBG, Intra TJA, Souza RP, et al. Avaliação do hipoclorito de sódio associado ou não ao uso do ultrassom sobre a permeabilidade dentinária. *Rev Bras Pesqui Saúde*. 2009;11(1):11-5.

Rossi-Fedele G, Doğramaci EJ, Guastalli AR, Steier L, de Figueiredo JA. Antagonistic interactions between sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, and citric acid. *J Endod*. 2012;38(4):426-31. doi: 10.1016/j.joen.2012.01.006. PubMed PMID: 22414823.

Ryu YH, Baik JE, Yang JS, Kang SS, Im J, Yun CH, et al. Differential immunostimulatory effects of Gram-positive bacteria due to their lipoteichoic acids. *Int Immunopharmacol*. 2009;9(1):127-33. doi: 10.1016/j.intimp.2008.10.014. PubMed PMID: 19013542.

Saber SI-D, El-Hady SA. Development of an intracanal mature *Enterococcus faecalis* biofilm and its susceptibility to some antimicrobial intracanal medications; an in vitro study. *Eur J Dent*. 2012;6(1):43-50. PubMed PMID: 22229006.

Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J Endod*. 1994;20(3):127-9. PubMed PMID: 7996084.

Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod*. 1975;1(1):19-21. PubMed PMID: 1061764.

Schonfeld SE, Greening AB, Glick DH, Frank AL, Simon JH, Herles SM. Endotoxic activity in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1982;53(1):82-7. PubMed PMID: 6948257.

Seltzer S, Farber PA. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994;78(5):634-45. PubMed PMID: 7838473.

Shafer WG, Hine MK, Levy BM. *Tratado de Patologia Bucal*. Rio de Janeiro: Interamericana; 1985.

Siqueira JF, Rôças IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J*. 2007;18(4):267-80. PubMed PMID: 18278296.

Siqueira JF, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*. 2008;34(11):1291-301. doi: 10.1016/j.joen.2008.07.028. PubMed PMID: 18928835.

Siqueira JF. Strategies to treat infected root canals. *J Calif Dent Assoc*. 2001;29(12):825-37. PubMed PMID: 11813396.

Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J*. 2001;34:1–10. PubMed PMID: 11307374.

Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J*. 1997;30(2):91-5. PubMed PMID: 10332242.

Socransky SS, Haffajee AD. Peridontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005;38(1):135–87 doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x. PMCID: PMC4529887.

Stanley HR, Pameijer CH. Pulp capping with a new visible-light-curing calcium hydroxide composition (Prisma VLC Dycal). *Oper Dent*. 1985;10(4):156-63. PubMed PMID: 3868762.

Su SC, Hua KF, Lee H, Chao LK, Tan SK, Yang SF, et al. LTA and LPS mediated activation of protein kinases in the regulation of inflammatory cytokines expression in macrophages. *Clin Chim Acta*. 2006;374(1-2):106-15. PubMed PMID: 16899235.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85(1):86-93. PubMed PMID: 1494447.

Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol*. 1992;7(5):257-62. PubMed PMID: 1494447.

Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. [dissertação]. Umet, Sweden: University of Umet; 1976.

Tanomaru JM, 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 Nov;36(11):733-9. PubMed PMID: 14641436.

Teixeira-Salum TB, Rodrigues DB, Gervásio AM, Souza CJ, Rodrigues V Jr, Loyola AM.. Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. *J Oral Pathol Med*. 2010 Mar;39(3):250-6. doi: 10.1111/j.1600-0714.2009.00863.x. PubMed PMID: 20102461.

Tian Y, Zhang X, Zhang K, Song Z, Wang R, Huang S, et al. Effect of *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid on apoptosis in human osteoblast-like cells. *J Endod*. 2013;39:632–7. doi: 10.1016/j.joen.2012. PubMed PMID: 23611381.

Torabinejad M, Walton RE. Endodontics: principles and practice. 4. ed., St. Louis: Mosby Elsevier; 2009.

Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod*. 1981;7(1):17-21. PubMed PMID: 6938618.

Valera MC, de Moraes Rego J, Jorge AO. Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on *Candida albicans* in root canals. *J Endod*. 2001;27(6):401-3. PubMed PMID: 11487135.

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

Valera MC, Silva KC, Maekawa LE, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Camargo CH, et al. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. J Appl Oral Sci. 2009;17(6):555-9. PubMed PMID: 20027425.

Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. Clin Microbiol Rev. 2003;16(3):379-414. PubMed PMID: 12857774.

Vera J, Siqueira JF, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B, et al. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. J Endod. 2012;38(8):1040-52. doi: 10.1016/j.joen.2012.04.010. PubMed PMID: 22794203.

Villas-Bôas MH, Bernardineli N, Cavenago BC, Marciano M, Del Carpio-Perochena A, de Moraes IG, et al. Microcomputed tomography study of the internal anatomy of mesial root canals of mandibular molars. J Endod. 2011;37:1682-6. doi: 10.1016/j.joen.2011.08.001. PubMed PMID: 22099905.

Vilas-Boas RC, Alcalde MP, Guimarães BM, Zapata RO, Bueno CR, Duarte MAH. RECIPROC: a comparison between reciprocating and rotational kinematics in curved canals. ROBRAC. 2013;22(63):164-8.

Vogel DY, Glim JE, Stavenhagen AW, Breur M, Heijnen P, Amor S, et al. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. Immunobiology. 2014 Sep;219(9):695-703. doi: 10.1016/j.imbio.2014.05.002. PubMed PMID: 24916404.

Walker A. A definitive and dependable therapy for pulpless teeth. J Am Dent Assoc. 1936;23(8):1418-25.

Wang CS, Arnold RR, Trope M, Teixeira FB. Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacteria. J Endod. 2007;33(11):1283-9. PubMed PMID: 17963947.

Wang JE, Dahle MK, McDonald M, Foster SJ, Aasen AO, Thiemermann C. Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. Shock. 2003;20(5):402-14. PubMed PMID: 14560103.

Wicken AJ, Knox KW. Lipoteichoic acids: a new class of bacterial antigen. Science. 1975;187(4182):1161-7. PubMed PMID: 46620.

Wong DT, Cheung GS. Extension of bactericidal effect of sodium hypochlorite into dentinal tubules. J Endod. 2014;40(6):825-9. doi: 10.1016/j.joen.2013.09.045. PubMed PMID: 24862710.

Xavier ACC, Martinho FC, Chung A, Oliveira LD, Jorge AOC, Valera MC, et al. One-visit versus two-visit root canal treatment: effectiveness in the removal of endotoxins

and cultivable bacteria. J Endod. 2013; Aug;39(8)959-64. doi: 10.1016/j.joen.2013.04.027. PubMed PMID: 23880258.

Xavier AC. Detecção de micro-organismos, quantificação de endotoxinas e avaliação in vivo do extrato glicólico de própolis em dentes com necrose pulpar e lesão periapical [dissertação]. São José dos Campos (SP): Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista - UNESP; 2011.

Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod. 2006;32:389-98. PubMed PMID: 16631834.

Zhao L, Chen J, Cheng L, Wang X, Du J, Wang F, et al. Effects of *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid on receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin expression in periodontal ligament fibroblasts. Int Endod J. 2013;47:163–72. doi: 10.1111/iej.12127. PubMed PMID: 23710898.

Zorko M, Jerala R. Alexidine and chlorhexidine bind to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid and prevent cell activation by antibiotics. J Antimicrob Chemother. 2008;62(4):730-7.

ANEXO A —Certificado do Comitê de Ética

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

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AÇÃO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO 3% E MEDICAÇÃO INTRACANAL AGITADOS COM ULTRASSOM SOBRE MICRORGANISMOS E SUAS TOXINAS EM CANAIS RADICULARES

Pesquisador: CLÁUDIA LUÍSA RIBEIRO FERREIRA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 53561916.6.0000.0077

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.504.995

Apresentação do Projeto:

TRATA-SE DE UM PROJETO QUE VISA AVALIAR A AÇÃO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO 3% E MEDICAÇÃO INTRACANAL AGITADOS COM ULTRASSOM SOBRE MICRORGANISMOS E SUAS TOXINAS EM CANAIS RADICULARES

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo será analisar a eficácia do Hipoclorito de sódio (NaOCl) 3% e medicação intra-canal com hidróxido de cálcio agitados com ultrassom, sobre *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* e se a agitação final é efetiva sobre endotoxinas de *Escherichia coli*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em relação aos benefícios indicados, não há correção a ser realizada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador responsável informou a origem dos 80 elementos dentários que serão utilizados na pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado o TERMO DE CESSÃO dos elementos dentários, assinado pelo responsável pela cessão dos dentes.

Recomendações:

Adequar o cronograma da pesquisa.

A PESQUISADORA DEVERÁ ATENTAR PARA O ENVIO DE RELATÓRIO SEMESTRAL NA FORMA DE NOTIFICAÇÃO, CASO NÃO O FAÇA, FICARÁ IMPEDIDA DE NOVA AVALIAÇÃO JUNTO AO CEP, ATÉ PERDURAR A PENDÊNCIA

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

ND

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer do relator

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_620440.pdf	30/03/2016 11:57:09		Aceito
Outros	termo_de_doacao_um.pdf	30/03/2016 11:56:43	CLAUDIA LUISA RIBEIRO FERREIRA	Aceito
Outros	termo_de_doacao_tres.pdf	30/03/2016 11:56:14	CLAUDIA LUISA RIBEIRO FERREIRA	Aceito
Outros	termo_de_doacao_dois.pdf	30/03/2016 11:55:48	CLAUDIA LUISA RIBEIRO FERREIRA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	16/02/2016 09:18:05	CLAUDIA LUISA RIBEIRO FERREIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhado.docx	20/01/2016 10:47:22	CLAUDIA LUISA RIBEIRO FERREIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av Engº Francisco José Longo 777
 Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000
 UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
 Telefone: (12)3947-9078 Fax: (12)3947-9010 E-mail: cep@fosjc.unesp.br



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

CLÁUDIA LUÍSA RIBEIRO FERREIRA

**AÇÃO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO 2,5% E MEDICAÇÃO
INTRACANAL COM AGITAÇÃO ULTRASSÔNICA SOBRE MICRO-
ORGANISMOS E ÁCIDO LIPOTEICÓICO EM CANAIS
RADICULARES**

2017

CLÁUDIA LUÍSA RIBEIRO FERREIRA

**AÇÃO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO 2,5% E MEDICAÇÃO INTRACANAL COM
AGITAÇÃO ULTRASSÔNICA SOBRE MICRO-ORGANISMOS E ÁCIDO
LIPOTEICÓICO EM CANAIS RADICULARES**

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

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Antonio Talge de Carvalho

São José dos Campos

2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho (Orientador)

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

Prof. Dr. Frederico Canato Martinho

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

Profa. Dra. Renata Amadei Nicolau

Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP)
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 02 de fevereiro de 2017.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais **Maria Goretti** e **José Milton** pelo apoio incondicional durante toda minha trajetória, pelas palavras de incentivo nas horas das dificuldades, pela educação e por todo amor que me foi dado, sem vocês nada disso seria possível e é por vocês que sempre corro atrás pra ser melhor.

Às minhas irmãs **Carol** e **Míriam** que sempre estiveram presentes em minha vida, obrigada por todo carinho, amor e amizade.

Ao meu noivo **Guilherme** que foi meu grande companheiro nessa caminhada, abdicou também de muitos finais de semana pra se fazer presente em cada momento. Obrigada pela paciência e apoio, você tornou toda trajetória mais leve.

Devo à vocês todas as minhas conquistas!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador **Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho** que enfrentou as dificuldades junto a mim e não mediu esforços para que esse trabalho fosse concluído. Obrigada por toda atenção.

À minha querida **Prof. Dra. Renata Amadei Nicolau** que foi minha grande incentivadora, sempre admirei como professora, orientadora e como pessoa, e que tem um coração enorme. Me acolheu com tanto carinho quando eu ainda nem sabia o que era uma iniciação científica e me apresentou a esse mundo fascinante, foi você que despertou em mim a vontade de conhecer um pouquinho mais do mundo acadêmico; pode ter certeza, se não fosse você nada disso estaria acontecendo na minha vida. Tenho muito orgulho de ter sido sua aluna e orientada de Iniciação Científica e levo você como minha referência por onde eu passo.

À **Profa. Tit. Márcia Carneiro Valera** pela oportunidade de compartilhar seus conhecimentos clínicos e científicos, pela atenção, estímulo, dedicação e exemplo. Te admiro demais pela forma em que leva seus conhecimentos aos alunos, sem medir esforços e abrindo mão as vezes de seu tempo livre pra nos ensinar ainda mais. Muito obrigada por tudo, tenho certeza que sou uma endodontista muito melhor depois de ser sido sua aluna.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que é meu guia, é Nele que eu encontro forças pra continuar quando tudo parece tão difícil. Sei que sem minha fé e Sua presença tão viva em minha vida, nada seria possível.

Ao Instituto de Ciências e Tecnologia (ICT) de São José dos Campos - Universidade Estadual Paulista (Unesp), através de seu **Diretor Prof. Dr. Estevão Tomomitsu Kimpara**, onde eu criei as minhas raízes durante esses dois anos.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, na pessoa do **Coordenador Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges**.

Ao **Prof. Assist. Dr. Frederico Canato Martinho** que tão prontamente aceitou meu convite para fazer parte da banca. Obrigada pelos ensinamentos e por esse ano dividido no laboratório da graduação, bastou te conhecer mais um pouco para que não restassem dúvidas de que queria o senhor fazendo parte deste momento.

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

À **Prof. Dra. Flávia Goulart da Rosa Cardoso**, pela ajuda despendida; sempre que me sentia insegura era à você que eu recorria. Saiba que tenho um carinho e admiração enormes por você.

Ao **Mestre Felipe Oliveira** por toda ajuda laboratorial e na estatística, sem sua ajuda as coisas seriam ainda mais difíceis, tenho certeza!

À minha colega de turma e amiga **Fernanda Pelegrini** que se tornou uma

companheira inseparável desde o início do curso. Compartilhamos momentos de dificuldades, uma dando sempre apoio a outra e muitos momentos de alegria, descontração e desabafos. Obrigada por ter caminhado junto a mim esses dois anos.

Às minhas queridas colegas de turma e amigas **Cássia Cestari e Daiana Cavalli**, por terem sido tão companheiras e por terem nos salvado emprestando materiais tantas vezes. Vou levar vocês no meu coração pro resto da vida.

À querida **Rayana Khoury** que chegou depois, mas não foi menos importante, pois sua ajuda com o inglês foi fundamental pra concretização deste sonho. Obrigada por nos contagiar com sua alegria.

Aos meus colegas, alunos do curso em Odontologia Restauradora, especialidade Endodontia, **Esteban, Alessandra e Diego** pela amizade e companheirismo.

À aluna de graduação e Iniciação Científica **Laiana**, que nos ajudou demais no laboratório. A vitória também é sua.

À **Prof. Dra. Luciane Dias de Oliveira** pelos ensinamentos e por todo suporte na pesquisa. A senhora foi peça fundamental para que tudo desse certo.

À **Capes** pela concessão de bolsa de mestrado.

As técnicas de laboratório, **Josiana Maria Alves Carneiro e Fernanda Brito**, pelo suporte nos trabalhos realizados.

Aos **secretários da Pós-Graduação** pela ajuda sempre que solicitada e informações prestadas.

À **Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP)**, Faculdade de Ciências da Saúde. Tenho muito orgulho de ter me formado por esta instituição.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

“O próprio Senhor irá à sua frente e estará com você; ele nunca o deixará, nunca o abandonará. Não tenha medo!

Não se desanime!”

(Deuteronômio 31:8)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Microbiologia das infecções endodônticas	19
2.2 Endotoxinas	22
2.3 Ácido Lipoteicóico (LTA)	25
2.4 Hipoclorito de sódio	28
2.5 Hidróxido de cálcio.....	30
2.6 Agitação ultrassônica	33
3 PROPOSIÇÃO	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Preparo dos espécimes	38
4.2 Contaminação dos espécimes	39
4.3 Preparo Biomecânico.....	41
4.5 Coletas do conteúdo do canal radicular.....	43
4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana (UFC/mL).....	45
4.7 Detecção e quantificação do ácido lipoteicóico	45
4.8 Análise estatística	47
5 RESULTADO	48
6 DISCUSSÃO	58
6.1 Discussão do tema.....	59
6.2 Discussão da Metodologia	60
6.3 Discussão dos Resultados	64
7 CONCLUSÃO	66

REFERÊNCIAS*	67
ANEXO.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Disposição dos espécimes após padronização.....	39
Figura 2 - Equipamento espectrofotômetro.....	40
Figura 3 - Disposição dos materiais na câmara de fluxo laminar para instrumentação dos espécimes.....	41
Figura 4 - Diagrama de distribuição dos grupos.....	43
Figura 5 - Representação da coleta dos micro-organismos.....	44
Figura 6 - Reação revelada utilizando tetrametilbenzidina (TMB). Após, foram adicionados em cada poço da placa solução stop (ácido sulfúrico 2 N).....	46
Figura 7 - Leitor de microplacas (Biotek).....	46
Figura 8 – Redução de <i>E. faecalis</i> e <i>E. coli</i> (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G1.....	48
Figura 9 - Redução de <i>E. faecalis</i> e <i>E. coli</i> (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G2.....	49
Figura 10 - Redução de <i>E. faecalis</i> e <i>E. coli</i> (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G3.....	49
Figura 11 - Redução de <i>E. faecalis</i> e <i>E. coli</i> (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G4.....	50
Figura 12 - Redução de <i>E. faecalis</i> e <i>E. coli</i> (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G5.....	50
Figura 13 - Redução de <i>E. faecalis</i> e <i>E. coli</i> (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G6.....	51
Figura 14 - Redução de <i>E. faecalis</i> e <i>E. coli</i> (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G7.....	51
Figura 15 - Redução de <i>E. faecalis</i> e <i>E. coli</i> (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G8.....	52

Figura 16 – Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) comparando a coleta de confirmação (1ª coleta) (n=80) com a coleta logo após o PBM sob agitação (n=40) ou não do NaOCl 2,5% (n=40).....	53
Figura 17 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G1.....	54
Figura 18 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G2.....	54
Figura 19 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G3.....	55
Figura 20 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G4.....	55
Figura 21 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G5.....	56
Figura 22 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G6.....	57
Figura 23 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) nos diferentes tempos de coleta, no G8.....	57
Figura 24 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G8.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Infusão de cérebro e coração
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio
EDTA	Etileno-diamina-tetra-acético
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Ácido lipoteicóico
MIC	Medicação intracanal
NaOCl	Hipoclorito de sódio
UFC	Unidades formadoras de colônias
PBM	Preparo biomecânico
PUI	Irrigação de ultrassônica passiva
SCR	Sistema de canais radiculares
TCFC	Tomografia computadorizada de feixe cônico
TMB	Tetrametilbenzidina

Ferreira CLR. Ação do hipoclorito de sódio 2,5% e medicação intracanal com agitação ultrassônica sobre micro-organismos e ácido lipoteicóico em canais radiculares [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar a eficácia do hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% e medicação intra-canal (MIC) com hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) agitados com ultrassom ou não, sobre, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e ácido lipoteicóico (LTA). Foram utilizados 80 dentes unirradiculares que foram instrumentados usando lima R40 do sistema Reciproc irrigados com 40 mL de NaOCl. Em seguida, os dentes foram aleatoriamente distribuídos em 8 grupos, de acordo com o protocolo de limpeza final e MIC: G1- agitação ultrassônica do NaOCl e MIC 7 dias, G2- agitação ultrassônica do NaOCl e MIC 14 dias, G3- agitação ultrassônica do NaOCl e sem agitação da MIC 7 dias, G4- agitação ultrassônica do NaOCl e sem agitação da MIC 14 dias, G5– sem agitação ultrassônica do NaOCl e com agitação da MIC 7 dias, G6– sem agitação ultrassônica do NaOCl e com agitação da MIC 14 dias, G7– sem agitação ultrassônica do NaOCl e MIC 7 dias e G8– sem agitação ultrassônica do NaOCl e MIC 14 dias. Foi feita a contagem de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) e quantificação de LTA. Todos os dados foram analisados estatisticamente. Os resultados mostraram uma diminuição de micro-organismos imediatamente após o PBM (preparo biomecânico) ($p < 0,001$). Nenhum protocolo empregado foi eficiente na completa eliminação de LTA. Pode-se concluir que em todos os grupos após o PBM houve redução/eliminação dos MO (micro-organismos), mas nenhum método testado foi eficiente para detoxificar completamente o LTA.

Palavras-chave: Toxinas bacterianas. Hipoclorito de sódio. Hidróxido de cálcio. Terapia ultrassônica.

Ferreira CLR. Action of sodium hypochlorite 2.5% and intracanal medication with ultrasonic agitation on microorganisms and their toxins in root canals [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the efficacy of 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl) and intracanal medications using calcium hydroxide (Ca(OH)₂) associated with ultrasound on *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and lipoteichoic acid (LTA). 80 single-rooted teeth were used that were instrumented using R40 file from the Reciproc system irrigated with 40 mL of NaOCl. Then, the teeth were randomly divided in 8 groups, according to the final cleansing protocol and intracanal medication period: G1- Ultrasonic activation of both NaOCl and Ca(OH)₂ (7 days); G2 - Ultrasonic activation of NaOCl and Ca(OH)₂ (14 days); G3 - Ultrasonic activation of NaOCl and no activation of Ca(OH)₂ (7 days); G4- Ultrasonic activation of NaOCl and no activation of Ca(OH)₂ (14 days); G5- no ultrasonic activation of NaOCl and ultrasonic activation of Ca(OH)₂ (7 days); G6- no ultrasonic agitation of NaOCl and ultrasonic agitation of Ca(OH)₂ (14 days); G7- no ultrasonic activation of NaOCl and Ca(OH)₂(7 days) and G8- no ultrasonic activation of either NaOCl and Ca(OH)₂(14 days). Culture techniques determined the colony-forming units (CFU) and the LTA was quantified. Data obtained was analyzed statistically. The results showed a decrease in microorganisms immediately after biomechanical preparation ($p < 0.001$). After biomechanical preparation a reduction/elimination of microorganisms was detected in all groups, however All groups after PBM there was reduction / elimination of MO, but none of the protocols tested were able to completely eliminate the LTA.

Keywords: Bacterial toxins. Sodium hypochlorite. Calcium hydroxide. Ultrasonic therapy.

1 INTRODUÇÃO

Na endodontia o grande obstáculo existente é a presença de micro-organismos no sistema de canais radiculares (SCR).

Nas infecções endodônticas primárias e secundárias existe a presença de micro-organismos aeróbios, anaeróbios estritos e facultativos. Sabe-se que nas infecções endodônticas primárias a predominância é das bactérias Gram-negativas (Sundqvist, 1992; Gomes et al., 2006a; Mohammadi, 2008), cujo seu principal fator de virulência é a endotoxina (LPS) que apresentam efeitos citotóxicos, podendo induzir e manter alterações pulpares e periapicais (Schein, Schilder, 1975; Fabricius et al., 1982; Martinho et al., 2010; Mohammadi, 2011).

Certos de que as infecções endodônticas e suas complicações advêm da combinação de alguns fatores como a capacidade de defesa do hospedeiro, número de micro-organismos presentes e a virulência apresentada por estes micro-organismos (Siqueira JF, Rôças, 2008), a realização de um tratamento endodôntico de sucesso deve incluir tanto a eliminação dos micro-organismos presentes, quanto a neutralização e/ou inativação dos fatores de virulência (Martinho, Gomes, 2008; Martinho et al., 2010; Oliveira et al., 2012; Vera et al., 2012).

Embora sabendo-se da predominância das bactérias Gram-negativas nas infecções endodônticas primárias, a presença de bactérias Gram-positivas também está comprovada (Xavier, 2011; Tian et al., 2013; Ferreira et al., 2015), indo além, onde alguns estudos já comprovaram que em casos de infecções secundárias ou persistentes, as bactérias Gram-positivas são predominantes (Narayanan, Vaishnavi, 2010; Ferreira et al., 2015).

Sabendo-se da presença desses micro-organismos, torna-se fundamental o estudo dos fatores de virulência dos mesmos. Dentre estes fatores, pode-se destacar o ácido lipoteicóico (LTA), o qual é considerado o correspondente Gram-positivo das endotoxinas (Su et al., 2006), sendo semelhantes tanto na estrutura quando nas respostas imunológicas geradas no hospedeiro (Baik et al., 2008).

O LTA presente na parede celular das bactérias Gram-positivas é formado pela ligação de poliglicerofosfatos e ácidos graxos e sabe-se que esta substância está envolvida na resposta inflamatória (Baik et al., 2008), na formação do biofilme

(Fabretti et al., 2006), além de possuir a capacidade de se aderir ao dente através de sua atividade adsorbtiva à hidroxiapatita, o que permite sua penetração nos túbulos dentinários (Han et al., 2006; Lee et al., 2009).

Alguns estudos demonstram que o LTA é capaz de ativar as células de defesa do hospedeiro, como macrófagos, induzindo a liberação de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Van Amersfoort et al., 2003; Wang CS et al., 2007; de Souza LF et al., 2008; Lima SM et al., 2015). Esta capacidade de influenciar a resposta imunológica é espécie dependente, e a ativação é gerada através de sinalização via receptor TLR-2 (Van Amersfoort et al., 2003; Wang JE et al., 2003).

Com o intuito de reduzir os micro-organismos e seus subprodutos, o preparo biomecânico com o auxílio de substâncias irrigadoras que tenham ação antimicrobiana é de extrema importância para que haja a eliminação desses micro-organismos e conseqüentemente o sucesso no tratamento endodôntico. O hipoclorito de sódio é a substância de maior escolha por apresentar inúmeras vantagens como ação antimicrobiana, dissolução de matéria orgânica, efeito clareador (Luz, 2013).

Estudos mostram que a utilização do hipoclorito de sódio é eficaz na redução dos micro-organismos e que sua concentração também influencia na ação antimicrobiana e maior penetração nos túbulos dentinários (Wong, Cheung, 2014; Cullen et al., 2015). Ele tem propriedades antissépticas devido à formação de ácido hipocloroso e liberação de cloro, que é um bactericida muito ativo, então a sua eficácia depende da concentração de ácido hipocloroso em solução não dissociada (Torabinejad, Walton, 2009).

Apesar de haver uma redução de micro-organismos com a irrigação adequada dos sistemas de canais radiculares, a redução de toxinas é bem menos expressiva, cerca de metade é reduzida quando se faz a instrumentação convencional (Martinho, Gomes, 2008; Martinho et al., 2010) e quase absoluta através da instrumentação com sistemas rotatórios de NiTi (Martinho et al., 2010).

Mesmo com um PBM convencional bem realizado, a redução das toxinas ainda não é suficiente, por esse motivo, faz-se necessário abrir mão de outros meios de eliminação, como a utilização de medicação intracanal durante o tratamento endodôntico (Xavier et al., 2013; Ferreira et al., 2015).

O uso da medicação intracanal é importante para o maior índice de eliminação de micro-organismos e toxinas, sendo que a medicação intracanal mais indicada para a neutralização de toxinas é o hidróxido de cálcio. Dentre suas diversas propriedades, pode-se destacar: capacidade de indução de mineralização, propriedades antimicrobianas e efetiva ação sobre LPS (Safavi et al., 1994; Nelson-Filho et al., 2002). Por promover a hidrólise da porção lipídica da toxina e neutralizando parcialmente seus efeitos biológicos, o hidróxido de cálcio possui ação efetiva sobre as bactérias (Safavi, Nichols, 1994; de Oliveira et al., 2005).

Na busca por novas alternativas de tratamento, novos meios de potencializar a limpeza dos canais estão sendo empregados, como agitação da solução irrigadora e da medicação com ultrassom (Ayranci et al., 2016).

A ativação passiva com ultrassom tem sido sugerida como um meio para melhorar o desbridamento do canal, sua desinfecção e posterior melhora na vedação do canal (Plotino et al., 2007). Além do desbridamento, o ultrassom mostra ter bons efeitos mecânicos, como a remoção de maior parte de *smear layer* quando comparados a preparos sem o uso de ultrassom (Layton et al., 2015). O acúmulo de detritos produzidos por processos mecânicos na instrumentação das áreas de difícil acesso pode ser prevenida pela agitação ultrassônica da solução irrigadora mesmo durante a fase de preparação (Paqué et al., 2011).

Diante do exposto, a proposta desta pesquisa foi analisar a eficácia do hipoclorito de sódio a 2,5% e medicação intra-canal com hidróxido de cálcio agitados ou não com ultrassom, sobre *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* e se a agitação final é efetiva sobre o ácido lipoteicóico (LTA).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiologia das infecções endodônticas

Kakehashi et al. (1965) realizou um estudo com ratos *germ-free* e convencionais, observando que após 14 dias no grupo convencional os dentes estavam com o tecido pulpar totalmente necrosado, com presença de tecido inflamatório crônico e formação de abscesso na região periapical. Em contra partida nos ratos do grupo *germ-free* não foi observado necrose pulpar e formação de abscesso, apenas um pequeno infiltrado inflamatório, concluindo que os micro-organismos estão ligados diretamente à etiologia das alterações pulpares e periapicais.

Em um estudo clássico, Sundqvist (1976) avaliou microbiologicamente 32 canais de dentes unirradiculares para identificar micro-organismos anaeróbios estritos. Todos os dentes avaliados apresentavam necrose pulpar por trauma. As bactérias foram isoladas dos espécimes que a lesão periapical era visível radiograficamente, havendo uma correlação positiva entre o tamanho da lesão periapical e o número de espécies bacterianas presentes nos canais radiculares. As bactérias anaeróbias estritas representaram cerca de 90% de toda microbiota isolada, tendo uma correlação positiva entre sintomatologia e um maior número de bactérias encontradas no canal. Os resultados mostraram o papel fundamental dos micro-organismos na etiologia e desenvolvimento das lesões periapicais.

Apesar de várias pesquisas já terem sido realizados, a microbiota do sistema de canais radiculares (SCR) é sempre muito estudada, pois várias espécies de micro-organismos são encontradas por pesquisas com métodos de identificação diferentes.

Na infecção endodôntica a microbiota é muito variada, como organismos aeróbios, anaeróbios estritos, anaeróbios facultativos e os fungos, mas sabe-se que nas infecções primárias a predominância é das bactérias Gram-negativas (Sundqvist, 1992; Gomes et al., 2006b; Mohammadi, 2008), mas a presença de bactérias Gram-positivas também já é comprovada (Chung, 2011; Xavier, 2011).

As bactérias e a seus fatores de virulência são os principais agentes para o surgimento da periodontite apical pós-tratamento podendo sobreviver a procedimentos biomecânicos ou invadir o canal através de uma infiltração coronária atingindo a obturação do canal radicular. Culturas bacterianas e estudos moleculares confirmam que *Enterococcus faecalis* é uma das mais prevalentes bactérias encontradas no canal radicular após o tratamento endodôntico (Pinheiro et al., 2003; Endo et al., 2014).

Estudo realizado por Gomes et al. (2006a) envolvendo 50 dentes com infecção endodôntica primária e 50 dentes com infecção endodôntica persistente, demonstrou por meio de cultura microbiológica a presença de *Enterococcus faecalis* em 42% dos casos.

Enterococcus faecalis pode sobreviver no canal radicular como organismo único, sem o suporte de outras espécies, e representar um problema para o sucesso do tratamento. Este gênero oferece resistência a várias substâncias antimicrobianas e ainda pode se favorecer por alterações no ecossistema do canal radicular e instituir uma infecção persistente (Oliveira et al., 2007a). *E. faecalis* pode invadir os túbulos dentinários em profundidade e, com isso, é provável que as células no interior dos túbulos dentinários que consigam sobreviver à instrumentação biomecânica e medicação intracanal possam colonizar os túbulos e reinfetar os canais radiculares obturados (Berber et al., 2006).

Um estudo de Roças e Siqueira (2011), avaliou através de testes moleculares a prevalência de *E. faecalis* em infecções endodônticas e sua associação com doenças perirradiculares. Os resultados deste estudo indicaram que *E. faecalis* é significativamente mais associado a casos assintomáticos de infecções endodônticas primárias do que com os sintomáticos. Além disso, a incidência de *E. faecalis* foi mais elevada em casos de insucesso do que em infecções primárias.

Estudo realizado por Xavier (2011) avaliou a microbiota presente em canais radiculares com infecção endodôntica primária e presença de lesão periapical e ação de diferentes substâncias químicas auxiliares. Por meio do teste de reação em cadeia polimerase foram detectados diferentes micro-organismos Gram-positivos na coleta iniciam com: *Filifactor alocis*, *Parvimonas micra* e *Enterococcus faecalis*. Indicando que cerca de 6,7% dos casos apresentam *Enterococcus faecalis*.

Em relação a incidência desse tipo de bactéria e infecções secundárias, estudo realizado por Endo et al. (2011) avaliando microbiota e níveis de endotoxinas presente em canais com insucesso endodôntico determinou, com testes bioquímicos e de reação em cadeia polimerase, a presença de *Enterococcus faecalis* em 57% dos casos e prevalência de bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas.

Enterococcus faecalis nestas infecções endodônticas secundárias ou persistentes deve-se, entre outros fatores, a sua capacidade de penetração em túbulos dentinários e a sua capacidade de impedir a liberação de enzimas hidrolíticas pelas células polimorfonucleares do hospedeiro (Rocas et al., 2011).

Além disso, *E. faecalis* possui fatores de virulência que podem estar associados a diferentes estágios da infecção endodôntica e à inflamação periapical, como: produção de substância de agregação, adesinas de superfície, produção extracelular de superóxido, enzimas líticas gelatinase e hialuronidase, e o ácido lipoteicóico (Kayaoglu, Orstavik, 2004).

Pelo empenho nos estudos da microbiota envolvida na patologia endodôntica, hoje já se sabe compreender melhor os micro-organismos envolvidos e isso trouxe a vantagem de poder otimizar o tratamento endodôntico, modificando os planos de tratamentos já instituídos e conseqüentemente ser mais eficaz no combate a esses micro-organismos. O grande desafio dos novos estudos está sendo de descobrir mais a fundo as características desses organismos mais resistentes a esse meio endodôntico e como fazer para eliminá-los.

As lesões traumáticas e as lesões cariosas são as principais vias de infecção do tecido pulpar. Uma vez reconhecida a presença de micro-organismos e seus subprodutos nos túbulos dentinários, um processo imuno-inflamatório é arquitetado neste tecido. As espécies bacterianas que inicialmente penetram o tecido dentinário são as anaeróbias facultativas, como aquelas pertencentes aos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* e micro-organismos filamentosos (Siqueira JF Jr., 2001). Dependendo do grau e intensidade da invasão bacteriana e do processo inflamatório, o tecido pulpar pode se tornar necrótico, propiciando assim a invasão do espaço pulpar pelos micro-organismos. Na dinâmica de uma infecção endodôntica, anaeróbios estritos são invasores secundários. Nos estágios iniciais, bactérias anaeróbias facultativas estão em maior percentual. Em, aproximadamente,

sete dias após o estabelecimento da infecção, 50% da microbiota já é composta por anaeróbios obrigatórios. Em três meses, a proporção desses anaeróbios pode chegar a 85% e, em seis meses, 90% (Fabricius et al., 1982).

Ferreira et al., 2015 em um estudo clínico teve como objetivo determinar o perfil microbiológico resistente a diferentes medicações intracanais em infecções endodônticas primárias, utilizando tanto a cultura microbiológica quanto a técnica de hibridação DNA-DNA. Foram utilizados vinte canais radiculares infectados e depois instrumentados antes de serem divididos aleatoriamente em 2 grupos de acordo com as medicações intracanais: hidróxido de cálcio ($\text{Ca} [\text{OH}]_2$) ou $\text{Ca} (\text{OH})_2$ + clorexidina (CHX). As amostras foram coletadas antes e após os procedimentos do canal radicular, que consistiu em submetê-los à cultura microbiológica e processá-los para hibridação DNA-DNA. Puderam concluir que o uso de $\text{Ca} (\text{OH})_2$ associado a CHX como medicação intracanal mostrou melhores resultados agindo em micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, embora tal ação para erradicar enterococos também deve ser buscada.

As doenças infecciosas representam uma categoria de interações que envolvem um hospedeiro frente a micro-organismos com potenciais colonizadores e patogênicos (Socransky, Haffajee, 2005). Em certas situações, tais micro-organismos podem invadir locais normalmente estéreis do nosso organismo, como o tecido pulpar, tornando-se assim micro-organismos oportunistas. O grau de patogenicidade de tais micro-organismos é denominado virulência, que é a capacidade de um micro-organismo produzir formas graves da doença. Relaciona-se com a produção de toxinas e à sua capacidade de multiplicação no organismo parasitado (Baik et al., 2011).

2.2 Endotoxinas (LPS)

Pode-se verificar que as bactérias Gram-negativas têm grande importância na infecção primária dos canais radiculares, participando efetivamente na indução das alterações pulpares e periapicais.

Schein e Schilder (1975) relataram que os dentes com polpas necróticas contêm maiores níveis de endotoxinas. Foi realizado um estudo clínico, para quantificar e detectar os níveis de endotoxina. O estudo foi com 40 pacientes onde eram submetidos à terapia endodôntica. Os resultados, mostraram que níveis de endotoxinas eram maiores em dentes sintomáticos do que em dentes assintomáticos, maiores em dentes com polpas necrosadas comparados com polpas vitais, e também maiores quantidades em dentes que com lesões periapicais.

Schonfeld et al. (1982) mostraram que a presença de endotoxinas nas lesões endodônticas está altamente correlacionada com lesões granulomatosas. A endotoxina, mais corretamente chamadas de lipopolissacarídeo (LPS), é um componente do envelope celular de bactérias Gram-negativas. Esta molécula é um potente mediador de inflamação que é igualmente ativa após a morte da célula bacteriana. Estas células Gram-negativas podem mesmo ser fagocitadas pelos macrófagos e, em seguida, serem lançadas com maior toxicidade.

A endotoxina é considerada como um dos principais fatores etiológicos envolvidos na patogênese e na manutenção da inflamação periapical, incluindo reabsorção óssea (Dwyer, Torabinejad, 1981; Jacinto et al., 2006). A endotoxina causa importantes efeitos biológicos inflamatórios, como ativação do sistema complemento, quimiotaxia de polimorfonucleares, indução de febre, leucopenia, hipotensão e choque, coagulação intravascular, ativação policlonal de linfócitos B e produção de anticorpos não-específicos (Oliveira et al., 2007b). Além disso, LPS ativa macrófagos, induzindo a síntese e liberação de mediadores da resposta inflamatória (prostaglandinas e leucotrienos) e citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF- γ) e interleucinas (IL-1 e IL-1 β) (Rogers et al., 2007).

As endotoxinas são moléculas estáveis ao calor compostas de polissacarídeos (açúcares polimerizados), lipídios (complexos contendo ácidos graxos) e proteínas. O LPS é composto por três segmentos covalentemente ligados: o Lipídio A, o Core e o Antígeno O. O Lipídio A é a região da molécula de endotoxina responsável por seus efeitos tóxicos (Rietschel, Brade, 1992).

Safavi e Nichols (1994) realizaram um estudo onde o objetivo era investigar se o tratamento com hidróxido de cálcio alterava sua ação biológica sobre LPS, onde era medido pela secreção de prostaglandina E₂. Culturas de células de monócitos foram estimuladas com LPS ou LPS tratado com hidróxido de cálcio.

Sobrenadantes de cultura foram analisados quanto ao teor de prostaglandina E₂ utilizando cromatografia gasosa - espectrometria de massa. A prostaglandina E₂ foi identificada nos sobrenadantes de monócitos estimuladas por LPS, mas não nos que estimuladas com LPS tratados com hidróxido de cálcio. Concluiu-se que o tratamento com hidróxido de cálcio pode alterar as propriedades biológicas dos LPS bacterianos.

Oliveira et al. (2012) realizaram um estudo clínico onde teve por objetivo investigar os efeitos do tratamento endodôntico utilizando diferentes irrigantes sobre endotoxinas em canais radiculares com necrose pulpar e periodontite apical e para avaliar os efeitos citotóxicos. Foram então selecionados trinta e seis canais radiculares. As amostras foram coletadas antes (S1) e após a instrumentação (S2). Os canais foram divididos em 3 grupos (n = 12) de acordo com a combinação utilizada irrigante: CLX + LW - gel de clorexidina 2%+ hidróxido de cálcio (água de cal 0,14%); CLX + PmB - clorexidina + polimixina B; CLX (controle), clorexidina + salina. A terceira amostra (S3) foi realizada após a ácido etilenodiaminotetracético e S4 após medicação intracanal (CLX + hidróxido de cálcio durante 14 dias). A combinação de CLX e limewater como irrigante foi o mais eficaz na redução de endotoxinas em canais radiculares e medicação intracanal foi importante para neutralizar os efeitos citotóxicos.

Diversos efeitos inflamatórios podem ser notados nas endotoxinas. O LPS induz prostaglandinas, leucotrienos, fator ativador de plaquetas, complemento 3A e 5A, e interleucina-1 entre outros. A ativação destes mediadores provoca um aumento da permeabilidade vascular, marginação dos neutrófilos nas células endoteliais, a quimiotaxia de neutrófilos, liberação de collagenase, ativação dos linfócitos, e entre outros efeitos biológicos, incluindo a reabsorção óssea e formação de granulomas crônicos (Dwyer, Torabinejad, 1981; Morrison, Ryan, 1987; Andrukhov et al., 2014).

Estudos envolvendo a quantificação de endotoxinas em dentes com necrose pulpar e lesão periapical, assim como estudos após o preparo biomecânico, mostram a eficácia dos procedimentos endodônticos na redução e/ou eliminação do conteúdo endotóxico (Oliveira et al., 2007a; Valera et al., 2014).

Cardoso et al. (2015) realizou um estudo em que correlacionava os níveis de endotoxinas de dentes com infecção endodôntica primária com sinais e sintomas

com o volume da destruição óssea periapical via TCFC (tomografia computadorizada de feixe cônico). Os resultados obtidos puderam provar que os níveis de endotoxinas encontrados nas infecções endodônticas estão relacionados tanto com o volume de destruição óssea periapical, quanto com a presença de sintomatologia dolorosa antes do tratamento.

Cardoso et al. (2016) realizou um estudo clínico investigando e quantificando as bactérias cultiváveis e seus níveis de endotoxinas na infecção endodôntica persistente, determinando sua antigenicidade contra macrófagos e fibroblastos pela secreção de IL-1 β e TNF- α e avaliando sua relação com características clínicas e radiográficas. Os achados do estudo revelaram a presença de espécies de bactérias Gram-negativas na infecção endodôntica persistente, com suas endotoxinas relacionadas com a severidade da destruição óssea e o desenvolvimento de sintomatologia. Além disso, áreas maiores de destruição óssea estavam relacionadas a níveis mais elevados de IL-1 β e TNF- α secretados por macrófagos e fibroblastos.

2.3 Ácido Lipoteicóico (LTA)

Outro componente, agora da parede celular de bactérias Gram-positivas, o ácido lipoteicóico (LTA) é considerado um importante fator de virulência envolvido em alterações pulpares e periapicais. Mesmo após a morte bacteriana, LTA persiste no canal radicular por longos períodos de tempo, as quais podem causar inflamação crônica (Seltzer, Farber, 1994).

Enterococcus são cocos Gram-positivos, e devido à suas características morfológicas e genéticas, eles podem resistir a procedimento intracanal e antibióticos sistêmicos, mesmo em condições ecológicas de estresse (Medeiros et al., 2014). O mecanismo de resistência do *E. faecalis* resulta da sua mudanças de fisiologia ou estrutura na célula bacteriana, que é uma estratégia de sobrevivência ao ataque por agentes antimicrobianos (Endo et al., 2014). Enterococcus spp. adquiriu determinantes genéticos que conferem resistência a várias classes de antibióticos, incluindo a clindamicina, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, e, mais

recentemente, a vancomicina (Endo et al., 2014; Gomes et al., 2011). Embora a incidência de cepas resistentes seja mais pronunciada em infecções hospitalares ou sistêmicas, os estudos usando infecções bacterianas isolados de endodontia têm mostrado a emergência de bactérias resistentes, em especial em procedimentos convencionais utilizados em procedimentos dentários (Gomes et al., 2011). Embora os antibióticos sistêmicos não sejam normalmente usados no tratamento de infecções associadas a lesões periapicais crônicas, em casos de pacientes com *flare-up* ou em risco de desenvolvimento de endocardite bacteriana, estes tornam-se um auxiliar importante na endodontia, sendo utilizado em regimes profiláticos (Endo et al., 2014).

O *Enterococcus faecalis* participa do processo das infecções endodônticas primárias e secundárias, portanto na parede celular dessas bactérias se encontra LTA que possui uma estrutura anfipática, ou seja, moléculas que apresentam a característica de possuírem uma região hidrofílica (solúvel em meio aquoso), e uma região hidrofóbica (insolúvel em água, porém solúvel em lipídios e solventes orgânicos), sendo formado por ligação de poliglicerofosfatos e ácidos graxos (Wicken, Knox, 1975) e estando envolvida na resposta inflamatória, síndrome séptica, formação de biofilme e adesão ao dente (Fabretti et al., 2006; Han et al., 2006; Baik et al., 2008; Lee et al., 2009). Este polímero de glicerofosfato ou ribitolfosfato covalentemente ligado ao glicolípido na membrana citoplasmática e projetando-se através da camada de peptidoglicano, é considerado essencial ao crescimento bacteriano (Van Amersfoort et al., 2003, Siqueira JF, Rôças, 2007).

LTA é um importante fator de virulência da bactéria Gram-positiva que é lançado durante a multiplicação bacteriana, principalmente após sua lise por lisozima, peptídeos bactericidas catiônicos, fosfolipase A, catepsinas, ou antibióticos beta-lactâmicos (Ginsburg, 2002). O LTA tem propriedades patogênicas semelhantes aos LPS de bactérias Gram-negativas (Ginsburg, 2002; Hahn, Liewehr, 2007; Siqueira JF, Rôças, 2007). No entanto, o LTA se difere na perda em termos de estrutura e gene de transcrição (Ryu et al., 2009).

LTA pode iniciar uma série de reações por ligação a receptores específicos (CD14 e toll-like2) ou por eventos não específicos (fosfolipídios da membrana; a ativação sistema do complemento; liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral alfa, interleucina [IL] -1-B, IL-6, IL-8, e prostaglandina

E2 (PGE2); regulação da angiogênese e liberação de hidrolases, proteases e de oxigênio reativo e regulação, recrutamento e ativação de neutrófilos (Ginsburg, 2002; Costa et al., 2003; Kayaoglu, Ørstavik, 2004; Siqueira JF, Rôças, 2007).

Os macrófagos derivados de monócitos podem ser ativados em 2 perfis, M1 e M2, no local da infecção. Macrófagos M1 podem desenvolver função antimicrobiana e anti-tumoral, enquanto que os macrófagos M2 estão relacionados com a proliferação celular e reparação de tecidos (Mills et al., 2012). A evidência sugere que a indução da destruição óssea ocorre após ativação de células osteoclásticas (Teixeira-Salum et al., 2010). A diferenciação de osteoclastos pode ser afetada por diferentes estímulos da citocina produzidos por células imunocompetentes em periodontite apical (Handal et al., 2009). Portanto, o macrófago de ativação M1 pode ser envolvido com a interleucina (IL) -6, IL-12, e fator de necrose tumoral (TNF) α , ao passo que a produção de IL-10 está envolvida com a ativação M2 (Vogel et al., 2014).

Baik et al. (2008) realizou um estudo com LTA proveniente de *E.faecalis*, avaliou a sua capacidade de estimulação de macrófagos (RAW 264.7), o qual produziu elevados níveis de fator de crescimento (TNF- α) e de óxido nítrico. O estudo ainda relata que o LTA estimula o receptor TLR2, mas não o TLR4 (receptor estimulado pelas endotoxinas) e conclui que os resultados indicam que o LTA é parcialmente responsável pelas respostas inflamatórias geradas pelo *E.faecalis*.

Tian et al. (2013) realizou um estudo para examinar o efeito do LTA, um importante fator de virulência de *E. faecalis*, sobre a apoptose de osteoblastos. Evidenciando que o LTA de *E. faecalis* pode inibir a proliferação e induzir apoptose de células MG63 de osteoblastos humanos.

Lima SM et al. (2015) avaliaram a expressão de mediadores inflamatórios produzidos por antígenos de 264,7 células mortas RAW de *Candida albicans* e *E. faecalis* na presença de calor (HK). Culturas de células RAW foram estimuladas com ambos os antígenos na presença ou ausência de interferon recombinante (rIFN) γ . Parâmetros da viabilidade celular, a produção de óxido nítrico (NO), bem como a síntese de interleucina (IL) -1 α , IL-6, IL-10, IL-12, proteína-1 quimiotático de monócitos, e fator de necrose tumoral (TNF) α foram analisados. Puderam constatar que o conhecimento em relação ao mecanismo de acolhimento de resposta a micro-organismos que perpetuam a infecção endodôntica e as lesões perirradiculares pode

contribuir para a otimização da terapia endodôntica. Os mediadores inflamatórios mencionados e fatores de virulência envolvidos no insucesso endodôntico podem orientar a progressão da lesão e também serem alvos no desenvolvimento de desinfetantes e agentes imunomoduladores.

Barbosa-Ribeiro et al. (2016a) realizou um estudo para investigar a prevalência de fatores de virulência e os fatores antimicrobianos resistentes a *Enterococcus faecalis*, que foram isolados de dentes com falha do tratamento endodôntico. Concluiu-se que *E. faecalis* isolados de infecções endodônticas persistentes mostraram resistência intermediária / total a vários agentes antimicrobianos, sendo a amoxicilina + clavulanato o agente mais eficaz. Além disso, as estirpes mostraram diferentes padrões de detecção de genes de virulência.

Em outro estudo, Barbosa-Ribeiro et al. (2016b) quantificou os níveis de LTA e bactérias cultiváveis nas diferentes fases do retratamento endodôntico. Também investigou a presença de micro-organismos Gram-positivos antes e depois do PBM e MIC. As taxas de redução das bactérias foram maiores que o LTA. Além disso, micro-organismos Gram-positivos estavam presentes em todas as fases do retratamento endodôntico.

Deste modo, sabendo-se que o LTA possui um papel importante nas afecções endodônticas, faz-se necessário o estudo de formas de eliminação/inativação desta substância, de forma a se elevar os índices de sucesso do tratamento endodôntico.

2.4 Hipoclorito de sódio

Em 1820, Labarraque em suas experimentações, obteve Hipoclorito de Sódio (NaOCl) em concentração de 2,5% e utilizou para a desinfecção de feridas. Em 1915, o químico Inglês Henry Dakin (1915) recomendou a utilização de uma solução de hipoclorito de sódio (0,5% - 0,6%) para irrigar feridas infectadas, pois observou que a cicatrização com a solução de Labarraque ocorria muito lentamente e que isso acontecia em decorrência da alta concentração da solução que causava injúria aos tecidos. A partir de então, começou-se a pesquisar a solução para outros fins.

Em 1917, Barret implantou o uso de NaClO para irrigação dos canais radiculares. Foi quando Walker (1936) utilizou pela primeira vez a solução de NaOCl a 5% para este fim. Hoje as concentrações de NaClO já são amplamente conhecidas e variadas (0,5%, 1%, 2,5% e 5,25%) e é aplicada dependendo da indicação.

A solução de NaOCl é bastante utilizada, pois apresenta características como: dissolução de tecido orgânico, clareador, ação antimicrobiana (Pelczar et al., 1980; Zehnder, 2006).

O NaOCl é utilizado durante a fase de instrumentação para aumentar máximo possível o seu tempo de ação no interior do canal sem ser quimicamente alterado pela presença de outras substâncias (Beus et al., 2012; Rossi-Fedele et al., 2012). A sua eficácia tem sido demonstrada que dependem da sua concentração, da temperatura, do pH da solução de armazenamento e condições (Beus et al., 2012; Cullen et al., 2015). Soluções aquecidas (45-60 °C) e concentrações mais elevadas (5-6%) têm demonstrado maiores propriedades de dissolução de tecido (Zehnder, 2006). A concentração maior de hipoclorito mostra ter também uma maior penetração nos túbulos, eliminando maior quantidade de bactérias dos canais radiculares (Wong, Cheung, 2014). No entanto, quanto maior for a concentração, mais grave é a reação potencial que pode acontecer se o irrigante inadvertidamente for forçado para dentro dos tecidos periapicais (Mehdipour et al., 2007; Rossi-Fedele et al., 2012). Para reduzir este risco, o uso de agulhas endodontia especialmente concebidos e uma técnica de injeção sem pressão são recomendadas (Kishen, 2010).

A principal desvantagem de NaOCl é a sua incapacidade para remover a porção inorgânica de camada de esfregaço. Por esta razão, recomenda-se a utilização para finalização da irrigação o EDTA (etileno-diamina-tetra-acético) (Zehnder, 2006). EDTA tem a capacidade de decompor o componente inorgânico de detritos intracanal e é geralmente utilizado a uma concentração de 17%. EDTA parece reduzir a atividade antibacteriana e de hipoclorito de solvente e por isso estes dois líquidos não deve ser no canal ao mesmo tempo (Clarkson et al., 2011). Por esta razão, durante a preparação mecânica lavagem abundante e frequente com hipoclorito de sódio é utilizado, enquanto o EDTA é utilizado, no final da fase de

preparação para remover completamente a camada de detritos inorgânicos e esfregaço de as paredes do canal.

A eficácia antimicrobiana do hipoclorito de sódio, com base no seu pH elevado, é semelhante ao mecanismo de ação do hidróxido de cálcio. O pH elevado do NaOCl interfere na integridade da membrana citoplasmática bacteriana, com uma inibição irreversível, ocorrendo modificações biossintéticas enzimáticas no metabolismo celular e a degradação observada em fosfolípido da peroxidação lipídica.

Um estudo com 50 dentes unirradiculares com periodontite apical, foram preparados usando instrumentos rotatórios BioRaCe (FKG Dentária, La Chaux-de-Fonds, Suíça) e irrigação com NaOCl 2,5% (n = 25) ou CHX 2% (n = 25). Para comparação da eficácia da irrigação o DNA das amostras clínicas foi extraído, e a redução dos níveis de bactérias totais e estreptococos foram avaliados. Todas as amostras foram positivas para a presença de bactérias. Após o PBM usando NaOCl 2,5% ou CHX2%, 44% e 40% dos canais radiculares ainda tinha apresentava as bactérias detectáveis, respectivamente e concluíram que mesmo com o PBM e irrigação, bactérias ainda persistiam nos canais radiculares (Rôças et al., 2016).

2.5 Hidróxido de cálcio

Mesmo com a irrigação com o hipoclorito de sódio e EDTA para a tentativa do combate dos micro-organismos e eliminação da camada de esfregaço do canal radicular, respectivamente, muitas vezes organismos mais resistentes ainda persistem e podem causar uma recolonização naquele meio. Em casos de necrose pulpar e/ou lesão periapicais muitas vezes se faz necessário o uso de uma medicação intracanal para tentativa de eliminação desses micro-organismos mais resistentes (de Souza CA et al., 2005).

A introdução do hidróxido de cálcio ocorreu em 1930 por Hermann e a partir de então começou uma nova época no campo da odontologia (Stanley, Pameijer, 1985). O sucesso clínico com este material é atribuído principalmente ao seu pH alcalino e da sua capacidade de dissociar rapidamente em íons hidroxila e íons

cálcio (Siqueira JF, 2001). Tronstad et al. (1981), demonstraram a difusão de íons cálcio através da dentina com a superfície externa. Estes íons são radicais livres extremamente oxidantes que apresentam reatividade com biomoléculas (Siqueira JF, 2001). Seus efeitos letais em células bacterianas seriam, provavelmente, devido a danos na membrana citoplasmática, desnaturação de proteínas e/ou danos ao DNA (Mohammadi, 2011). Apesar de não elevada, esta capacidade antimicrobiana é relatada na literatura.

Safavi e Nichols (1994) demonstraram que o Ca(OH)_2 tem a capacidade de hidrolisar a porção lipídica do LPS bacteriano, promovendo sua degradação, além de alterar as propriedades biológicas. Entretanto, o Ca(OH)_2 tem se mostrado ineficaz contra *E. faecalis* (Gomes et al., 2009), pois esse micro-organismo tem a capacidade de sobreviver em canais radiculares sozinho e sem auxílio de outra bactéria (Siren et al., 1997), assim como em um ambiente com baixa disponibilidade de nutrientes.

O Ca(OH)_2 tem sido utilizado em várias situações clínicas e é mantido dentro do canal para diferentes períodos de tempo que variam de 7 dias como medicação intracanal e de 6 a 24 meses para induzir a apicificação (Kleier, Barr, 1991). A eficácia antibacteriana de hidróxido de cálcio pode ser dependente no veículo usado (Cwikla et al., 2005).

Em um estudo *in vitro*, foi analisada a ação da irrigação com hipoclorito de sódio 1% associada a medicações intracanaís de hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% durante 14 dias sobre *E. faecalis* e *C. albicans*. Todas as medicações intracanaís testadas foram eficientes em reduzir micro-organismos após o PBM, sendo que a associação do Ca(OH)_2 + CLX apresentou melhores resultados. Assim, é possível que esta associação possa combinar a atividade antimicrobiana da CLX à potente ação mineralizadora e neutralizadora de endotoxinas do Ca(OH)_2 (Valera et al., 2009).

Estudo de Baik et al. (2011) avaliou a efetividade do hidróxido de cálcio sobre o ácido lipoteicoico presente na parede celular do *E. faecalis*. Através de um pré-tratamento do LTA com o hidróxido de cálcio foi possível anular a capacidade do LTA ativar a liberação de fator de necrose tumoral por parte dos macrófagos. Os autores sugerem que o hidróxido de cálcio pode inibir a toxicidade do LTA, promovendo uma diminuição da resposta inflamatória.

Saber e EL-Hady (2012) desenvolveram biofilme maduro de *E. faecalis*, no interior de canais radiculares e testaram sua susceptibilidade à algumas medicações intracanais. Cento e quarenta e oito pré-molares inferiores uniradiculares humanos foram instrumentados com Protaper universal, utilizando-se NaOCl 2,5% como substância química auxiliar. Em seguida, os dentes foram inoculados com suspensão de *E. faecalis* e permaneceram incubados por 30 dias, havendo a troca do caldo a cada 72 h. Os dentes foram divididos em cinco grupos de acordo com a medicação intracanal a ser utilizada: amoxicilina e clavulanato, ciprofloxacina, clindamicina, doxiciclina e pasta de hidróxido de cálcio. As medicações permaneceram por uma semana no interior dos canais radiculares. Amostras bacterianas foram coletadas e plaqueadas para posterior contagem de unidade formadora de colônias (UFC). A observação em microscópio eletrônico de varredura confirmou o crescimento do biofilme bacteriano. Notou-se que todos os agentes quimioterapêuticos foram superiores ao hidróxido de cálcio em eliminar o biofilme, tendo destaque para a amoxicilina com clavulanato, ciprofloxacina e clindamicina. Assim, a utilização de agentes antimicrobianos pode ser benéfica em casos de periodontite apical resistente, mas apenas após a realização de teste microbiológico para saber qual o antimicrobiano apropriado.

Estudo realizado *in vivo* demonstrou, através de contagem microbiana e quantificação de endotoxinas presentes em amostras obtidas de 40 canais radiculares, que a o hidróxido de cálcio associado ao propilenoglicol é efetivo na neutralização de endotoxinas e importante durante o tratamento endodôntico (Xavier et al., 2013).

Valera et al. (2014) avaliaram o efeito do extrato glicólico de gengibre como medicação intracanal associado ou não ao Ca(OH)_2 sobre micro-organismos e endotoxinas em 48 dentes humanos extraídos. Os espécimes foram divididos em 4 grupos de acordo com a medicação intracanal: Ca(OH)_2 , extrato glicólico de gengibre 20% (GEN), associação de Ca(OH)_2 + GEN (3ª coleta), solução salina (grupo controle). Os resultados mostram que todas as medicações contribuíram para eliminação de micro-organismos e redução significativa de endotoxinas, sendo que os melhores resultados foram encontrados na medicação de Ca(OH)_2 .

Barbosa-Ribeiro et al. (2016a), realizou um estudo utilizando dentes uniradiculares contaminados, em que foram necessários o retratamento

endodôntico, estes foram aleatoriamente distribuídos em 2 grupos de acordo com a substância química usada: grupo CHX gel 2%, e o grupo hipoclorito de sódio 6% (NaOCl) e medicados com hidróxido de cálcio. Amostras do canal radicular foram coletadas e após 30 dias de medicação intra-canal com hidróxido de cálcio+ CHX gel 2% e foi feita outra coleta. Concluíram que as taxas de redução das bactérias eram maiores do que as do LTA. Além disso, os micro-organismos gram-positivos estavam presentes em todas as fases do tratamento endodôntico.

2.6 Agitação ultrassônica

O ultrassom foi inicialmente utilizado nas décadas de 1940 e 1950. Basicamente, a técnica consistia na conversão da energia elétrica em energia mecânica sob a forma de vibração. Por meio de uma pequena ponta, vibrando em torno de 29.000 Hz, fluía um abrasivo de óxido de alumínio, resultando em corte rápido da estrutura dentária (Shafer et al., 1985).

A ativação ultrassônica do hipoclorito de sódio ainda permanece o padrão ouro e nos estudos é usada como controle na comparação aos demais sistemas que empregam agitação mecânica (Plotino et al., 2016).

Para ser eficiente a solução irrigadora deve tocar em todas as paredes do canal, sendo isso muito mais difícil utilizando somente a irrigação convencional (Villas-Boas MH et al., 2011). O ultrassom é utilizado ajudando a solução irrigadora a tocar mais ao longo das paredes do canal, fazendo com que a mesma penetre mais nos túbulos e conseqüentemente trazendo uma melhor eficiência da ação da solução (Gu et al., 2009).

O ultrassom é utilizado na endodontia normalmente em uma frequência entre 25 e 40 kHz. A eficácia do ultrassom na irrigação é determinada pela sua capacidade de produzir “cavitação” e “transmissão acústica”. A cavitação é minimizada e emitida para ponta do instrumento utilizado, enquanto que o efeito da transmissão acústica é mais significativo. O ultrassom cria bolhas de pressão positiva e negativa nas moléculas do líquido com as quais entram em contato. Eles tornam-se instáveis e, em seguida, elas entram em colapso e causam uma implosão

semelhante a um vácuo de descompressão. Explodindo e implodindo eles liberam impacto energético responsável para o seu efeito detergente. Tem sido demonstrado que ativação ultrassônica de hipoclorito de sódio, consideravelmente, aumenta a eficácia de limpeza do canal radicular. Além disso, aumenta significativamente o fluxo de líquido e melhora tanto o solvente antibacteriano e capacidades o efeito de remoção de detritos orgânicos e inorgânicos desde as paredes do canal radicular (Plotino et al., 2007).

A ativação ultrassônica do NaOCl a partir de 30 s a 1 min, sendo 3 ciclos de 10-20 s (com renovação constante do irrigante), mostra ser um tempo suficiente para obter um canal limpo no final do PBM (Plotino et al., 2007). O ultrassom mostra ser menos eficaz para aumentar a atividade do EDTA, mas mesmo assim pode contribuir para uma melhorar a remoção da camada de esfregaço (Cameron, 1995; Plotino et al., 2007).

O acúmulo de detritos produzidos por processos mecânicos na instrumentação das áreas de difícil acesso pode ser prevenido pela ativação ultrassônica da solução irrigadora mesmo durante a fase de preparação (Paqué et al., 2011). Portanto, o uso de irrigação contínua com ultrassom pode ser vantajoso.

Em um estudo utilizando diferentes tipos de irrigação com agitação (irrigação com seringa convencional, ativação manual dinâmica com cone guta-percha, a irrigação com agitação ultrassônica contínua e irrigação com pressão apical negativa foram testados em 20 canais radiculares de ex vivo em com um sulco padronizado, cheio de detritos na porção apical de uma parede do canal. A agitação ultrassônica mostrou ser significativamente melhor do que todas as outras técnicas testadas neste estudo ($p < 0,001$). Concluindo que PUI foi a técnica mais eficaz em remover restos de dentina das irregularidades apicais (Jiang et al., 2012).

Akçay et al., (2016) realizaram um estudo com cento e cinquenta e seis dentes extraídos foram divididos em quatro grupos de acordo com o tipo de cimento obturador ($n=39$): AH Plus, iRoot SP, MTA Fillapex e GF vedação biológica. Cada grupo era ainda subdividido aleatoriamente em três grupos de acordo com o protocolo final de irrigação ($n=13$): agulha convencional irrigação (CI), fluxo de fótons induzido por foto-acústica (Photon-Induced Photoacoustic Streaming) (PIPS) e irrigação de ultrassônica passiva (PUI). Pôde-se observar então que, a área de penetração do cimento obturador nos túbulos dentinários foi significativamente

afetados pela seleção do cimento obturador e o procedimento de irrigação final e que o uso de Root com PIPS ou PUI mostrou-se mais vantajoso quanto a penetração do cimento nos túbulos dentinários.

Almeida (2016) realizou um estudo utilizando vinte e quatro ratos que tiveram o incisivo superior direito extraído e deixado em bancada por uma hora. Em seguida, foram removidos: papila dentária, polpa dentária e ligamento periodontal. Os dentes foram imersos em solução de fluoreto de sódio fosfato acidulado a 2%. Na sequência os canais radiculares foram secos e os animais divididos em quatro grupos experimentais: Grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$ seguido da agitação ultrassônica, Grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e própole, Grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e própole seguido da agitação ultrassônica. Após a colocação do curativo, foi confeccionado um plug apical de MTA. Os alvéolos foram irrigados com soro fisiológico e os dentes reimplantados. Puderam concluir que o uso da MIC com hidróxido de cálcio associado à própole a 10% seguido da agitação ultrassônica não se mostrou mais efetivo que o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ no processo de reparo do reimplante tardio de dentes de rato.

Muitos estudos ainda são feitos para aperfeiçoar as técnicas de remoção da camada de smear layer do interior dos canais. Keles et al. (2016) estudaram noventa caninos inferiores com raiz em forma oval. Foi realizado o retratamento dos espécimes com o R-Endo retratamento. As amostras foram divididas aleatoriamente em seis grupos ($n = 15$). Os grupos foram divididos de acordo com a técnica de agitação: R-Endo com irrigação convencional, com arquivo auto-ajustável, com irrigação de ultrassônica passiva, R-Endo + Er: YAG, R-Endo + PIPS e R-Endo + Nd: YAG. Em comparação com o grupo de irrigação convencional (R-Endo + CI), todos os outros grupos foram mais bem sucedidos na redução da camada de detritos ($P < 0,05$). A menor quantidade de magma residual e detritos foi detectada no Er: YAG grupo ($P < 0,05$). O uso adicional de diferentes métodos de agitação contribui para a remoção de detritos e lama dentinária seguinte obturação do canal radicular remoção com instrumentos rotatórios; No entanto, nenhuma das técnicas testadas tornar paredes dos canais radiculares completamente livre de smear layer ou detritos.

Atualmente a utilização do ultrassom é feita na agitação da solução irrigadora de escolha e para remoção do $\text{Ca}(\text{OH})_2$, poucos trabalhos ainda utiliza-o para a

agitação da MIC, portanto mais estudos para comprovação de sua eficiência conjunto a uma medicação deverão ser feitos.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da solução de hipoclorito de sódio 2,5% e medicação intra-canal com hidróxido de cálcio agitados ou não com ultrassom, sobre *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e ácido lipoteicóico (LTA) no sistema de canais radiculares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa – Plataforma Brasil – e obteve aprovação, sob o número de parecer 1.504.995 (ANEXO A).

4.1 Preparo dos espécimes

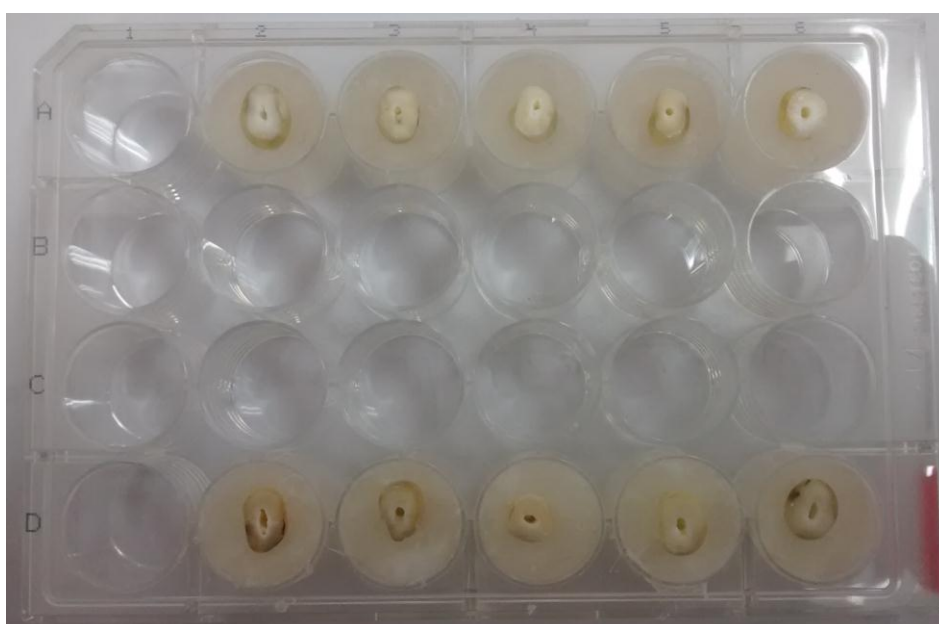
Foram selecionados 80 dentes unirradiculares humanos, que após a exodontia foram limpos e acondicionados em solução salina fisiológica até o momento de sua utilização. A seleção dos dentes foi feita baseada nas dimensões e similaridade, morfologia da raiz. As coroas foram seccionadas com disco de carborundum, para que se obtivesse a padronização do comprimento dos espécimes em $16 \pm 0,5$ mm. Foi realizada a exploração inicial dos canais radiculares com lima kerr #15 em toda extensão do dente. Em seguida, foi realizada a instrumentação com lima endodôntica recíproca R25 do sistema (VDW, Munich, Germany). Durante todo o processo de instrumentação recíproca, foi realizado o preparo do terço cervical, médio e apical, sendo que os canais foram irrigados com 3 ml de solução salina fisiológica a cada terço do canal.

Os espécimes foram vedados na região apical com resina fotopolimerizável Z-100 (3M ESPE, Dental Products, Saint Paul, USA), seguindo o protocolo de condicionamento com ácido fosfórico 37% (Vigodent SA Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), aplicação do adesivo Single Bond (3M ESPE, Dental Products, Saint Paul, USA) e aplicação da resina fotopolimerizável, que foi fotoativada por 40 s e em seguida as raízes foram impermeabilizadas externamente com uma camada de adesivo epóxi (Brascola, São Paulo, SP, Brasil), exceto a região da abertura cervical.

A distribuição dos dentes foi feita aleatoriamente em 8 placas de cultura de 24 poços (Costar, New York, NY, USA), com 10 dentes em cada e fixados com resina acrílica quimicamente ativada (Dencor Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo,

SP, Brasil) (Figura 1). As placas foram tampadas e embaladas. Todos os materiais, instrumentais e as placas utilizadas foram enviadas para esterilização por radiação gama com cobalto 60 (20 KGy por 6 h), realizada pela EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiação, Cotia, SP, Brasil), para neutralizar toxinas pré-existentes (Csako et al., 1983).

Figura 1 - Disposição dos espécimes após padronização



Legenda: Dentes dispostos na placa de cultura de células de 24 poços após padronização dos espécimes para facilitar o manuseio e instrumentação dos mesmos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Contaminação dos espécimes

Os espécimes foram contaminados utilizando-se os micro-organismos *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Foi realizada a verificação da pureza das cepas, sendo utilizados meios seletivos para crescimento de cada micro-organismo e também foi realizada a coloração de Gram e avaliação microscópica. Após esta verificação, os micro-organismos foram

semeados em placas de Petri contendo ágar infusão-cérebro-coração (BHI Agar) (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) para *E. faecalis* e *E. coli*. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h (*E. coli*) e 48 h (*E. faecalis*). A partir do crescimento nas placas, foram preparadas suspensões em solução salina fisiológica estéril e apirogênico (Segmenta, Ribeirão Preto, SP, Brasil) contendo 10^6 céls/mL que foram comprovadas pela leitura em espectrofotômetro (Figura 2). Em ambiente estéril, câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda. – Campinas, SP, Brasil), os canais radiculares foram contaminados com 10 µl da suspensão de *E. coli* e 10 µl de caldo BHI (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia). Na entrada dos canais foi colocada uma bolinha de algodão apirogênica embebida em caldo BHI. Os espécimes foram mantidos em estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em umidade relativa, por 7 dias, sendo que a cada 2 dias, foi adicionado caldo BHI no interior dos canais radiculares. Após 7 dias, foram adicionados aos canais radiculares 10 µl da suspensão de *E. faecalis* e 10 µl de caldo BHI. Na entrada dos canais foi colocada uma bolinha de algodão apirogênica embebida em caldo BHI. Os espécimes foram mantidos em estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, em umidade relativa, por 21 dias, sendo que a cada 2 dias, foi adicionado meio de cultura (caldo BHI) no interior dos canais radiculares até o preenchimento completo dos mesmos com o auxílio de seringas tipo insulina de 1 mL (Injex Indústrias Cirúrgicas Ltda., Ourinhos, SP, Brasil). Após 28 dias de incubação, foi realizada coleta de todos os espécimes para confirmação da contaminação (item 4.5) dos canais radiculares.

Figura 2 - Equipamento espectrofotômetro



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Preparo Biomecânico

Após a confirmação da contaminação todos os espécimes foram submetidos a técnica de instrumentação utilizando o Sistema Reciproc R40 (VDW, Munich, Germany), seguindo orientações do fabricante. Utilizou-se apenas uma lima do sistema reciprocante em cada espécime. Todos os dentes foram instrumentados com uma lima R40. A irrigação foi feita com hipoclorito de sódio 2,5%. Foi realizado preparo biomecânico utilizando a lima R40 nos terços cervical, médio e apical. Após preparo do terço cervical, o canal foi irrigado com 5 mL de NaOCl 2,5% em cada terço no momento do PBM (terço cervical, médio e apical) e 5 mL a cada 20 s da agitação ultrassônica (3 tempos de 20 s); para finalizar, o canal foi irrigado com 10 mL de NaOCl 2,5% totalizando 40 mL por canal radicular. Os canais que não foram agitados com ultrassom também foram irrigados com 40 mL de NaOCl 2,5% , sendo que no momento de agitação a solução era colocada e deixada no interior do canal o mesmo tempo dos grupos com agitação ultrassônica. Todos os espécimes foram tratados com EDTA (Biodinâmica, Ibiporã - Paraná – Brasil) por 3 min após o PBM e irrigados com 3 mL de solução salina fisiológica. Após PBM, os espécimes foram divididos em 8 grupos experimentais, de acordo com o método de limpeza final e MIC com UltraCal (Ultradent do Brasil Produtos Odontológicos Ltda, Indaiatuba, SP – Brasil). Os procedimentos experimentais foram realizados em fluxo laminar (Figura 3).

Figura 3 - Disposição dos materiais na câmara de fluxo laminar para instrumentação dos espécimes



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Divisão dos grupos experimentais

Os grupos foram divididos de acordo com as diferentes formas de tratamento como ilustra a Figura 4.

Grupo 1- PBM auxiliado pela agitação final com ultrassom, os canais das amostras foram preenchidos com UltraCal e agitada com ultrassom durante o último minuto, utilizando-se uma ponta de aço inoxidável E1-Irrisonic (Helse, Santa Rosa do Viterbo, Brasil) de 0,10 mm de diâmetro no comprimento de trabalho, com 10% da potência e por fim a abertura de acesso foi vedada e a MIC deixada agir por 7 dias.

Grupo 2 - PBM auxiliado pela agitação final com ultrassom, os canais das amostras foram preenchidos com UltraCal e agitada com ultrassom durante o último minuto, utilizando-se uma ponta de aço inoxidável E1-Irrisonic (Helse, Santa Rosa do Viterbo, Brasil) de 0,10 mm de diâmetro no comprimento de trabalho, com 10% da potência e por fim a abertura de acesso foi vedada e a MIC deixada agir por 14 dias.

Grupo 3 - PBM auxiliado pela agitação final com ultrassom durante o último minuto, utilizando-se uma ponta de aço inoxidável E1-Irrisonic (Helse, Santa Rosa do Viterbo, Brasil) de 0,10 mm de diâmetro no comprimento de trabalho, com 10% da potência, os canais das amostras foram preenchidos com UltraCal, e por fim a abertura de acesso foi vedada e a MIC deixada agir por 7 dias.

Grupo 4 - PBM auxiliado pela agitação final com ultrassom durante o último minuto, utilizando-se uma ponta de aço inoxidável E1-Irrisonic (Helse, Santa Rosa do Viterbo, Brasil) de 0,10 mm de diâmetro no comprimento de trabalho, com 10% da potência, os canais das amostras foram preenchidos com UltraCal, e por fim a abertura de acesso foi vedada e a MIC deixada agir por 14 dias.

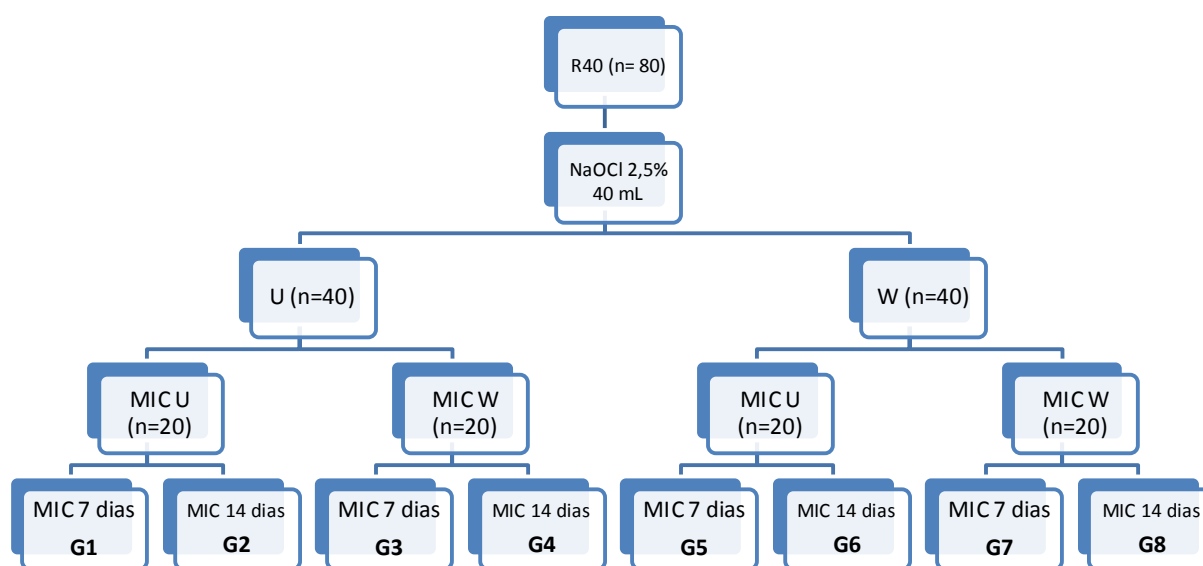
Grupo 5 - PBM convencional, os canais das amostras foram preenchidos com UltraCal e agitada com ultrassom durante o último minuto, utilizando-se uma ponta de aço inoxidável E1-Irrisonic (Helse, Santa Rosa do Viterbo, Brasil) de 0,10 mm de diâmetro no comprimento de trabalho, com 10% da potência e por fim a abertura de acesso foi vedada e a MIC deixada agir por 7 dias.

Grupo 6 - PBM convencional, os canais das amostras foram preenchidos com UltraCal e agitada com ultrassom durante o último minuto, utilizando-se uma ponta de aço inoxidável E1-Irrisonic (Helse, Santa Rosa do Viterbo, Brasil) de 0,10 mm de diâmetro no comprimento de trabalho, com 10% da potência e por fim a abertura de acesso foi vedada e a MIC deixada agir por 14 dias.

Grupo 7 - PBM convencional, os canais das amostras foram preenchidos com UltraCal, e por fim a abertura de acesso foi vedada e a MIC deixada agir por 7 dias.

Grupo 8 - PBM convencional, os canais das amostras foram preenchidos com UltraCal, e por fim a abertura de acesso foi vedada e a MIC deixada agir por 14 dias.

Figura 4 - Diagrama de distribuição dos grupos



Legenda: R40 – lima utilizada para preparo dos espécimes; n – número de espécimes; U – com agitação ultrassom; W – sem agitação ultrassom; HC – MIC com hidróxido de cálcio.

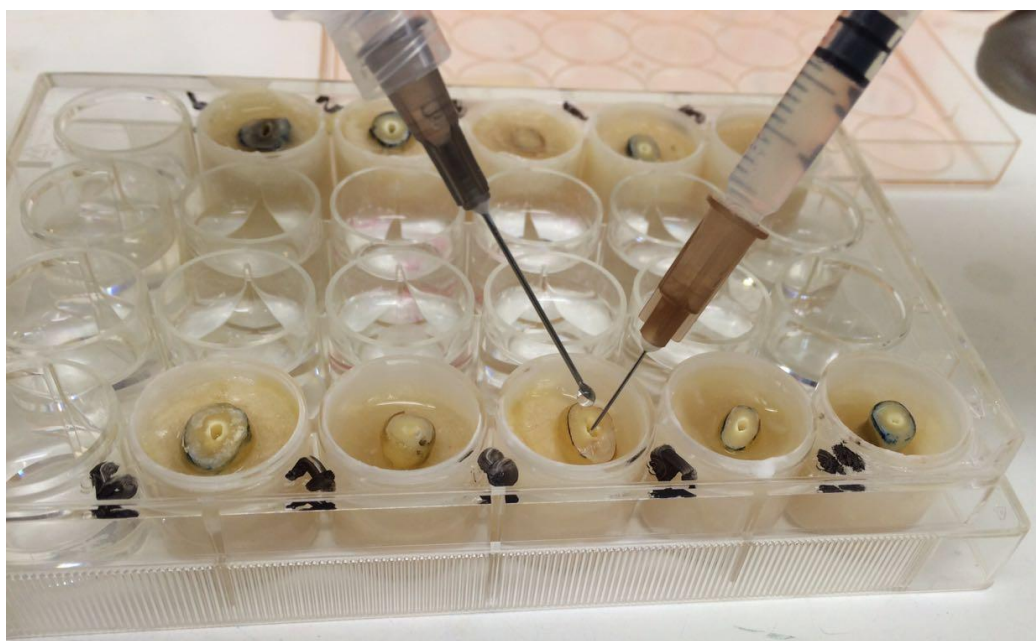
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Coletas do conteúdo do canal radicular

Todas as coletas dos canais radiculares, coleta de confirmação (1), coleta imediatamente após a instrumentação (2), coleta imediatamente após a aplicação do

EDTA 17% (3), coleta após 7 e 14 dias de MIC (4), foram realizadas da mesma forma: os canais foram preenchidos com solução salina fisiológica apirogênica com o auxílio de seringas de 1mL, esta solução foi agitada com auxílio da agulha e o conteúdo do canal radicular foi coletado com auxílio de outra seringa de 1 mL. Este procedimento foi realizado até completar a quantidade de 100 µl coletados do canal radicular (Figura 5), os quais foram transferidos para microtubos de centrifugação de 1,5 ml (tipo eppendorf) (Axygen, Union City, USA) contendo 900 µl de solução salina fisiológica apirogênico.

Figura 5 - Representação da coleta dos micro-organismos



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para todas as amostras coletadas, foram realizados testes para verificação da atividade microbiana e quantificação de LTA nos canais radiculares.

4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana (UFC/mL)

Para determinar a atividade antimicrobiana, foram realizadas diluições seriadas das amostras coletadas do canal radicular e alíquotas de 30 µl de cada amostra foi semeada (técnica da gota – 10 µl cada gota), em dois diferentes meios de cultura, seletivo para cada micro-organismo: ágar *Enterococcosel* (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD 21152, USA) para *E. faecalis* e ágar *MacConkey* (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) para *E. coli*. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 24 h, para determinação de UFC/ml. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) de *E. faecalis* e *E. coli* remanescentes no canal radicular.

4.7 Detecção e quantificação do ácido lipoteicóico

Para realizar a detecção e quantificação de ácido lipoteicóico (LTA), placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-LTA. As placas foram mantidas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS com 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS com 2 % de soro albumina bovina, BSA) por 1 h a temperatura ambiente. Após, foram lavadas com tampão de lavagem e receberam 100 µL das amostras coletadas dos canais radiculares e 100 µL dos padrões de LTA com concentrações conhecidas (curva-padrão). Os testes foram realizados em duplicata e as placas foram mantidas 2 h a temperatura ambiente. Após, as placas foram novamente lavadas e foram acrescentados 100µL de anticorpo anti-LTA. As placas foram mantidas por 1 h em temperatura ambiente. Após lavagem, foram acrescentados 100 µL de anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase. Após 1 h em temperatura ambiente, as placas foram lavadas e a reação foi revelada utilizando tetrametilbenzidina (TMB). Após, foram adicionados em cada poço da placa solução

stop (ácido sulfúrico 2N) (Figura 6) e as densidades ópticas (DO) foram lidas no leitor de microplacas (Biotek) com comprimento de onda de 450 nm (Figura 7).

Figura 6 - Reação revelada utilizando tetrametilbenzidina (TMB). Após, foram adicionados em cada poço da placa solução *stop* (ácido sulfúrico 2 N)



Legenda: Solução azul - Reação revelada utilizando tetrametilbenzidina (TMB). Solução amarela - Após, foram adicionados em cada poço da placa solução *stop* (ácido sulfúrico 2 N).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 - Leitor de microplacas (Biotek)



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.8 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn, com significância de 5%.

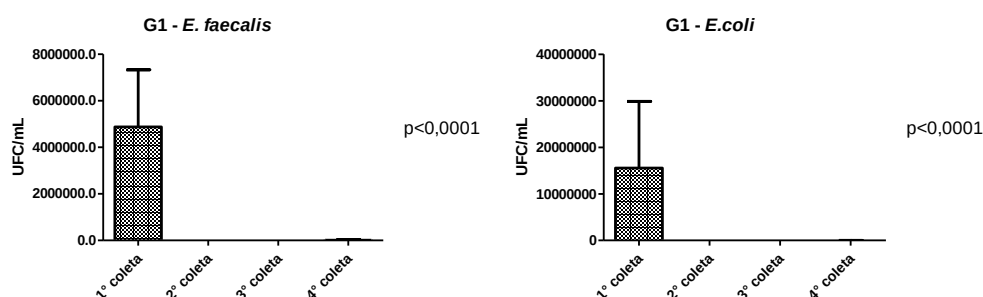
5 RESULTADO

5.1 Atividade Antimicrobiana (UFC/mL)

O crescimento microbiano foi verificado em 100% das amostras iniciais coletadas (1ª coleta), confirmando a presença de *E. faecalis* e *E. coli*, validando a metodologia proposta. As figuras 8 a 11 ilustram a média dos valores de UFC/mL nos diferentes grupos experimentais após coleta de confirmação (1ª coleta), após PBM (2ª coleta), após a remoção do EDTA (3ª coleta) e após o uso de MIC (4ª coleta).

Analisando as figuras 8, 9 e 10 (grupos G1, G2 e G3, respectivamente) é possível observar uma redução (UFC/mL) estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) de *E. faecalis* e *E. coli* da primeira coleta quando comparada com as demais coletas, evidenciando a efetividade do PBM realizado com sistema Reciproc e uso de NaOCl 2,5% como substância química auxiliar na eliminação de micro-organismos. No grupo G4 (Figura 11) o mesmo ocorreu para *E. faecalis*, porém para *E. coli* os níveis microbianos foram reduzidos gradativamente podendo ser observada sua completa eliminação após 14 dias da ação de MIC de Ca(OH)_2 .

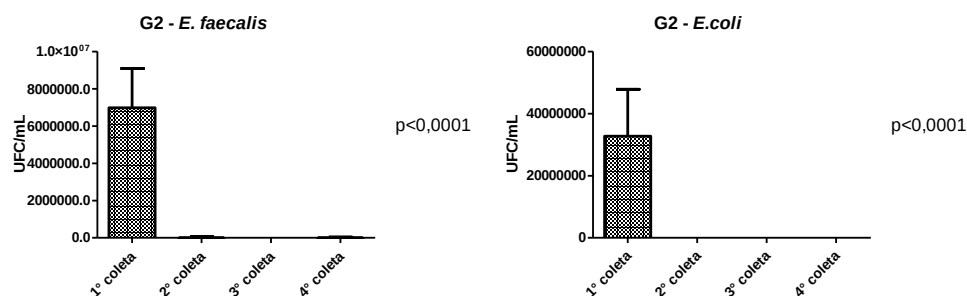
Figura 8 – Redução de *E. faecalis* e *E. coli* (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G1



Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC. G1 - PBM com agitação ultrassônica final, MIC por 7 dias com agitação ultrassônica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

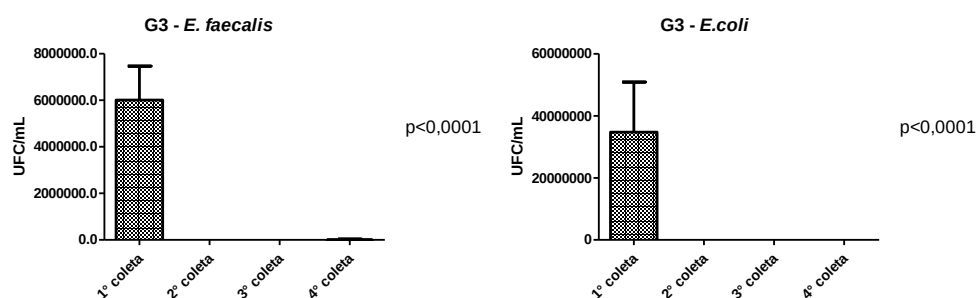
Figura 9 - Redução de *E. faecalis* e *E. coli* (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G2



Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC. G2 - PBM com agitação ultrassônica final, MIC por 14 dias com agitação ultrassônica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

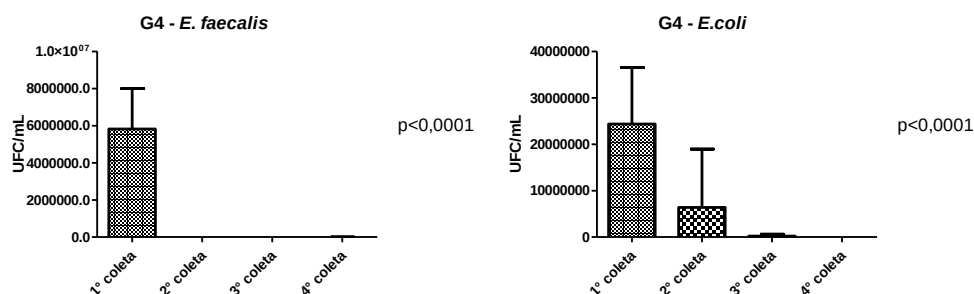
Figura 10 - Redução de *E. faecalis* e *E. coli* (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G3



Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC. G3 - PBM com agitação ultrassônica final, MIC por 7 dias sem agitação ultrassônica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 - Redução de *E. faecalis* e *E. coli* (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G4

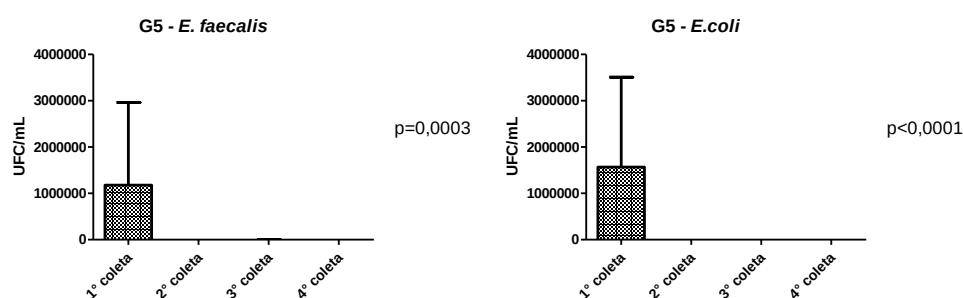


Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC. G4 - PBM com agitação ultrassônica final, MIC por 14 dias sem agitação ultrassônica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os grupos G5, G6, G7 e G8 (Figuras 12, 13, 14 e 15, respectivamente) demonstraram uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) de *E. faecalis* e *E. coli* da primeira para as demais coletas, sendo efetiva na eliminação de micro-organismos logo após o PBM. Vale ressaltar que nesses grupos não foi utilizada a agitação ultrassônica durante o PBM.

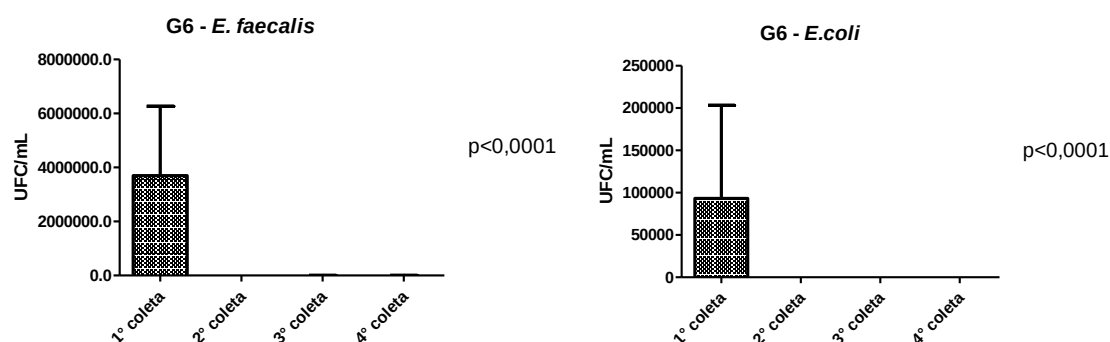
Figura 12 - Redução de *E. faecalis* e *E. coli* (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G5



Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC. G5 - PBM sem agitação ultrassônica final, MIC por 7 dias com agitação ultrassônica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

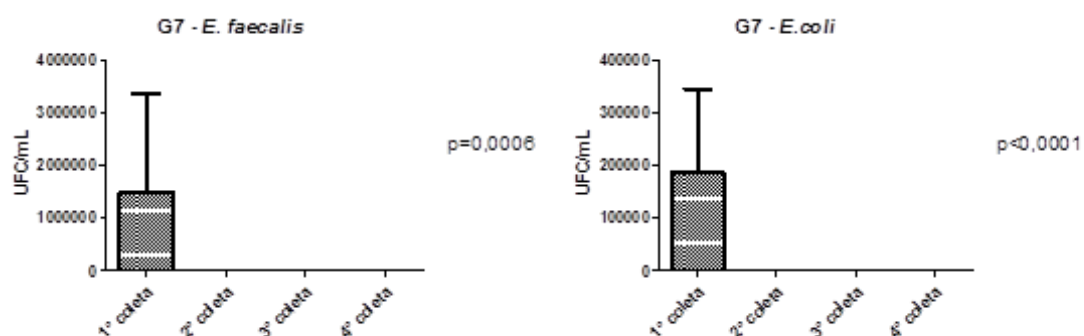
Figura 13 - Redução de *E. faecalis* e *E. coli* (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G6



Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC. G6 - PBM sem agitação ultrassônica final, MIC por 14 dias com agitação ultrassônica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

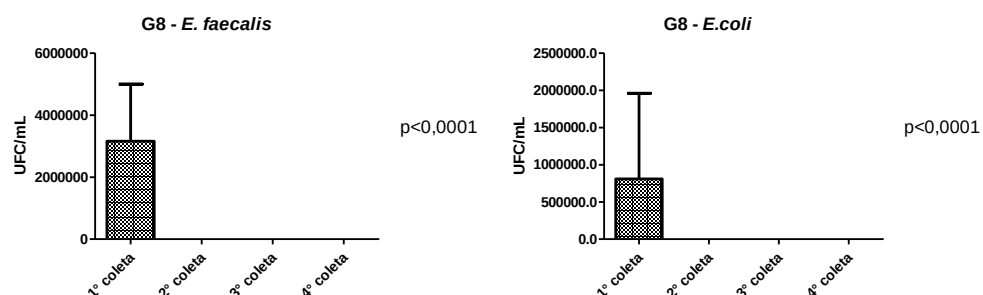
Figura 14 - Redução de *E. faecalis* e *E. coli* (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G7



Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC. G7 - PBM sem agitação ultrassônica final, MIC por 7 dias sem agitação ultrassônica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 - Redução de *E. faecalis* e *E. coli* (UFC/mL) com diferentes tempos de coleta, no G8



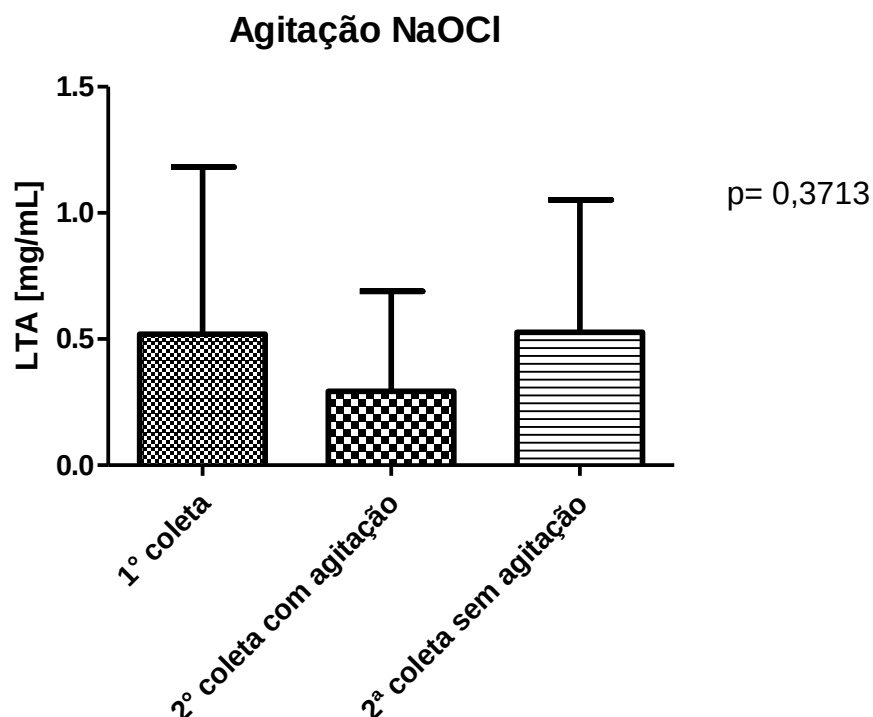
Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC. G8 - PBM sem agitação ultrassônica final, MIC por 14 dias sem agitação ultrassônica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Quantificação dos níveis de ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL)

Em relação a quantificação de ácido lipoteicóico (LTA), pôde-se notar que a variação entre os grupos referente a sua eliminação ou não durante cada coleta, não foi estatisticamente significativa em todos os grupos ($p > 0,05$) sendo o NaOCl 2,5% agitado ou não com ultrassom, como pode ser observado na figura 16.

Figura 16 – Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) comparando a coleta de confirmação (1ª coleta) (n=80) com a coleta logo após o PBM sob agitação (n=40) ou não do NaOCl 2,5% (n=40)



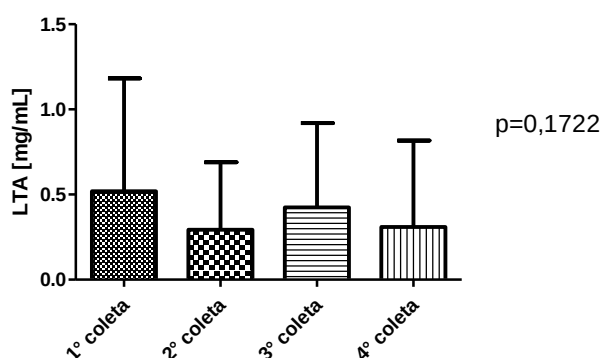
Fonte: Elaborado pelo autor.

Após o PBM todos os grupos receberam a MIC de Ca(OH)_2 , sendo que a variação nos níveis de LTA não foi estatisticamente significante, independente do protocolo empregado ($p > 0,05$).

Todos os gráficos ilustram a confirmação da contaminação em cada grupo (1ª coleta) e a quantificação após o PBM com e sem agitação ultrassônica e aplicação do EDTA.

A figura 17 ilustra pequena redução dos níveis de LTA após a utilização de 7 dias de MIC de Ca(OH)_2 sob agitação com ultrassom, não havendo diferença significativa entre as coletas no G1 ($p = 0,1722$).

Figura 17 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G1

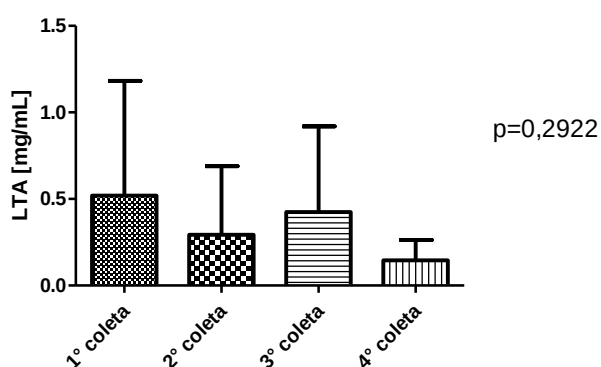


Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 18 representa o gráfico do G2, ilustrando a média de redução dos níveis de LTA no interior do SCR quando colocada a MIC sob agitação com ultrassom, por um período de 14 dias. Pode-se verificar que a diferença entre as coletas de G2 não foi significativa (p=0,2922).

Figura 18 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G2



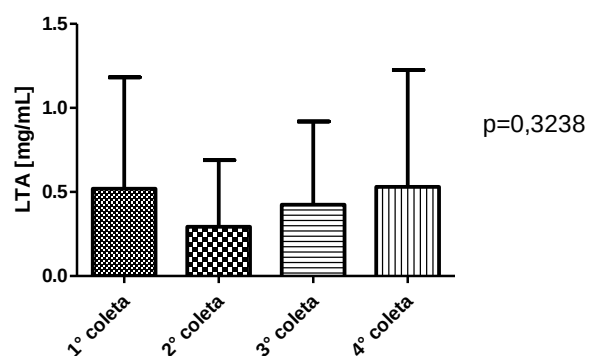
Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O gráfico representativo do G3 (Figura 19) ilustra o aumento dos níveis de LTA no interior do SCR quando colocada a MIC de Ca(OH)_2 sem agitação com

ultrassom, por período de 7 dias, porém sem diferença significativa entre as coletas ($p=0,3238$).

Figura 19 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G3

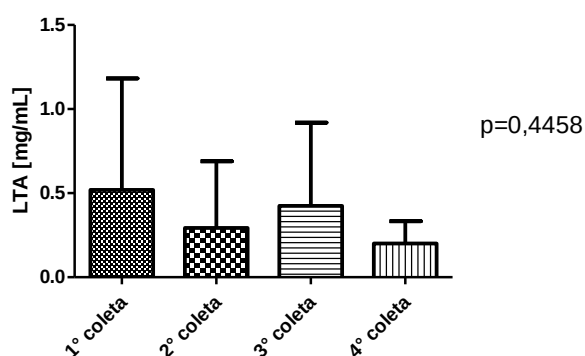


Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 20 ilustra a redução na quantidade de LTA no interior do SCR após a aplicação da MIC sem agitação com ultrassom, por período de 14 dias, no G4, não havendo diferença entre as coletas ($p=0,4458$).

Figura 20 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G4

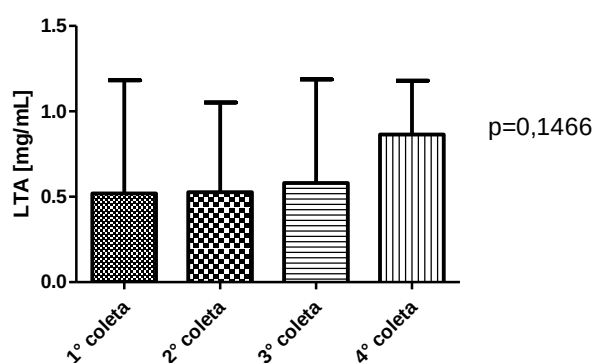


Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O gráfico representativo do G5 (Figura 21) ilustra o aumento na quantidade de LTA no SCR, sendo esta maior da que foi encontrada na coleta de confirmação quando colocada a MIC sob agitação com ultrassom, por período de 7 dias. No entanto, a diferença entre as coletas do G5 não foi significativa ($p=0,1466$).

Figura 21 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G5

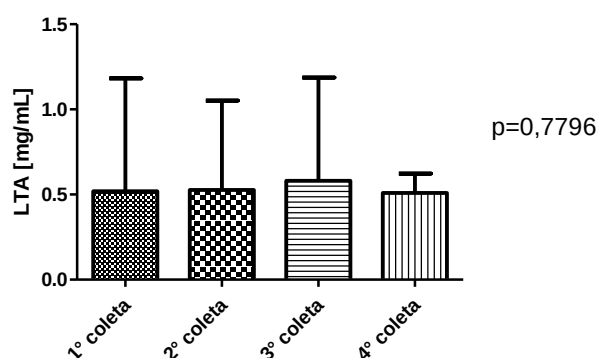


Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O gráfico representativo do G6 (Figura 22) ilustra os níveis de LTA no SCR que se manteve em mesmo nível mesmo quando colocada a MIC de Ca(OH)_2 sob agitação com ultrassom, por 14 dias. A diferença entre as coletas de G6 não foi significativa ($p=0,7796$).

Figura 22 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G6

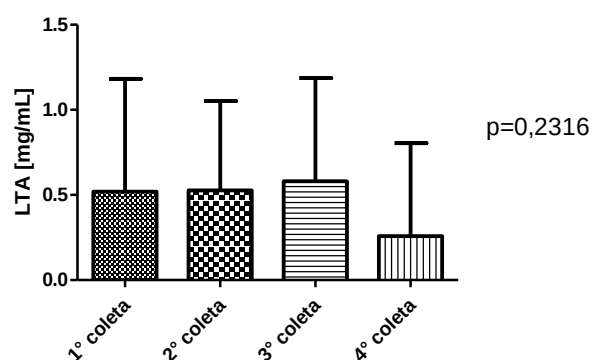


Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 23 ilustra os valores médios de redução dos níveis de LTA no SCR quando colocada a MIC sem agitação por 7 dias. A diferença entre as coletas de G7 não foi significativa (p=0,2316)

Figura 23 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) nos diferentes tempos de coleta, no G8



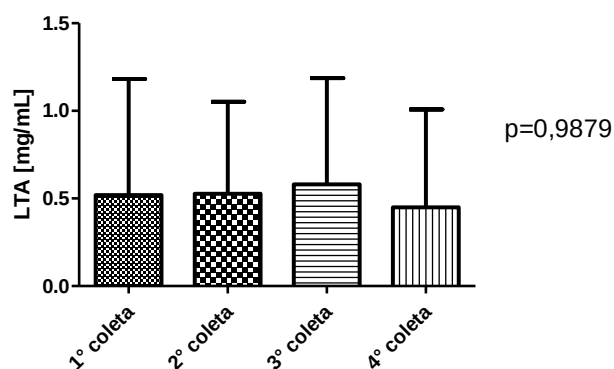
Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 24 evidencia a redução de ácido lipoteicóico do SCR que se manteve em um mesmo nível mesmo quando colocada a MIC de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sem agitação por

14 dias. Analisando o gráfico verifica-se que não houve diferença entre as coletas de G6 ($p=0,9879$).

Figura 24 - Quantificação do ácido lipoteicóico (LTA) (mg/mL) com diferentes tempos de coleta, no G8



Legenda: 1ª coleta – confirmação, 2ª coleta – após PBM, 3ª coleta – após uso de EDTA, 4ª coleta – após uso de MIC.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

6.1 Discussão do tema

Sabe-se que a etapa de preparo biomecânico com abundante irrigação do sistema de canais radiculares são essenciais para o sucesso do tratamento endodôntico. Com o passar dos anos, a busca por novas técnicas com objetivo de otimizar o tratamento na eliminação de micro-organismos e seus produtos, criando alternativas para potencializar a ação das substâncias químicas auxiliares tem sido realizadas (Azim et al., 2016).

Para maior eficácia, a substância química auxiliar deve entrar em contato com todas as paredes do canal radicular, sendo muito mais difícil quando utilizado somente seringas e pontas de irrigação convencionais (Villas-Bôas MH et al., 2011). Desta forma, o ultrassom tem sido utilizado no intuito de favorecer o contato da substância química auxiliar com uma maior área da dentina do canal, com intuito que a mesma penetre em profundidade nos túbulos dentinários e conseqüentemente trazendo uma maior eficiência da ação da solução (Gu et al., 2009).

A ativação ultrassônica da substância química auxiliar, como o NaOCl, tem sido muito utilizada nos estudos, funcionando como controle na comparação aos demais sistemas que empregam agitação mecânica (Plotino et al., 2016). Outro fator importante é que a melhora na eficiência da limpeza dos canais radiculares já é considerado um avanço, mesmo que o terço apical não seja completamente limpo, já está provado que muitos detritos que poderiam permanecer naquela região são removidos com a agitação ultrassônica (Paqué et al., 2011).

Para alcançar maior sucesso na terapia endodôntica, atingindo maior sanificação do SCR, além de um eficiente PBM, o uso de uma medicação intracanal (MIC) é um passo quase que obrigatório na terapia endodôntica e, neste aspecto, o medicamento mais utilizado tem sido a pasta de Ca(OH)_2 associado com diferentes veículos. O mecanismo de ação do Ca(OH)_2 dá-se por meio da alcalinização da dentina, portanto o medicamento necessita penetrar nos túbulos dentinários, pois quanto maior a profundidade de penetração, melhor será seu efeito (Estrela,

Holland, 2003). Uma das formas de tentar aumentar a penetração do medicamento na dentina é por meio da agitação ultrassônica do mesmo, que permite maior difusão da MIC nos túbulos dentinários, promovendo uma potencialização em seu efeito (Duarte et al., 2012).

Neste estudo, foi utilizada a agitação da substância química auxiliar (NaOCl 2,5%) para avaliar a possível potencialização de uma solução irrigadora já consagrada por suas propriedades (Pelczar et al, 1980; Zehnder, 2006) e também da MIC de Ca(OH)_2 amplamente utilizada contra micro-organismos nos SCR (Bystrom et al., 1985; Valera et al., 2001).

Mesmo após a duplicação ou morte da bactéria, são liberadas suas toxinas, com grande potencial para causar o insucesso do tratamento endodôntico. O ácido lipoteicóico encontra-se presente na parede celular de bactérias Gram-positivas, sendo um de seus principais fatores de virulência, uma vez que está envolvido na resposta inflamatória, síndrome séptica, formação de biofilme e adesão da bactéria ao dente (Fabretti et al., 2006; Baik et al., 2008; Lee et al., 2009). Devido a sua importância no quadro das afecções endodônticas, tornou-se fundamental o estudo de formas de neutralização dessa substância, visto que o sucesso do tratamento pode estar relacionado tanto a completa remoção de micro-organismos do sistema de canais radiculares como também da detoxificação de seus produtos.

6.2 Discussão da Metodologia

Nas pesquisas *in vitro* com dentes extraídos tem sido bastante comum a utilização de dentes bovinos (Nakamichi et al., 1983) e estes são morfológica e histologicamente similares aos dentes humanos. Outra vantagem é a grande facilidade de se obter dentes em matadouros, o que é um grande facilitador no momento de se realizar uma pesquisa (Reeves et al., 1995). Por outro lado, Arends et al., (1989) verificaram que a dentina bovina é mais porosa que a dentina humana. A permeabilidade dentinária está presente tanto na dentina humana quanto na bovina, sendo que esta última apresenta ainda túbulos dentinários mais largos. Apesar de ser difícil a utilização de dentes humanos em pesquisas *in vitro* devido à

obtenção dos espécimes e de sua padronização, o presente estudo utilizou os espécimes de dentes humanos por apresentarem dimensões reais dos túbulos dentinários, eliminando assim essa variável.

Nesta pesquisa foram usados dentes unirradiculares humanos, que tiveram suas coroas seccionadas e desprezadas e, somente a porção radicular, com o tamanho dos espécimes padronizados em $16 \pm 0,5$ mm foram utilizadas (Maekawa et al., 2013; Valera et al., 2014). Para padronização do diâmetro do canal radicular, importante para a inoculação e cultivo dos micro-organismos, foi utilizado instrumento R25 do sistema Reciproc e posteriormente os espécimes receberam selamento na região apical com resina fotopolimerizável, para impedir o extravasamento do conteúdo do interior do canal. Depois de padronizados, os espécimes foram dispostos em placas de 24 poços e fixados com resina acrílica quimicamente ativada para facilitar o manuseio no momento da instrumentação (Oliveira et al., 2007b). Todo material utilizado na pesquisa foi previamente esterilizado por radiação gama cobalto 60, pela Empresa Brasileira de Radiação (EMBRARAD), pois de acordo com Csako et al. (1983), a radiação é capaz de neutralizar pirógenos previamente a execução da metodologia.

No presente estudo foi utilizado *E. faecalis*, um micro-organismo Gram-positivo, frequentemente encontrado em canais radiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical (Pinheiro et al., 2003) e em casos de insucesso do tratamento endodôntico (Cardoso et al., 2016). Apesar de *E. coli* (bactéria Gram-negativa) não ser uma bactéria muito comumente encontrada no interior de canais radiculares com polpa necrosada, os estudos de Siqueira JF et al. (2001) e Geibel et al. (2005) identificaram sua presença nos canais de dentes com necrose pulpar e presença de lesões periapicais.

Nesta pesquisa, os canais foram contaminados com *E. faecalis* e *E. coli* por 28 dias e após, realizou-se o PBM (Oliveira et al., 2007; Maekawa et al., 2013; Valera et al., 2015). Para o PBM foi utilizado a solução de NaOCl 2,5% devido a sua comprovada ação antimicrobiana (Boff, 2010; Roças et al., 2016; Roldi et al., 2009), dissolução de tecido orgânico e ação clareadora (Pelczar, 1980, Zehnder et al., 2006). em uma quantidade total de 40 mL (Benítez et al., 2014) sendo esta dividida em 5 mL em cada terço no momento do PBM (terço cervical, médio e apical) e 5 mL a cada 20 s da agitação ultrassônica (3 tempos de 20 s); para finalizar, o canal foi

irrigado com 10 mL de NaOCl 2,5%. Os canais que não foram agitados com ultrassom também foram irrigados com 40 mL de NaOCl 2,5% , sendo que no momento de agitação a solução era colocada e deixada no interior do canal o mesmo tempo dos grupos com agitação ultrassônica. Essa quantidade de solução irrigadora foi utilizada segundo estudo já realizado (Benítez et al., 2014), pois a lima única do sistema Reciproc produz grande quantidade de raspas de dentina, e seu tempo de trabalho dentro do canal é menor fazendo-se necessário uma irrigação abundante.

O PBM é um fator de extrema importância para diminuição/eliminação de micro-organismos do SCR. Apesar de haver grande redução de micro-organismos com a irrigação/instrumentação adequada, a redução de toxinas proveniente de micro-organismos é bem menos expressiva, cerca de metade é reduzida quando se utiliza a instrumentação manual (Martinho, Gomes, 2008; Martinho et al., 2010) e a redução é quase que absoluta através da instrumentação com sistemas rotatórios de NiTi (Martinho et al., 2010). No presente estudo foi utilizada a instrumentação recíprocante com lima R40, pois este sistema apresenta vantagens como: facilidade de utilização, tempo de preparo e segurança com relação ao risco de fratura quando comparado com outros sistemas como WaveOne, Mtwo e ProTaper (Motti, 2012).

Ao realizar o PBM do canal radicular nesta pesquisa, foi verificada diminuição significativa de micro-organismos presentes. Esta redução deve-se à ação mecânica dos instrumentos e às ações física e química do NaOCl, que ao entrar em contato com matéria orgânica, ou seja, com a célula bacteriana, forma ácido hipocloroso, que libera cloro nascente, o qual se liga ao grupamento amina (NH) dos aminoácidos, formando cloraminas, interferindo no metabolismo celular e inibindo a função enzimática bacteriana a partir de uma oxidação irreversível dos grupos SH (sulfidril) de enzimas bacterianas essenciais (Haapasalo et al., 2014). Esta redução se deve à ação conjunta do PBM e da solução de NaOCl, uma vez que Bystrom et al. (1985) demonstraram que a instrumentação manual por si só pode reduzir o número de bactérias presentes em canais radiculares somente em 50% necessitando assim, estar associada com o uso de soluções irrigadoras, já Martinho e Gomes (2008) obtiveram diminuição de micro-organismos anaeróbios em todas as amostras, mas eliminação somente em 5/24 casos, obtendo valores de eliminação de 20%. Os resultados do presente estudo foram superiores aos citados acima.

Provavelmente, isto se deve ao uso do NaOCl associado à instrumentos reciprocantes. Os instrumentos Reciproc são eficientes na limpeza de canais radiculares, devido ao seu “design”, uma vez que suas arestas de corte facilitam a eliminação de detritos do interior dos canais radiculares, com isto, melhora a ação da solução irrigadora utilizada durante o PBM. A movimentação inerente a esse sistema consiste na oscilação entre 150° no sentido anti-horário e 30° no sentido horário, segundo o fabricante (Villas-Boas RC et al., 2013).

Com relação a medicação intracanal, o Ca(OH)_2 é o curativo de demora mais utilizado mundialmente. Além de todas as suas propriedades tais como potente ação antimicrobiana, neutralizadora do pH ácido e indutora de mineralização (Leonardo et al., 2002), o Ca(OH)_2 também apresenta ação sobre toxinas (Safavi, Nichols, 1994; Tanomaru et al., 2003). O mecanismo de ação do Ca(OH)_2 dá-se por meio da alcalinização da dentina, portanto o medicamento necessita penetrar nos túbulos dentinários, pois quanto maior a profundidade de penetração, melhor a limpeza (Estrela, Holland, 2003). Uma das formas de aumentar essa penetração do medicamento na dentina é por meio da agitação ultrassônica, que permite maior difusão do curativo de demora nos túbulos, promovendo uma melhor limpeza (Duarte et al., 2012).

O Ca(OH)_2 tem sido utilizado em várias situações clínicas e é mantido dentro do canal para diferentes períodos de tempo que variam de 7 (Kleier, Barr, 1991) a 14 dias (Valera et al., 2009) como medicação intracanal e de 6 a 24 meses para induzir a apicificação (Kleier, Barr, 1991). O presente estudo mostrou que não houve diferença entre o tempo de MIC na tentativa de eliminar micro-organismos e toxinas presentes no sistema de canais radiculares.

A agitação do NaOCl 2,5% no presente estudo foi realizada em 3 tempos de 20 s renovando a solução em cada intervalo, pois segundo Plotino et al. (2007) que estudou a ativação ultrassônica do NaOCl a partir de 30 s a 1 min, sendo 3 ciclos de 10-20 s (com renovação constante do irrigante), mostrou ser um tempo suficiente para obter um canal limpo ao término do PBM. De acordo com mesmo autor, o ultrassom mostrou ser menos eficaz para aumentar a atividade do EDTA, mas mesmo assim pode contribuir para uma melhora sobre a remoção da camada de esfregaço (Plotino et al., 2007).

Um estudo testando influência da agitação ultrassônica na atividade antimicrobiana e penetrabilidade de pastas de Ca(OH)_2 mostrou que a agitação ultrassônica das pastas de Ca(OH)_2 aumentou sua atividade antimicrobiana e possibilitou maior penetração intratubular, com preenchimento de túbulos dentinários (Arias, 2013). Em nosso estudo, a agitação ultrassônica da MIC intracanal foi testada no intuito de analisar a possível potencialização da redução microbiana e difusão da MIC no SCR e também sobre LTA.

6.3 Discussão dos Resultados

Os resultados da contagem de UFC/mL demonstraram redução estatisticamente significativa logo após o PBM em comparação com a coleta de confirmação (1ª coleta). A solução de NaOCl apresenta capacidade de dissolver tecidos orgânicos quando em contato durante um tempo suficiente para sua ação. A sua eficácia tem sido demonstrada dependendo de sua concentração, temperatura, pH da solução e condições em que a solução é armazenada (Beus et al., 2012; Cullen et al., 2015). Nesta pesquisa não verificamos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos que receberam agitação ou não pelo ultrassom, sendo ambos os tratamentos eficientes e mostrando ainda a eficiência do NaOCl no PBM. O ultrassom parece ter vindo então para auxiliar na limpeza de um modo geral, mas sozinho não mostra eficiência e sim quando associado a uma solução desinfetante. Portanto, quando se fala em redução de micro-organismos, pode-se notar que a eficiência é mais relacionada a concentração, quantidade e tempo da substância química auxiliar em contato com o SCR, do que propriamente a agitação ultrassônica (Roldi et al., 2009). Utilizamos o NaOCl 2,5%, que possui eficácia comprovada nesta concentração como pode ser verificado nas pesquisas (Boff, 2010; Roças et al., 2016; Roldi et al., 2009).

Nossos resultado discordam dos obtidos por Roldi et al., (2009) que em um estudo utilizando a agitação do NaOCl 2,5% ou não, observaram que a utilização do ultrassom associado com a irrigação de NaOCl 2,5% foi mais eficiente que somente a irrigação, sendo que durante todo o processo de PBM foi utilizado 10 mL de

solução irrigadora. No presente estudo, a irrigação durante o PBM foi realizada com 40 mL de NaOCl 2,5%, podendo ser a diferença entre o volume da solução irrigadora uma justificativa para a maior eficiência na eliminação dos micro-organismos mesmo quando não agitados com o ultrassom.

A agitação da MIC tem sido estudada para tentar potencializar sua eficiência. Assim o presente estudo testou grupos com e sem agitação da MIC e variou o tempo de ação no interior do canal. Arias (2013) testou a influência da agitação ultrassônica na atividade antimicrobiana e penetrabilidade de pastas de Ca(OH)_2 e concluiu que a agitação ultrassônica das pastas de Ca(OH)_2 aumentou sua atividade antimicrobiana e possibilitou maior penetração intratubular, com preenchimento de túbulos dentinários.

Os resultados do presente estudo não concordam com os obtidos por Arias (2013), pois demonstraram que a agitação ou não da MIC não influenciou na redução de micro-organismos e LTA, corroborando com os resultados de Almeida (2016) que avaliou o efeito do uso da MIC de Ca(OH)_2 associado à própolis a 10% seguida da agitação ultrassônica em reimplante tardio de dentes de rato e concluiu que o uso do curativo intracanal de Ca(OH)_2 associado à própolis a 10% seguido da agitação ultrassônica não se mostrou mais efetivo que o Ca(OH)_2 puro no processo de reparo do reimplante tardio de dentes de rato.

Assim, sabendo-se que LTA induz liberação de diferentes citocinas pró inflamatórias e mediadores químicos (Zorko, Jerala, 2008; Finney et al., 2012), faz-se necessário mais estudos para promover a completa neutralização do LTA.

7 CONCLUSÃO

Diante da metodologia empregada podemos concluir que:

- a) O PBM usando NaOCl 2,5% com ou sem ativação ultrassônica foi eficaz na eliminação de *E. coli* e *E. faecalis* do sistema de canais radiculares;
- b) Com relação a detoxificação do LTA, tanto a utilização do NaOCl 2,5% ativado ou não por ultrassom quanto o emprego da MIC com Ca(OH)_2 ativado ou não por ultrassom não foram eficientes ao ponto de remover ou diminuir significativamente os níveis de LTA do sistema de canais radiculares.

REFERÊNCIAS*

- Akçay M, Arslan H, Durmus N, Mese M, Capar ID. Dentinal tubule penetration of AH Plus, iRoot SP, MTA fillapex, and guttaflow bioseal root canal sealers after different final irrigation procedures: A confocal microscopic study. *Lasers Surg Med.* 2016 Jan;48(1):70-6. doi: 10.1002/lsm.22446. PubMed PMID: 26774730.
- Almeida MM. Avaliação do hidróxido de cálcio associado própole com agitação ultrassônica como curativo intracanal em reimplante dentário tardio [dissertação]. Araçatuba (SP): Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (Unesp); 2016.
- Andrukhov O, Ertlschweiger S, Moritz A, Bantleon HP, Rausch-Fan X. Different effects of *P. gingivalis* LPS and *E. coli* LPS on the expression of interleukin-6 in human gingival fibroblasts. *Acta Odontol Scand.* 2014;72(5):337-45. doi: 10.3109/00016357.2013.834535. PubMed PMID: 24255960.
- Arends J, Christoffersen J, Ruben J, Jongebloed WL. Remineralization of bovine dentine in vitro. *Caries Res.* 1989; 23(5):309-14. PubMed PMID: 2766315.
- Arias MP. Influência da agitação ultrassônica na ação antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio e própolis [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (USP); 2013.
- Ayranci LB, Arslan H, Akçay M, Capar ID, Gok T, Saygili G. Effectiveness of laser-assisted irrigation and passive ultrasonic irrigation techniques on smear layer removal in middle and apical thirds. *Scanning.* 2016 Mar;38(2):121-7. doi: 10.1002/sca.21247. PubMed PMID: 26183211.
- Azim AA, Aksel H, Zhuang T, Mashtare T, Babu JP, Huang GT. Efficacy of 4 Irrigation protocols in killing bacteria colonized in dentinal tubules examined by a novel confocal laser scanning microscope analysis. *J Endod.* 2016;42(6):928-34. doi: 10.1016/j.joen.2016.03.009. PubMed PMID: 27130334 PMCID: PMC4884135.
- Baik JE, Jang KS, Kang SS, Yun CH, Lee K, Kim BG, et al. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* through deacylation of the lipid moiety. *J Endod.* 2011;37(2):191-6. doi: 10.1016/j.joen.2010. PubMed PMID: 21238801.
- Baik JE, Ryu YH, Han JY, Im J, Kum KY, Yun CH, et al. Lipoteichoic acid partially contributes to the inflammatory responses to *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2008;34(8):975-82. doi: 10.1016/j.joen.2008.05.005. PubMed PMID: 18634930.
- Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of *enterococcus faecalis* isolates from teeth with failure of the endodontic treatment. *J Endod.* 2016a Jul;42(7):1022-8. doi: 10.1016/j.joen.2016.03.015. Epub 2016 May 21. PubMed PMID: 27221594.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of lipoteichoic acid contents and cultivable bacteria at the different phases of the endodontic retreatment. *J Endod*. 2016b Apr;42(4):552-6. doi: 10.1016/j.joen.2016.01.002.

Benítez SR, Guelfand CS, Jiménez MM, Egea JJS. Root-canal disinfection of immature teeth. *J Clin Exp Dent*. 2014;6(4):e357-63.

Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vainna ME, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J*. 2006;39:10-7. PubMed PMID: 16409323.

Beus C, Safavi K, Stratton J, Kaufman B. Comparison of the effect of two endodontic irrigation protocols on the elimination of bacteria from root canal system: a prospective, randomized clinical trial. *J Endod*. 2012;38(11):1479-83. doi: 10.1016/j.joen.2012.07.005. PubMed PMID: 23063221.

Boff TL. Análise histológica da capacidade de limpeza do terço apical de canais radiculares achatados com o uso passivo do ultrassom [monografia]. Passo Fundo (RS): Faculdade de Ingá – UNINGÁ. 2010.

Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol*. 1985 Oct;1(5):170-5. PubMed PMID: 3865763.

Cameron JA. The choice of irrigant during hand instrumentation and ultrasonic irrigation of the root canal: a scanning electron microscope study. *Aust Dent J*. 1995;40(2):85-90. PubMed PMID: 7786235.

Cardoso FG, Ferreira NS, Martinho FC, Nascimento GG, Manhães LR, Rocco MA, et al. Correlation between Volume of Apical Periodontitis Determined by Cone-beam Computed Tomography Analysis and Endotoxin Levels Found in Primary Root Canal Infection. *J Endod*. 2015;41(7):1015-9. doi: 10.1016/j.joen.2015.02.005. PubMed PMID: 25935504.

Cardoso FG, Chung A, Martinho FC, Camargo CH, Carvalho CA, Gomes BP, et al. Investigation of Bacterial Contents From Persistent Endodontic Infection and Evaluation of Their Inflammatory Potential. *Braz Dent J*. 2016;27:412-8. doi: 10.1590/0103-6440201600520. PubMed PMID: 27652703.

Chung A. Detecção de micro-organismos, quantificação de endotoxinas e ação in vivo do Zingiber officinale em dentes com necrose pulpar e lesão periapical [dissertação]. São José dos Campos (SP): Faculdade de Odontologia de São Jose dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

Clarkson RM, Podlich HM, Moule AJ. Influence of ethylenediaminetetraacetic acid on the active chlorine content of sodium hypochlorite solutions when mixed in various

proportions. *J Endod.* 2011;37:538-43. doi: 10.1016/j.joen.2011.01.018. PubMed PMID: 21419305.

Costa ED, de Souza-Filho FJ, Barbosa SV. Tissue reactions to a component of root canal system bacteria: lipoteichoic acid. *Braz Dent J.* 2003;14(2):95-8. PubMed PMID: 12964651.

Csako G, Elin RJ, Hochstein D, Tsai CH. Physical and biological properties of U.S. standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. *Infect Immun.* 1983 Jul;41(1):190-6. PubMed PMID: 6345389 PMCID: PMC264762.

Cullen JK, Wealleans JA, Kirkpatrick TC, Yaccino JM. The effect of 8.25% sodium hypochlorite on dental pulp dissolution and dentin flexural strength and modulus. *J Endod.* 2015;41(6):920-4. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.028. PubMed PMID: 25791075.

Cwikla SJ, Bélanger M, Giguère S, Progulske-Fox A, Vertucci FJ. Dentinal tubule disinfection using three calcium hydroxide formulations. *J Endod.* 2005;31(1):50-2. PubMed PMID: 15614007.

Dakin HD. On the use of certain antiseptic substances in the treatment of infected wounds. *Br Med J.* 1915;2(2852):318-20. PubMed PMID: 20767784.

de Oliveira LD, Carvalho CA, Valera MC, Koga-Ito CY, Jorge AO. Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules. *Braz Oral Res.* 2005;19(1):5-10. PubMed PMID: 16229349.

de Souza CA, Teles RP, Souto R, Chaves MA, Colombo AP. Endodontic therapy associate with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiologic evaluation by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. *J Endod.* 2005;31:79–83. PubMed PMID: 15671813.

de Souza LF, Jardim FR, Sauter IP, de Souza MM, Bernard EA. High glucose increases RAW 264.7 macrophages activation by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *Clin Chim Acta.* 2008 ;398(1-2):130-3. doi: 10.1016/j.cca.2008.09.007. PubMed PMID: 18824162.

Duarte MA, Balan NV, Zeferino MA, Vivan RR, Moraes CAH, Tanomaru Filho M, Ordinola-Zapata R, Moraes IG. Effect of ultrasonic activation on pH and calcium released by calcium hydroxide pastes in simulated external root resorption. *J Endod.* 2012;38:834-7. doi: 10.1016/j.joen.2012.03.005. PubMed PMID: 22595121.

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. PubMed PMID: 7012264.

Endo MS. Identificação de micro-organismos e quantificação de endotoxinas em canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical

[dissertação]. Campinas (SP): Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); 2011.

Endo MS, Signoretti FG, Kitayama VS, Marinho, AC; Martinho, FCanato; Gomes, BP. Culture and molecular detection of from patients with failure endodontic treatment and antimicrobial susceptibility of clinical isolates. *Enterococcus faecalis*. Braz Dent Sci. 2014;17(3):83-91.

Estrela C, Holland R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. J Appl Oral Sci. 2003;11:269-82. PubMed PMID: 21394401.

Fabretti F, Theilacker C, Baldassarri L, Kaczynski Z, Kropec A, Holst O, et al. Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. Infect Immun. 2006;74(7):4164-71. PubMed PMID: 16790791.

Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Möller AJ. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. Scand J Dent Res. 1982;90(2):134-44. PubMed PMID: 6951255.

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

Finney SJ, Leaver SK, Evans TW, Burke-Gaffney A. Differences in lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced cytokine/chemokine expression. Intensive Care Med. 2012;38(2):324-32.

Geibel MA, Schu B, Callaway AS, Gleissner C, Willershausen B. Polymerase chain reaction-based simultaneous detection of selected bacterial species associated with closed periapical lesions. Eur J Med Res. 2005 Aug;10(8):333-8. PubMed PMID: 16131474.

Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. Lancet Infect Dis. 2002;2(3):171-9. PubMed PMID: 11944187.

Gomes BP, Jacinto RC, Montagner F, Sousa EL, Ferraz CC.. Analysis of the antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from endodontic infections in Brazil during a period of nine years. J Endod. 2011;37:1058–62. doi: 10.1016/j.joen.2011.05.015, PubMed PMID: 21763894.

Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Molecular analysis of Filifactoralocis, Tannerella forsythia, and Treponema denticola associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. J Endod. 2006a;32(10):937-40. PubMed PMID: 16982268.

Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, et al. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent*. 2009;37(1):76-81. doi: 10.1016/j.jdent.2008.09.009. PubMed PMID: 18995944.

Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006b;102(2):247-53. PubMed PMID: 16876070.

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

Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br Dent J*. 2014 Mar;216(6):299-303.

Hahn CL, Liewehr FR. Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. *J Endod*. 2007;33(3):213-9. PubMed PMID: 17320699.

Han SH, Kim JH, Seo HS, Martin MH, Chung GH, Michalek SM, et al. Lipoteichoic acid-induced nitric oxide production depends on the activation of platelet-activating factor receptor and Jak2. *J Immunol*. 2006;176(1):573-9. PubMed PMID: 16365452.

Handal T, Caugant DA, Olsen I, Sunde PT. Bacterial diversity in persistent periapical lesions on root-filled teeth. *J Oral Microbiol*. 2009 May 21;1. doi: 10.3402/jom.v1i0.1946. PubMed PMID: 21523213.

Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza Filho FB. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. *Int Endod J*. 2006;39(1):62-70. PMID: 16409330.

Jiang LM, Lak B, Eijsvogels LM, Wesselink P, van der Sluis LW. Comparison of the cleaning efficacy of different final irrigation techniques. *J Endod*. 2012;38(6):838-41. doi: 10.1016/j.joen.2012.03.002. PubMed PMID: 22595122.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965 Sep;20:340-9. PubMed PMID: 14342926.

Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(5):308-20. PubMed PMID: 15470268.

Keles A, Kamalak A, Keskin C, Akçay M, Uzun İ. The efficacy of laser, ultrasound and self-adjustable file in removing smear layer debris from oval root canals following retreatment: a scanning electron microscopy study. *Aust Endod J*. 2016. doi: 10.1111/aej.12145. PubMed PMID: 26786709.

Kishen A. Advanced therapeutic options for endodontic biofilms. *Endod Topics*. 2010;22:99-123. doi: 10.1111/j.1601-1546.2012.00284.x.

Kleier DJ, Barr ES. A study of endodontically apexified teeth. *Endod Dent Traumatol*. 1991;7(3):112-7. PubMed PMID: 1685990.

Layton G, Wu W, Selvaganapathy PR, Friedman S, Kishen A. Fluid dynamics and biofilm removal generated by syringe-delivered and 2 ultrasonic-assisted irrigation methods: a novel experimental approach. *J Endod*. 2015;41(6):884-9. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.027. PubMed PMID: 25749254.

Lee JK, Baik JE, Yun CH, Lee K, Han SH, Lee W, et al. Chlorhexidine gluconate attenuates the ability of lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* to stimulate toll-like receptor 2. *J Endod*. 2009;35(2):212-5. doi: 10.1016/j.joen.2008.10.018. PubMed PMID: 19166775.

Leonardo MR, Silveira FF, Silva LA, Tanomaru Filho M, Utrilla LS. Calcium hydroxide root canal dressing. Histopathological evaluation of periapical repair at different time periods. *Braz Dent J*. 2002;13(1):17-22. PubMed PMID: 11870956.

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

Lima GA, Aguiar CM, Câmara AC, Alves LC, Santos FA, Nascimento AE. Comparison of smear layer removal using the Nd:YAG Laser, Ultrasound, ProTaper Universal System, and CanalBrush methods: An in vitro study. *J Endod*. 2015;41:400-4. doi: 10.1016/j.joen.2014.11.004. PubMed PMID: 25600669.

Lima SM, Sousa MG, Freire Mde S, de Almeida JA, Cantuária AP, Silva TA, et al. Immune Response Profile against Persistent Endodontic Pathogens *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* In Vitro. *J Endod*. 2015 Jul;41(7):1061-5. doi: 10.1016/j.joen.2015.02.016. PubMed PMID: 25845887.

Luz LB. Análise do pH e ação antimicrobiana de soluções e géis de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações [trabalho de conclusão de curso]. Porto Alegre (RS): Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2013.

Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CA, Camargo CH, Jorge AO. Effect of *Zingiber officinale* and propolis on microorganisms and endotoxins in root canals. *J Appl Oral Sci*. 2013 Jan-Feb;21(1):25-31. PubMed PMID: 23559108.

Martinho FC, Chiesa WM, Marinho AC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, et al. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. *J Endod*. 2010;36(11):1766-9. doi: 10.1016/j.joen.2010.08.019. PubMed PMID: 20951284.

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. doi: 10.1016/j.joen.2007.11.015. PubMed PMID: 18291273.

Medeiros AW, Pereira RI, Oliveira DV, Martins PD, d'Azevedo PA, Van der Sand S, et al. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. Braz J Microbiol. 2014;45:327-32. doi: 10.1590/S1517-83822014005000031. PubMed PMID: 24948952 PMCID: PMC4059318.

Mehdipour O, Kleier DJ, Averbach RE. Anatomy of sodium hypochlorite accidents. Compend Contin Educ Dent. 2007;28(10):544-6, 548, 550. PubMed PMID: 18018389.

Mills CD. M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. Crit Rev Immunol. 2012;32(6):463-88. PubMed PMID: 23428224.

Mohammadi Z. Endotoxin in endodontic infections: a review. J Calif Dent Assoc. 2011 Mar;39(3):152-5, 158-61. PubMed PMID: 21563594.

Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. Int Dent J. 2008;58(6):329-41. PubMed PMID: 19145794.

Morrison DC, Ryan JL. Endotoxins and disease mechanisms. Annu Rev Med. 1987;38:417-32. PubMed PMID: 3555304.

Nakamichi I, Iwaku M, Fusayama T. Bovine teeth as possible substitutes in the adhesion test. J Dent Res. 1983;62(10):1076-81. PubMed PMID: 6352757.

Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. J Conserv Dent. 2010;13(4):233-9. doi: 10.4103/0972-0707.73386. PubMed PMID: 21217951.

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

Oliveira LD, Carvalho CAT, Jorge AOC. Micro-organismos causadores de infecções pulpares e peripicais. In: Jorge AOC. Microbiologia bucal. 3. ed. São Paulo: Santos; 2007a. p. 127-42 (Cap.9).

Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, Koga-Ito CA, Valera MC. In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007b;104:135-42. doi: 10.1016/j.tripleo.2006.11.037. PubMed PMID: 17376712.

Oliveira LD, Carvalho CA, Carvalho AS, Alves Jde S, Valera MC, Jorge AO. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. J Endod. 2012 Aug;38(8):1053-7. doi: 10.1016/j.joen.2012.04.015. PubMed PMID: 22794204.

Paqué F, Boessler C, Zehnder M. Accumulated hard tissue debris levels in mesial roots of mandibular molars after sequential irrigation steps. *Int Endod J*. 2011;44(2):148-53. doi: 10.1111/j.1365-2591.2010.01823.x. PubMed PMID: 21083577.

Pelczar M, Reid R, Chan EC. *Microbiologia*. 2. ed. São Paulo: McGraw-Hill Ltda; 1980.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol*. 2003 Apr;18(2):100-3. PubMed PMID: 12654099.

Plotino G, Cortese T, Grande NM, Leonardi DP, Di Giorgio G, Testarelli L, et al. New Technologies to Improve Root Canal Disinfection. *Braz Dent J*. 2016 Feb;27(1):3-8. doi: 10.1590/0103-6440201600726. PubMed PMID: 27007337.

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

Reeves GW, Fitchie JG, Hembree Jr JH, Puckett AD. Microleakage of new dentin bonding systems using human and bovine teeth. *Oper Dent*. 1995;20(6):230-5. PubMed PMID: 8710704.

Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am*. 1992 Aug;267(2):54-61. PubMed PMID: 1641625.

Rôças IN, Provenzano JC, Neves MA, Siqueira JF. Disinfecting effects of rotary instrumentation with either 2.5% sodium hypochlorite or 2% chlorhexidine as the main irrigant: a randomized clinical study. *J Endod*. 2016;42(6):943-7. doi: 10.1016/j.joen.2016.03.019. PMID: 27142579.

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

Rogers JE, Coatney DD, Rossa C, Bronson P, Krieder JM, Giannobile WV, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2007;78(3):550-8. doi: 10.1902/jop.2007.060321. PMID: PMC2683373.

Roldi A, Gagno AS, Barroso J, Intra JBG, Intra TJA, Souza RP, et al. Avaliação do hipoclorito de sódio associado ou não ao uso do ultrassom sobre a permeabilidade dentinária. *Rev Bras Pesqui Saúde*. 2009;11(1):11-5.

Rossi-Fedele G, Doğramaci EJ, Guastalli AR, Steier L, de Figueiredo JA. Antagonistic interactions between sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, and citric acid. *J Endod*. 2012;38(4):426-31. doi: 10.1016/j.joen.2012.01.006. PubMed PMID: 22414823.

Ryu YH, Baik JE, Yang JS, Kang SS, Im J, Yun CH, et al. Differential immunostimulatory effects of Gram-positive bacteria due to their lipoteichoic acids. *Int Immunopharmacol*. 2009;9(1):127-33. doi: 10.1016/j.intimp.2008.10.014. PubMed PMID: 19013542.

Saber SI-D, El-Hady SA. Development of an intracanal mature *Enterococcus faecalis* biofilm and its susceptibility to some antimicrobial intracanal medications; an in vitro study. *Eur J Dent*. 2012;6(1):43-50. PubMed PMID: 22229006.

Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J Endod*. 1994;20(3):127-9. PubMed PMID: 7996084.

Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod*. 1975;1(1):19-21. PubMed PMID: 1061764.

Schonfeld SE, Greening AB, Glick DH, Frank AL, Simon JH, Herles SM. Endotoxic activity in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1982;53(1):82-7. PubMed PMID: 6948257.

Seltzer S, Farber PA. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994;78(5):634-45. PubMed PMID: 7838473.

Shafer WG, Hine MK, Levy BM. *Tratado de Patologia Bucal*. Rio de Janeiro: Interamericana; 1985.

Siqueira JF, Rôças IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J*. 2007;18(4):267-80. PubMed PMID: 18278296.

Siqueira JF, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*. 2008;34(11):1291-301. doi: 10.1016/j.joen.2008.07.028. PubMed PMID: 18928835.

Siqueira JF. Strategies to treat infected root canals. *J Calif Dent Assoc*. 2001;29(12):825-37. PubMed PMID: 11813396.

Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J*. 2001;34:1–10. PubMed PMID: 11307374.

Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J*. 1997;30(2):91-5. PubMed PMID: 10332242.

Socransky SS, Haffajee AD. Peridontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005;38(1):135–87 doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x. PMCID: PMC4529887.

Stanley HR, Pameijer CH. Pulp capping with a new visible-light-curing calcium hydroxide composition (Prisma VLC Dycal). *Oper Dent*. 1985;10(4):156-63. PubMed PMID: 3868762.

Su SC, Hua KF, Lee H, Chao LK, Tan SK, Yang SF, et al. LTA and LPS mediated activation of protein kinases in the regulation of inflammatory cytokines expression in macrophages. *Clin Chim Acta*. 2006;374(1-2):106-15. PubMed PMID: 16899235.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85(1):86-93. PubMed PMID: 1494447.

Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol*. 1992;7(5):257-62. PubMed PMID: 1494447.

Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. [dissertação]. Umet, Sweden: University of Umet; 1976.

Tanomaru JM, 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 Nov;36(11):733-9. PubMed PMID: 14641436.

Teixeira-Salum TB, Rodrigues DB, Gervásio AM, Souza CJ, Rodrigues V Jr, Loyola AM.. Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. *J Oral Pathol Med*. 2010 Mar;39(3):250-6. doi: 10.1111/j.1600-0714.2009.00863.x. PubMed PMID: 20102461.

Tian Y, Zhang X, Zhang K, Song Z, Wang R, Huang S, et al. Effect of *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid on apoptosis in human osteoblast-like cells. *J Endod*. 2013;39:632–7. doi: 10.1016/j.joen.2012. PubMed PMID: 23611381.

Torabinejad M, Walton RE. Endodontics: principles and practice. 4. ed., St. Louis: Mosby Elsevier; 2009.

Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod*. 1981;7(1):17-21. PubMed PMID: 6938618.

Valera MC, de Moraes Rego J, Jorge AO. Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on *Candida albicans* in root canals. *J Endod*. 2001;27(6):401-3. PubMed PMID: 11487135.

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

Valera MC, Silva KC, Maekawa LE, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Camargo CH, et al. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. *J Appl Oral Sci.* 2009;17(6):555-9. PubMed PMID: 20027425.

Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(3):379-414. PubMed PMID: 12857774.

Vera J, Siqueira JF, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B, et al. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod.* 2012;38(8):1040-52. doi: 10.1016/j.joen.2012.04.010. PubMed PMID: 22794203.

Villas-Bôas MH, Bernardineli N, Cavenago BC, Marciano M, Del Carpio-Perochena A, de Moraes IG, et al. Microcomputed tomography study of the internal anatomy of mesial root canals of mandibular molars. *J Endod.* 2011;37:1682–6. doi: 10.1016/j.joen.2011.08.001. PubMed PMID: 22099905.

Vilas-Boas RC, Alcalde MP, Guimarães BM, Zapata RO, Bueno CR, Duarte MAH. RECIPROC: a comparison between reciprocating and rotational kinematics in curved canals. *ROBRAC.* 2013;22(63):164-8.

Vogel DY, Glim JE, Stavenhagen AW, Breur M, Heijnen P, Amor S, et al. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology.* 2014 Sep;219(9):695-703. doi: 10.1016/j.imbio.2014.05.002. PubMed PMID: 24916404.

Walker A. A definitive and dependable therapy for pulpless teeth. *J Am Dent Assoc.* 1936;23(8):1418-25.

Wang CS, Arnold RR, Trope M, Teixeira FB. Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacteria. *J Endod.* 2007;33(11):1283-9. PubMed PMID: 17963947.

Wang JE, Dahle MK, McDonald M, Foster SJ, Aasen AO, Thiemermann C. Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. *Shock.* 2003;20(5):402-14. PubMed PMID: 14560103.

Wicken AJ, Knox KW. Lipoteichoic acids: a new class of bacterial antigen. *Science.* 1975;187(4182):1161-7. PubMed PMID: 46620.

Wong DT, Cheung GS. Extension of bactericidal effect of sodium hypochlorite into dentinal tubules. *J Endod.* 2014;40(6):825-9. doi: 10.1016/j.joen.2013.09.045. PubMed PMID: 24862710.

Xavier ACC, Martinho FC, Chung A, Oliveira LD, Jorge AOC, Valera MC, et al. One-visit versus two-visit root canal treatment: effectiveness in the removal of endotoxins

and cultivable bacteria. J Endod. 2013; Aug;39(8)959-64. doi: 10.1016/j.joen.2013.04.027. PubMed PMID: 23880258.

Xavier AC. Detecção de micro-organismos, quantificação de endotoxinas e avaliação in vivo do extrato glicólico de própolis em dentes com necrose pulpar e lesão periapical [dissertação]. São José dos Campos (SP): Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista - UNESP; 2011.

Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod. 2006;32:389-98. PubMed PMID: 16631834.

Zhao L, Chen J, Cheng L, Wang X, Du J, Wang F, et al. Effects of *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid on receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin expression in periodontal ligament fibroblasts. Int Endod J. 2013;47:163–72. doi: 10.1111/iej.12127. PubMed PMID: 23710898.

Zorko M, Jerala R. Alexidine and chlorhexidine bind to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid and prevent cell activation by antibiotics. J Antimicrob Chemother. 2008;62(4):730-7.

ANEXO A —Certificado do Comitê de Ética

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

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AÇÃO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO 3% E MEDICAÇÃO INTRACANAL AGITADOS COM ULTRASSOM SOBRE MICRORGANISMOS E SUAS TOXINAS EM CANAIS RADICULARES

Pesquisador: CLÁUDIA LUÍSA RIBEIRO FERREIRA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 53561916.6.0000.0077

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.504.995

Apresentação do Projeto:

TRATA-SE DE UM PROJETO QUE VISA AVALIAR A AÇÃO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO 3% E MEDICAÇÃO INTRACANAL AGITADOS COM ULTRASSOM SOBRE MICRORGANISMOS E SUAS TOXINAS EM CANAIS RADICULARES

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo será analisar a eficácia do Hipoclorito de sódio (NaOCl) 3% e medicação intra-canal com hidróxido de cálcio agitados com ultrassom, sobre *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* e se a agitação final é efetiva sobre endotoxinas de *Escherichia coli*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em relação aos benefícios indicados, não há correção a ser realizada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador responsável informou a origem dos 80 elementos dentários que serão utilizados na pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado o TERMO DE CESSÃO dos elementos dentários, assinado pelo responsável pela cessão dos dentes.

Recomendações:

Adequar o cronograma da pesquisa.

A PESQUISADORA DEVERÁ ATENTAR PARA O ENVIO DE RELATÓRIO SEMESTRAL NA FORMA DE NOTIFICAÇÃO, CASO NÃO O FAÇA, FICARÁ IMPEDIDA DE NOVA AVALIAÇÃO JUNTO AO CEP, ATÉ PERDURAR A PENDÊNCIA

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

ND

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer do relator

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_620440.pdf	30/03/2016 11:57:09		Aceito
Outros	termo_de_doacao_um.pdf	30/03/2016 11:56:43	CLAUDIA LUISA RIBEIRO FERREIRA	Aceito
Outros	termo_de_doacao_tres.pdf	30/03/2016 11:56:14	CLAUDIA LUISA RIBEIRO FERREIRA	Aceito
Outros	termo_de_doacao_dois.pdf	30/03/2016 11:55:48	CLAUDIA LUISA RIBEIRO FERREIRA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	16/02/2016 09:18:05	CLAUDIA LUISA RIBEIRO FERREIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhado.docx	20/01/2016 10:47:22	CLAUDIA LUISA RIBEIRO FERREIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

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