



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

FELIPE PAIVA MACHADO

**INFECÇÕES ENDODÔNTICAS PRIMÁRIA X SECUNDÁRIA:
perfil microbiano, níveis de endotoxinas e ácido lipoteicóico,
sinais e sintomas**

FELIPE PAIVA MACHADO

**INFECÇÕES ENDODÔNTICAS PRIMÁRIA X SECUNDÁRIA: perfil microbiano,
níveis de endotoxinas e ácido lipoteicóico, sinais e sintomas**

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

Área: Endodontia. Linha de pesquisa: Estudos Clínicos e Laboratoriais de Materiais e Técnicas Endodônticas (Endodontia).

Orientadora: Profa. Tit. Dra. Marcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2019]. 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).

Machado, Felipe Paiva

Infecções endodônticas primária x secundária: perfil microbiano, níveis de endotoxinas e ácido lipoteicóico, sinais e sintomas / Felipe Paiva Machado. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.
87 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, 2018.
Orientadora: Marcia Carneiro Valera.

1. Periodontite periapical. 2. Microbiota. 3. Endotoxinas. 4. Ensaio de imunoabsorção enzimática. 5. Hibridização de ácido nucleico. I. Valera, Marcia Carneiro, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

Universidade de São Paulo

Faculdade de Odontologia de Bauru (USP)

Campus de Bauru

São José dos Campos, 14 de dezembro de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico esta formação primeiramente a Deus, pois devo a Ele cada passo que dou e conquista que alcanço, pois sempre sei que está ao meu lado, guiando-me e orientando-me.

À minha mãe, que tanto me ajuda em tudo que pode e muito além. Pelo seu amor incondicional e por sempre acreditar em mim, por incentivar e dar forças onde quer que eu esteja, não me sinto sozinho, pois também sei que ela está rezando e cuidando de mim.

Ao meu pai, que sempre ajuda com seu apoio, orientações e disposição a fazer tudo que pode, a qualquer hora e lugar. Por possibilitar com seu auxílio tudo que tenho me proposto a fazer. Como é bonito o orgulho que tem a cada passo que dou.

À minha irmã e ao meu cunhado, por estarem sempre comigo. À minha irmã por todo seu amor e ao meu cunhado, que se tornou um irmão. Vocês que me deram um dos maiores presentes, minha sobrinha e afilhada Bianca, que tanto amo.

A vocês, minha família, dedico mais esta nossa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera, por ter acreditado em mim ao me aprovar na sua equipe durante essa caminhada de aprendizado e crescimento pessoal e profissional que foi o mestrado. Por todos seus ensinamentos, desde a graduação, no meu primeiro contato com a Endodontia, até aprofundamentos clínicos, pedagógicos, pessoais e profissionais compartilhando suas experiências e conhecimentos, incentivando sempre a ir além, buscar ser melhor e crescer cada vez mais, valorizando e ensinando o que é ser um mestre e o valor de sempre ter a ciência como base.

Agradeço ao professor Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho que sempre esteve presente durante todo o Mestrado, tanto nos créditos quanto nas clínicas, destacando-se o CETRADE, no qual sempre me auxiliou. Fico feliz por ter sido minha banca no Exame Geral de Qualificação e agora estar novamente na minha defesa, contribuindo para a minha formação e o meu trabalho, acompanhando-me em mais este momento.

Agradeço a toda equipe da especialização em Endodontia da FUNBEO – FOB – USP, que me recebeu com muito carinho e companheirismo, compartilhando seus conhecimentos e sendo fundamental para ampliar meus saberes na Endodontia. Em especial, à professora Dra. Flaviana Bombarda de Andrade, que foi minha orientadora durante a especialização, sempre compartilhando suas histórias, experiências e conhecimentos durante as aulas e clínicas com dedicação, acolhimento e amizade. Foi uma época especial de crescimento pessoal e profissional, na qual conheci excelentes professores e amigos de turma que recordarei com felicidade. Estou muito feliz e grato por estar presente na minha defesa de mestrado, colaborando mais uma vez na minha formação.

Aos professores dos créditos e do departamento de Odontologia Restauradora, em especial aos professores da Endodontia.

Agradeço à professora Flávia pelo convívio e ensinamentos e auxílio nas metodologias das pesquisas realizadas.

A todos os colegas do mestrado e doutorado, amigos que fiz, tanto da área de Endodontia, quanto de Dentística, compartilhando e apoiando em muitos momentos desta jornada. Aos que ingressaram comigo, em especial à Thaís, à Laís, ao Ricardo e à Bruna. À Cassia pela amizade e ensinamentos durante todo o mestrado, inclusive na metodologia clínica e laboratorial que me ensinou e compartilhou o que pode, sendo fundamental para a realização deste projeto, sempre disposta a ajudar em tudo. Ao Esteban e à Bruna que fizeram parte da pesquisa clínica, estando sempre presentes e pela colaboração mútua, em um aprendizado em conjunto. À Rayana pela amizade, por ter compartilhado seus conhecimentos e pela ajuda fundamental nesta pesquisa. À Daiana pela disposição e boa vontade em nos ajudar sempre que precisamos e sua colaboração para a realização do *Checkerboard*.

À professora Luana que contribuiu com suas opiniões e estudos no Exame Geral de Qualificação. À Izilvânia da Universidade de Guarulhos que auxiliou e ensinou em relação à realização do *Checkerboard*. Ao professor Rocco, no auxílio da volumetria das lesões. À professora Luciane pela disponibilidade em sempre ajudar, pelo estágio na disciplina de Terapêutica e a ela e ao Felipe pelo auxílio na realização do teste de LTA. Aos professores Sérgio da Radiologia e Mauro da Periodontia e a toda equipe da Propedêutica, em especial à professora Janete; à triagem, em especial à Marcia e às técnicas Fernanda e Josiana pela contribuição na triagem e agendamentos dos pacientes.

Aos pacientes, fundamentais na pesquisa e que bem receberam e colaboraram com nosso atendimento e intervenção e às alunas de iniciação científica Karina, Daniele, Karollyne, Daniela e Beatriz pela colaboração no projeto.

Aos apoios do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES/Brasil, pela bolsa durante o mestrado, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processos n. 2015/05397-1 e n. 2018/01703-9) pelo auxílio à minha orientadora viabilizando esta trajetória.

Enfim a todos que se envolveram e torceram por mim direta ou indiretamente no percurso do curso de mestrado e na realização da minha dissertação, em especial aos meus familiares, às minhas amigas e as novas que surgiram.

Muito obrigado!

"A sabedoria começa na reflexão". Sócrates

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Relação da microbiota das infecções endodônticas primária e secundária com sinais e sintomas	15
2.2 Endotoxinas	18
2.3 Ácido lipoteicóico.....	21
2.4 Radiografias periapicais x Tomografias computadorizadas de feixe cônico na destruição óssea periapical	23
3 PROPOSIÇÃO	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Seleção de paciente	29
4.2 Seleção dos casos e análise de sinais e sintomas clínicos	30
4.2.1 Infecção endodôntica primária.....	30
4.2.2 Infecção endodôntica secundária.....	31
4.2.3 Análise de sinais e sintomas clínicos.....	31
4.3 Intervenção odontológica.....	32
4.4 Coletas do canal radicular	33
4.5 Carga microbiana (UFC/mL)	34
4.6 Análise por <i>Checkerboard</i>	37
4.6.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento	37
4.6.2 Isolamento do DNA e preparo das sondas.....	38
4.6.3 <i>Checkerboard DNA –DNA hybridization</i>	40
4.7 Quantificação de Endotoxinas (EU/mL).....	42
4.8 Detecção e quantificação de ácido lipoteicóico (ELISA)	44
4.9 Análise da volumetria da destruição óssea periapical (mm ³).....	45
4.10 Análise estatística	49
5 RESULTADO	50
5.1 Cultura microbiológica.....	50
5.2 <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	50

5.3 Quantificação dos níveis dos fatores de virulência – LPS e LTA	54
5.4 Análise por Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico: Volume da lesão periapical.....	55
5.5 Associação de endotoxinas e ácido lipoteicóico com sinais e sintomas clínicos e volume da lesão periapical em dentes com infecções endodônticas primária e secundária	55
5.6 Associação de micro-organismos com sinais e sintomas clínicos e o volume da lesão periapical em dentes com infecções endodônticas primária e secundária.....	58
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS.....	67
APÊNDICES.....	76
ANEXO.....	84

Machado FP. Infecções endodônticas primária x secundária: perfil microbiano, níveis de endotoxinas e ácido lipoteicoico, sinais e sintomas [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

Esta pesquisa clínica teve como objetivo comparar a carga e composição microbiana bem como as concentrações de LPS e LTA encontradas na infecção endodôntica primária (IEP) e na infecção endodôntica secundária (IES). Além disso, a correlação desses achados com características clínicas e tomográficas também foram investigadas. Sessenta dentes de pacientes com IEP (31) e IES (29) foram submetidos à avaliação clínica e tomográfica, seguido do tratamento endodôntico ou retratamento. Amostras foram coletadas de cada canal radicular utilizando cones de papel. Logo após a abertura coronária (IEP) ou após a desobturação dos canais (IES) o conteúdo coletado foi submetido à técnica de cultura microbiológica para determinar a carga microbiana de bactérias anaeróbias e ao método *Checkerboard DNA-DNA hybridization* para investigação de espécies bacterianas presentes. O teste de Lisado de Amebócito de Limulus e o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática foram utilizados para quantificar os níveis de LPS e LTA. Os dados obtidos foram correlacionados com os achados clínicos e tomográficos. Maiores quantidades de bactérias cultiváveis e de LPS foram encontradas na IEP ($p < 0,05$). Não houve diferença nos níveis de LTA entre IEP e IES ($p > 0,05$). A mediana de espécies por canal radicular encontrada na IEP foi de 9 espécies e na IES foi de 22 ($p < 0,05$). As espécies bacterianas mais prevalentes detectadas na IEP foram *P. gingivalis* (14/31) e *S. intermedius* (14/31). Na IES, as espécies mais prevalentes foram *P. gingivalis* (21/29) e *C. rectus* (20/29). LPS foi correlacionado positivamente com um maior volume da lesão periapical ($p < 0,05$). Níveis de LTA não foram relacionados a sinais e sintomas ou ao volume da lesão periapical ($p > 0,05$). Concluiu-se que dentes com IEP tiveram maiores quantidades de carga microbiana e de LPS do que os dentes com IES. Uma maior quantidade de LPS foi correlacionada positivamente com um maior volume de destruição óssea periapical. Uma ampla interação de espécies bacterianas específicas resultou em diferentes características clínicas.

Palavras-chave: Periodontite periapical. Microbiota. Endotoxinas. Ensaio de imunoabsorção enzimática. Hibridização de ácido nucleico.

Machado FP. Primary x secondary endodontic infections: microbial profile, endotoxins and lipoteichoic acid levels, signs and symptoms [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

*This clinical research aimed to compare the microbial load and composition as well as the LPS and LTA concentrations found in Primary Endodontic Infection (PEI) and Secondary Endodontic Infection (SEI). In addition, the correlation of these findings with clinical and tomographic features was also investigated. Sixty patients' teeth with PEI (31) and SEI (29) were submitted to clinical and tomographic assessment, followed by endodontic treatment or retreatment. Samples were taken from each root canal using paper points. After the coronary opening (PEI) or after the removal of root filling material (SEI), the collected samples were submitted to the microbiological culture technique to determine the microbial load of anaerobic bacteria and to the Checkerboard DNA-DNA hybridization method for investigation of present bacterial species. The *Limulus* amebocyte lysate assay and enzyme-linked immunosorbent assay were used to quantify LPS and LTA levels. The data obtained were correlated with clinical and tomographic findings. A higher number of cultivable bacteria and LPS was found in PEI ($p < 0.05$). There was no difference in LTA levels between PEI and SEI ($p > 0.05$). The median number of species per root canal found in PEI was 9 and 22 in SEI ($p < 0.05$). The most prevalent bacterial species detected in PEI were *P. gingivalis* (14/31) and *S. intermedius* (14/31). In SEI, the most prevalent species were *P. gingivalis* (21/29) and *C. rectus* (20/29). LPS was positively correlated with a larger periapical lesion volume ($P < 0.05$). LTA levels were not related to signs and symptoms or periapical lesion volume ($p > 0.05$). It was concluded teeth with PEI had higher contents of microbial load and LPS than teeth with SEI. However, a more diverse microbiota was found in SEI than that of PEI. Higher content of LPS was positively correlated with larger periapical bone destruction. A widely interaction of specific microbial species resulted in different clinical features.*

Keywords: *Periapical periodontitis. Microbiota. Endotoxins. Enzyme-linked Immunosorbent assay. Nucleic acid hybridization.*

1 INTRODUÇÃO

As infecções endodônticas são compostas por micro-organismos que se proliferam e se perpetuam nos sistemas de canais radiculares, como consequência de necrose pulpar, decorrente de traumatismo do elemento dental, presença de lesões cariosas ou restaurações defeituosas (Kirkevang et al., 2007). Os micro-organismos e seus produtos, a exemplo dos lipopolissacarídeos e o ácido lipoteicóico, representam importante papel no estabelecimento e desenvolvimento da lesão periapical (Takehashi et al., 1965), sendo, portanto, de grande importância conhecer seus efeitos no organismo. Sendo assim, o tratamento endodôntico tem como objetivo a eliminação dos micro-organismos e seus produtos causadores da resposta inflamatória periapical.

A periodontite apical é uma doença inflamatória que afeta os tecidos adjacentes ao ápice radicular como consequência de uma infecção presente no sistema de canais radiculares (Montagner et al., 2010; Martinho et al., 2014). A infecção endodôntica primária tem caráter polimicrobiano, com presença de micro-organismos aeróbios e anaeróbios Gram-positivos e Gram-negativos (Gomes et al., 1996; Rôças et al., 2003, 2010; Siqueira et al., 2003; Montagner et al., 2010). Esta infecção é inicialmente causada por micro-organismos que colonizam o tecido pulpar necrosado, sendo que a microbiota envolvida pode variar de acordo com o tempo de infecção (Siqueira et al., 2010).

As bactérias Gram-negativas, durante sua morte ou multiplicação, liberam produtos, os lipopolissacarídeos (LPS), presentes na membrana externa das mesmas, sendo que sua liberação causa efeitos biológicos como a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Hong et al., 2004; Tang et al., 2011), as quais levam à reação inflamatória e reabsorção óssea periapical (Yamasaki et al., 1992). Os altos níveis de LPS estão associados com o desenvolvimento de dor espontânea (Horiba et al., 1991; Khabbaz et al., 2001; Jacinto et al., 2005; Cardoso et al., 2015), dor à palpação (Jacinto et al., 2005) e dor à percussão (Gomes et al., 2009).

Com o intuito de eliminar os micro-organismos e seus produtos, o tratamento endodôntico é muito importante durante todas as suas etapas. Estas incluem desde a remoção de tecido cariado e restaurações extensas, até a eliminação bacteriana

pela irrigação e instrumentação dos canais radiculares e aplicação de medicação intracanal, seguida do preenchimento hermético do canal radicular por materiais obturadores e da realização do procedimento restaurador (Mohamed et al., 2017), desempenhando papel fundamental.

Entretanto, as condições patológicas podem permanecer mesmo após a conclusão do tratamento endodôntico, havendo a necessidade da realização de uma reintervenção (Carrote, 2005; Eliyas et al., 2014). Isso se deve a possíveis falhas na desinfecção do sistema de canais radiculares durante o tratamento endodôntico ou falhas técnicas de instrumentação e obturação incompleta do canal radicular deixando espaços na região apical, favorecendo a permanência de restos necróticos e bactérias no sistema de canais radiculares (Dahlén, Möller, 1992) ou ainda sua recontaminação pela ausência de um correto selamento coronário (Peciulienė et al., 2006; Estrela et al., 2008a).

Estudos mostram que a microbiota da infecção endodôntica secundária difere da encontrada na infecção endodôntica primária, apresentando reduzida diversidade, dada à predominância de espécies anaeróbias facultativas Gram-positivas (Siqueira, 2001; Pinheiro et al., 2003; Adib et al., 2004; Gomes et al., 2004), como *Enterococcus faecalis*, podendo inclusive ocorrer casos de monoinfecção (Hancock et al., 2001; Rôças et al., 2004). *E. faecalis* é considerado um dos micro-organismos mais prevalentes na infecção endodôntica secundária, atingindo frequências de até 90% dos casos (Molander et al., 1998; Pinheiro et al., 2003; Rôças et al., 2004). Além disso, é nove vezes mais comum em canais tratados do que não tratados (Rôças et al., 2004), o que sugere que pode ser inibido por outros membros da comunidade microbiana mista comumente encontrados em infecções primárias, e que condições ambientais menos propícias em um canal tratado não impedem sua sobrevivência (Siqueira et al., 2010).

Como produto de *E. faecalis* e de outras bactérias Gram-positivas, o ácido lipoteicóico (LTA) é um importante fator de virulência, participando do desenvolvimento e permanência da patologia periapical (Ginsburg, 2002; Costa et al., 2003). Estudos sobre o LTA (Knox, 1973; Hausmann et al., 1975; Hummell et al., 1985; Keller et al., 1992) demonstraram alterações nos tecidos, como a reabsorção óssea (Hausmann et al., 1975), a ativação das vias do sistema complemento (Loos et al., 1986; Hummell et al., 1985) e liberação de citocinas pró-inflamatórias;

regulação de angiogênese; liberação de hidrolases, proteases e das espécies reativas de oxigênio de neutrófilos e macrófagos; além da regulação, recrutamento e ativação de neutrófilos (Ryu et al., 2009).

A diminuição da densidade óssea causada pelos produtos bacterianos decorrentes da infecção endodôntica é identificada no exame radiográfico como uma área radiolúcida ao redor do ápice radicular (Bender, 1997). Entretanto, estudos confirmaram que a radiografia periapical é limitada ao se detectar a radiolucência periapical (Bender, 1997; Paula-Silva et al., 2009), uma vez que há sobreposição de tecidos e baixa eficácia do método ao se avaliar a profundidade de uma lesão periapical (Stavropoulos, Wenzel, 2007; Low et al., 2008; Bornstein et al., 2011; Tsai et al., 2012). Desta forma, a reconstrução da imagem em três dimensões se tornou possível e atualmente tem sido utilizada na endodontia, através do advento da tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC).

A TCFC é capaz de fornecer representações tridimensionais de alta qualidade e precisão dos elementos ósseos do esqueleto maxilofacial. Os sistemas de TCFC disponíveis fornecem pequenas imagens de campo de visão em baixa dose com resolução espacial suficiente para aplicações em diagnóstico endodôntico, orientação de tratamento e avaliação pós-tratamento. A TCFC beneficia a endodontia, tornando possível demonstrar características anatômicas que as imagens intraorais, panorâmicas e cefalométricas não são capazes de fornecer, sendo capaz de avaliar no sentido vestibulo-lingual a real destruição óssea. Além disso, devido à reconstrução dos dados da TCFC ser realizada utilizando um computador, os dados podem ser reorientados em suas verdadeiras relações espaciais (Scarfe et al., 2009), sendo que estudos, como de Cardoso et al. (2015), já têm utilizado a TCFC para avaliar a presença e o volume da lesão periapical, correlacionando este volume com presença de micro-organismos e seus produtos.

Levando em consideração o tema abordado, há na literatura maior número de trabalhos que avaliam a infecção endodôntica em relação à carga microbiana, à quantificação de LPS e sinais e sintomas (Gomes et al., 2004; Blome et al., 2008; Gomes et al., 2012; Tennert et al., 2013; Leite et al., 2015; Lysakowska et al., 2016; Pandey et al., 2016; Keskin et al., 2017). Porém, pouco se tem avaliado os níveis de LTA, importante fator de virulência de bactérias Gram-positivas. Sabe-se ainda que as infecções endodônticas primária e secundária diferem entre si quanto à

microbiota predominante, podendo levar a variações nos níveis dos subprodutos dos micro-organismos presentes.

Entretanto, até o presente momento, tais análises não foram relacionadas em conjunto com os níveis de LTA e o volume inicial das lesões periapicais a fim de criar uma comparação de todos estes fatores (carga microbiana, identificação microbiológica de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, níveis de endotoxinas e LTA, sinais e sintomas e volume da lesão periapical) em um único estudo clínico para um conhecimento mais abrangente e correlacionado. Sendo assim, faz-se necessário um estudo mais aprofundado sobre o tema, trazendo uma significativa contribuição para a área de endodontia, uma vez que para melhorar e/ou buscar melhores estratégias de tratamento, é necessário compreender plenamente o perfil microbiológico dos diferentes tipos de infecção endodôntica, bem como sua patogenicidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Relação da microbiota das infecções endodônticas primária e secundária com sinais e sintomas

Sinais e sintomas têm sido associados à presença de espécies microbianas em infecções primárias e secundárias. Gomes et al. (2004) investigaram a microbiota de 60 canais radiculares com infecções primárias (41) e secundárias (19) e a associação de espécies presentes com sinais e sintomas endodônticos específicos. Técnicas anaeróbicas estritas foram usadas para diluição seriada, plaqueamento, incubação e identificação. Foram encontradas 56 espécies bacterianas. Os anaeróbios mais freqüentemente isolados foram: *Peptostreptococcus micros* (35%), *Fusobacterium necrophorum* (23,3%), *Fusobacterium nucleatum* (11,7%), *Prevotella intermedia / nigrescens* (16,7%), *Porphyromonas gingivalis* (6,7%) e *Porphyromonas endodontalis* (5%). Verificou-se que a microbiota do canal radicular de dentes não tratados com periodontite apical era mista, compreendendo micro-organismos Gram-negativos e Gram-positivos e principalmente anaeróbios, geralmente contendo mais de 3 espécies por canal. Por outro lado, as bactérias anaeróbias facultativas e Gram-positivas predominaram em canais com tratamento endodôntico fracassado, que abrigaram 1-2 espécies por canal. Foram encontradas relações sugeridas entre anaeróbios, especialmente Gram-negativos, e a presença ou história de dor, sensibilidade à percussão e edema. Foram encontradas associações entre: a) dor e *P. micros*, *P. intermedia/nigrescens* e *Eubacterium spp.*; b) história de dor e *P. micros*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium spp.*; c) sensibilidade à percussão e *Porphyromonas spp.*, *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium spp.*; d) edema e *Peptostreptococcus spp.*, *Porphyromonas* e *Enterococcus spp.*; e) canais úmidos e *Porphyromonas* e *Fusobacterium spp.*; f) exsudato purulento e *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium spp.*; g) tratamento endodôntico anterior e *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus spp.*, *P. micros*, *F. Necrophorum*. Estas

descobertas indicam potenciais interações complexas de espécies, resultando em quadros clínicos característicos que não podem ser alcançados por espécies individuais. Eles também indicam que a microbiota de canais com infecção endodôntica primária difere em número e em espécies dos canais com infecção secundária usando a técnica de cultura.

Blome et al. (2008) avaliaram amostras de canais radiculares quanto à presença e número de espécies previamente selecionadas, bem como quanto à carga bacteriana total em dentes com periodontite apical crônica, utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real. Quarenta pacientes adultos com lesão periapical documentada radiograficamente foram incluídos, sendo 20 com infecção primária e 20 com secundária. Após a remoção do tecido pulpar necrótico ou da obturação, foi obtida uma primeira amostra bacteriana. Após o preparo biomecânico (PBM) do canal radicular, uma segunda amostra foi retirada e uma terceira amostra foi obtida após 14 dias de curativo intracanal com hidróxido de cálcio. A análise por PCR em tempo real permitiu quantificar as contagens bacterianas totais e nove espécies selecionadas. Os canais radiculares com infecções primárias abrigavam significativamente mais bactérias do que os dentes com infecções secundárias. A contagem bacteriana total média no grupo de retratamento foi de $2,1 \times 10^6$ e foi significativamente reduzida após preparo do canal radicular e curativo intracanal. O valor inicial correspondente para infecções primárias foi: $4,6 \times 10^7$. Os números das bactérias selecionadas e sua frequência de detecção também foram significativamente reduzidos. Os canais radiculares com infecções primárias continham uma carga bacteriana maior. Tanto para a infecção primária quanto para a secundária, o PBM do canal radicular reduziu as contagens bacterianas em pelo menos 95%.

Tennert et al. (2014) analisaram a microbiota de infecções endodônticas primárias e secundárias/persistentes de pacientes submetidos ao tratamento endodôntico com relação aos achados clínicos e radiográficos. Amostras dos canais radiculares de 21 pacientes alemães foram coletadas usando 3 cones de papel estéreis sequenciais. No caso de canais obturados, a guta-percha foi removida com limas estéreis e as amostras foram coletadas com cones de papel estéreis. As amostras foram plaqueadas e os micro-organismos foram então isolados e identificados morfolologicamente por análises bioquímicas e sequenciamento dos

genes 16S RNAr de micro-organismos isolados. Em 12 dos 21 canais radiculares, 33 espécies diferentes puderam ser isoladas. Verificou-se que 50% dos casos com micro-organismos isolados eram de infecção endodôntica primária e 50% dos casos eram de secundária. Doze das espécies isoladas foram anaeróbias facultativas e 21 anaeróbias obrigatórias. Infecções monomicrobianas foram encontradas para *Enterococcus faecalis* e *Actinomyces viscosus*. *E. faecalis* foi mais frequentemente isolada em infecções endodônticas secundárias (33%). *Moraxella osloensis* foi isolada de uma infecção endodôntica secundária que teve uma obturação insuficiente do canal radicular acompanhada por uma leve sensação dolorosa. Uma nova composição bacteriana envolvendo *Atopobium rimae*, *Anaerococcus prevotii*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Dialister invisus* e *Fusobacterium nucleatum* foi coletada de dentes com abscessos apicais crônicos. *M. osloensis* foi detectada em canais radiculares pela segunda vez e somente em pacientes alemães.

Pandey et al. (2016) avaliaram a associação de sinais e sintomas endodônticos com os patógenos dos canais radiculares. Um total de 120 pacientes foi selecionado para o estudo e dividido amplamente em dois grupos (n = 60): grupo I contendo pacientes com infecção primária e grupo II contendo pacientes em que o retratamento foi necessário. Os parâmetros clínicos como dor, sensibilidade à percussão, edema, radiolucência periapical na análise radiográfica, cárie e mobilidade dentária foram avaliados. Cones de papel estéréis foram inseridos no canal radicular para coleta da amostra microbiológica, que foi posteriormente encaminhada ao laboratório para análise de cultura. Ao comparar a média de idade dos pacientes nos dois grupos, não houve associação significativa. Resultados estatisticamente significantes foram obtidos comparando a associação entre dor e *S. mitis*. Correlação positiva foi observada na comparação da associação entre sensibilidade à percussão e *E. faecalis*. Além disso, uma associação positiva foi observada entre a radiolucência periapical e *S. mitis*.

Lysakowska et al. (2016) isolaram cepas bacterianas aeróbias e anaeróbias dos canais radiculares de 33 pacientes envolvendo infecções endodônticas primárias e secundárias. Quatorze cepas foram isoladas de nove infecções endodônticas primárias, das quais três eram enterococos e três *Clostridium spp.* Uma microbiota cultivável muito mais diversa foi isolada das infecções endodônticas secundárias. Estreptococos e enterococos juntos corresponderam a 48% das cepas

isoladas. *Propionibacterium spp.* (13%), *Actinomyces spp.* (8%) e *Lactobacillus spp.* (8%) também foram grupos significativos de micro-organismos. Entre uma a quatro espécies foram encontradas em cada dente em culturas positivas. A mais comum foi *E. faecalis* seguida por *Propionibacterium acnes* e *Streptococcus spp.* A radiolucência foi observada com maior frequência em infecções sintomáticas causadas por *Actinomyces spp.* do que nos assintomáticos. Quase todos os pacientes com infecção sintomática (n = 28) sofreram de dor associada ao dente tratado (86%) e sensação de desconforto (89%). Verificou-se que 32% dos pacientes com doença sintomática relataram sensação de que o dente ficava mais desconfortável à pressão, 50% identificaram dor irradiada e 29% notaram uma sensação de maior mobilidade dentária. Abscesso foi observado em 39% dos pacientes com presença de sintomatologia e 61% com secreção de exsudato. Constatou-se também que 64% relataram sensibilidade à percussão vertical e 46% à percussão horizontal. Ao todo, a presença de lesão periapical em radiografias foi encontrada em 95% dos dentes.

Keskin et al. (2017) caracterizaram as comunidades microbianas de infecções endodônticas primárias e secundárias/persistentes utilizando pirosequenciamento de alto rendimento das amostras pulverizadas de 20 dentes humanos extraídos com infecção endodôntica primária e 20 dentes com secundária. Um total de 15 filos, 160 gêneros e 368 espécies foram detectados. Nenhuma diferença significativa entre infecções endodônticas primárias e secundárias/persistentes foi encontrada em relação à diversidade e riqueza de unidades taxonômicas operacionais nos níveis de filos, gêneros e espécies, revelando que a diversidade microbiana das infecções endodônticas secundárias/persistentes não diferiu das primárias. Uma nova espécie de arquea, *Candidatus Nitrosoarchaeum limnia*, foi detectada em canais radiculares de 1 paciente com infecção endodôntica primária pela primeira vez.

2.2 Endotoxinas

Devido à presença de endotoxinas [lipopolissacarídeos (LPS)] como fator de

virulência de bactérias Gram-negativas encontrado nas infecções endodônticas, Gomes et al. (2012) realizaram estudo clínico para comparar os níveis de endotoxinas em infecções primárias e secundária, por meio do ensaio Lisado de Amebócitos de *Limulus*, correlacionando o conteúdo de LPS com os achados clínicos/radiográficos. Além disso, a presença de bactérias anaeróbias Gram-negativas também foi investigada. Amostras foram coletadas de 15 canais radiculares com infecção endodôntica primária (IEP) e 15 com infecção endodôntica secundária (IES) usando cones de papel. Endotoxinas foram detectadas em 100% das amostras com valores medianos de 7,49 EU/mL na primária e 3,96 EU/mL na secundária. O valor médio de endotoxinas encontrado na presença de sintomas clínicos foi significativamente maior do que em dentes assintomáticos com IEP. Uma correlação positiva foi encontrada entre o conteúdo de endotoxina e um tamanho maior da área radiolúcida (> 3 mm). A técnica de reação em cadeia da polimerase (16S DNAr) foi usada para investigação bacteriana, sendo que *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola* e *Treponema socranskii* foram detectados em dentes com IEP e IES, respectivamente. *P. endodontalis* estava presente apenas em dentes com infecções primárias. Dentes com IEP tinham conteúdos mais elevados de endotoxinas e uma comunidade bacteriana Gram-negativa mais complexa do que dentes com IES. Além disso, os níveis de endotoxinas foram relacionados à gravidade da destruição óssea em tecidos periapicais, bem como o desenvolvimento de características clínicas em dentes com infecções primárias.

Cardoso et al. (2016) investigaram e quantificaram bactérias cultiváveis e seus níveis de endotoxinas na infecção endodôntica persistente, determinando sua antigenicidade contra macrófagos e células de fibroblastos pela secreção de IL-1 β e TNF- α e avaliando sua relação com características clínicas e radiográficas. As amostras dos canais radiculares foram obtidas após a remoção do material obturador radicular. As bactérias e medianas de endotoxina foram $1,24 \times 10^5$ UFC/mL e 9,62 EU/mL, respectivamente. *Porphyromonas endodontalis* foi a espécie mais frequentemente detectada. Níveis mais elevados de endotoxinas foram encontrados em dentes com dor à palpação (23,56 EU/mL) e não na sua ausência (8,21 EU/mL). Áreas maiores de destruição óssea foram relacionadas a níveis mais elevados de endotoxinas e secreção de IL-1 β e TNF- α . Os achados do estudo revelaram a

presença de bactérias Gram-negativas na infecção endodôntica persistente, com suas endotoxinas relacionadas à gravidade da destruição óssea e ao desenvolvimento da sintomatologia.

Sousa et al. (2016) mediram os níveis de endotoxinas em canais radiculares infectados e exsudatos relacionados a abscessos apicais agudos (AAAs). Além disso, a eficácia dos procedimentos na redução dos níveis de endotoxina nos canais radiculares foi monitorada. Amostras pareadas de canais radiculares e exsudatos infectados de AAAs foram coletadas de 10 pacientes usando cones de papel. Endotoxinas foram detectadas em 100% das amostras de AAAs e dos canais radiculares com valores medianos de 175 EU/mL e 41,5 EU/mL, respectivamente. Após PBM, as endotoxinas foram reduzidas para um valor mediano de 0,54 EU/mL. A irrigação subsequente com EDTA não apresentou uma eficácia significativa na redução dos níveis de endotoxina (mediana = 0,37 EU/mL). No entanto, a medicação intracanal por 30 dias ($\text{Ca} [\text{OH}]_2$ + clorexidina) reduziu as endotoxinas para valores medianos de 0,03 EU/mL.

Martinho et al. (2017) realizaram revisão sistemática e meta-análise para avaliar a relação entre os níveis de endotoxina e presença de sinais/sintomas clínicos e características radiográficas em pacientes com infecção endodôntica. Meta-análise revelou que os indivíduos que tinham dentes com sensibilidade à percussão e episódio anterior de dor apresentaram níveis mais elevados de endotoxina do que suas contrapartes. O tamanho da lesão radiográfica > 2 mm e presença de exsudato do canal radicular foram associados a níveis mais elevados de endotoxina. Por fim, observaram uma forte evidência de que as endotoxinas estão relacionadas com a presença de sinais/sintomas clínicos e características radiográficas em pacientes com infecção endodôntica.

Cavalli et al. (2017) realizaram estudo clínico para correlacionar o perfil microbiológico e os níveis de endotoxinas encontrados na IEP com a presença de características clínicas e, também, para avaliar a remoção de micro-organismos e endotoxinas usando sistemas rotatório, recíprocante e híbrido para o preparo biomecânico. As espécies mais frequentemente detectadas foram *Capnocytophaga ochracea* (53%) e *Fusobacterium nucleatum* (53%) e *F. nucleatum* (50%) e *Leptotrichia buccalis* (50%), antes e após a instrumentação, respectivamente. Na redução de endotoxinas após a instrumentação, Mtwo apresentou os melhores

resultados (95,05%) seguidos dos grupos Genius (91,85%) e Reciproc (64,68%), mas não houve diferença estatística entre os grupos. Dor prévia e sensibilidade à percussão também foram associados a micro-organismos específicos.

2.3 Ácido lipoteicóico

Como o ácido lipoteicóico (LTA) é um importante fator de virulência de bactérias Gram-positivas, como *Enterococcus faecalis*, Baik et al. (2008) examinaram se o hidróxido de cálcio pode detoxicar o LTA da *E. faecalis*, uma vez que é um medicamento endodôntico amplamente utilizado para eliminar bactérias viáveis e inativar fatores de virulência. Um ensaio imunoenzimático mostrou que *E. faecalis* morta por hidróxido de cálcio era menos potente que as bactérias mortas pelo calor ao estimular a liberação do fator de necrose tumoral alfa. O pré-tratamento do LTA com hidróxido de cálcio anulou notavelmente a capacidade do LTA de induzir a liberação do fator de necrose tumoral alfa. Além disso, o LTA tratado com hidróxido de cálcio não foi capaz de estimular o receptor *Toll-like 2*, que reconhece o LTA funcionalmente intacto. Estes resultados sugeriram que o hidróxido de cálcio pode detoxicar LTA, resultando na atenuação das respostas inflamatórias a *E. faecalis* e seu LTA.

O conteúdo infeccioso dos canais radiculares, incluindo bactérias e ácido lipoteicóico (LTA) também é ressaltado por causar lesões nos tecidos periapicais, envolvendo estudos sobre o assunto, como o realizado por Barbosa-Ribeiro (2016). Em seu ensaio clínico para quantificar os níveis de LTA e bactérias cultiváveis nas diferentes fases do retratamento endodôntico (RE) de dentes com periodontite apical pós-tratamento, investigaram, também, a presença de micro-organismos Gram-positivos antes e após o preparo biomecânico (PBM) e medicação intracanal (MIC). Vinte canais radiculares infectados de dentes unirradiculares foram divididos aleatoriamente em 2 grupos (n=10) de acordo com a substância química usada para o PBM: grupo clorexidina (CHX) gel 2% e hipoclorito de sódio (NaOCl) 6%. As amostras do canal radicular foram coletadas com cones de papel antes (S1) e após PBM (S2) e após 30 dias de MIC com hidróxido de cálcio + gel de CHX 2%(S3). Um

total de 70 espécies Gram-positivas, de 102 espécies isoladas, foram encontradas nos canais radiculares (54 em S1, 4 em S2 e 12 em S3). *Enterococcus faecalis* foi a mais frequentemente isolada em todas as fases do RE. LTA e bactérias cultiváveis estavam presentes em todas as amostras S1. PBM diminuiu os níveis globais de bactérias cultiváveis em 99,4% e LTA em 24,8%, enquanto o nível de redução total global de MIC em bactérias viáveis foi de 99,5% e em LTA foi de 38,6%. PBM com gel de CHX 2% (grupo CHX, 99,3%) foi mais eficaz do que NaOCl 6% (grupo NaOCl, 92,1%) na redução bacteriana. Em relação à redução de LTA, o PBM com gel de CHX 2% (grupo CHX, 26,9%) foi mais efetivo ($P < 0,05$) do que NaOCl 6% (grupo NaOCl, 22,6%). Assim, taxas de redução de bactérias foram maiores que as do LTA. Além disso, micro-organismos Gram-positivos estavam presentes em todas as fases do retratamento endodôntico.

Yang et al. (2016) também destacaram que *Enterococcus faecalis* está associada com infecção endodôntica persistente e periodontite apical refratária e o ácido lipoteicóico (LTA) como um importante fator de virulência de bactérias Gram-positivas, investigando o efeito do LTA de *E. faecalis* (EfLTA) na diferenciação de osteoclastos. Células de ratos foram incubadas e submetidas a fatores estimulantes para avaliar a diferenciação em osteoclastos na presença ou ausência de EfLTA. Foram utilizados *Western blotting*, ensaios de fagocitose e ELISA para avaliar citocinas e quimiocinas. Observaram que o EfLTA inibe a diferenciação de macrófagos em osteoclastos e, assim, mantém as capacidades fagocíticas e inflamatórias dos macrófagos, contribuindo potencialmente para a periodontite apical refratária.

Embora o hipoclorito de sódio (NaOCl) tenha sido usado como irrigante endodôntico comum para erradicar bactérias no canal radicular, Hong et al. (2016) observaram que não havia sido esclarecido se o NaOCl atenua a resposta inflamatória induzida pelo ácido lipoteicóico de *E. faecalis* (EfLTA) e realizaram estudo em células de ratos diante EfLTA tratado com NaOCl para determinar a indução de mediadores inflamatórios. Os danos estruturais do EfLTA por NaOCl foram examinados usando coloração com prata e cromatografia e descobriram que uma concentração $< 0,0001\%$ de NaOCl poderia efetivamente inibir o EfLTA indutor de resposta inflamatória. Ainda ressaltaram que essa concentração, que é muito menor do que a concentração bactericida, poderia imediatamente inativar o EfLTA e

provavelmente reduzir a resposta inflamatória no canal radicular infectado.

2.4 Radiografias periapicais x Tomografias computadorizadas de feixe cônico na destruição óssea periapical

Os métodos de imagem para detecção de periodontite apical (PA) têm sido avaliados quanto ao seu uso e sua acurácia na endodontia. Estrela et al. (2008a) utilizaram a tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) para identificação de periodontite apical com uso de índice baseado tridimensionalmente a partir de medidas correspondentes à radiolucência periapical interpretada na TCFC. Um total de 1014 imagens (radiografias periapicais e tomografias) originalmente de 596 pacientes foram avaliadas. A PA foi identificada em 39,5% e 60,9% dos casos por radiografia e TCFC, respectivamente. Em outro estudo, Estrela et al. (2008b) avaliaram um total de 888 exames de imagem de pacientes com infecção endodôntica (1508 dentes), incluindo tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) e radiografias panorâmicas e periapicais. A prevalência de PA foi significativamente maior com a TCFC. A sensibilidade geral das radiografias periapicais foi superior a das panorâmicas e ambas tiveram alta precisão. Concluíram ainda que a PA foi corretamente identificada com métodos convencionais quando apresentou situação avançada e a TCFC foi provada como sendo precisa para identificar AP.

Tradicionalmente, a radiografia periapical tem sido usada para avaliar o resultado do tratamento do canal radicular com a ausência de radiolucência periapical, sendo considerada uma confirmação de um periápice saudável. No entanto, Wu et al. (2009) realizaram estudo com o objetivo de identificar as limitações de revisões sistemáticas publicadas anteriormente, avaliando o resultado do tratamento endodôntico, demonstrando que uma alta porcentagem de casos confirmados por radiografias como saudáveis revelou periodontite apical na tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) e na histologia. Nos dentes, onde o tamanho reduzido da radiolucência existente foi diagnosticado por radiografias e considerado para indicar a cicatrização periapical, o aumento da lesão foi frequentemente confirmado pela TCFC. Ressaltaram ainda que, em estudos

clínicos, dois fatores adicionais podem ter contribuído ainda mais para a superestimação de resultados bem-sucedidos após o tratamento do canal: (I) extrações e retratamentos raramente foram registrados como falhas; e (II) a taxa de acompanhamento foi frequentemente menor que 50%, sendo que os resultados do tratamento do canal radicular devem ser reavaliados em estudos longitudinais de longo prazo utilizando TCFC e critérios de avaliação mais rigorosos.

Estrela et al. (2009), em estudo realizado com o intuito de avaliar a reabsorção radicular inflamatória (RRI) por meio de um método usando TCFC, utilizaram um total de 48 radiografias periapicais e TCFC originalmente de 40 pacientes avaliados. A RRI foi detectada em 68,8% radiografias e em 100% das TCFC. A extensão da IRR foi > 1-4 mm em 95,8% das imagens de TCFC e em 52,1% das imagens obtidas pelo método convencional, concluindo-se que a TCFC parece ser útil na avaliação da IRR, sendo que seu desempenho diagnóstico foi melhor que o da radiografia periapical.

Patel et al. (2012b) compararam a prevalência de lesões periapicais em raízes individuais visualizadas com radiografias intra-orais (periapicais) e TCFC. Duzentas e setenta e três raízes pareadas foram avaliadas com os dois sistemas radiológicos, as lesões periapicais estavam presentes em 20% e ausentes em 80% das raízes avaliadas com radiografias periapicais. Quando os mesmos 273 conjuntos de raízes foram avaliados com TCFC, as lesões estavam presentes em 48% e ausentes em 52% das raízes. Setenta e cinco raízes adicionais foram detectadas com TCFC. As limitações das radiografias periapicais que podem dificultar a detecção de lesões periapicais são superadas com a TCFC. Isso resulta, em primeiro lugar, por mais raízes sendo avaliadas e, em segundo, mais lesões periapicais sendo detectadas com TCFC.

Posteriormente, Patel et al. (2012a) compararam a alteração radiográfica periapical de raízes individuais usando radiografias periapicais digitais versus tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) um ano após o tratamento do canal radicular e para determinar o resultado radiológico do tratamento para cada dente. A taxa de cura (ausência de radiolucência periapical) para todas as raízes combinadas foi de 92,7% com radiografias periapicais e 73,9% para TCFC. O diagnóstico usando TCFC revelou uma menor taxa de cura e cicatrização para o tratamento da IEP do que radiografias periapicais, particularmente em raízes de

molares. Houve um aumento de 14 vezes na taxa de falha quando os dentes sem radiolucências periapicais pré-operatórias foram avaliados com TCFC em comparação com radiografias periapicais após 1 ano.

Venskutonis et al. (2014) compararam a acurácia da radiografia periapical digital intraoral e da tomografia computadorizada de feixe cônico na detecção de radiolucências periapicais em dentes tratados endodonticamente. Em 20 pacientes (42,4 anos, 65% homens e 35% mulheres) um total de 35 dentes tratados endodonticamente (27 superiores e 8 inferiores) foram avaliados. No geral, foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre o número de lesões periapicais observadas nos exames de TCFC ($n = 42$) e radiográfico ($n = 24$). Concluíram que as TCFC foram mais acuradas em comparação às radiografias periapicais digitais na detecção de radiolucências periapicais em dentes tratados endodonticamente. A diferença foi mais pronunciada nos molares.

Cardoso et al. (2017) utilizaram a TCFC para determinar o volume de destruição óssea periapical em um estudo clínico correlacionando-o com os níveis de endotoxinas e a quantificação de carga microbiana encontradas na infecção endodôntica primária. As quantidades de bactérias e endotoxinas foram correlacionadas com o desenvolvimento de características clínicas. Endotoxinas e bactérias foram detectadas em 100% das amostras do canal radicular (24 de 24), com valores medianos de 10,92 unidades de endotoxina (UE)/mL e $7,5 \times 10^5$ UFC/mL, respectivamente. A mediana do volume da destruição óssea determinada pela análise da TCFC foi de 100 mm^3 . A análise de regressão múltipla revelou uma correlação positiva entre níveis mais elevados de endotoxinas presentes na infecção do canal radicular e maior volume de destruição óssea. Além disso, níveis mais altos de endotoxinas também foram correlacionados com a presença de dor prévia.

Torabinejad et al. (2018) realizaram estudo para determinar a prevalência e o tamanho de radiolucências periapicais usando imagens de TCFC em dentes sem sinais aparentes de lesões nas radiografias intra-orais. Cento e vinte raízes de 53 pacientes que foram determinados como não apresentando sinais de lesões em radiografias intra-orais foram incluídas neste estudo. Tomografias computadorizadas foram realizadas em tamanho de voxel de $0,125 \text{ mm}^3$. A maioria das raízes (53,3%) apresentou ligamento periodontal $\leq 0,5 \text{ mm}$; 26,7% apresentaram radiolucência entre 0,5 a 1 mm, 15,0% com radiolucência de 1,0 a 1,5 mm, 0,8% com

radiolucência de 1,5 a 2,0 mm, 1,7% com radiolucência de 2,0 a 2,5 mm e 2,5% tinham larguras de radiolucência > 2,5 mm. Vinte por cento dos dentes com tratamento endodôntico com base na imagem radiográfica periapical convencional tiveram radiolucência da TCFC com mais de 1 mm. Os autores destacaram que essas radiolucências podem não ser alterações patológicas, sendo que os clínicos devem ser advertidos contra o tratamento excessivo antes de determinar a verdadeira natureza desses achados.

3 PROPOSIÇÃO

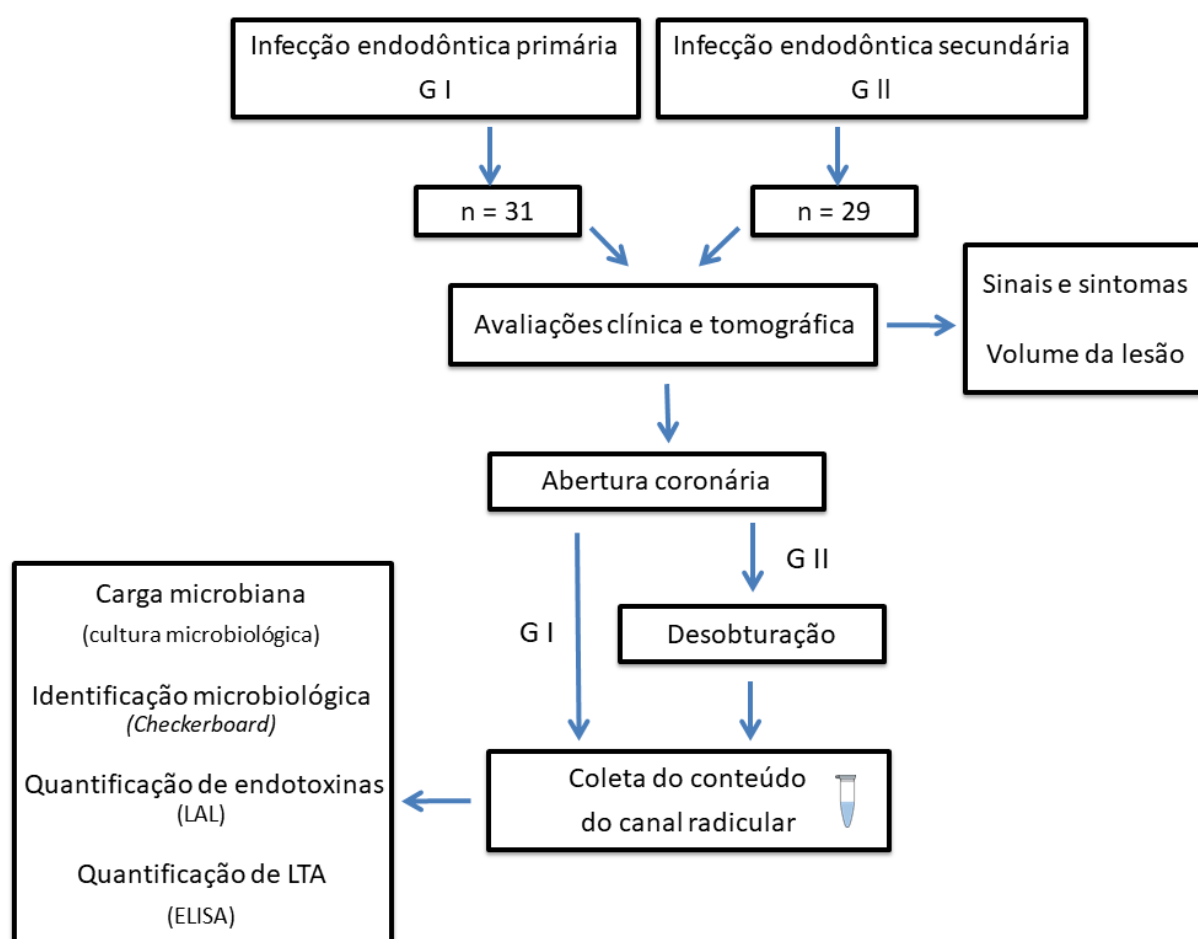
O objetivo deste estudo foi analisar o perfil das infecções endodônticas primária e secundária, avaliando:

- a) Carga microbiana por cultura de micro-organismos anaeróbios (UFC/mL) e identificação microbiológica de 40 espécies bacterianas, Gram-positivas e Gram-negativas, pelo método Checkerboard DNA-DNA hybridization;
- b) Níveis de LPS (EU/mL) e de LTA (pg/mL);
- c) A correlação destes achados com sinais e sintomas clínicos e o volume da lesão periapical.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A figura 1 ilustra o organograma resumido da metodologia proposta neste estudo envolvendo as infecções endodônticas primária e secundária.

Figura 1 – Divisão dos grupos e metodologia



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1 Seleção de paciente

Este estudo foi realizado na Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, Brasil, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) local, por meio da Plataforma Brasil, protocolo nº 2.708.907 (ANEXO A) e cadastrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (REBEC), número de registro: RBR-45wjx4. Foram selecionados 60 dentes unirradiculares permanentes de pacientes encaminhados para a Clínica de Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora com necessidade de tratamento ou retratamento endodôntico, sendo que os dentes tratados foram: incisivos centrais (20/60), incisivos laterais (21/60), caninos (8/60), primeiros pré-molares (8/60) e segundos pré-molares (3/60). O cálculo do tamanho da amostra foi baseado em um estudo previamente realizado por Gomes et al., 2004 e condizente com a disponibilidade de casos que seguiram os critérios de inclusão e exclusão durante a triagem de pacientes, sendo que para este estudo foram selecionados 31 pacientes que apresentaram infecção endodôntica primária e 29 com secundária. Uma radiografia inicial foi realizada para todos os dentes incluídos na pesquisa (Figura 2), seguido do preenchimento da ficha clínica (APÊNDICE A). Todos os pacientes eram voluntários, com idade entre 21 a 60 anos (sendo 24 do sexo masculino e 36 do sexo feminino) e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE B).

Figura 2 - Radiografias periapicais de dentes com infecção endodôntica e presença de lesão periapical com indicação de tratamento e retratamento endodôntico



Legenda: Dentes com infecção endodôntica primária (a) e infecção endodôntica secundária (b) com presença de lesão periapical (*).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Seleção dos casos e análise de sinais e sintomas clínicos

4.2.1 Infecção endodôntica primária

Os 31 dentes foram selecionados seguindo critérios de inclusão e exclusão. Foram incluídos dentes unirradiculados permanentes portadores de necrose pulpar e presença de lesão periapical visível radiograficamente. Foram excluídos dentes com doença periodontal, fratura radicular, exposição da câmara pulpar, pacientes que utilizaram antifúngicos e antibióticos no período de três meses antes do tratamento endodôntico e casos com impossibilidade de isolamento absoluto.

4.2.2 Infecção endodôntica secundária

Foram incluídos no estudo 29 dentes unirradiculados permanentes com presença de tratamento endodôntico prévio insatisfatório e realizado a no mínimo 3 anos e com presença de lesão periapical visível radiograficamente.

O insucesso do tratamento endodôntico foi baseado em exame clínico e radiográfico, avaliando presença de sinais e/ou sintomas clínicos como presença de dor espontânea, dor à palpação, dor à percussão, fístula e edema, indicando a necessidade de retratamento endodôntico. Não foram incluídos dentes com doença periodontal, fratura radicular, exposição da câmara pulpar ao meio bucal, pacientes que utilizaram antifúngicos e antibióticos no período de três meses antes do retratamento endodôntico, impossibilidade de isolamento absoluto e tratamento realizado no período inferior a 3 anos.

4.2.3 Análise de sinais e sintomas clínicos

Para ambos os grupos, foram anotados os dados pessoais, a história médica e a história dentária. No exame subjetivo foram obtidas informações sobre a condição atual do dente a ser tratado e quanto à presença ou ausência de dor espontânea. No exame objetivo dados como a presença de edema, fístulas, presença de restaurações, cáries e fraturas foram anotados. Foram executados testes para verificar dor à percussão, dor à palpação e mobilidade, além da realização de sondagem periodontal e teste de sensibilidade pulpar negativo.

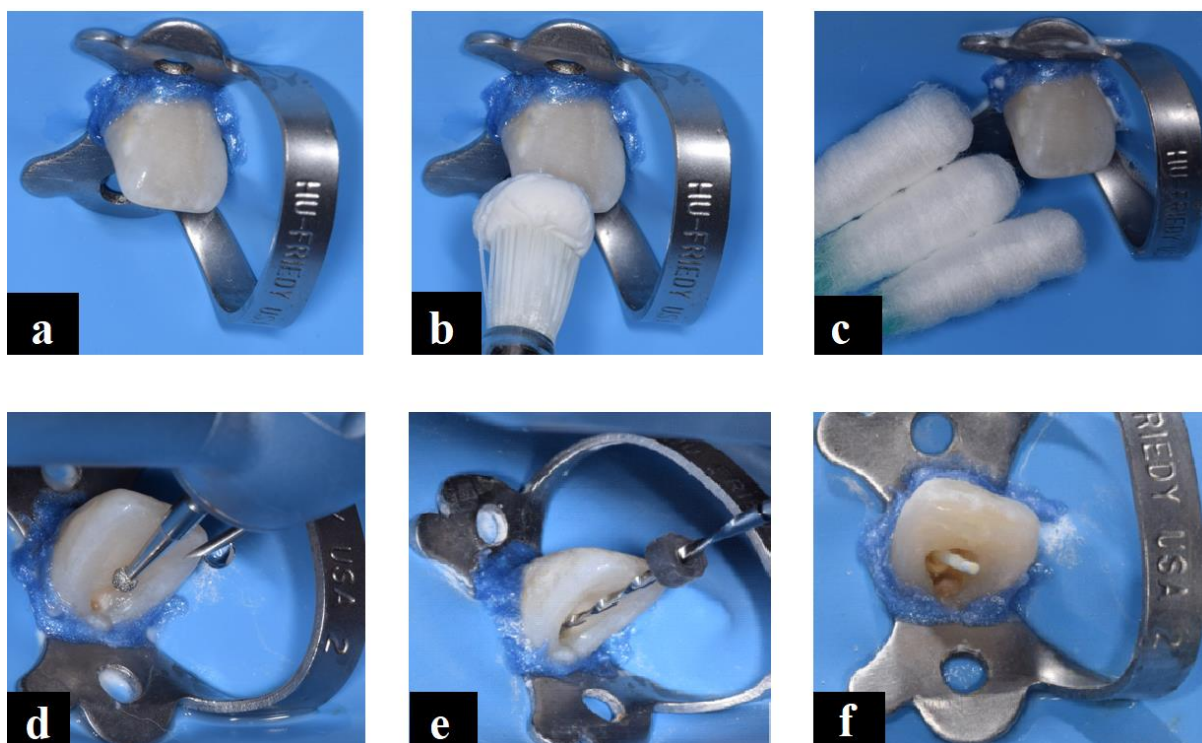
Todas as características clínicas referentes ao dente investigado foram anotadas na ficha clínica de cada paciente (APÊNDICE A). Em seguida, os pacientes foram submetidos à TCFC *Classic I-Cat* (Imaging Science International, Hatchfield, EUA) na região dos dentes selecionados, antes da intervenção odontológica, confirmando a presença de destruição óssea periapical.

4.3 Intervenção odontológica

Todos os materiais e instrumentais utilizados nesta pesquisa foram previamente submetidos à esterilização por radiação gama com cobalto 60 (dose 20 KGy por 6 horas, IPEN, São Paulo, SP, Brasil) e todos os passos subsequentes realizados de forma asséptica. Os pacientes foram submetidos à anestesia e isolamento absoluto, realizando um vedamento da interface coroa/lençol com barreira física de resina fotopolimerizável (Top Dam – FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil) (Figura 3). Em seguida, foi realizada profilaxia com pasta profilática (Vigodent S/A Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e escova de Robinson (Microdont – Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 3) e realizada uma sequência de assepsia do campo operatório com swabs (Jiangsu Medical Materials Co. Ltda, Jiangsu, China) estéreis umedecidos em água oxigenada 30 volumes (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) seguido de hipoclorito de sódio (NaOCl) 5,25% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) e neutralização do NaOCl, para evitar a contaminação química do canal radicular com essa solução e a interferência com a cultura microbiológica, com tiosulfato de sódio 5% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil), comprovando a esterilidade conforme o estudo de Ferreira et al. (2015). A abertura coronária foi realizada com auxílio de brocas acionadas em alta rotação, sob refrigeração com solução salina fisiológica apirogênica (Figura 3). Terminada a abertura coronária, no grupo de infecção endodôntica primária, os canais foram inundados com solução salina fisiológica apirogênica e agitados com lima, para desprender o biofilme, e foi feita coleta do conteúdo do canal radicular e os pacientes prosseguiram nas demais etapas do tratamento endodôntico. No grupo de infecção secundária, terminada a remoção do material restaurador, o canal foi desobturado com auxílio da lima R25 (25.08) do sistema reciprocante Reciproc® (VDW, Munich, Alemanha) sem o uso de solventes de guta-percha (para não haver interferência com as coletas realizadas em sequência) até o comprimento pré-odontométrico (CPO - comprimento aparente radiográfico subtraído em 3 mm). Em seguida, foi realizada uma tomada radiográfica para obtenção do comprimento de trabalho (CT) (1 mm do ápice radiográfico) e para verificar a remoção total do material obturador. Caso não ocorresse a total remoção

do material, a desobturação foi complementada com lima Hedstroem. Uma vez comprovada adequada desobturação do canal radicular, o mesmo foi mantido inundado com solução salina fisiológica apirogênica e realizada a coleta do interior do canal radicular, juntamente com a guta-percha coletada durante a desobturação (Figura 3).

Figura 3 - Sequência da intervenção odontológica



Legenda: a) Isolamento do campo operatório e selamento com barreira gengival fotopolimerizável; b) profilaxia do campo operatório com escova de Robinson e pasta profilática; c) desinfecção do campo operatório; d) abertura coronária; e) remoção do material obturador (infecção endodôntica secundária); f) coleta do canal radicular com cone de papel absorvente.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Coletas do canal radicular

Para a coleta de amostras do canal radicular, 4 cones de papel absorventes nº 15 (Dentsply Maillefer Ind. E Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil) apirogênicos foram

introduzidos um de cada vez no interior do canal radicular respeitando-se o comprimento pré-odontométrico (CPO = comprimento aparente radiográfico subtraído em 2 mm para infecção endodôntica primária e 3 mm para a secundária) permanecendo nesta posição por 60 segundos. O primeiro cone de papel introduzido no canal radicular foi armazenado em microtubo (1,5 mL) (Axygen INC, Union City, CA, EUA) estéril e aprotogênico contendo 1 mL de água aprotogênica (Equiplax Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) para posterior análise de endotoxinas e LTA. Os próximos 3 cones de papel foram armazenados em microtubo (1,5 mL) estéril contendo VMGA III para posterior análise microbiológica (Figura 4).

Figura 4 - Coletas do conteúdo do canal radicular



Legenda: Um cone de papel armazenado em 1 mL de água aprotogênica e 3 cones de papel armazenados em 1 mL de VMGA III.

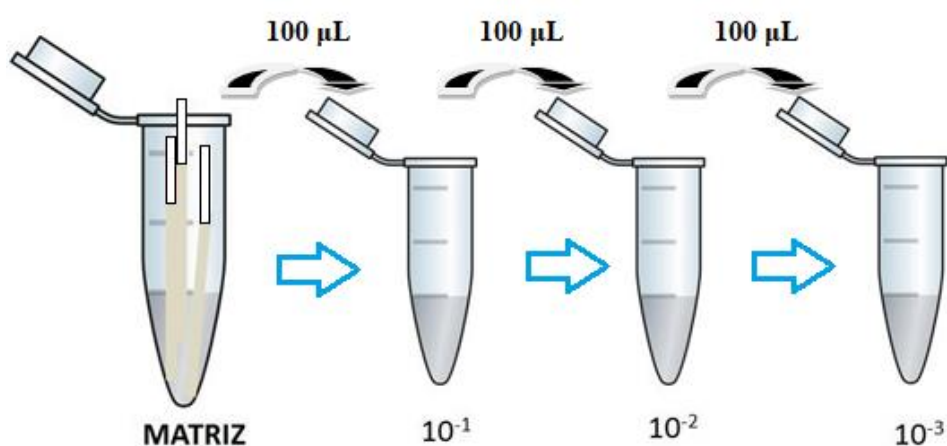
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Carga microbiana (UFC/mL)

A carga microbiana foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de micro-organismos no canal radicular. O microtubo (1,5mL) contendo os 3 cones de papel (amostra matriz) armazenados em 1 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III foi agitado por 60 segundos em vórtex até

a dessorção do conteúdo para facilitar a dispersão dos micro-organismos. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas transferindo 100 µL da amostra matriz para microtubos da diluição 10^{-1} e assim consecutivamente até a diluição 10^{-3} em microtubos (1,5 mL) contendo 900 µL de Caldo Infuso Cérebro Coração (BHI) (Brain Heart Infusion Broth - HiMedia Laboratories Pvt. Ltda, Mubai, Índia) (Figura 5).

Figura 5 – Diluições seriadas a partir da amostra matriz para a realização da semeadura do conteúdo dos canais radiculares, pelo método de cultura microbiológica



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a detecção de micro-organismos anaeróbios e facultativos (Figura 6) foram semeados 50 µL da amostra matriz (sem diluição) e 50 µL da diluição 10^{-3} em placas de Petri (Interlab distribuidora de produtos científicos, São Paulo, SP, Brasil) contendo *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA – Neogen Corporation, Michigan, EUA), acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado suplementados por hemina (5 mg/L) e vitamina K1 (1 mg/L) (APÊNDICE C). As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose a 37°C por 14 dias (Figura 6).

Figura 6 - Análise da presença de micro-organismos e contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL)



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

O número de unidades formadoras de colônias (UFCs) foi determinado a partir da contagem do número de colônias nas placas analisadas. Para a obtenção do número de UFC presente na amostra por mL (amostra inicial) foi necessário multiplicar por 20 ou 20.000 o número de UFC observado na contagem das placas, dependendo da diluição utilizada. A escolha da placa para contagem de UFC estava relacionada à possibilidade de contar de forma individual o número de UFC presente. Quando não possibilitada a contagem na amostra inicial, foi utilizada a diluição 10^{-3} . Ou seja, quando a diluição 10^{-3} foi escolhida, o valor correspondente a essa diluição é 1000 vezes menor que o inicial (1 mL). A alíquota plaqueada foi de 50 μ L, ou seja, 20 vezes menor que 1 mL. Portanto o fator de multiplicação do número de UFC obtido seria 20.000.

4.6 Análise por *Checkerboard*

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

Os microtubos contendo os 3 cones de papel absorvente (amostra matriz) armazenados em 1 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III foram agitados até a dessorção do conteúdo para facilitar a dispersão dos micro-organismos e 300 µL de cada amostra foram transferidos para outro microtubo. Após esse procedimento, os tubos foram centrifugados a 8.000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante neles contido foi então descartado e o pellet ressuspensionado com 150 µL de solução TE (10 Mm Tris-HCL, 1 Mm EDTA pH 7,6). A cada tubo plástico contendo amostras e solução tampão TE foram acrescentados 100 µL de NaOH (Labsynth) a 0,5 M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por um longo período de tempo. Em seguida, as amostras foram armazenadas sob refrigeração a -20 °C até que fossem analisadas.

4.6.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento

A lista das 40 cepas bacterianas utilizadas nesta pesquisa para o preparo das sondas de DNA está apresentada no quadro 1. As espécies avaliadas foram selecionadas devido a sua associação às infecções endodônticas ou a sua presença em outras infecções orais e saliva. Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA) ou do *Forsyth Institute* (Boston, MA, EUA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e cultivado em Agar-triptose de soja (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) contendo 5% de sangue desfibrinado de ovelha (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, EUA) a 35 °C sob condição de anaerobiose. Algumas bactérias foram cultivadas em

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

4.6.2 Isolamento do DNA e preparo das sondas

As cepas bacterianas foram cultivadas anaerobicamente e as colônias foram raspadas e depositadas em tubos plásticos para microcentrifuga de 1,5 mL contendo 1 mL de solução TE (pH 7,6). As células foram lavadas 2 vezes por centrifugação na solução TE a 3500xg por 10 minutos. Em seguida, as cepas Gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas em SDS (dodecilsulfato de sódio, Labsynth) a 10% e proteinase K (Sigma) em uma concentração de 20 mg/mL. As cepas de bactérias Gram-positivas foram lisadas em 150 µL de uma mistura enzimática contendo 15 mg/mL de lisozima (Sigma) e 5 mg/mL de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão TE (pH 8,0). O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith et al. (1989). As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 40 espécies (Quadro 1) pela marcação de 1 µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *random primer digoxigenin labeling kit* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA), de acordo com o método descrito por Feinberg e Vogelstein (1983).

Quadro 1 - Relação das cepas bacterianas, o metabolismo respiratório e a coloração Gram das bactérias utilizadas para o desenvolvimento da sonda de DNA bacteriano

Espécie	Cepas	Metabolismo
Gram +		
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	Anaeróbio facultativo
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929	Anaeróbio facultativo
<i>Actinomyces oris</i>	43146	Anaeróbio facultativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	Anaeróbio facultativo
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	Anaeróbio facultativo
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099	Anaeróbio estrito
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271	Anaeróbio estrito
<i>Gemella morbillorum</i>	27824	Anaeróbio estrito
<i>Parvimonas micra</i>	33270	Anaeróbio estrito
<i>Propionibacterium acnes</i> (I+II)	11827 e 11282	Anaeróbio aerotolerável
<i>Streptococcus anginosus</i>	33397	Anaeróbio facultativo
<i>Streptococcus constellatus</i>	27823	Anaeróbio facultativo
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558	Anaeróbio facultativo
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335	Anaeróbio facultativo
<i>Streptococcus mitis</i>	49456	Anaeróbio facultativo
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556	Anaeróbio facultativo
Gram -		
<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans</i> (a+b)	43718 e 29523	Anaeróbio estrito
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236	Anaeróbio estrito
<i>Campylobacter rectus</i>	33238	Anaeróbio estrito
<i>Campylobacter showae</i>	51146	Anaeróbio estrito
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	Anaeróbio estrito
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596	Anaeróbio estrito
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612	Anaeróbio estrito
<i>Eikenella corrodens</i>	23837	Anaeróbio facultativo
<i>Fusobacterium nucleatum ssp nucleatum</i>	25586	Anaeróbio estrito
<i>Fusobacterium nucleatum ssp polymorphum</i>	10953	Anaeróbio estrito
<i>Fusobacterium nucleatum ssp vicentii</i>	49256	Anaeróbio estrito
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693	Anaeróbio estrito
<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201	Anaeróbio estrito
<i>Neisseria mucosa</i>	19696	Anaeróbio facultativo
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406	Anaeróbio estrito
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277	Anaeróbio estrito
<i>Prevotella nigrescens</i>	33563	Anaeróbio estrito
<i>Prevotella intermedia</i>	25611	Anaeróbio estrito
<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845	Anaeróbio estrito
<i>Seimonas noxia</i>	43541	Anaeróbio estrito
<i>Tannerella forsythia</i>	43037	Anaeróbio estrito
<i>Treponema denticola</i>	B1	Anaeróbio estrito
<i>Treponema socranskii</i>	S1	Anaeróbio estrito
<i>Veillonella parvula</i>	10790	Anaeróbio estrito

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6.3 *Checkerboard DNA-DNA hybridization*

As suspensões contendo as amostras coletadas foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 mL de acetato de amônia ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$) a 5 M. Com isto, as células bacterianas foram lisadas e o DNA ficou suspenso na solução. Uma membrana de nylon (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences, Chicago, IL – EUA) foi montada em Minislot 30® (Immunetics, Cambridge, MA – EUA).

Suspensão de cada amostra contendo DNA livre foi depositada nas fendas do Minislot 30® e o DNA permaneceu depositado na membrana de nylon. As duas últimas canaletas do Minislot 30® foram reservadas para a colocação dos controles, contendo uma mistura das espécies dos micro-organismos que foram investigados pelas sondas de DNA, em duas concentrações, 10^5 e 10^6 células bacterianas, ou seja, 0,001 µg e 0,01 µg de cada espécie, respectivamente.

A membrana foi removida do aparato e o DNA, previamente depositado na mesma, foi fixado por intermédio de aquecimento em forno a 120 °C, por 20 minutos. A membrana contendo o DNA fixado foi pré-hibridizada a 42 °C, por uma hora, em uma solução de 50% formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% caseína (Vetec), 5 x solução salina citrada (SSC) (1 x SSC = 150 mM NaCl) (Vetec), 15M de citrato de sódio (pH 7,0) (J.T.Baker, Edo. Fr Méx., México), 25 mM de fosfato de sódio (pH 6,5) (Labsynth) e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Sigma). Em seguida a membrana foi posicionada no *Miniblotter 45®* (Immunetics, Cambridge, MA – EUA) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles perpendiculares às canaletas do aparato.

Cada sonda de DNA contida numa solução de hibridização [45% formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/mL de RNA levedura, 10% de sulfato de dextrano, 1% de caseína e 20 mg/mL de sonda de DNA] foi colocada em uma canaletas do *Miniblotter 45®*, de modo que cada canaletas foi preenchida com 135 µL de uma determinada sonda. As sondas hibridizaram perpendicularmente às linhas contendo o DNA bacteriano fixado, propiciando um formato xadrez, uma vez que as linhas de DNA horizontais se cruzaram com as verticais correspondentes às canaletas contendo as sondas de DNA. O aparato *Miniblotter 45®* e a membrana

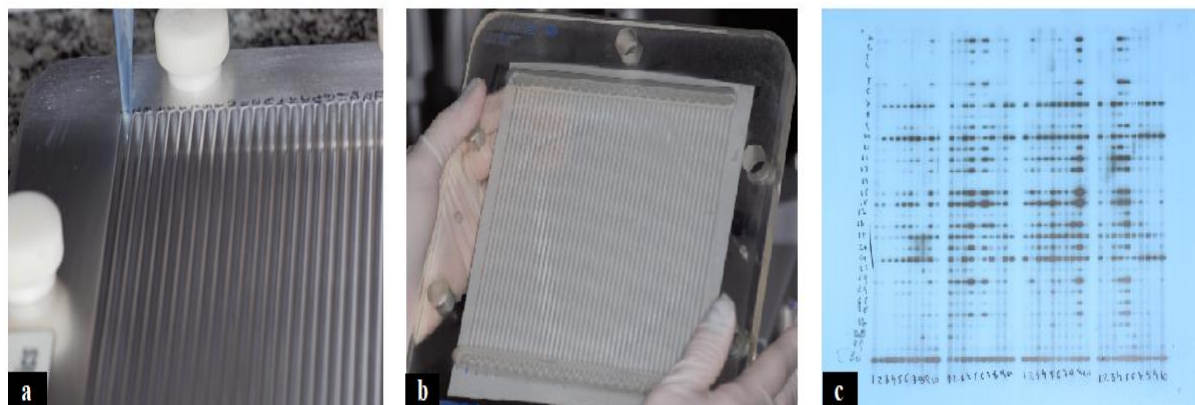
com as sondas e o DNA das amostras bacterianas fixadas, foram colocados dentro de um saco plástico umedecido para evitar a desidratação das mesmas e incubado a 42 °C para que a hibridização ocorresse. A hibridização das membranas com as sondas ocorreu durante um período mínimo de 12 horas (*overnight*).

Após a hibridização com as sondas, as membranas foram removidas do *Miniblotter 45®* e lavadas por 40 minutos a 65 °C, numa solução adstringente composta por 1% de SDS, 1 mM de EDTA e 20 mM de Na₂HPO₄, a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por 1 hora sob agitação, em uma solução bloqueadora contendo 1% de ácido maleico (Vetec), 3 M NaCl, 0,2 M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína (pH 8,0) e, logo após, por 30 minutos na mesma solução contendo anticorpo anti-digoxigenina (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments – Roche Diagnostics GmbH, Mannheim – Alemanha) conjugado à fosfatase alcalina (Roche), em uma concentração de 1:10000. As membranas foram, então, lavadas 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1 M ácido maleico, 3 M NaCl, 0,2 M NaOH, 0,3% Tween 20, pH 8,0, e uma vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1 M de Tris HCl, 0,1 M de NaCl (pH 9,5). Para detecção dos sinais, as membranas foram incubadas por 45 minutos a 37 °C em uma solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina, CDP-Star Detection Reagent® (Amershan Biosciences UK Limited, Buckinghamshire – Reino Unido). Em seguida, as membranas foram colocadas em um cassete, Chassi Radiográfico 30 x 40 cm (Konex, São Paulo, SP, Brasil) sob um filme radiográfico (Kodak® X-OMAT Kodak Brasileira Com. E Ind. Ltda, São José dos Campos, SP) e foi radiografado por aproximadamente 40 minutos. Os filmes foram posteriormente revelados manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com as orientações do fabricante (Figura 7).

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, calibrado e cego para as terapias empregadas. A leitura foi realizada 2 vezes, em dias diferentes, para conferência de resultados. Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra dos canais radiculares foi comparado, em intensidade, ao sinal produzido pela mesma sonda nas 2 linhas de controles contendo 10⁵ e 10⁶ células bacterianas. A intensidade de hibridização foi dividida em classes diferentes em relação aos níveis observados de contagem: (0) não

detectado; (1) $<10^5$ células, (2) cerca de 10^5 células, (3) entre 10^5 e 10^6 células; (4) cerca de 10^6 células ou mais.

Figura 7 - Teste *Checkerboard DNA-DNA hybridization*



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

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7 Quantificação de Endotoxinas (EU/mL):

Para verificar a neutralização de endotoxinas, as amostras coletadas dos canais radiculares foram submetidas à análise quantitativa pelo teste cinético cromogênico do Lisado de Amebócitos de *Limulus* (cinético QCL - LAL) (Lonza, Walkersville, MD, EUA).

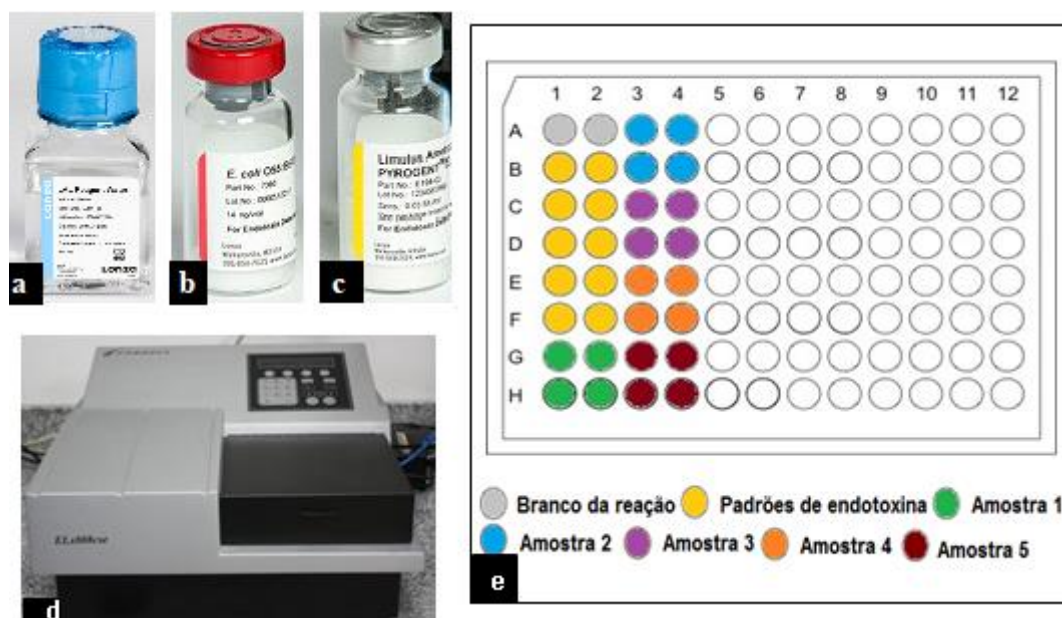
Inicialmente foi realizada uma curva-padrão (APÊNDICE D). O controle padrão de endotoxina de *Escherichia coli* foi reconstituído com um volume especificado, no certificado de qualidade, da água apirogênica. Esta suspensão continha 50 EU/mL. Foram realizadas diluições a partir deste padrão de endotoxina em diferentes concentrações (50; 5; 0,5; 0,05; 0,005 EU/mL). Para cada amostra, foi realizado um controle positivo (amostra do conteúdo do canal radicular adicionada de uma quantidade conhecida de endotoxina).

Em uma placa apirogênica de 96 poços, foram adicionados 100 μ L de água

apirrogênica (branco da reação), os padrões de endotoxina, as amostras coletadas do canal radicular e os controles positivos (Figura 8). A placa foi incubada no leitor cinético QCL a 37 ± 1 °C por 10 minutos, o qual estava acoplado a um microcomputador com software WinkQCL™ específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Após, foram adicionados em cada poço da placa 100 µL do reagente cinético cromogênico do LAL, com uma micropipeta multicanal e ponteiros apirrogênicos (Figura 8).

Após o início do ensaio cinético, o software da leitora de microplacas monitorou, de forma contínua, a absorbância a 405 nm em cada poço da microplaca. O software WinkQCL™ automaticamente calculou uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Os parâmetros da curva-padrão foram impressos no relatório.

Figura 8 – Montagem da placa, reagentes e leitor utilizado na quantificação de endotoxinas



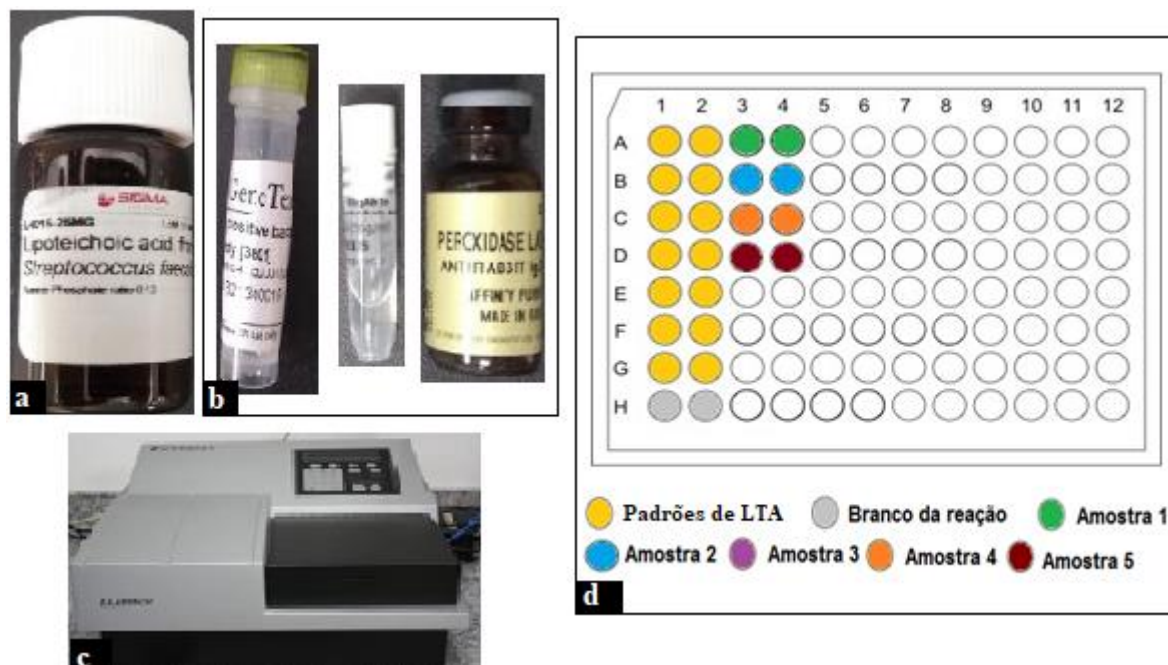
Legenda: a) Água apirrogênica; b) endotoxina padrão de *E. coli*; c) reagente cinético cromogênico do LAL; d) leitor cinético QCL; e) esquema de montagem da placa de 96 poços.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.8 Detecção e quantificação de ácido lipoteicóico (pg/mL):

Para realizar a detecção e quantificação de ácido lipoteicóico (LTA), placas de microtitulação de 96 poços (Nunc Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-LTA (mouse anti-LTA monoclonal antibody). As placas foram mantidas *overnight* em umidade relativa. No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS e bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS com 2% de soro albumina bovina, BSA) por 1 hora em temperatura ambiente. Após, foram lavadas com tampão de lavagem (PBS com 0,05% de Tween 20) e receberam 100 µL das amostras coletadas dos ápices radiculares e 100 µL dos padrões de LTA seguidos de diluições seriadas na razão de 2 (curva-padrão) e o branco da reação com PBS (Figura 9). Os testes foram realizados em duplicata e as placas foram mantidas 1 hora em temperatura ambiente. Após, as placas foram novamente lavadas e foram acrescentados 100 µL de anticorpo policlonal anti-LTA (rabbit anti-LTA polyclonal antibody). As placas foram mantidas por 30 minutos em temperatura ambiente. Após lavagem, foram acrescentados 100 µL de anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase. Após 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz, as placas foram lavadas e a reação foi revelada utilizando tetrametilbenzidina (TMB). Após 20 minutos ao abrigo de luz, foram adicionados em cada poço da placa 50 µL de solução stop (ácido sulfúrico 2 N) e as densidades ópticas (DO) foram lidas no leitor de microplacas (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) com comprimento de onda de 450 nm.

Figura 9 – Montagem da placa, reagentes e leitor utilizado na quantificação de endotoxinas



Legenda: a) LTA padrão de *E. faecalis*; b) kit de anticorpos; c) leitor de placas BioTek; d) esquema de montagem da placa de 96 poços.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.9 Análise da volumetria da destruição óssea periapical (mm³)

As tomografias computadorizadas de feixe cônico (TCFC) realizadas previamente ao tratamento endodôntico foram submetidas a medidas através do cálculo da volumetria da destruição óssea periapical. Os exames tomográficos foram realizados no Departamento de Diagnóstico e Cirurgia do Instituto de Ciência de Tecnologia de São José dos Campos (ICT- SJC).

Para a aquisição das imagens por TCFC, o plano de oclusão do paciente foi orientado paralelamente ao plano horizontal (correspondente ao plano axial) conforme o protocolo recomendado pelo fabricante. Todos os exames foram realizados usando o tomógrafo Classic I-Cat (Imaging Science International, Hatchfield, EUA) com 6 cm de campo de visão ou FOV (*field of view*), voxel isotrópico de 0,25 mm, 120 kVp, 36,15 mAs e 12 bits de profundidade de escala de

cinza. Todos os exames foram trabalhados em formato DICOM (*Digital Image and Communication in Medicine*) e lidos em software específico. Os dados DICOM de cada varredura foram salvos em arquivos separados, importados e avaliados com o software Nemotec[®] (Nemotec[®], Madri, Espanha).

O processo de segmentação e as medições volumétricas no software Nemotec[®] foram baseados no seguinte protocolo com orientação no longo eixo do dente para a referência dos cortes:

- a) De posse da tela de reconstrução multiplanar (MPR) foi realizado o posicionamento das coordenadas “X”, “Y” e “Z” nos planos axial, sagital e coronal, de acordo com o dente a ser avaliado: corte axial – alinhado perpendicular ao longo eixo do dente; corte sagital – alinhado paralelamente ao longo eixo do dente, acompanhando a inclinação do rebordo alveolar; e corte coronal – alinhado com o longo eixo do dente; sendo que todos os cortes deveriam passar pela região de maior dimensão da lesão periapical;
- b) Foram realizadas a segmentação 2D e medidas das lesões periapicais (corte sagital: medidas vestibulo-palatina e supero-inferior; corte coronal: medidas supero-inferior e antero-posterior);
- c) Inspeccionaram-se os limites da segmentação realizada nos diferentes cortes e corrigiu-se quando necessário (Figura 10).

Figura 10 – Segmentação 2D da TCFC utilizando o longo eixo do dente



Legenda: Limites da segmentação 2D e medidas das lesões periapicais.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Para análise da volumetria da destruição óssea periapical, foram realizadas as seguintes etapas:

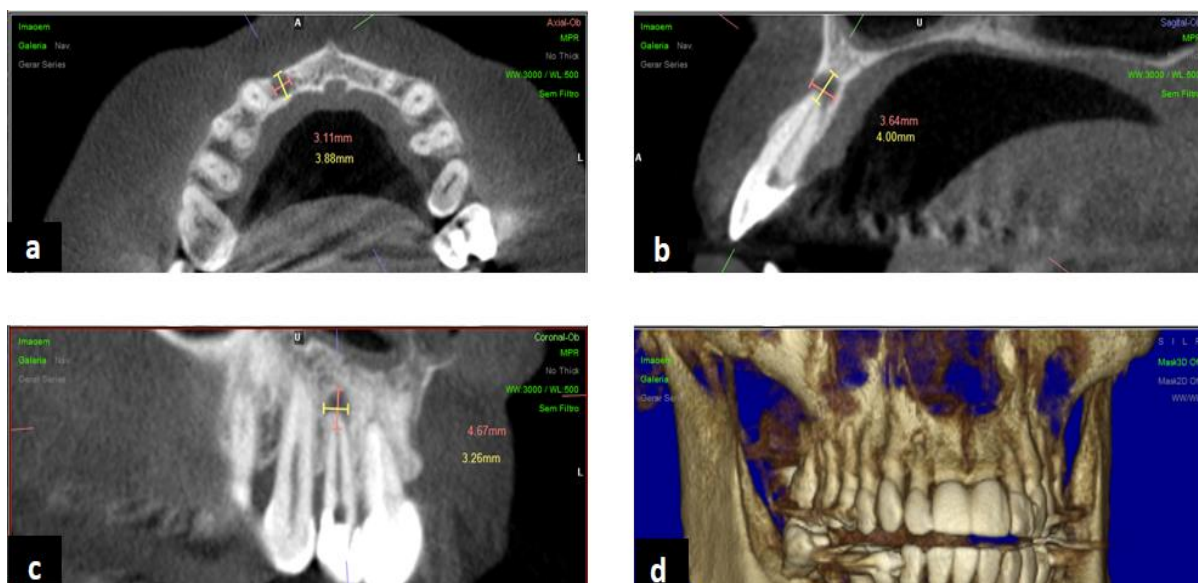
- a) Segmentação 2D e medidas das lesões periapicais (corte axial: medidas antero-posterior e vestibulo-palatina; corte sagital: medidas vestibulo-palatina e supero-inferior; corte coronal: medidas supero-inferior e antero-posterior) em todos os 3 planos para determinar a área radiolúcida que delimita a lesão;
- b) Após a criação das medidas nos planos de corte, sagital, coronal e axial, foi determinado um polígono abrangendo todo o limite da lesão, com margem de segurança, para a formatação da reconstrução 3D da radiolucência periapical, com tolerância de 350 HU (*Hounsfield Unit*). A escolha do número de tolerância de leitura para a geração da volumetria foi baseada em um estudo piloto com diferentes opções de HU;
- c) Os limites da lesão foram inspecionados para verificar se a mesma se encontrava contemplada no polígono gerado, sendo corrigido quando necessário;
- d) A opção “detectar volume” do software foi utilizada para

automaticamente calcular volumetria da lesão;

- e) Com a obtenção do volume, gerado em cm^3 , foram obtidas duas medidas de área, em cm^2 , sendo a mínima sessão e a sessão axial da lesão.

Todos os exames foram avaliados. A volumetria de cada radiolucência periapical foi medida seguindo o mesmo procedimento de segmentação no software Nemotec[®] (Figura 11 e 12) e salvos em um arquivo do Programa *Microsoft Office Excel*.

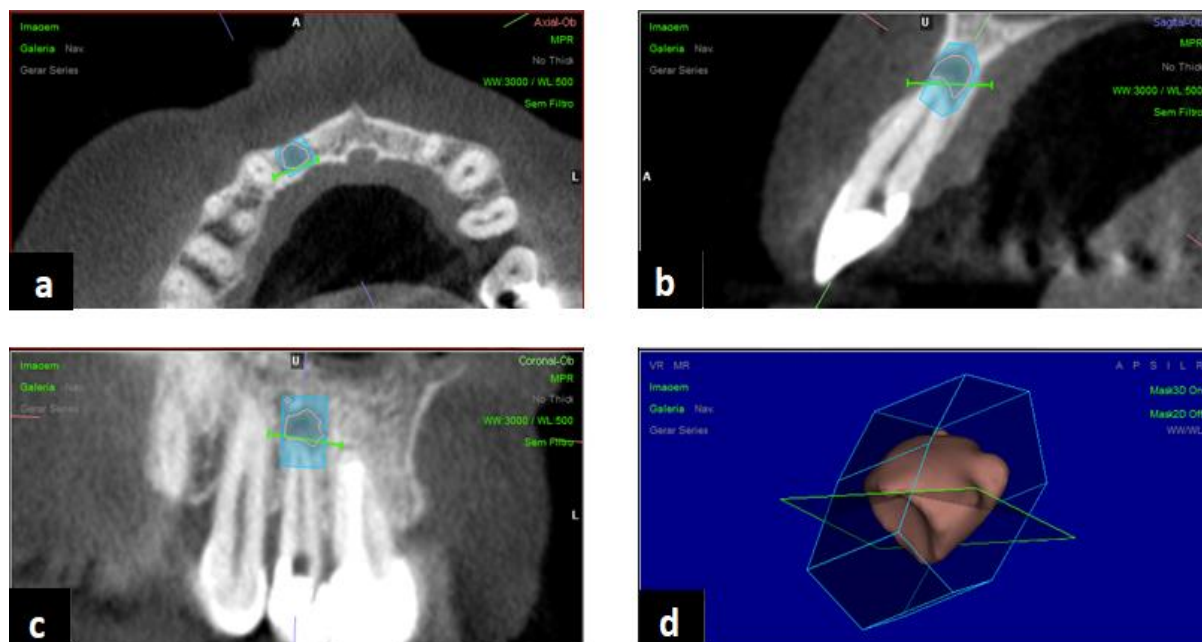
Figura 11 – Imagem da TCFC da verificação pré-operatória transferida para o software Nemotec[®] e segmentação 2D da lesão periapical nos diferentes planos de corte



Legenda: a) plano axial: em vermelho - medida antero-posterior, em amarelo – medida vestibulo-palatina; b) plano sagital: em vermelho – medida vestibulo-palatina, em amarelo – medida supero-inferior; c) plano coronal: em vermelho – medida supero-inferior, em amarelo – medida antero-posterior; d) imagem 3D da arcada dentária superior.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 – Imagem da TCFC da verificação pré-operatória transferidos para o *software* Nemotec® após criação das medidas nos diferentes planos de corte, formando um polígono que abrangesse todo o limite da lesão



Legenda: a) plano axial; b) plano sagital; c) plano coronal; d) reconstrução 3D da radiolucência periapical.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.10 Análise estatística

Os dados obtidos foram montados em planilhas Excel (Microsoft, Redmond, WA, EUA) e os cálculos foram feitos por meio do sistema Statistix 8 (Analytical Software, Tallahassee, FL, EUA) e GraphPad Prism (La Jolla, CA). Foi realizada análise descritiva a fim de possibilitar a visualização e distribuição dos dados e avaliação estatística com nível de significância de 5%. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar a carga microbiana, o número de espécies, níveis de LPS e LTA e o volume da lesão periapical. A correlação de Pearson foi utilizada para verificar correlações positivas entre níveis de LPS e LTA e espécies bacterianas com diferentes sinais e sintomas clínicos e o volume da lesão periapical, possibilitando quantificar a magnitude da associação (forte ou fraca) como segue: correlação muito forte ($>0,80$); forte ($0,80 - 0,60$); intermediário ($0,60 - 0,40$) e fraco ($<0,40$).

5 RESULTADO

5.1 Cultura microbiológica

A análise da cultura microbiológica revelou a presença de micro-organismos anaeróbios cultiváveis em 100% de todas as amostras na IEP e 93,10% das amostras na IES. Um maior número de bactérias anaeróbias cultiváveis foi encontrado na IEP com uma diferença estatística em comparação com a IES ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Mediana e *range* da carga microbiana de micro-organismos anaeróbios encontrados em cada grupo

Grupos	Carga microbiana ($\log_{10}$ UFC/mL)
	Anaeróbios
IEP	4,42 (1,30 – 6,26) A
IES	3,34 (0 – 4,61) B

Legenda: Letras representam diferença inter-grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Checkerboard DNA-DNA Hybridization

Os resultados da análise pelo método *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* revelaram que a presença de DNA bacteriano foi detectada em 96,77% (30/31) das amostras coletadas dos canais radiculares investigados com IEP. Na IES, a presença de DNA bacteriano foi detectada em 86,20% (25/29) das amostras coletadas dos canais radiculares investigados. As amostras positivas mostraram presença para pelo menos 1 das 40 sondas bacterianas de DNA testadas. Foi observada diferença estatística entre a IEP e a IES em relação à mediana de espécies microbianas (Tabela 2). A mediana do número de espécies bacterianas por canal radicular encontrada na IEP foi 9 (variação de 0 a 26) (Tabela 2), enquanto na IES foi 22 (variação de 0 a 39) ($p < 0,05$).

As espécies bacterianas Gram-positivas mais prevalentes detectadas na IEP foram *S. intermedius* (14/31 - 45,16%), *E. faecalis* (13/31 - 41,94%), *P. acnes* (13/31 - 41,94%) e *S. constellatus* (11/31 - 35,48%), enquanto as bactérias Gram-negativas mais prevalentes foram *P. gingivalis* (14/31 - 45,16%), *C. sputigena* (13/31 - 41,94%), *P. melaninogenica* (13/31 - 41,94%) e *L. buccalis* (12/31 - 38,71%). Na IES, as espécies bacterianas Gram-positivas mais prevalentes detectadas foram *E. nodatum* (19/29 - 65,62%), *S. mitis* (18/29 - 62,07%) e *E. faecalis*, *S. constellatus*, *E. faecium* e *E. saburreum* (17/29 - 58,62%), enquanto as espécies bacterianas Gram-negativas mais prevalentes detectadas foram: *P. gingivalis* (21/29 - 72,41%), *C. rectus* (20/29 - 68,97%) e *C. sputigena* e *F. nucleatum. sp. vicentii* (19/29 - 65,62%). A frequência e concentração de DNA das espécies bacterianas individuais investigadas na IEP e na IES são mostradas nas figuras 13 e 14, respectivamente.

Um total de 895 DNA bacterianos pertencentes a 40 espécies avaliadas foram detectadas de 60 pacientes. A IEP (31/60) apresentou 302 amostras de DNA, 112 sendo Gram-positivas e 190 Gram-negativas. Na IES (29/60) verificou-se 593 DNA, sendo 224 de bactérias Gram-positivas e 369 de Gram-negativas. As bactérias Gram-negativas foram responsáveis por 62,46% do total de espécies isoladas dos 60 canais, sendo responsáveis por 62,91% das amostras de DNA na IEP (31/60) e por 62,23% do DNA das bactérias na IES (29/60). As bactérias Gram-positivas foram responsáveis por 37,54% do total de espécies isoladas dos 60 canais, sendo responsáveis por 37,09% das amostras de DNA na IEP (31/60) e por 37,77% do DNA das bactérias na IES (29/60).

Tabela 2 – Mediana e *range* do número de espécies bacterianas encontradas em cada grupo

Grupos	Espécies bacterianas
IEP	9 B (0 – 26)
IES	22 A (0 – 39)

Legenda: Letras representam diferença inter-grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 - Gráfico de barras de frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano encontradas em dentes com infecção endodôntica primária

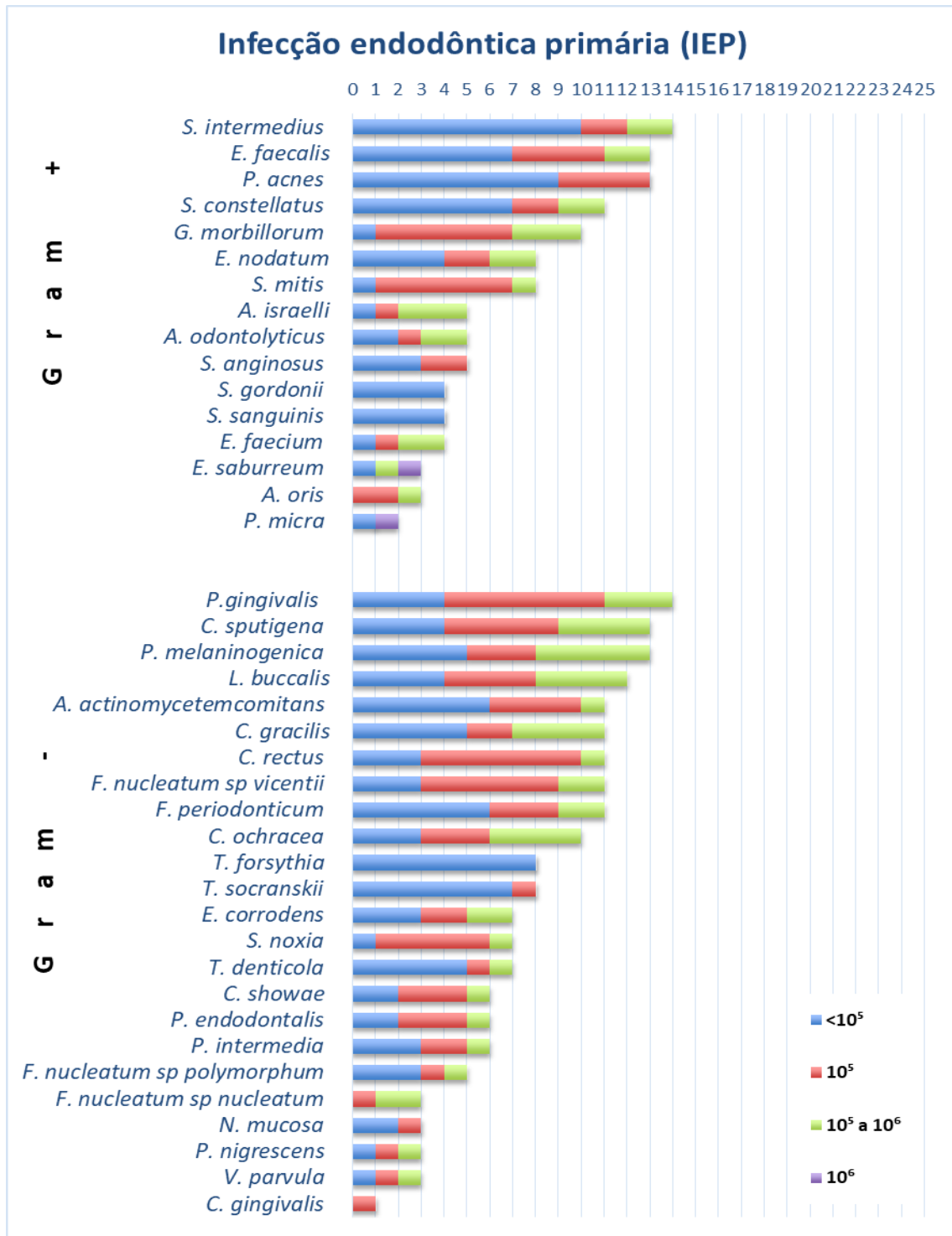
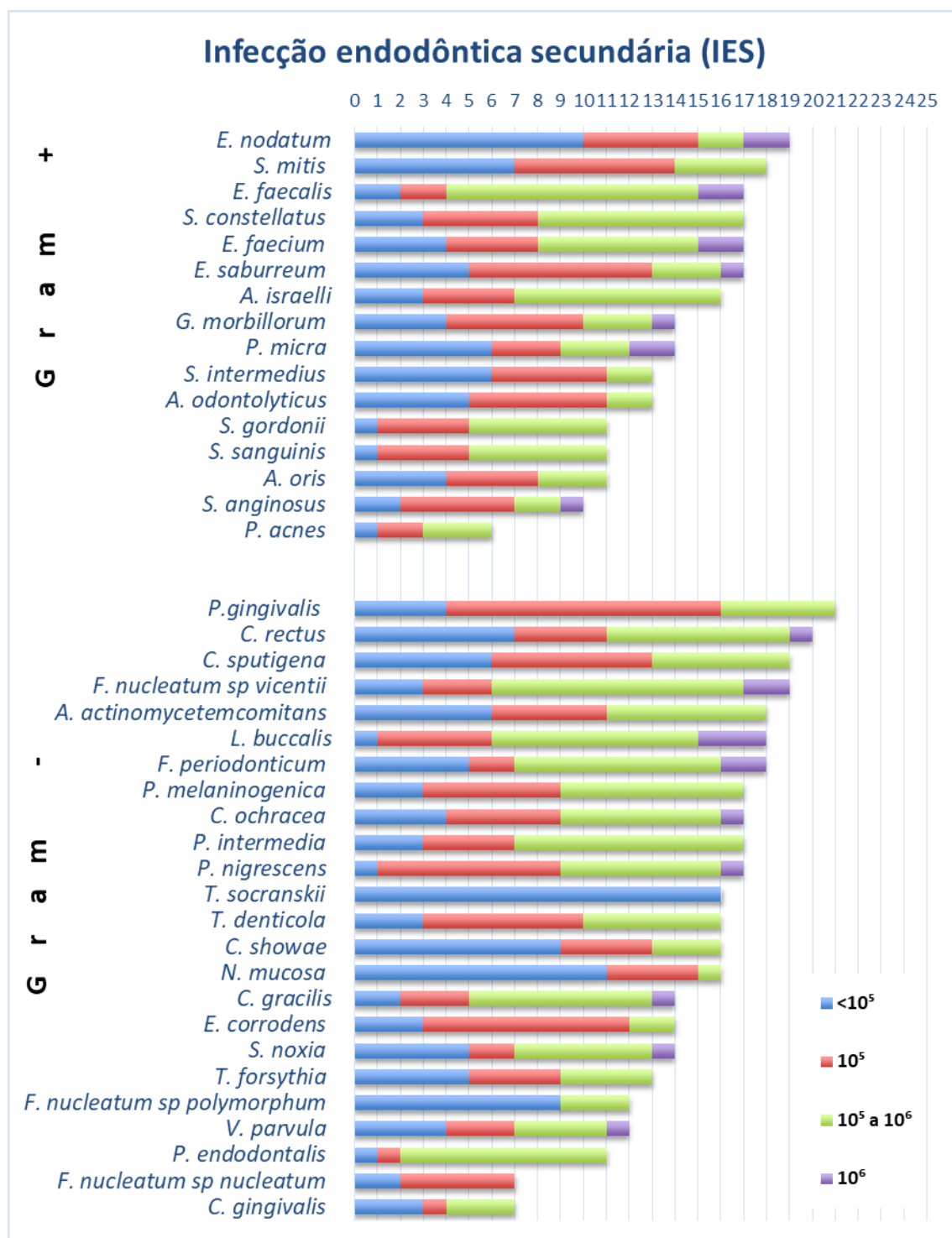


Figura 14 - Gráfico de barras de frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano encontradas em dentes com infecção endodôntica secundária



Legenda: O comprimento total de cada barra indica o número de amostras positivas, e cores diferentes indicam o número dessas amostras contendo diferentes concentrações de DNA bacteriano
 Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Quantificação dos níveis dos fatores de virulência – LPS e LTA

Para a quantificação dos níveis de lipopolisacarídeos, as medianas e *range* na IEP foram 2,07 EU/mL (0,25 - 3,65). Na IES foram 0,54 EU/mL (-1,86 - 2,10), respectivamente (Tabela 3). Os níveis de LPS foram significativamente superiores na IEP quando comparada à IES ($p < 0,05$).

Para a quantificação dos níveis de ácido lipoteicóico, as medianas e *range* na IEP foram 2,25 (1,79 - 2,51). Na IES foram 2,12 (1,67 - 2,51) (Tabela 3). Não houve diferença estatística nos níveis de LTA entre ambas as infecções ($p > 0,05$).

Tabela 3 - Mediana e *range* dos níveis dos fatores de virulência (LPS e LTA) encontrados em cada grupo

Grupos	Níveis dos fatores de virulência	
	LPS (log ₁₀ EU/mL)	LTA (log ₁₀ pg/mL)
IEP	2,07 A	2,25 A
	(0,25 – 3,65)	(1,79 – 2,51)
IES	0,54 B	2,12 A
	(-1,86 – 2,10)	(1,67 – 2,51)

Legenda: Letras representam diferença inter-grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Análise por Tomografia Computadoriza de Feixe Cônico: Volume da lesão periapical

A mediana e *range* do volume de destruição óssea determinada pela análise tomográfica na IEP foi de 60 mm³ (20 - 280 mm³) e na IES de 60 mm³ (10 - 680 mm³). Não houve diferença estatística significativa entre o volume da lesão periapical entre as infecções endodônticas primária e secundária (Tabela 4).

Tabela 4 - Mediana e range do volume da lesão periapical (mm³)

Grupos	Volume da Lesão Periapical (mm ³)
IEP	60 A (20 - 280)
IES	60 A (10 - 680)

Legenda: Letras representam diferença inter-grupos.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Associação de endotoxinas e ácido lipoteicóico com sinais e sintomas clínicos e volume da lesão periapical em dentes com infecções endodônticas primária e secundária

Infecção endodôntica primária: Durante anamnese 25,81% dos pacientes (8/31) relataram dor espontânea. Clinicamente, foi observado que 19,35% dos pacientes (6/31) apresentavam dor à percussão, 22,58% (7/31) dor à palpação; 9,68% (3/31) apresentaram fístula e a presença de exsudato foi observada em 9,68% (3/31) dos pacientes (Tabela 5).

Infecção endodôntica secundária: Durante anamnese 48,28% dos pacientes (14/29) relataram dor espontânea. Clinicamente, foi observado que 24,14% dos pacientes (7/29) apresentavam dor à percussão, 24,14% (7/29) dor à palpação; 3,45% (1/29) apresentaram fístula e a presença de exsudato foi observada em 10,34% (3/29) dos pacientes (Tabela 5).

Tabela 5 - Sinais e sintomas clínicos nos diferentes grupos

Grupos	Dor espontânea	Dor à percussão	Dor à palpação	Fístula	Exsudato
IEP	8/31 (25,81%)	6/31 (19,35%)	7/31 (22,58%)	3/31 (9,68%)	3/31 (9,68%)
IES	14/29 (48,28%)	7/29 (24,14%)	7/29 (24,14%)	1/29 (3,45%)	3/29 (10,34%)
TOTAL	22/60 (36,67%)	13/60 (21,67%)	14/60 (23,33%)	4/60 (6,67%)	6/60 (10%)

Legenda: Estatística descritiva de sinais e sintomas em número de casos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Através do teste de correlação de Pearson, observou-se que não houve correlação entre LTA e LPS e sinais e sintomas na infecção endodôntica primária, porém houve correlação positiva entre LPS e o volume da lesão periapical (mm³), em uma associação considerada fraca (<0,40) (Tabela 6).

Tabela 6 - Correlação individual entre LTA e LPS e sinais e sintomas e volume da lesão periapical na infecção endodôntica primária

Parâmetros	Dor espontânea	Dor à percussão	Dor à palpação	Fístula	Exsudato	Volume da lesão periapical
LTA	r= -0.1302	r= 0.01968	r= 0.2719	r= 0.1816	r= 0.1857	r= -0.1627
	p= 0.4852	p= 0.9163	p= 0.1389	p= 0.3283	p= 0.3172	p= 0.3818
LPS	r = 0.3542	r= -0.1553	r= -0.1937	r= -0.1264	r= -0.1487	r= 0.3881
	p = 0.0506	p = 0.4040	p= 0.2965	p= 0.4980	p= 0.4245	p=0.031

Legenda: Coeficiente de Correlação de Pearson (r) e valor p.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Através do teste de correlação de Pearson, observou-se que não houve correlação entre LTA e LPS e sinais e sintomas e do volume da lesão periapical na infecção endodôntica secundária (Tabela 7).

Tabela 7 - Correlação individual entre LTA e LPS e sinais e sintomas e volume da lesão periapical na infecção endodôntica secundária

Parâmetros	Dor espontânea	Dor à percussão	Dor à palpação	Fístula	Exsudato	Volume da lesão periapical
LTA	r= -0.1189	r= -0.07785	r= 0.1789	r= -0.08931	r= 0.07894	r= -0.1238
	p= 0.5388	p= 0.6881	p= 0.3531	p= 0.6450	p= 0.6840	p= 0.5224
LPS	r = -0.09244	r= 0.1039	r= -0.06945	r= -0.1104	r= -0.2175	r= -0.2901
	p = 0.6334	p= 0.5918	p= 0.7204	p= 0.5686	p= 0.2570	p= 0.1269

Legenda: Coeficiente de Correlação de Pearson (r) e valor p.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6 Associação de micro-organismos com sinais e sintomas clínicos e o volume da lesão periapical em dentes com infecções endodônticas primária e secundária

Através do teste de correlação de Pearson foi possível realizar associações positivas entre sinais e sintomas clínicos e o volume da lesão periacal com micro-organismos, bem como suas características de respiração celular e coloração Gram dos micro-organismos, em dentes com infecções endodônticas primária e secundária.

Na infecção endodôntica primária, micro-organismos Gram-positivos foram associados com dor espontânea (associação fraca) e exsudato (associação fraca). Dor à percussão (associações intermediária a forte) e dor à palpação (associações fraca à intermediária) foram associadas tanto com micro-organismos Gram-positivos quanto Gram-negativos (Tabela 8).

Na infecção endodôntica secundária, tanto micro-organismos Gram-positivos quanto Gram-negativos foram associados à presença de exsudato (associações fraca a intermediária) e volume da lesão periapical (associações fraca a intermediária) (Tabela 9).

Tabela 8 - Associações positivas entre sinais e sintomas clínicos com espécies bacterianas em dentes com infecção endodôntica primária

Parâmetros	Espécies de micro-organismo	Coefficiente de Correlação de Pearson	Associação	Valor p
Dor espontânea	<i>A. israeli</i> (G+ Fac)	0.3848	Fraca	0.0326
	<i>E. faecium</i> (G+ Fac)	0.6301	Forte	0.0001
Dor à percussão	<i>A. israeli</i> (G+ Fac)	0.4935	Intermediária	0.0048
	<i>V. parvula</i> (G- Est)	0.4870		0.0055
	<i>P. nigrescens</i> (G- Est)	0.4870		0.0055
	<i>T. denticola</i> (G- Est)	0.4807		0.0062
	<i>E. nodatum</i> (G+ Est)	0.4008		0.0254
	<i>A. oris</i> (G+ Fac)	0.422		0.0180
Dor à palpação	<i>E. nodatum</i> (G+ Est)	0.5154	Intermediária	0.0030
	<i>E. saburreum</i> (G+ Est)	0.4560		0.0099
	<i>V. parvula</i> (G- Est)	0.4370		0.0140
	<i>P. melaninogenica</i> (G- Est)	0.4153		0.0202
	<i>P. micra</i> (G+ Est)	0.4132		0.0209
	<i>A. oris</i> (G+ Fac)	0.3741	Fraca	0.0382
Exsudato	<i>P. acnes</i> (G+ Aerotolerante)	0.3613	Fraca	0.0458

Legenda: Valores da correlação de Pearson e do valor p entre sinais e sintomas clínicos com micro-organismos e suas respectivas coloração Gram e respiração celular.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 9 - Associações positivas entre sinais e sintomas clínicos e volume da lesão periapical com espécies bacterianas em dentes com infecção endodôntica secundária

Parâmetros	Espécies de micro-organismo	Coefficiente de Correlação de Pearson	Associação	Valor p
Exsudato	<i>S. mitis</i> (G+ Fac)	0.5890	Intermediária	0.0008
	<i>G. morbillorum</i> (G+ Est)	0.4704		0.01
	<i>E. corrodens</i> (G- Fac)	0.4544		0.0133
	<i>P. melanogenica</i> (G- Est)	0.4438		0.0159
	<i>T. denticola</i> (G- Est)	0.4084		0.0279
	<i>C. sputigena</i> (G- Est)	0.4014		0.0309
	<i>A. actinomycetemcomitans</i> (G- Fac)	0.3935	Frac	0.0347
	<i>E. faecium</i> (G+ Fac)	0.3842		0.0396
	<i>F. nucleatum sp vicentii</i> (G- Est)	0.3807		0.0416
	<i>S. gordonii</i> (G+ Fac)	0.3788		0.0427
	<i>S. sanguinis</i> (G+ Fac)	0.3788		0.0427
	<i>C. showae</i> (G- Est)	0.3768		0.0439
Volume da lesão periapical	<i>P. melaninogenica</i> (G- Est)	0.4839	Intermediária	0.0078
	<i>S. mitis</i> (G+ Fac)	0.4746		0.0093
	<i>C. sputigena</i> (G- Est)	0.4098		0.0273
	<i>E. nodatum</i> (G+ Est)	0.3869	Frac	0.0381
	<i>S. gordonii</i> (G+ Fac)	0.3863		0.0385

Legenda: Valores da correlação de Pearson e do valor p entre sinais e sintomas clínicos e volume da lesão periapical com micro-organismos e suas respectivas coloração Gram e respiração celular.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo clínico comparou a microbiota encontrada na IEP e e na IES. Embora existam vários relatos abordando a microbiota em infecções endodônticas, até o momento, nenhum estudo correlacionou os achados microbiológicos com os níveis de LPS e LTA e com os sinais e sintomas clínicos e o volume da lesão periapical.

A análise da cultura microbiológica revelou a presença de micro-organismos anaeróbios cultiváveis em 100% de todas as amostras na IEP e 93,10% da IES. Quando a carga microbiana de bactérias anaeróbias foi comparada entre as infecções, os dados obtidos mostraram um maior número de UFC/mL na IEP em comparação com a IES, com uma diferença significativa entre as infecções. Esses resultados corroboram com os achados de estudos anteriores, que mostraram que canais radiculares com IEP contêm maior carga bacteriana (Blome et al., 2008). Embora a técnica de coleta das amostras com cones de papel para canais obturados tenha sido descrita anteriormente (Cugulo et al., 2007), deve-se atentar que, provavelmente, a remoção do material obturador do canal radicular pode causar a eliminação de alguns micro-organismos juntamente com os debris formados pelo procedimento mecânico e, assim, levar a resultados enganosos, subestimando o número de bactérias nesses casos (Gomes et al., 1994). Para minimizar este problema, o material obturador removido do canal radicular também foi colocado juntamente com os cones de papel absorvente no meio de transporte.

Dados do Checkerboard DNA-DNA hybridization revelaram que 96,77% das amostras coletadas da IEP apresentaram pelo menos 1 sonda de DNA das espécies bacterianas analisadas, com mediana de 9 espécies por canal radicular, o que corrobora com a natureza polimicrobiana da IEP (2). Os micro-organismos mais prevalentes na IEP foram *P. gingivalis* e *S. intermedius* (45,16%), *E. faecalis*, *P. acnes*, *C. sputigena* e *P. melaninogenica* (41,94%), *L. buccalis* (38,71%) e *S. constellatus* (35,48%).

Na IES, os dados do Checkerboard DNA-DNA hybridization revelaram que 86,21% das amostras apresentaram pelo menos 3 sondas de DNA das espécies bacterianas analisadas com uma mediana de 22 espécies por canal radicular,

confirmando a natureza polimicrobiana também encontrada na IES. Os micro-organismos mais prevalentes na IES foram *P. gingivalis* (72,41%), *C. rectus* (68,97%), *F. nucleatum* sp. *vicentii* e *E. nodatum* (65,62%), *S. mitis* (62,07%), *E. faecalis*, *S. constellatus*, *E. faecium* e *E. saburreum* (58,62%).

De acordo com os resultados do presente estudo, *P. gingivalis* apresentou a maior frequência em ambas as infecções. Possivelmente, essa bactéria interage com *F. nucleatum*, que é um facilitador de sua colonização (Ahn et al., 2016). *P. gingivalis* é também uma bactéria Gram-negativa estritamente anaeróbia, que apresenta vários fatores de virulência, como a presença de fímbrias e proteínas extracelulares relacionadas à formação de biofilme. Além disso, os subprodutos dessas bactérias estão relacionados a vários estágios da doença periapical (Enersen et al., 2013) e doença sistêmica (Li et al., 2000).

No entanto, vários estudos ressaltam o notável papel desempenhado por *E. faecalis* nas infecções endodônticas (Stuart et al., 2006; Zoletti et al., 2011). Os dados obtidos no presente estudo revelaram que *E. faecalis* era de fato uma das espécies mais prevalentes em ambas as condições de periodontite apical, como foi possível observar no nosso estudo, onde apesar deste micro-organismo se apresentar em terceiro lugar em relação às bactérias Gram-positivas na IES (58,62%) e no segundo da IEP (41,94%), ele estava presente em maiores quantidades na secundária, demonstrando assim sua prevalência nos casos de reintervenção endodôntica. Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores, que também detectaram uma alta prevalência dessa espécie anaeróbia facultativa, não apenas na IEP, mas também em dentes com falha do tratamento endodôntico (Gomes et al., 2008; Gomes et al., 2006).

O método Checkerboard DNA-DNA hybridization tem sido amplamente utilizado, pois permite a detecção rápida e simultânea de várias espécies bacterianas em um grande número de amostras (Socransky et al., 2004). Neste estudo, a análise molecular foi utilizada para identificar e quantificar as quantidades de DNA correspondente a 10^5 e 10^6 células das 40 espécies microbianas testadas. A presença de diferentes taxas bacterianas, juntamente com os dados semiquantitativos fornecidos por este método, revela algumas espécies/filotipos específicos que podem ser utilizados como alvos para futuras investigações, a fim

de se obter uma análise quantitativa mais precisa com contagens absolutas, como por exemplo PCR em tempo real (Pourhajibagher e Bahador, 2018).

Ao analisar os dados da metodologia do Checkerboard DNA-DNA hybridization, é possível observar uma gama significativamente maior de espécies microbianas detectadas na IES. Por outro lado, analisando os dados da cultura microbiológica, foi encontrada uma maior carga microbiana na IEP. Sabe-se que a técnica de cultura microbiológica só detecta bactérias viáveis e cultiváveis, subestimando a presença de espécies difíceis ou impossíveis de cultivar. Além disso, os meios de cultura selecionados e o transporte prolongado de amostras durante o procedimento de cultivo podem descartar a presença de algumas espécies críticas (Siqueira et al., 2000). Por sua vez, as abordagens moleculares permitem uma rápida detecção e quantificação de patógenos endodônticos, independentemente de sua viabilidade, e até mesmo a identificação de espécies cultiváveis pode ser mais confiável (Petti et al., 2005). Como desvantagem dos métodos moleculares, o DNA de micro-organismos mortos no sistema de canais radiculares ou a difusão do DNA da cavidade oral para o canal radicular podem levar a resultados falso-positivos (Baumgartner, 2004). Isto salienta a relevância das técnicas de cultivo para cultivar micro-organismos viáveis. Portanto, os resultados obtidos por ambas as metodologias, embora diferentes, são complementares (Anderson et al., 2012) e somente uma combinação da cultura, bem como técnicas independentes de cultura, alcançariam uma análise microbiana abrangente das infecções endodônticas (Anderson et al., 2012). Além disso, a disparidade em relação à composição e ao número de espécies pode não estar apenas associada a diferenças nas metodologias, mas também ser influenciada por outros fatores, como as questões relacionadas ao tamanho da amostra e aos efeitos geográficos (Baumgartner et al., 2004). Por exemplo, o aumento da resistência de diferentes perfis bacterianos pode ser devido ao uso de antibióticos na prática geral que divergem em diferentes países (Harbarth, Samore, 2005). Além disto, quando se faz identificação microbiana, o pesquisador precisa escolher as bactérias previamente, o que pode gerar diferentes resultados, especialmente na prevalência de determinadas bactérias nas IEP e IES.

Endotoxinas e LTA foram detectados em amostras de todos os canais radiculares. Os níveis de endotoxina foram significativamente maiores na IEP do que

os observados na IES, o que está de acordo com o estudo de Gomes, Endo e Martinho (2012). Enquanto nenhuma diferença significativa foi encontrada em relação aos níveis de LTA entre a IEP e a IES. Entretanto, vale a pena reforçar a necessidade de mais investigações sobre o papel do LTA nos sinais clínicos da periodontite apical, uma vez que esse fator de virulência exerce diversos efeitos sobre os fenômenos imunoinflamatórios e pode indiretamente levar ao dano tecidual, sendo considerado um contribuinte potencial para a refratariedade da periodontite apical (Yang et al., 2016). Todavia, pouca informação é fornecida na literatura endodôntica sobre o LTA de bactérias Gram-positivas em dentes com IEP e IES. A falta de tais estudos provavelmente se deve a dificuldades no manejo do LTA puro e estruturalmente intacto (Gao et al., 2001). Segundo Morath et al. (Morath et al., 2002), o LTA utilizado em estudos anteriores foi frequentemente contaminado com endotoxinas ou estruturalmente deteriorado durante a purificação, o que inviabiliza a caracterização dos efeitos reais do LTA sobre a ativação das células imunológicas. Contudo, deve-se levar em conta que as infecções endodônticas são doenças multifatoriais, associadas a vários fatores do hospedeiro e bacterianos (Siqueira, Rôças, 2007). O LPS é certamente o fator de virulência mais investigado e citado, no entanto, parece simplista dar todo o crédito da patogenicidade endodôntica a essa molécula. Especialmente porque, embora exista uma proporção maior de bactérias Gram-negativas, existem muitas Gram-positivas e em altos níveis, como no caso de *E. faecalis*, assim, o envolvimento de outros fatores de virulência não deve ser subestimado.

Ao avaliar a associação da microbiota com sinais e sintomas relatados pelos pacientes com IEP, foi encontrada forte correlação entre dor à percussão e *E. faecium*. Entretanto, na IES, os resultados não indicam qualquer associação entre espécies bacterianas e a presença de dor espontânea, dor à percussão, dor à palpação e fístula. Associações positivas de bactérias específicas foram correlacionadas apenas com a presença de exsudato e com o volume da lesão periapical, mas nenhuma das associações foi considerada forte. No entanto, o presente estudo revelou que maiores quantidades de endotoxinas na IEP foram associadas com o maior volume de destruição óssea, suportando os resultados de Cardoso et al. (2015) e quase houve associação com dor espontânea, porém sem diferença estatística ($p = 0,0506$). Sendo o LPS reconhecido por induzir a produção

de muitos fatores locais, incluindo citocinas pró-inflamatórias que foram relatadas como indutoras da formação de quimiotaxia de osteoclastos e da destruição óssea (Mörmann et al., 2008).

O presente estudo possibilitou verificar que ambas as infecções apresentaram natureza polimicrobiana com predomínio de bactérias Gram-negativas e a IES apresentou maior diversidade bacteriana. Houve também uma ampla interação de espécies, resultando em diferentes características clínicas. Os níveis de LTA foram semelhantes nas infecções endodônticas primária e secundária e não foram relacionados a sinais e sintomas ou ao volume da lesão periapical. No entanto, os níveis de LPS foram maiores na IEP e foram relacionados ao volume da lesão periapical. Diante à diversidade de metodologias utilizadas e disparidades de achados encontrados na literatura em relação ao estudo das infecções endodônticas primária e secundária, revisões sistemáticas futuras são essenciais a fim de contribuir para uma determinação significativa da prevalência bacteriana e sua associação com características clínicas.

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto, pode-se concluir em relação às infecções endodônticas primária e secundária que:

- a) As infecções apresentaram natureza polimicrobiana, com predomínio de bactérias Gram-negativas;
- b) A IEP apresentou maior quantidade de bactérias anaeróbias cultiváveis comparada à IES;
- c) A IES apresentou maior diversidade bacteriana, com maior quantidade de espécies por canal;
- d) As espécies bacterianas mais prevalentes detectadas na IEP foram *P. gingivalis* (14/31) e *S. intermedius* (14/31). Na IES, as espécies mais prevalentes foram *P. gingivalis* (21/29) e *C. rectus* (20/29);
- e) Quanto aos fatores de virulência, maiores quantidades de LPS foram encontradas na IEP e não houve diferença estatística nos níveis de LTA entre IEP e IES;
- f) Não houve diferença no volume da lesão periapical entre IEP e IES, porém maior nível de LPS foi correlacionado com maior volume de destruição óssea periapical e sinais e sintomas na IEP;
- g) Níveis de LTA não foram relacionados a sinais e sintomas ou ao volume da lesão periapical;
- h) Uma ampla interação de espécies bacterianas específicas resultou em diferentes características clínicas.

REFERÊNCIAS*

- Adib V, Spratt D, Ng YL, Gulabivala K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *Int Endod J*. 2004 Aug;37(8):542-51.
- Ahn SH, Song JE, Kim S, Cho SH, Lim YK, Kook JK, et al. NOX1/2 activation in human gingival fibroblasts by *Fusobacterium nucleatum* facilitates attachment of *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Microbiol*. 2016;198:573–83.
- Anderson AC, Hellwig E, Vespermann R, Wittmer A, Schmid M, Karygianni L, et al. Comprehensive analysis of secondary dental root canal infections: a combination of culture and culture-independent approaches reveals new insights. *PLoS One*. 2012;7:e49576.
- Baik JE, Kum KY, Yun CH, Lee JK, Lee K, Kim KK, et al. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2008 Nov;34(11):1355-1359. doi: 10.1016/j.joen.2008.08.014. Epub 2008 Sep 16. PubMed PMID: 18928846.
- 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*. 2016 Apr;42(4):552-6. doi: 10.1016/j.joen.2016.01.002. PubMed PMID: 27000273.
- Baumgartner J, Siqueira Jr J, Xia T, Róças IN. Geographical Differences in Bacteria Detected in Endodontic Infections Using Polymerase Chain Reaction. *J Endod*. 2004;30:141–4.
- Baumgartner JC. Microbiological and molecular analysis of endodontic infections. *Endod Top*. 2004;7:35–51.
- Bender IB. Factors influencing the radiographic appearance of bony lesions. *J Endod*. 1997 Jan;23(1):5-14.
- Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Oct;23(5):384-90. doi: 10.1111/j.1399302X.2008.00440.x. PubMed PMID 18793361.
- Bornstein MM, Lauber R, Sendi P, Von Arx T. Comparison of periapical radiography and limited cone-beam computed tomography in mandibular molars for analysis of anatomical landmarks before apical surgery. *J Endod*. 2011 Feb;37(2):151-7. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.014.

* 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 jan 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Cardoso FG, Chung A, Martinho FC, Camargo CH, Carvalho CA, Gomes BP, et al. Investigation of Bacterial Contents From Persistent Endodontic Infection and Evaluation of Their Inflammatory Potential. *Braz Dent J.* 2016 Jul-Aug;27(4):412-8. doi: 10.1590/0103-6440201600520. PubMed PMID: 27652703.

Cardoso FG, Ferreira NS, Martinho FC, Nascimento GG, Manhães LR Jr, 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 Jul;41(7):1015-9. doi: 10.1016/j.joen.2015.02.005. Epub 2015 Apr 30. PubMed PMID: 25935504.

Carrotte P. Surgical endodontics. *Br Dent J.* 2005 Jan 22;198(2):71-9. PubMed PMID: 15702099.

Cavalli D, Toia CC, Flores Orozco EI, Khoury RD, Cardoso FGDR, Alves MC, Carvalho CAT, Valera MC. Effectiveness in the Removal of Endotoxins and Microbiological Profile in Primary Endodontic Infections Using 3 Different Instrumentation Systems: A Randomized Clinical Study. *J Endod.* 2017 Aug;43(8):1237-1245. doi: 10.1016/j.joen.2017.03.032. Epub 2017 Jun 9. PubMed PMID: 28606669.

Cogulu D, Uzel A, Oncag O, Aksoy SC, Eronat C. Detection of *Enterococcus faecalis* in necrotic teeth root canals by culture and polymerase chain reaction methods. *Eur J Dent.* 2007;1:216–21.

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.

Dahlén G, Möler AJR. Microbiology of endodontic infections. In: Slots J, Taubman MA, editors. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. Saint Luis, Mo, USA: Mosby Year Book; 1992. p. 444-75.

Eliyas S, Vere J, Ali Z, Harris I. Micro-surgical endodontics. *Br Dent J.* 2014 Feb;216(4):169-77. doi: 10.1038/sj.bdj.2014.142. PubMed PMID: 24557386.

Enersen M, Nakano K, Amano A. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *J Oral Microbiol.* 2013;5:20265.

Estrela C, Bueno MR, Azevedo BC, Azevedo JR, Pécora JD. A new periapical index based on cone beam computed tomography. *J Endod.* 2008a Nov;34(11):1325-31. doi: 10.1016/j.joen.2008.08.013. Epub 2008 Sep 17.

Estrela C, Bueno MR, De Alencar AH, Mattar R, Valladares Neto J, Azevedo BC, Et al. Method to evaluate inflammatory root resorption by using cone beam computed tomography. *J Endod.* 2009 Nov;35(11):1491-7. doi: 10.1016/j.joen.2009.08.009. PubMed PMID: 19840636.

Estrela C, Bueno MR, Leles CR, Azevedo B, Azevedo JR. Accuracy of cone beam computed tomography and panoramic and periapical radiography for detection of apical periodontitis. *J Endod*. 2008b Mar;34(3):273-9. doi: 10.1016/j.joen.2007.11.023. Epub 2008 Jan 31. PubMed PMID: 18291274.

Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*. 1983 Jul;132(1):6-13.

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

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

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

Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Associations of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J*. 1994;27:291-8.

Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod*. 2012 Aug;38(8):1082-6. doi: 10.1016/j.joen.2012.04.021. PubMed PMID: 22794210.

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

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

Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial Analysis of Canals of Root-filled Teeth with Periapical Lesions Using Polymerase Chain Reaction. *J Endod*. 2008;34:537-40.

Gomes 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 Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102:247-53.

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

Hancock HH 3rd, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001 May;91(5):579-86. PubMed PMID: 11346739.

Harbarth S, Samore MH. Antimicrobial resistance determinants and future control. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:794–801.

Hausmann E, Lüderitz O, Knox K, Weinfeld N. Structural requirements for bone resorption by endotoxin and lipoteichoic acid. *J Dent Res.* 1975;54(Special issue B):B94-B99.

Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med.* 2004 Mar;33(3):162-9.

Hong SW, Baik JE, Kang SS, Kum KY, Yun CH, Han SH. Sodium Hypochlorite Inactivates Lipoteichoic Acid of *Enterococcus faecalis* by Deacylation. *J Endod.* 2016 Oct;42(10):1503-8. doi: 10.1016/j.joen.2016.06.018. Epub 2016 Aug 9. PubMed PMID: 27520407.

Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin & clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991 Apr;71(4):492-5.

Hummell DS, Swift AJ, Tomasz A, Winkelstein JA. Activation of the alternative complement pathway by pneumococcal lipoteichoic acid. *Infect Immun.* 1985;47:384-387.

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

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.

Keller R, Fischer W, Keist R, Bassetti S. Macrophage response to bacteria: Induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids. *Infect Immun.* 1992;60:3664-3672.

Keskin C, Demiryürek EÖ, Onuk EE. Pyrosequencing Analysis of Cryogenically Ground Samples from Primary and Secondary/Persistent Endodontic Infections. *J Endod.* 2017 Aug;43(8):1309-1316. doi: 10.1016/j.joen.2017.03.019. Epub 2017 Jun. PubMed PMID: 28648489.

Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 May;91(5):587-93.

Kirkevang LL, Vaeth M, Hörsted-Bindslev P, Bahrami G, Wenzel A. Risk factors for developing apical periodontitis in a general population. *Int Endod J*. 2007 Apr;40(4):290-9. Epub 2007 Feb 1.

Knox KW, Wicken AJ. Immunobiological properties of teichoic acids. *Bacter Rev* 1973;37:215-257.

Leite FR, Nascimento GG, Demarco FF, Gomes BP, Pucci CR, Martinho FC. Prevalence of treponema species detected in endodontic infections: systematic review and meta-regression analysis. *J Endod*. 2015 May;41(5):579-87. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.020. Epub 2015 Mar 17. Review. PubMed PMID: 25791076.

Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:547–58.

Loos M, Clas F, Fischer W. Interaction of purified lipoteichoic acid with the classical complement pathway. *Infect Immun* 1986;53:595-599.

Low KM, Dula K, Burgin W, Von Arx T. Comparison of periapical radiography and limited cone-beam tomography in posterior maxillary teeth referred for apical surgery. *J Endod*. 2008 May;34(5):557–62. doi: 10.1016/j.joen.2008.02.022.

Lysakowska ME, Ciebiada-Adamiec A, Sienkiewicz M, Sokolowski J, Banaszek K. The cultivable microbiota of primary and secondary infected root canals, their susceptibility to antibiotics and association with the signs and symptoms of infection. *Int Endod J*. 2016 May;49(5):422-30. doi: 10.1111/iej.12469. Epub 2015 Jun. PubMed PMID: 26011084.

Martinho FC, de Rabello DGD, Ferreira LL, Nascimento GG. Participation of endotoxin in root canal infections: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Dent*. 2017 Jul-Sep;11(3):398-406. doi: 10.4103/ejd.ejd_84_17. Review. PubMed PMID: 28932155; PubMed Central PMCID: PMC5594974.

Martinho FC, Leite FR, Nascimento GG, Cirelli JA, Gomes BP. Clinical investigation of bacterial species and endotoxin in endodontic infection and evaluation of root canal content activity against macrophages by cytokine production. *Clin Oral Investig*. 2014 Dec;18(9):2095-102.

Mohamed A, Steier L. Uncertain Decision-Making in Primary Root Canal Treatment. *J Evid Based Dent Pract*. 2017 Sep;17(3):205-215. doi: 10.1016/j.jebdp.2017.01.001. Epub 2017 Jan 28. Review. PubMed PMID: 28865817.

Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1998;31:1-7.

Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr.* 1966 Dec;74(5):Suppl:1-380.

Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, Gomes BP. Treponema species detected in infected root canals and acute apical abscess exudates. *J Endod.* 2010 Nov;36(11):1796-9. doi: 10.1016/j.joen.2010.08.008. PubMed PMID: 20951290.

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

Mörmann M, Thederan M, Nackchbandi I, Giese T, Wagner C, Hänsch GM. Lipopolysaccharides (LPS) induce the differentiation of human monocytes to osteoclasts in a tumour necrosis factor (TNF) α -dependent manner: A link between infection and pathological bone resorption. *Mol Immunol.* 2008;45:3330–7.

Pandey V, Choudhary I, Kumar V, Tripathi P, Misra A, Bagde H. Assessment of Correlation between Clinical Parameters and Pulp Canal Pathogens in Endodontic Pathologies: A Microbiological Study. *J Contemp Dent Pract.* 2016 Aug 1;17(8):654-8. PubMed PMID: 27659083.

Patel S, Wilson R, Dawood A, Foschi F, Mannocci F. The detection of periapical pathosis using digital periapical radiography and cone beam computed tomography - part 2: a 1-year post-treatment follow-up. *Int Endod J.* 2012a Aug;45(8):711-23. doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02076.x. PubMed PMID: 22775142.

Patel S, Wilson R, Dawood A, Mannocci F. The detection of periapical pathosis using periapical radiography and cone beam computed tomography - part 1: pre-operative status. *Int Endod J.* 2012b Aug;45(8):702-10. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01989.x. Epub 2011 Dec 21. PubMed PMID: 22188219.

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

Peciuliene V, Rimkuvienė J, Maneliene R, Ivanauskaite D. Apical periodontitis in root filled teeth associated with the quality of root fillings. *Stomatologija.* 2006;8(4):122-6.

Petti CA, Polage CR, Schreckenberger P. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J Clin Microbiol.* 2005;43:6123–5.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003;36:1-11.

Pourhajibagher M, Bahador A. Diagnostic accuracy of multiplex real-time PCR approaches compared with cultivation -based detection methods: Monitoring the endopathogenic microbiota pre and post photo-activated disinfection. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;22:140–6.

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

Rôças IN, Siqueira JF Jr, Andrade AF, Uzeda M. Oral treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR. *Int Endod J.* 2003 Jan;36(1):20-6. PubMed PMID: 12656510.

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

Ryu YH, Baik JE, Yang JS, Kang SS, Im J, et al. Differential immunostimulatory effects of Gram-positive bacteria due to their lipoteichoic acids. *Int Immunopharmacol* 2009; 9(1): 127-33.

Scarfe WC, Levin MD, Gane D, Farman AG. Use of cone beam computed tomography in endodontics. *Int J Dent*2009;2009:634567.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. PCR-based identification of *Treponema maltophilum*, *T amylovorum*, *T medium*, and *T lecithinolyticum* in primary root canal infections. *Arch Oral Biol.* 2002; 48:495–502.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000;89:744–8.

Siqueira Jr JF, Lopes HP, Elias CN. "Microbiologia Endodôntica." *Endodontia: biologia e técnica.* 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

Siqueira JF, Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001 Jan;34(1):1-10.

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

Smith GL, Socransky SS, Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol.* 1989 Mar;4(1):47-51.

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, et al. Use of checkerboard DNA–DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Dec;19(6):352-62. doi: 10.1111/j.1399-302x.2004.00168.x. PubMed PMID: 15491460.

Sousa EL, Martinho FC, Nascimento GG, Leite FR, Gomes BP. Quantification of endotoxins in infected root canals and acute apical abscess exudates: monitoring the effectiveness of root canal procedures in the reduction of endotoxins. *J Endod*. 2014 Feb;40(2):177-81. doi: 10.1016/j.joen.2013.10.008. Epub 2013 Dec 10. PubMed PMID: 24461400.

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

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. *J Endod*. 2006;32:93–8.

Tang Y, Sun F, Li X, Zhou Y, Yin S, Zhou X. *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharides induce RANKL by mouse osteoblast in a way different from that of *Escherichia coli* lipopolysaccharide *J Endod*. 2011 Dec;37(12):1653-8. doi: 10.1016/j.joen.2011.08.015.

Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K, et al. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod*. 2014 May;40(5):670-7. doi: 10.1016/j.joen.2013.10.005. Epub 2013 Nov 19. PubMed PMID: 24767562.

Torabinejad M, Rice DD, Maktabi O, Oyoyo U, Abramovitch K. Prevalence and size of periapical radiolucencies using cone-beam computed tomography in teeth without apparent intraoral radiographic lesions: a new periapical index with a clinical recommendation. *J Endod*. 2018 Mar;44(3):389-394. doi: 10.1016/j.joen.2017.11.015. Epub 2018 Feb 1. PubMed PMID: 29395115.

Tsai P, Torabinejad M, Rice D, Azevedo B. Accuracy of cone-beam computed tomography and periapical radiography in detecting small periapical lesions. *J Endod*. 2012 Jul;38(7):965–70. doi: 10.1016/j.joen.2012.03.001.

Venskutonis T, Daugela P, Strazdas M, Juodzbals G. Accuracy of digital radiography and cone beam computed tomography on periapical radiolucency detection in endodontically treated teeth. *J Oral Maxillofac Res*. 2014 Jul 1;5(2):e1. doi: 10.5037/jomr.2014.5201. eCollection 2014 Apr. PubMed PMID: 25089173; PubMed Central PMCID: PMC4115593.

Wu MK, Shemesh H, Wesselink PR. Limitations of previously published systematic reviews evaluating the outcome of endodontic treatment. *Int Endod J*. 2009 Aug;42(8):656-66. doi: 10.1111/j.1365-2591.2009.01600.x. Epub 2009 Jun 22. Review. PubMed PMID: 19548929.

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

Yang J, Park OJ, Kim J, Baik JE, Yun CH, Han SH. Lipoteichoic Acid of *Enterococcus faecalis* Inhibits the Differentiation of Macrophages into Osteoclasts. *J Endod.* 2016 Apr;42(4):570-4. doi: 10.1016/j.joen.2016.01.012. Epub 2016 Feb 23. PubMed PMID: 26920932.

Zoletti GO, Pereira EM, Schuenck RP, Teixeira LM, Siqueira JF Jr, dos Santos KR. Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. *Res Microbiol.* 2011;162:151–8.

APÊNDICE A – Ficha clínica

Nome: _____

Data: ____ / ____ / ____ DENTE _____

HISTÓRIA MÉDICA

Estado de saúde geral:				
Medicamento em uso:				
()Diabete	()Hepatite	()Coração	Pressão:	()Sinusite
()Rim	()Alergia	()Úlceras	()Alcoolismo	()Fígado
()Doença mental	()Doenças sangue	()Outras		
Problemas com anestesia:				
Outros:				

HISTÓRIA CLÍNICA

Queixa principal:				
TIPO DE DOR	()Provocada	()Espontânea	()Intermitente	()Contínua
	()Localizada	()Difusa		
Tomou analgésico ou outro medicamento?				
A dor cessa com analgésico?				
Dói há quanto tempo?				

EXAME CLÍNICO LOCAL

()Dente cariado	()Dente restaurado	()Edema	()Alteração de cor	()Mobilidade
()Fístula	()Extrusão	()Oclusão	()Problema periodontal	

TESTES

()Frio	()Calor	()Palpação	()Percussão
---------	----------	-------------	--------------

EXAME RADIOGRÁFICO

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

TRATAMENTO RADICAL

Medida aparente do dente no RX inicial:

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

Diâmetro do I.A.F. (nº do instrumento):
Diâmetro do I.A.I. (nº do instrumento):
Diâmetro cirúrgico do canal:
Escalonamento até:
Irrigação:
Curativo de demora:
Obturação (técnica e material):
Selamento:

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

CONTROLES RADIOGRÁFICOS

Data	Observações
1º	
2º	
3º	

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro(a) Senhor(a)

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: **“INFECÇÕES ENDODÔNTICAS PRIMÁRIA X SECUNDÁRIA: perfil microbiano, níveis de endotoxinas e ácido lipoteicóico”**.

O objetivo deste estudo é avaliar o perfil inicial da infecção endodôntica em pacientes que apresentem dentes que necessitem de tratamento ou retratamento de canal. Para esta avaliação, será coletado material do interior do canal dos dentes e, em seguida, será submetido à análise laboratorial, e também, observados sinais e sintomas e realização de exames de imagem para diagnóstico e detecção de lesão (radiografia periapical e tomografia computadorizada de feixe cônico). O tratamento de canal será realizado de forma convencional, utilizando equipamentos de última geração, buscando um resultado adequado e satisfatório.

O paciente como beneficiário, receberá tratamento endodôntico gratuitamente, com técnicas avançadas, seguindo protocolos consagrados que contribuirão para o sucesso do caso. Todo o tratamento de canal será realizado dentro das normas de biossegurança e serão realizados por profissionais altamente capacitados; os resultados obtidos trarão benefícios para outras pessoas uma vez que a pesquisa irá gerar avanços científicos com melhoras no tratamento de canal realizado na atualidade.

O projeto proposto tem riscos mínimos ao paciente por se tratar de um procedimento invasivo; podendo ocorrer imprevistos durante o atendimento em função do próprio tratamento. Os riscos podem ser próprios às condições do dente a ser tratado, como: a) fratura do mesmo durante o procedimento caso o elemento se encontre enfraquecido ou com presença de trincas; b) fratura do instrumento (não há complicações diretas em decorrência a este risco, uma vez que o material é inerte e estéril); c) dor pós-operatória (ocorre devido a um processo inflamatório superficial dos tecidos periapicais decorrentes da instrumentação do canal). No caso de algum imprevisto, o paciente será amparado e receberá todos os cuidados necessários para controlar quaisquer eventualidades.

INFORMAÇÕES E CONTATOS

Informações do pesquisador responsável:

Marcia Carneiro Valera, professora Titular da Disciplina de Endodontia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP, portadora do CPF 039.137.548-22, estabelecido à Avenida Eng. Francisco José Longo, 777, na cidade de São José dos Campos-SP, telefone para contato (12) 3947 9048.

Contato Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do ICT-UNESP:

Av. Francisco José Longo, 777 – São Dimas – CEP: 12.245-000 – São José dos Campos – SP ou pelo telefone: (12) 3947-9028, e-mail: ceph@fosjc.unesp.br. Informo que será garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela colaboração.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o(a) Sr. (a) _____, portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa das informações constantes neste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa proposta. Fica claro que o participante da pesquisa, pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica, ou inserir aqui o Código de Ética do sigilo profissional de sua profissão). Por fim, como pesquisador(a) responsável pela pesquisa, comprometo-me a cumprir todas as exigências contidas no item IV.3 e IV.4 (se pertinente) da resolução do CNS/MS n. 466 de dezembro de 2012, publicada em 13 de junho de 2013. Por estarmos de acordo com o presente termo o firmamos em duas vias. A primeira via ficará de posse do participante da pesquisa e a outra do pesquisador (caso o participante seja paciente, serão três vias, sendo que a terceira via fará parte do prontuário). Todas as vias serão rubricadas em todas as suas páginas e assinadas ao seu término.

Assinatura Paciente

Assinatura Pesquisador

*Professora Titular da Disciplina de Endodontia do Instituto de Ciência e
Tecnologia de São José dos Campos - UNESP*

APÊNDICE C – Meio de Cultura

Fastidious Anaerobe Ágar (FAA – Neogen Corporation, Michigan, EUA)

Preparo

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

Enriquecimento do Meio

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

APÊNDICE D – Realização da curva padrão

- A) Ver certificado para conferência do número do lote e quantidade de volume para endotoxina.
- B) Colocar a quantidade de água apirogênica (Lonza, Walkersville, MD, EUA) de acordo com as instruções do fabricante na endotoxina de *E. coli*, encontrado no kit fornecido pela empresa (Figura 15).

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



Fonte: Elaborado pelo autor.

- C) Agitar a suspensão durante 15 minutos.
- D) Separar 4 tubos de vidro apirogênicos, tamanho 13 mm x 100 mm (Lonza, Walkersville, MD, EUA), identificá-los de acordo com as diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) e pipetar 900 μ L de água apirogênica em cada tubo de vidro (Figura 16).

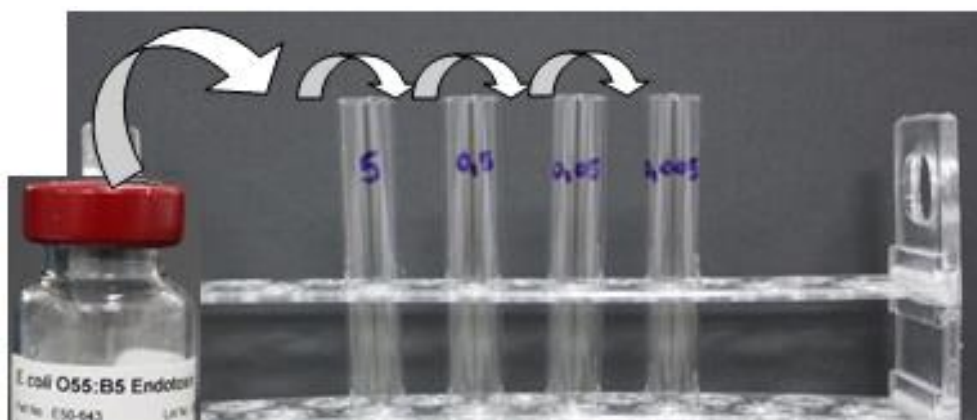
Figura 16 – Tubos de vidro apirogênicos necessários para diluição da endotoxina



Fonte: Elaborado pelo autor.

- E) Decorridos os 15 minutos, transferir 100 μL da suspensão de endotoxina para o tubo “5” (referente à diluição 10^{-1}). Agitar 1 minuto, transferir 100 μL para o próximo tubo “0,5” (referente à diluição 10^{-2}) e assim sucessivamente (Figura 17).

Figura 17 – Esquema de diluições da endotoxina para realização da curva padrão.



Fonte: Elaborado pelo autor.

ANEXO A – Comitê de Ética / Plataforma Brasil / CEP

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Infecções endodônticas primária x secundária: carga e perfil microbiano, níveis de endotoxinas e ácido lipoteicoico e sinais e sintomas

Pesquisador: Marcia Carneiro Valera

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 85955018.8.0000.0077

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.708.907

Apresentação do Projeto:

Neste projeto serão selecionados pacientes com sessenta dentes unirradiculares, sendo trinta com infecção endodôntica primária (GI) e trinta com infecção endodôntica secundária (GII). Inicialmente, serão avaliados sinais e sintomas. Todos os dentes serão radiografados e submetidos à TCFC para verificação da destruição óssea periapical. Coletas do conteúdo do canal radicular serão realizadas após abertura coronária (GI) e após remoção do material obturador para os casos de retratamento (GII). Os conteúdos coletados serão submetidos à cultura microbiológica (UFC/mL), identificação microbiológica pelo método molecular Checkerboard DNA-DNA hybridization, quantificação de endotoxinas (EU/mL) pelo teste Lisado Amébocito de Limulus e níveis de LTA pelo método ELISA. A volumetria da destruição óssea periapical será avaliada por meio da TCFC utilizando o software Nemotec®. Os dados serão analisados estatisticamente comparando o perfil das infecções endodônticas primária (GI) x secundária (GII).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Os objetivos deste estudo serão obter o perfil inicial das infecções endodônticas primária e secundária avaliando: a) carga microbiana por cultura de anaeróbios (UFC/mL) e identificação microbiológica por Checkerboard; b) quantificação dos níveis de endotoxinas (EU/mL) e ácido lipoteicoico (LTA); c) relacionar UFC/mL e perfil microbiológico com sinais e sintomas clínicos e

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

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



Continuação do Parecer: 2.708.907

com o volume da lesão periapical (mm^3), através do uso de tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC); d) relacionar os níveis de endotoxinas e de LTA com sinais e sintomas clínicos e com volume de lesões por TCFC.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O projeto proposto poderá acarretar em riscos mínimos ao paciente por se tratar de um procedimento invasivo; podem ocorrer imprevistos durante o atendimento em função do próprio tratamento. Os riscos podem ser inerentes às condições do dente a ser tratado, como: a) fratura do mesmo durante o procedimento caso o elemento se encontre enfraquecido ou com presença trincas; b) fratura do instrumento durante a remoção do

material obturador (não há complicações diretas em decorrência a este risco, uma vez que o material é inerte e estéril); c) dor pós-operatória (ocorre) devido a um processo inflamatório superficial dos tecidos periapicais decorrentes da instrumentação do canal). No caso de algum imprevisto, o paciente será amparado e receberá todos os cuidados necessários para controlar quaisquer eventualidades.

Benefícios:

o tratamento de canal será realizado de forma convencional, utilizando equipamentos de última geração para otimizar o tratamento, buscando um resultado adequado e satisfatório. Os medicamentos a serem utilizados possuem comprovação científica de ausência de efeitos tóxicos para o organismo. Além disso, todo o tratamento de canal será realizado dentro das normas de biossegurança e serão realizados por profissionais altamente capacitados; os resultados obtidos trarão benefícios para outras pessoas uma vez que a pesquisa irá gerar avanços científicos com melhoras no tratamento de canal realizado na atualidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O objetivo deste estudo será verificar o perfil inicial das infecções endodônticas primária e secundária, avaliando: a) carga microbiana por cultura de anaeróbios (UFC/mL) e identificação microbiológica por Checkerboard; b) quantificação dos níveis de endotoxinas (EU/mL) e ácido lipoteicoico (LTA); c) relacionar UFC/mL e perfil microbiológico com sinais e sintomas clínicos e com o volume inicial da lesão periapical (mm^3), através do uso de tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC); d) relacionar os níveis de endotoxinas e de LTA com sinais e sintomas clínicos e com o volume das lesões periapicais por TCFC. Para isso, serão selecionados sessenta dentes

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

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



Continuação do Parecer: 2.708.907

unirradiculares, sendo trinta com infecção endodôntica primária (GI) e trinta com infecção endodôntica secundária (GII). Inicialmente, serão avaliados sinais e sintomas. Todos os dentes serão radiografados e submetidos à TCFC para verificação da destruição óssea periapical. Coletas do conteúdo do canal radicular serão realizadas após abertura coronária (GI) e após remoção do material obturador para os casos de retratamento (GII). Os conteúdos coletados serão submetidos à cultura microbiológica (UFC/mL), identificação microbiológica pelo método molecular Checkerboard DNA-DNA hybridization, quantificação de endotoxinas (EU/mL) pelo teste Lisado Amebócito de Limulus e níveis de LTA pelo método ELISA. A volumetria da destruição óssea periapical será avaliada por meio da TCFC utilizando o software Nemotec®. Os dados serão analisados estatisticamente comparando o perfil das infecções endodônticas primária (GI) x secundária (GII). Levando em consideração o tema abordado, existem trabalhos que avaliam a infecção endodôntica primária e secundária quanto ao perfil microbiano, associando as análises microbiológica, de endotoxinas e sinais e sintomas (Gomes et al., 2004; Blome et al., 2008; Gomes et al., 2012; Tennert et al., 2013; Leite et al., 2015; ysakowska et al., 2016; Pandey et al., 2016; Keskin et al., 2017). Entretanto, até o presente momento não foram relacionadas tais análises com os níveis de LTA e volume inicial das lesões periapicais por TCFC e sua relação com sinais e sintomas. Sendo assim necessário um estudo mais aprofundado sobre o tema, o que trará uma significativa contribuição para a área de endodontia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Avaliamos que o TCLE está bem construído, com todos os dados obrigatórios, sem ser muito extenso e utilizando uma linguagem adequada.

Recomendações:

Não temos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Percebemos que o pesquisador alterou a idade dos pesquisados, não necessitando do Termo de Assentimento. Respondeu a todas as pendências apresentadas e, não havendo mais nenhuma consideração, aprovamos o projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

O (a) pesquisador(a) irá receber e-mail da Secretaria do CEPH-ICT-CAMPUS DE SJCAMPUS-UNESP, para envio de relatórios parciais/final, para não incorrer na penalidade de não o fazendo, em não ter novas submissões avaliada pelo Comitê de Ética, até que sane a pendência de envio do

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

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



Continuação do Parecer: 2.756.907

relatório, na forma de notificação através do sistema da Plataforma Brasil. Obs:- No site do www.ict.unesp.br
– Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos, encontrará o formulário para envio do Relatório parcial/final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	formulario_resp_pendencia.pdf	22/05/2018 09:21:23	CARLOS ALBERTO GUEDES	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1085389.pdf	19/05/2018 00:04:48		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEreformulado.pdf	18/05/2018 23:58:14	Marcia Carneiro Valera	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoreformulado.pdf	18/05/2018 23:57:46	Marcia Carneiro Valera	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	consentimentolivreescarecidofelipe.pdf	08/03/2018 13:32:27	Marcia Carneiro Valera	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto dissertacao felipemachado.pdf	08/03/2018 13:31:38	Marcia Carneiro Valera	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoProfaMarcia.pdf	08/03/2018 13:29:34	Marcia Carneiro Valera	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 12 de Junho de 2018

Assinado por:
Denise Nicodemo
(Coordenador)

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