

ANA TERESA SANT'ANNA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA RESPOSTA
DOS TECIDOS PERIAPICAIS DE DENTES DE
MACACO À ENDOTOXINA ASSOCIADA AO
FORMOCRESOL**

ARARAQUARA

2003

ANA TERESA SANT'ANNA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA
RESPOSTA DOS TECIDOS PERIAPICAIS DE
DENTES DE MACACO À ENDOTOXINA
ASSOCIADA AO FORMOCRESOL**

Tese de Doutorado em Odontopediatria

Orientadora: Profa. Dra. Lizete T. O. Ramalho

Co-orientadora: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

ARARAQUARA

2003

Sant'Anna, Ana Teresa

Avaliação histológica da resposta dos tecidos periapicais de dentes de macaco à endotoxina associada ao formocresol / Ana Teresa Sant'anna Laguna. – Araraquara : [s.n.], 2003.

104 f ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lizeti T. O. Ramalho

Co-orientadora: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

1. Endodontia 2. Dente decíduo 3. Endotoxina I. Título

ANA TERESA SANT'ANNA LAGUNA

NASCIMENTO 09.03.1970 - RIBEIRÃO PRETO/SP

FILIAÇÃO RONEY DE PAULO SANT'ANNA

JACYRA BOSSA SANT'ANNA

1989/1992 Curso de Graduação

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP

1994/1995 Curso de Especialização em Odontopediatria - Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto - USP

1998/2000 Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria nível de Mestrado -
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Professora das Disciplinas de Cariologia, Odontopediatria e
Odontologia para Bebês - Universidade de Franca.

2001-2003 Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria nível de Doutorado -
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Professora das Disciplinas de Odontopediatria e Ortopedia Funcional
dos Maxilares - Universidade de Franca.

É com imensa gratidão que dedico este trabalho

A Deus,

Que, com seu infinito amor, permitiu esta caminhada.

Obrigada por estar comigo.

À minha família, **Fabrício, João e Francisco,**

Vocês são minha fonte de amor e equilíbrio.

Aos meus pais, **Roney e Jacyra,**

Por todo amor e dedicação que sempre nos devotaram. E pelos avós maravilhosos que são.

À minha querida irmã, **Ana Maria,**

Minha maior amiga e companheira, sempre compartilhando de todos os momentos da minha vida.

Agradecimentos especiais

Profa Dra. **Lizeti Toledo Oliveira Ramalho,**

Sua alegria de viver é contagiante. Saiba que sua amizade marcou minha vida.

Sou sua eterna admiradora.

Prof. Dr **Dionísio Vinha,**

Desde a graduação, sua figura foi marcante como grande mestre.

Obrigada pelo estímulo constante e por acreditar em meu trabalho.

Prof. Dr. **José Américo de Oliveira e equipe**

Obrigada pela acolhida calorosa e pelo trabalho impecável que realizaram.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- UNESP, na pessoa do atual Exmo. Diretor, Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached

Ao Curso de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, por meio de sua Coordenadora Geral, Profa. Dra. Rosemary Adriana Chierice Mancantonio

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, na pessoa da Profa. Dra. Rita de Cássia Loyola Cordeiro.

Aos Professores do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Profa. Dra. Angela Cristina Cilense Zuanon, Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansanni, Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro, Prof. Dr. Fábio César Braga Abreu e Lima, Profa. Dra. Josimeri Hebbeling Costa, Profa. Dra. Lourdes Ap. Martins dos Santos-Pinto, Profa. Dra. Rita de Cássia Loyola Cordeiro.

À Profa. Elisa Maria Aparecida Giro, pelo incentivo, confiança e dedicação.

Aos queridos professores Luís Carlos e Denise Spolidório, grandes amigos e incentivadores. Obrigada pela atenção.

Às colegas do Curso de Pós- Graduação: Cláudia, Márcia e Marcela pela amizade renovada dia a dia.

Aos colegas de docência da UNIFRAN, Soraia e Fernanda, pela amizade sincera e companheirismo de todas as horas.

Aos meus queridos amigos Luís Antônio Potenza e Pedro Sergio Simões, sem vocês este trabalho não existiria. Pelas suas mãos obtive lâminas maravilhosas.

Aos meus grandes amigos Luís José, Wlamir, Marlei e Cristina. Vocês são os jovens exemplos que tento seguir.

Aos professores e funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto- USP. Em especial à Profa. Lea Assed Bezerra da Silva, pela atenção.

Aos funcionários do Setor de Pós-graduação, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, especialmente à Mara, Rosângela, Vera e Guilherme, pela disponibilidade e paciência.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara, em especial à Maria José e Maria Helena.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Célia, Sônia, Adriana, Tânia, Sílvia, Dulce, Dona Odete, Toninho, Edinho e Diego, pela amizade e colaboração de todo dia.

Aos funcionários do 6º andar, Luís, Pelícola, Conceição, Dona Maria, Belinha e Pedrinho, pelo companheirismo e dedicação.

À CAPES, pelo auxílio obtido

A todos os amigos, pela alegria e carinho a mim dedicados e pelo bem que me fizeram com sua convivência.

LISTA DE ABREVIATURAS

C^{14} = carbono radioativo

Ca = cálcio

CO₂ = dióxido de carbono

DNA = ácido desoxirribonucleico

E.coli = Escherichia coli

FC = formocresol

FNT = fator de necrose tumoral

FNT- α = fator de necrose tumoral α

HC = hidróxido de cálcio

H.E. = hematoxilina e eosina

Ig = imunoglobulina

IL = interleucina

IL-1 α = interleucina 1 α

IL-1 β = interleucina 1 β

KDO = 2-keto 3-deoxioctanato

LPS = lipopolissacáride ou endotoxina

LPS/FC = mistura endotoxina e formocresol

LPS + • FC = solução de endotoxina e bolinha de algodão com formocresol

OAF = fator ativador de osteoblasto

PG2= prostaglandina 2

PGE = prostaglandina

PMCC = paramonoclorofenolcanforado

PTH = hormônio paratireoideano

RTF = meio microbiológico reduced transport medium

RX = radiografias

T.M. = tricrômico de Masson

ZOE = óxido de zinco eugenol

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
REVISÃO DA LITERATURA	16
PROPOSIÇÃO	51
MATERIAL E MÉTODO	53
RESULTADO	65
DISCUSSÃO	74
CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	83
RESUMO	99
ABSTRACT	101
ANEXO	103

Introdução

Terapia pulpar para dentes decíduos é um dos assuntos mais divergentes na área da Odontopediatria, pois muitas são as técnicas e medicamentos disponíveis no mercado com eficácia comprovada.

Formocresol é o medicamento mais antigo e popular para tratamento endodôntico dos dentes decíduos. Foi introduzido por Buckley⁸, em 1904 e desde então tem sido um dos medicamentos mais estudados. Sua fórmulação em 19% de formaldeído, 35% de cresol e 15% de veículo glicerina e água.

Na década de 30, Sweet⁷⁴,1930 preconizou a pulpotomia formocresol para tratamento de dentes decíduos com pulpites e Coodlidge⁹, 1932 mostrou histologicamente que o formocresol utilizado na concentração original é capaz de fixar o tecido pulpar, mantendo o dente em função até a época de exfoliação.

Mais tarde, na década de 70, Straffon & Han⁷¹, em 1970 e Morawa et al.³⁹, em 1975 propuseram a diluição deste medicamento em 1/5. Esta diluição apresentou o mesmo efeito tecidual que o formocresol concentrado utilizado anteriormente.

Estudos clínicos e radiográficos demonstraram a efetividade do formocresol concentrado no tratamento endodôntico de dentes decíduos com e sem vitalidade (Droter¹⁶,1963; Rölling et al.⁵⁸,1976; Boeve & Dermaut⁶, 1982; van Amerongen et al.⁷⁹,1986; Mulder et al.⁴²,1987; Nunn et al.⁴⁸,1996).

Porém o uso de medicamentos a base de formaldeído tem sido criticado devido ao seu provável potencial mutagênico e carcinogênico (Block⁵, 1983; Lewis³²,1998; Lewis³³,1981; Squire & Cameron⁶⁹,1984).

Myers et al.⁴⁴, em 1978; Myers et al.⁴⁵, em 1983 e Pashley et al.⁵¹, em 1980 demonstraram a ação sistêmica do formocresol.

Ainda hoje o formocresol vem sendo o medicamento mais utilizado para pulpotomias, segundo levantamentos realizados nos Estados Unidos, Canadá e Reino Unido.(Avram & Pulver², 1989; Primosch et al.⁵³, 1997; Llewelyn³⁵,2000).

O formocresol mostrou ser bactericida para microrganismos gram-positivos, gram-negativos, aeróbios e anaeróbios (Sundqvist⁷³,1992; Ohara⁴⁹, 1993; Tchaou⁷⁵,1996).

Esta característica é de extrema importância pois bactérias gram-negativas são os microrganismos predominantes em canais radiculares dos dentes com necrose pulpar (Schein & Shilder⁶³,1975). Essas bactérias apresentam alto poder destrutivo, pois geram produtos e subprodutos tóxicos aos tecidos apicais e periapicais (Rietchiold & Brade⁵⁷,1992; Barthel³, 1997). Isto ocorre porque esses microrganismos apresentam além de membrana celular, parede celular ou membrana esquelética constituída por proteínas, lipoproteínas e lipopolissacarídeos também denominados de endotoxina (Dahlén et al.¹⁴,1981; Dwyer & Torabinejad¹⁷,1981; Pitts et al.⁵²,1982; Mattison et al.³⁸,1987; Rietchiold & Brade⁵⁷,1992).

A endotoxina é liberada durante a multiplicação celular ou lise da bactéria promovendo uma série de respostas biológicas tais como inflamação periapical e reabsorção óssea (Dwyer & Torabinejad¹⁷,1981; Mattison et al.³⁸,1987; Pitts et al.⁵²,1982; Stashenko⁷⁰,1990). Sua atuação sobre os macrófagos (Rietveld & Brade⁵⁷,1992) e neutrófilos (Munford & Hall⁴³, 1986) desencadeia a liberação de mediadores químicos como TNF (Fator de Necrose Tumoral), Interleucinas (1, 6 e 8), interferon-alfa e prostaglandinas, aumentando o efeito inflamatório (Safavi & Rossomando⁶¹,1991; Wang & Stashenko⁸⁰,1991). Além disso, ativa o sistema complemento e o metabolismo do ácido aracdônico, provocando aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia para neutrófilos e macrófagos, liberação de prostaglandinas, causando sintomatologia dolorosa (Cotran et al.¹⁰,1991; Horiba et al.²⁵,1991; Morrison & Kline⁴⁰,1977; Raiz⁵⁵,1974). Estas citocinas estimulam também a reabsorção óssea, através de suas influências sobre os osteoclastos (Safavi & Nichols⁵⁹,1993; Wang & Stashenko⁸⁰,1991; Jiang et al.²⁹, 2003).

Nos últimos anos, trabalhos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de observar qual medicamento disponível no mercado é capaz de inativar a endotoxina bacteriana, eliminando assim seu potencial tóxico. Já foram estudados a soda cáustica (Dwyer & Torabinejad¹⁷,1981) enzimas neutrofílicas (Munford & Hall⁴³, 1986) e hidróxido de cálcio (Safavi & Nichols⁶⁰,1994; Barthel³, 1997; Silva et al.⁶⁷,2002; Jiang et al.²⁹, 2003).

Sendo o formocresol um medicamento utilizado para tratamento endodôntico de dentes decíduos e pelo fato de estes dentes apresentarem

endotoxina em seu sistema de canais radiculares, a proposta deste trabalho é avaliar histologicamente a reação do tecido periapical de dentes de macacos tratados endodoticamente com a associação endotoxina/formocresol.

Revisão da literatura

Formocresol

Devido a vasta literatura a respeito do formocresol, será realizada uma breve retrospectiva até a década de 70, iniciando a revisão de literatura propriamente dita a partir de 1980.

O formocresol foi introduzido por Buckley⁸, em 1904 para tratamento de canais de dentes decíduos e permanentes e desde então vem sendo amplamente estudado.

No início do século passado predominavam estudos verificando a ação bactericida do medicamento. A partir da década de 30 iniciaram-se estudos histológicos avaliando os efeitos deste medicamento sobre o tecido pulpar.

Nas décadas de 60 e 70 observa-se uma predominância nos estudos clínicos, com o acompanhamento clínico e radiográfico de pulpotomias em dentes decíduos utilizando-se formocresol como curativo. Nestes estudos observa-se um índice elevado de sucesso deste medicamento sendo este, então, recomendado para pulpotomias em dentes decíduos.

Desta época iniciaram os trabalhos relacionados com os efeitos biológicos de medicamentos a base de formaldeído. Destaca-se na literatura o artigo de Myers et al.⁴⁴, em 1978, realizaram pulpotomias com curativo de

formocresol por 5 minutos, em dentes decíduos e permanentes de macacos, utilizando formaldeído marcado (^{14}C formaldeído) na composição do formocresol. Com isso, os autores pretendiam determinar absorção sistêmica desse formaldeído. O formaldeído marcado foi observado no plasma e na urina, após 2 horas. Pulpotomias de 5 minutos resultaram em absorção sistêmica de, aproximadamente, 1% da dose colocada no dente. Duas horas após as pulpotomias, não foi encontrado aumento na absorção sistêmica da droga.

Pashley et al.⁵¹, em 1980, utilizaram formaldeído marcado com ^{14}C , na formulação do formocresol, para observar a absorção sistêmica desse medicamento, após a realização de múltiplas pulpotomias em cães. Foram feitas 16 pulpotomias nos dentes anteriores, superiores e inferiores. Os curativos foram realizados com bolinhas de algodão, com 10 μl de formocresol de Buckley, por 5 minutos. Os curativos do primeiro cão continham 17 μCi e, no segundo cão, 45 μCi , de C^{14} de formaldeído contido no formocresol. As amostras de sangue foram coletadas 15, 30, 45 e 60 minutos após as pulpotomias. As coletas de urina foram feitas de 0-20, 20-40, 40-60 minutos. Após 60 minutos, os cães foram sacrificados e amostras de tecido do pulmão, fígado, baço, músculo esquelético, coração e rim foram coletadas, além de líquido cérebro-espinhal e bile. Foram encontrados traços do formaldeído marcado no rim, fígado, sangue, pulmão e líquido cérebro-espinhal, mostrando que esse medicamento é absorvido sistemicamente.

Em 1981, Gazi et al.²² realizaram estudo *in vivo*, através de implantes de polietileno, em dorso de ratos, avaliando o potencial irritante do formocresol, formocresol diluído (50% em propilenoglicol) e solução salina (controle) sobre o

tecido conjuntivo subcutâneo. Num mesmo animal, administraram-se os três materiais, e os períodos de análise foram 1 dia, 1, 2 e 4 semanas. Concluiu-se que o formocresol diluído 50% tem ação bactericida e produz menos irritação tecidual que o formocresol concentrado.

Lewis & Chestner³³, em 1981, em revisão de literatura, levantaram a questão do uso do formaldeído em medicamentos odontológicos, particularmente como constituinte do formocresol, que é usado em larga escala em Odontopediatria. A questão surgiu principalmente porque o formaldeído não tem formulação determinada, sua dosagem, muitas vezes, é arbitrária, além de ser um medicamento comprovadamente tóxico, mutagênico e com potencial carcinogênico.

Cunningham et al.¹¹, 1982 avaliaram o efeito do formocresol e glutaraldeído sobre algumas enzimas presentes em polpas de bois através de estudo *in vitro*. Polpas de 1os e 2os molares permanentes inferiores de bezerros foram removidas, limpas com solução salina, tratadas por 2 horas à temperatura ambiente com 5 ml com uma das seguintes soluções: 0,85 de solução salina; 100% de glicerina; 0,5, 1,0 ou 5,0% de glutaraldeído ou formocresol nas diluições 1:5 ou 1:25. Após o tratamento as amostras de polpas foram lavadas para avaliação do lactato desidrogenase e medida da fosfatase alcalina. Glutaraldeído a 1% e formocresol na diluição 1:5 reduziram a porcentagem de lactato desidrogenase e a atividade da fosfatase alcalina, porém a fosfatase alcalina menos intensamente. A lactato desidrogenase mostrou ser mais sensível aos medicamentos que a fosfatase alcalina.

Boeve & Dermaut⁶, em 1982 avaliaram clínica e radiograficamente o tratamento com formocresol em dentes decíduos com necrose e abscesso, após 36 meses observaram uma porcentagem de sucesso de 87%.

Esses achados levaram Myers et al.⁴⁵, em 1983, a pesquisar as alterações celulares ocorridas no fígado, rim, pulmão e coração, após múltiplas pulpotomias em cães. Após 6 horas do ato operatório, os animais foram sacrificados, e os órgãos foram analisados. O rim e o fígado mostraram alterações sugestivas de injúria tecidual, principalmente o fígado, que apresentou evidência de edema celular. O pulmão e coração não apresentaram alterações.

Na mesma linha de pesquisa em relação à distribuição sistêmica do formaldeído, Block et al.⁵, em 1983, realizaram pulpotomias com formocresol, utilizando formaldeído marcado com ¹⁴C em 4º pré-molares inferiores de 4 cães. A técnica utilizada foi a de curativos de 5 minutos com o medicamento. Em cada cão, foram feitas biópsias dos linfonodos, fígado e rim, e coleta de amostra de sangue em intervalos de 1 hora, 1, 7, 14 e 28 dias. Após 28 dias, os cães foram sacrificados, e os tecidos dos órgãos foram analisados em microscopia óptica. O exame histológico demonstrou destruição severa dos tecidos pulpare adjacentes à pulpotomia, com produtos de desintegração na polpa, no tecido periapical e periodontal. E ainda foram encontrados traços de formaldeído marcado no sangue, nos linfonodos, no fígado e rim, e a presença desse radioisótopo foi diminuindo com o tempo.

Bengtson et al.⁴, em 1986, avaliaram, clínica e radiograficamente, pulpotomias com formocresol em 84 dentes decíduos vitais. Foram utilizados

curativos com formocresol de Buckley, diluído (1/5) por 10 minutos. A avaliação clínica e radiográfica foi feita em período de 3 a 8 meses, 9 a 12 meses e 13 a 18 meses. O grau de sucesso obtido para 3 a 8 meses foi de 95%; para 9 a 12 meses, 93% e, 13 a 18 meses, 100%; sendo que a média de sucesso no trabalho foi de 96,4%.

van Amerongen et al.⁷⁹, em 1986, fizeram um trabalho dividido em duas partes. Na primeira parte, avaliaram a duração de pulpotomias com formocresol em 152 dentes, comparando-os com seus correspondentes contra-laterais. A duração de cada dente foi determinada pelo registro do tempo de exfoliação ou extração. Esse registro incluía fatores que poderiam ter influenciado o tempo de duração do dente. Os autores concluíram que não existe diferença significativa entre a duração dos dentes tratados com pulpotomia e os não tratados, e também não existe diferença significativa entre o tempo de duração de dentes tratados, que apresentavam vitalidade, daqueles que não apresentavam, durante o ato operatório.

Na segunda parte do trabalho, Mulder et al.⁴², em 1987, dão enfoque aos resultados das pulpotomias sobre os dentes sucessores permanentes. No contexto do estudo, os autores avaliaram a ocorrência de distúrbios nos sucessores permanentes, através da observação de lesões no esmalte e hipoplasia. Foram avaliados 278 pré-molares, divididos em grupos teste e controle. Os dentes foram avaliados por 2 observadores que analisaram lesões no esmalte, fazendo a diferenciação de hipoplasia. As principais conclusões do trabalho foram: não houve diferença significativa em número de dentes com lesão entre os grupo teste

e controle; quando se relacionou a idade do paciente, ao receber a pulpotomia, não se observou diferença significativa; não houve diferença entre hipoplasia e lesão de esmalte, em relação à idade dos dentes, ao receber pulpotomia, e o formocresol não exerceu nenhuma influência no tamanho de lesões de esmalte encontradas do grupo teste. As conclusões gerais do estudo foram que a pulpotomia com formocresol é uma técnica de sucesso para dentes decíduos e não implica nenhum dano aos sucessores permanentes.

Em 1987, Jeng et al.²⁸ utilizaram cultura de células para avaliar a citotoxicidade do formocresol e seus componentes (formaldeído, cresol) e também do glutaraldeído, tido como substituinte do formocresol, na clínica. Foram feitas culturas de fibroblastos, nas quais foram determinadas as concentrações das drogas que seriam não tóxicas para fazer uma comparação quantitativa dos agentes testados. O formaldeído foi o componente mais tóxico. O glutaraldeído, 2,5%, foi 15 a 20 vezes menos tóxico que o formocresol ou o formaldeído, 19%.

Avram & Pulver², em 1989 realizaram pesquisa sobre terapias pulparez indicadas por especialistas canadenses e escolas de Odontopediatria. A pesquisa foi realizada através de questionário. Os autores verificaram que o formocresol é o material de escolha para 50% dos especialistas canadenses, 40,8% dos chefes de Departamento de Odontopediatria utilizam esse material para tratamento endodôntico de dentes decíduos vitais.

Feigal & Messer²⁰, em 1990, realizaram uma revisão de literatura do glutaraldeído e o formocresol, focalizando sua distribuição sistêmica, sua citotoxicidade e mutagenicidade. Glutaraldeído é melhor agente fixador que o

formocresol, pois sua fixação é superficial. Essa propriedade resulta em menor zona de necrose e limitação na fixação em porções mais profundas do tecido. Esses efeitos teciduais indicam que o glutaraldeído é mais vantajoso como agente em pulpotomias, porém esses resultados não têm relação com os achados clínicos. Como não se tem nenhuma prova de que o glutaraldeído dá melhores resultados que o formaldeído, os autores sugerem que esse material não pode ser considerado um substituto do formocresol. Para ser aceito como uma alternativa para o formocresol, deveria mostrar sucesso equivalente e ainda maior segurança no seu uso. Os dados da literatura mostraram que o glutaraldeído tem citotoxicidade semelhante à do formaldeído.

Trope⁷⁸, em 1990, comparou o efeito de 3 medicamentos intracanaís, na incidência de dor pós-instrumentação. Foi feita instrumentação de 474 dentes. Os dentes foram irrigados com hipoclorito de sódio a 0,5%. Os dentes que não apresentavam sinais radiográficos de periodontite foram instrumentados até 1-2 mm do ápice do canal; e os dentes que apresentavam evidências radiográficas de periodontite foram instrumentados de 0,5 a 1mm do ápice radiográfico do canal. Os medicamentos utilizados como curativo foram formocresol (156 dentes), Ledermix (160 dentes), e hidróxido de cálcio (158 dentes). De todos os dentes tratados, apenas 12 apresentaram dor pós-instrumentação, e estes eram dentes que tinham algum envolvimento periapical evidente radiograficamente. Seis dos 12 dentes, ocorreram em retratamento, e 6, em dentes sem tratamento endodôntico prévio. Não houve diferença significativa entre o uso dos 3 medicamentos.

Em estudo do potencial embriogênico e teratogênico do formocresol, Friedberg & Gartner²¹, em 1990, utilizaram esse material nas concentrações 25 e 50%, em fetos de pintinhos. Foi injetado formocresol em embriões de pintinhos, 48 horas após eles serem botados, e o sacrifício foi feito 9 dias após a incubação. Foram utilizados 132 ovos na pesquisa, divididos em 4 grupos: 1- formocresol 25%; 2- formocresol 50%; 3- glicerina, e 4- o ovo era aberto, a agulha era inserida, mas não era injetado nada. A porcentagem de mortalidade foi de 4,8% para os ovos que foram apenas perfurados; 17,7% para os ovos injetados com veículo; 40% para os ovos com formocresol 25%; e 100% para os ovos com 50% de formocresol. O formocresol mostrou ser embriotóxico e teratogênico, pois produziu anormalidades de peso e tamanho dos embriões, hematomas craniofaciais, anormalidades faciais, deformidades nos olhos e no bico, mudanças histológicas, incluindo alteração na organização dos olhos, formação do bico, palato, vasos, músculos, cartilagem e osso.

Ranly & Garcia-Godoy⁵⁶, em 1991, também confirmam a preocupação com materiais endodônticos, salientando que existe uma tendência na utilização de materiais com menor toxicidade como o formocresol diluído e pastas à base de iodofórmio (kri-past).

Devido ao uso do formocresol também para dentes com necrose pulpar, Ohara et al.⁴⁹, em 1993 avaliaram “*in vitro*” o efeito de vários medicamentos endodônticos (formocresol, eugenol, glutaraldeído, iodato de potássio) sobre 6 bactérias anaeróbias (*Peptococcus magnus*; *Proprienibacterium acnes*; *Veillonella parvula*; *Lactobacillus fermentum*; *Prorphyromonas gingivalis*; *Fusobacterium*

necleatum) e observaram que o formocresol foi o material que obteve melhor resultado contra as bactérias estudadas.

Yamasaki et al.⁸³, em 1994, investigaram o efeito do formocresol sobre tecido periapical de ratos, após pulpectomia. Foram feitas pulpectomias no canal mesial dos 1^{os} molares inferiores diretos, e os curativos foram divididos em 3 grupos: grupo A: curativo com solução salina; grupo B: curativo com cone de papel embebido com formocresol; e grupo C foi colocada 1 gota de formocresol no canal e, posteriormente, colocado curativo com cone de papel embebido com formocresol. Os tecidos periapicais foram examinados histologicamente e histometricamente, 3, 7, 14 e 28 dias após a inserção, e foi feita a contagem dos fibroblastos do tecido de granulação e células inflamatórias. Histologicamente, no grupo A, foi encontrada inflamação leve após 14 e 28 dias, enquanto, nos grupos B e C, a inflamação foi moderada. Histometricamente, a área do ligamento periodontal, nos grupos B e C, estava aumentada comparando-se com o grupo A, aos 14 e 28 dias. As células inflamatórias dos grupos B e C aumentaram significativamente quando comparadas com as do grupo A, aos 14 e 28 dias, enquanto os fibroblastos contados nos grupos B e C diminuíram em relação ao grupo A, aos 14 e 28 dias. Esses resultados demonstram que o formocresol retarda a cicatrização após pulpectomias.

Waterhouse⁸¹, em 1995, fez uma revisão de literatura sobre formocresol e glutaraldeído. Têm sido propostas alternativas, como hidróxido de cálcio e glutaraldeído, contudo a substituição do formocresol por outro medicamento à

base de aldeído pode não ser a solução, pois os aldeídos não parecem ser os mais seguros para o uso em Odontologia.

Avaliando a atividade antibacteriana de 9 materiais endodônticos, Tchaou et al.⁷⁵, em 1996, compararam essa atividade contra 21 espécies de bactérias gram-negativas, facultativas e gram-positivas, em difusão em ágar. Os materiais utilizados foram Paramonoclorofenolcanforado(PMCC) + Hidróxido de cálcio; PMCC e óxido de zinco-eugenol; formocresol e óxido de zinco-eugenol; clorexidina e óxido de zinco-eugenol; Kri-past; óxido de zinco-eugenol; óxido de zinco e água; Vitapex; vaselina (controle). A atividade antibacteriana dos materiais foi dividida em 5 grupos baseados nos diâmetros das zonas de inibição. Todos os materiais, exceto a vaselina, mostraram atividade antibacteriana contra os 21 microrganismos. Geralmente, todos os materiais inibiram gram-negativos mais efetivamente que os facultativos e gram-positivos. Materiais contendo Paramonoclorofenolcanforado ou formocresol produziram grande e média efetividade contra a maioria das bactérias. Clorexidina e óxido de zinco; Kripast; óxido de zinco e água; e ZOE inibiram todas ou a maioria das bactérias, mas esse efeito foi menor quando comparado com Paramonoclorofenolcanforado e água; Paramonoclorofenol e óxido de zinco-eugenol ou formocresol e óxido de zinco-eugenol. Hidróxido de cálcio e água e vitapex e vaselina geralmente não tiveram efeito inibitório.

Nunn et al.⁴⁸, em 1996, traçam um perfil do formocresol como medicamento para terapia pulpar em dentes decíduos, destacando alguns autores. Buckley preconizou esse medicamento, ele justificou seu uso para dentes com

necrose e putrescentes, dizendo que o formocresol tinha propriedade de converter, quimicamente, gases irritantes em líquidos e sólidos não irritantes. Sweet⁷⁴, em 1937, preconizou o uso do formocresol em terapia pulpar, em 5 sessões. Muitos autores, ao longo da História, vêm questionando a segurança no uso do formocresol (especialmente estudos *in vivo*). Por isso, muitas pesquisas foram feitas na tentativa de se encontrar um material alternativo. Quando se tentou preparar o medicamento na forma diluída, notou-se a dificuldade, pois não se sabia qual formulação iria diluí-lo. Drummond e Curzon mostraram que a formulação, para ser efetiva clinicamente, deveria ter 30 ml de formocresol, em 90 ml de glicerol e 30 ml de água, porém a maioria dos trabalhos mostrava que a formulação era 19% de formaldeído; 35% de tricresol, 15% de glicerol, e 50% de água. O formaldeído, como gás, para ser sensível, deve ser dissolvido em água. Para ser efetivo, então, sua formulação deve ser: 35 ml de tricresol, 15 ml de glicerol em água. Com isso, a preparação passa a ter 19% de gás formaldeído. A fórmula de Buckley contém 19% de formaldeído, dos 38% da solução com formaldeído, portanto tem o equivalente a 7% do gás. Se se utilizar a solução diluída, haverá 1/13% do gás de formaldeído. Com isso, percebe-se que a formulação do mercado não é precisa. Foi sugerido que o tempo de vida útil do material deveria ser de, aproximadamente, 2 meses, com o material estocado em frasco marrom, no entanto a solução diluída dura apenas algumas horas, devido à sua instabilidade.

Primosch et al⁵³, em 1997 realizaram um levantamento sobre quais são as principais filosofias de terapia pulpar ministradas as escolas de Odontopediatria

nos Estados Unidos. Para a realização do levantamento, foram mandados questionários de múltipla escolha às escolas de Odontopediatria. Este questionário consistia de duas partes, a primeira com perguntas sobre as terapias pulpres utilizadas naquela unidade, e a Segunda consistia de perguntas sobre as terapias empregadas em casos hipotéticos. Os resultados demonstraram que a grande maioria das escolas utiliza formocresol diluído 1/5 para pulpotomias.

Lewis³², em 1998, faz uma revisão de literatura sobre o formaldeído, tecendo considerações sobre suas possíveis propriedades mutagênicas e carcinogênicas. Dentre os materiais que possuem formaldeído em sua composição, está o formocresol, que é, até hoje, freqüentemente utilizado na clínica odontológica. A literatura confirma que o formocresol tem um efetivo potencial bactericida, porém sua formulação ainda é arbitrária, o que lhe dificulta a diluição. Quando foi utilizado em experimentos “*in vivo*”, mostrou grande potencial fixador, porém os tecidos retardaram sua cicatrização. A literatura mostra que o formaldeído, produz alterações sistêmicas e alterações em células do fígado e rim.

Segura et al.⁶⁵, em 1998 avaliou o efeito *in vitro* do Tifell na adesão de macrófagos. Tifell consiste na mistura de formocresol e eugenol (20% de formaldeído, 20% de tricresol e 20% de eugenol) e é largamente utilizado como medicamento intracanal e em pulpotomias de dentes decíduos na Espanha. Para o experimento foram removidos macrófagos do peritônio de ratos Wistar e as amostras de células foram armazenadas em Ependorfs e em seguida foram adicionados soluções de Tifell nas diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000. Os

resultados mostraram que o Tifell inibiu a capacidade de aderência dos macrófagos em todas as condições testadas. O efeito inibitório do Tifell foi tempo e dose dependente. Os macrófagos têm uma papel de extrema importância na resposta imune do hospedeiro à inflamações, infecções e no processo de reparo, portanto a associação formocresol-eugenol diminui a função macrofágica e dificulta o processo de reparo. Os autores concluíram que o formocresol, sozinho, pode ser menos tóxico que o formocresol com eugenol.

Matsumoto et al.³⁶, em 1998 realizou um estudo imunohistoquímico para observar o comportamento de células que expressam IL1 α e IL1 β através de observações de lesões periapicais de ratos. As lesões eram induzidas de 2 maneiras: no grupo 1, através de simples pulpectomia e contaminação dos canais e os animais eram sacrificados 3, 15 e 28 dias após a procedimento; no grupo 2 era realizado curativo de formocresol 14 após pulpectomia e o curativo permanecia por 7 dias. Como resultado foi observado que em ambos grupos houve presença de lesão com abscesso. Na fase aguda foi observada a presença de IL1 α e IL1 β adjacente a vários osteoclastos, porém o número de IL1 β era duas vezes maior que a IL1 α . Já na fase crônica foi observado uma menor quantidade de IL1 β e conseqüentemente diminuição da expansão da lesão. Ambas IL1 α e IL1 β foram principalmente expressas pelos macrófagos. No grupo 2, após a aplicação de curativo com formocresol, muitos macrófagos expressando IL1 β foram observados nas proximidades dos sítios de reabsorção.

Em 2000, Farooq et al.¹⁹, realizaram uma avaliação retrospectiva comparando a porcentagem de sucesso de pulpotomias formocresol e proteção

pulpar indireta para dentes com cárie profunda. Foram testados 133 molares decíduos com cárie profunda, destes 78 foram tratados com pulpotomia formocresol e 55 com proteção pulpar indireta (remoção parcial de tecido cariado) com ionômero de vidro. Todos os dentes foram restaurados com coroa de aço cromado e os tratamentos foram avaliados por 2 a 7 anos. O tratamento com proteção pulpar indireta obteve 93% de sucesso contra 74% para pulpotomia formocresol e os casos de pulpíte obtiveram 85% de sucesso para proteção pulpar indireta e 76% para a pulpotomia. Os autores concluíram que a proteção pulpar indireta teve maior porcentagem de sucesso que a pulpotomia formocresol em molares decíduos com cárie profunda.

No ano de 2000 foi publicado um Guia Clínico Nacional de Odontopediatria do Reino Unido no qual apresenta a opinião dos melhores clínicos para tratamento pulpar na dentição decídua. O formocresol diluído foi recomendado para a técnica de pulpotomia de dentes decíduos vitais (Llewelyn³⁵,2000).

Curzon et al.¹², em carta enviada à revista British Dental Journal em setembro de 2000 ressaltou alguns aspectos sobre pulpotomia formocresol que ainda não haviam sido levantadas pelos autores. Eles salientaram que milhões de pulpotomias vem sendo feitas sem nenhum efeito tóxico comprovado cientificamente. Atualmente tem sido preconizado o uso do formocresol na forma diluída para todos os dentes decíduos com 90% de sucesso. Um outro fator importante é a necessidade de restauração após a pulpotomia, sendo preconizado o uso de coroas de aço cromado.

Strange et al.⁷², 2001 observaram o sucesso de pulpotomias com a técnica da cuetagem e aplicação de sub-base de óxido de zinco-eugenol associado com 1 gota de formocresol. Além disso, comparou o sucesso desta técnica com os relatos da literatura sobre a técnica tradicional de curativo de formocresol 5 minutos utilizando o critério de excluir a reabsorção interna como falha radiográfica. Cento e noventa e seis molares decíduos foram avaliados clínica e radiograficamente, a avaliação com o novo critério sem considerar reabsorção interna mostrou 99% de sucesso para a técnica de pulpotomia com sub-base de óxido de zinco-eugenol associado a 1 gota de formocresol.

King et al.³⁰, 2002 verificaram a concentração do formocresol utilizado por odontopediatras em pulpotomias de dentes decíduos. Para a realização do estudo, os autores enviaram 806 questionários a odontopediatras membros da Academia Americana de Odontopediatria, e retornaram 422, totalizando 52% de resposta. Foi observado que 82% dos Odontopediatras dos Estados Unidos utilizam formocresol para pulpotomia de dentes decíduos, destes 69% usam formocresol concentrado, 27% a forma diluída e 4% não sabem. Para a diluição do formocresol, 34% disse que já comprava o produto diluído, 58% diluíam no consultório e 8% mandavam diluir na farmácia. Os autores concluíram que a maioria dos Odontopediatras utiliza o formocresol na forma concentrada.

Guelmann et al.²³, 2002 realizaram um estudo retrospectivo para avaliar o sucesso das pulpotomias formocresol realizadas de como tratamento de emergência de molares decíduos. Os dados foram coletados de 216 pulpotomias, tendo como critério de inclusão dentes com história positiva de dor e ausência de

sinais clínicos e radiográficos de degeneração pulpar. O sucesso ou falha foi determinado depois de realizada a restauração definitiva pela presença ou ausência de patologias clínicas e radiográficas. Como resultado foi verificado que 64 dentes foram avaliados num período de 2 anos. Dos dentes restaurados definitivamente em 90 dias após a emergência, 53% obtiveram sucesso na pulpotomia, e os dentes restaurados após 1 ano da realização da emergência tiveram 31% de sucesso. Pacientes menores que 6 anos mostraram maiores chances de sucesso que pacientes mais velhos. Os autores concluíram que o baixo sucesso nos primeiros três meses após a emergência se deve a erro de diagnóstico, enquanto que falha após 1 ano pode ser atribuída a microinfiltração na material restaurador temporário.

Endotoxina

A História da endotoxina começou no final de 1870, quando Robert Koch determinou que cada doença infecciosa era decorrente da presença de microrganismos (bactérias) e ainda que esses microrganismos poderiam produzir toxinas que eram responsáveis por alguns sintomas tais como febre.

Pesquisadores como Boivin (Paris), Goebel (Nova York) e Morgan e Mesrobeanu (Londres) concluíram que essa substância resistente estava presente na parede celular de bactérias gram-negativas e era constituída de polissacárides, lipídeos e proteínas, os quais, mais tarde, foram denominados lipopolissacárides ou endotoxina (Rietchiold & Brade⁵⁷, 1992).

A endotoxina da bactéria gram-negativa é composta de 3 regiões estruturais: a cadeia lateral O, o core ou núcleo e o lípide A. O core está localizado mais profundamente e contém 2-keto-3-deoxioctanato (KDO) e se liga à cadeia lateral O e ao lípide A. O lípide A é composto por um dissacarídeo glucosamina, ligado a um único grupo fosfato, e tem 4 a 6 ácidos graxos ligados à hidroxila desse açúcar(Munford & Hall⁴³,1986; Qureshi⁵⁴, 1983).

Em 1975, Westphal⁸² descreveu o lípide A, região da endotoxina responsável pelo seu potencial tóxico.

Muitos estudos vem sendo realizados sobre endotoxina e seus efeitos biológicos. Para este estudo foi realizada uma revisão da literatura a partir da década de 80.

Poucos são os trabalhos da literatura que relacionam endotoxina a Odontologia. Destaca-se o trabalho Dahlén & Bergenholtz,¹³ em 1980, os quais avaliaram a presença de endotoxina em canais radiculares de dentes com necrose pulpar. Foram retiradas amostras de canais de 13 dentes com necrose pulpar, para analisar a presença de endotoxina através da técnica de Limulus lysate. O resultado está relacionado com a quantidade de bactérias viáveis, presentes nas amostras colhidas, endotoxina de diferentes bactérias anaeróbias e diferentes frações de exsudato inflamatório. Verificou-se que a atividade das endotoxinas das amostras dos canais está relacionada com a presença e o número de bactérias gram-negativas presentes no canal.

Dwyer & Torabinejad,¹⁷ 1981, avaliaram, radiograficamente e histologicamente, o efeito da endotoxina sobre tecidos periapicais de dentes de gatos, utilizando endotoxina de *Escherichia coli* pura e detoxificada com NaOH. Em 6 animais, injetou-se 0,1 ml de solução de endotoxina em cada canino, nas concentrações 100µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml e solução salina (controle). Em três animais, injetou-se endotoxina detoxificada com NaOH, e um animal foi utilizado como controle adicional, sendo injetada solução salina em seus caninos. Os períodos de análise foram 2, 4 e 6 semanas. A avaliação radiográfica revelou áreas de reabsorção óssea intensa no grupo de dentes com a endotoxina pura em todos os períodos; nos grupos com solução salina e endotoxina detoxificada observaram-se pequenas áreas radiolúcidas periapicais. A avaliação histopatológica mostrou área de inflamação mais intensa nos dentes injetados com endotoxina pura do que

nos injetados com endotoxina detoxificada ou solução salina, porém não houve diferença entre as 3 concentrações de endotoxina testadas.

Dahlén et al.¹⁴, em 1981, avaliaram o efeito da endotoxina de bactéria *Fusobacterium nucleatum*, em canais radiculares de macacos, após biopulpectomia. Foram utilizados 44 dentes, de 4 macacos jovens. Os elementos dentais foram divididos em 2 grupos: grupo experimental, com 27 dentes que foram abertos, neles se realizou biopulpectomia e injetou-se cerca de 5-10µl de endotoxina na concentração de 10 mg/ml; e grupo controle com 17 dentes que foram abertos, realizou-se a biopulpectomia e injetou-se solução salina. Nos 10 dentes restantes, a polpa foi removida, e os canais foram mantidos vazios. Foram realizadas análises radiográficas, histopatológicas e histoquímica, 3 e 7 meses após o experimento. Na análise radiográfica, observou-se lesão periapical. A análise histopatológica mostrou reação inflamatória, com reabsorção óssea em todos os dentes do grupo experimental, e a análise histoquímica evidenciou reação inflamatória, com aumento da atividade enzimática das células do osso da região periapical, o que sugere aumento da reabsorção óssea.

Ainda com intuito de avaliar a interação de endotoxina com mediadores químicos, Raiz et al.⁵⁵, em 1981 estudaram o efeito de 4 fatores que levam à reabsorção, óssea como endotoxina, prostaglandina (PGE), hormônio paratireoideano (PTH) e fator ativador de osteoblasto (OAF). O estudo foi feito avaliando-se *in vitro* a liberação de Ca de ossos removidos de fetos de ratos de 19 dias. Ratas grávidas de 18 dias receberam injeção contendo 200 U Ci de ⁴⁵Ca marcado, para a verificação nos fetos do experimento. As porções de ossos

removidas foram pré-cultivadas por 18 a 24 horas em BGJ e, depois, adicionadas com suplemento de albumina sérica bovina, no qual as várias substâncias teste foram adicionadas. O ^{45}Ca médio do osso foi medido pela cintilação. As respostas foram sinérgicas, ou seja, as drogas, quando associadas, produziram efeito maior do que individualmente. O efeito da endotoxina não foi inibido pela adição de inibidores de prostaglandinas (indometacin, ácido flufenâmico e RO-20-5720). Concluiu-se que, a interação da endotoxina com outros indutores de reabsorção óssea pode produzir altas respostas, e suas associações podem ser importantes para a patogênese da reabsorção óssea.

Pitts et al.⁵², em 1982, avaliaram o efeito da endotoxina de *Salmonella minnesota*, sobre tecidos periapicais de pré-molares de cães, após biopulpectomia. Foram utilizados 16 dentes (36 raízes) de 2 cães adultos. Deste total, 16 raízes receberam a solução de endotoxina na concentração de 1 mg/ml, e a outra metade das raízes recebeu solução salina. Semanalmente, os dentes foram radiografados, e a endotoxina e a solução salina foram renovadas. Após 4 a 5 semanas, a análise histopatológica mostrou reabsorção óssea e reação inflamatória severa com predomínio de polimorfonucleares. A análise radiográfica mostrou que os dentes com endotoxina apresentavam reação periapical mais precocemente que os dentes com solução salina.

Pesquisas sobre a relação da endotoxina com processos inflamatórios continuaram sendo feitas. Schonfeld et al.⁶⁴, em 1982, examinaram, histologicamente, 30 amostras de tecidos, classificadas como inflamadas (granuloma apical) ou não inflamadas (escaras ou cistos não inflamados). As

amostras foram homogeneizadas em água esterilizada. A presença de endotoxina foi determinada pela avaliação da pureza Limulus 75% dos tecidos inflamados apresentaram endotoxina, enquanto 20% dos tecidos não inflamados continham endotoxina. A presença de endotoxina está altamente relacionada com presença de inflamação nesses tecidos.

Muitos foram os estudos que avaliaram a composição química da endotoxina, Qureshi et al.⁵⁴, em 1983, demonstraram que o lípide A é composto por um dissacarídeo glucosamina, ligado a um único grupo fosfato, e tem de 4 a 6 ácidos graxos ligados à hidroxila desse açúcar.

Torabinejad et al.⁷⁶, em 1985 fizeram uma revisão da literatura sobre os conceitos de mecanismos e mediadores que estão envolvidos na patogênese das lesões periapicais em humanos. A região periapical consiste em cemento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar; estas duas últimas partes citadas são altamente vascularizadas. Quando ocorre necrose pulpar, diversas reações inflamatórias são desencadeadas, como reações imunológicas liberando mediadores não específicos da inflamação como as aminas vasoativas, cininas, fragmentos do sistema complemento e metabólitos do ácido aracdônico. Injúrias mecânicas no tecido periapical também podem iniciar a liberação de mediadores não específicos da inflamação. A progressão de lesões patológicas no tecido periapical pode levar a uma combinação de vários tipos de reações imunológicas.

Munford & Hall⁴³, em 1986, demonstraram que a toxicidade tecidual da endotoxina é reduzida pela atividade enzimática de neutrófilos humanos. A enzima hidrolase acyloxyacyl, produzida pelos neutrófilos, remove ácidos graxos

da endotoxina, reduzindo a bioatividade do lípide A. Sugere-se que a hidrolase acyloxyacyl pode ser um mecanismo de defesa do organismo, para reduzir a toxicidade da endotoxina, promovendo respostas inflamatórias benéficas e estímulos imunes.

Insatisfeitos com as descobertas odontológicas sobre o efeito da endotoxina, Mattison et al.³⁸, em 1987, avaliaram o efeito da endotoxina da *Eikenella corrodens* e da *Escherichia coli* sobre o tecido periapical de pré-molares de cães, na concentração de 10µg/ml. Foram utilizados 28 dentes (56 raízes) de 7 cães adultos, nos quais foram realizadas biopulpectomia e, em 42 raízes, injetou-se 0,1 ml de *Eikenella corrodens*, em 8 raízes, 0,1 ml de *Escherichia coli*, e, em 6 raízes, água destilada. Radiografias e exames de sangue foram realizados semanalmente, por um período de 12 semanas. Apenas um animal foi sacrificado para análise histopatológica que mostrou extensa perda óssea e intenso infiltrado de células inflamatórias. Os outros 6 animais foram avaliados pelo exame radiográfico e análise do sangue. Na análise radiográfica, observou-se a progressão mais rápida das lesões periapicais dos dentes com *Eikenella corrodens*, e na análise do sangue, não foi observada presença de anticorpos. A análise histológica mostrou grande destruição óssea e infiltrado inflamatório.

Em revisão de literatura, Stashenko⁷⁰, em 1990, abriu a hipótese de que as imunocitocinas exercem grande papel na patogênese de lesões periapicais. Infecções bacterianas em polpas dentais resultam em destruição pulpar e, subsequentemente, estimulam resposta inflamatória celular e destruição óssea no periápice. A endotoxina bacteriana induz a produção de muitos mediadores

peptídicos, ou citocinas, por células inflamatórias. Essas citocinas, as quais incluem a $IL1\beta$, $IL1\alpha$, fator de necrose tumoral (derivado dos macrófagos) e linfotoxina (derivado dos linfócitos), têm mostrado potente ação sobre a reação óssea e inibição de formação óssea tanto em pesquisas *in vitro* como em *in vivo*.

Wang & Stashenko⁸⁰, em 1991, realizaram estudo, no qual foi empregado a técnica de abertura de dentes de rato para posterior contaminação pulpar e observação de lesão periapical. Esta técnica foi empregada para determinação da atividade de reabsorção e a expansão de lesões periapicais. Para isso, os autores realizaram a técnica de radioluscência e posteriormente curetagem das lesões para análise microbiológica do tecido periapical para quantificação dos níveis de cálcio presentes no tecido curetado. Para a análise da radioluscência, foram realizadas radiografias periapical onde media-se o tamanho das lesões após 10, 15, 20 e 30 dias da abertura dos canais e observou-se que todos os dentes apresentaram lesão periapical. Para a avaliação da reabsorção óssea utilizaram a técnica de cultura de ossos longos de fetos de ratos que receberam ^{45}Ca ao 18º dia de idade fetal. Estes ossos eram retirados dos fetos no 19º dia e cultivados em meio de cultura BGJb. Fazia-se então, a curetagem do tecido periapical dos dentes dos ratos do experimento, e levava-se este tecido neste meio de cultura onde fazia-se a comparação dos níveis de cálcio, conseguindo uma quantificação da reabsorção óssea. Os resultados mostraram nas amostras de 15 dias, que houve uma significativa perda óssea, 10,7% de cálcio estava presente. Dentes foram abertos, polpas foram expostas e deixadas contaminar por bactérias orais. Após 10, 15, 20, 30 dias do início do experimento os animais foram sacrificados. Antes do

sacrifício realizava-se radiografias para avaliação do tecido periapical dos dentes expostos. Em seguida curetava-se a região periapical e este tecido curetado foi semeado em placas com albumina sérica bovina e 1% de penicilina e estreptomicina. Como controle, foi feito o mesmo com tecido periapical de dentes não expostos. As peças passaram por processos microbiológicos e foram feitas radiografias de radiolusência periapical. As lesões expandiram-se mais rapidamente entre 0 e 15 dias (fase ativa), e o aumento em largura ocorreu mais devagar (20 a 30 dias - fase crônica). As medidas foram avaliadas radiograficamente e foram feitas análises automatizadas. Porções de tecido periapical obtido em amostra de 15 dias mostraram níveis significativos de atividade de reabsorção óssea, determinada pela absorção de cálcio. O trabalho sugere que a atividade de reabsorção óssea está temporariamente relacionada com a destruição óssea periapical, e que esse modelo pode ser usado para estudar mediadores envolvidos na patogênese da reabsorção óssea inflamatória.

Safavi & Rossomando⁶¹, em 1991, avaliaram a presença de fator de necrose tumoral (FNT é produzido por macrófagos como resposta à endotoxina bacteriana) em amostras coletadas via canal de dentes, para tratamento endodôntico e periodontite, dentes assintomáticos e com necrose pulpar e áreas radiolúcidas periapicais. Para controle, foram usados dentes para tratamento endodôntico, porém com vitalidade pulpar. As amostras foram retiradas após pulpectomia. Para a evidenciação da presença de fator de necrose tumoral, foram feitos processamentos microbiológicos. Fator de necrose tumoral foi detectado em

todos os tecidos periapicais das amostras com periodontite e não foram encontrados na amostra com vitalidade.

Novas pesquisas avaliaram a presença de endotoxina em dentes sintomáticos. Horiba et al.²⁵, em 1991, coletaram amostras de exsudato de canais de dentes com periodontite, avaliando e correlacionando sintomatologia com a presença de endotoxina. Foram feitos testes laboratoriais para a detecção de endotoxina, e sua presença ficou mais evidente em dentes sintomáticos, com radiolusência e com exsudato, do que em dente sem essas características.

Rietchi & Brade⁵⁷, em 1992, fizeram um histórico da endotoxina, mostrando que sua atividade tóxica é largamente divulgada na literatura, e que são benéficos os aspectos da exposição à endotoxina (quando em pequenas doses), pois ela aumenta a resistência do hospedeiro contra algumas doenças, como nova infecção bacteriana e câncer.

Com o propósito de investigar a ativação do sistema complemento, Horiba et al.²⁶, em 1992, avaliaram a ação das endotoxinas de *P.endodontalis*, *Veillonella parvula* e *Fusobacterium nucleatum*, isolados de canais infectados. Para observar a ativação do sistema complemento fez-se a avaliação do consumo do componente C3T. Para fazer isso, colocava-se a endotoxina, que seria avaliada, em presença de soro humano. Foi avaliado o consumo do C3T em presença de várias concentrações de endotoxina, 01, 10, 50 e 100 µg. A porcentagem e o consumo do C3T foi menor que 10% para 1 µg, 15 a 25 % para 10 µg, mais de 60% para 50 µg, e mais de 70% para 100µg.

Sundqvist⁷³, em 1992, fez uma análise criteriosa da colonização bacteriana em canais radiculares e notou que, no interior desses canais, ocorre pressão, o que resulta no estabelecimento de certas populações bacterianas. A mudança de populações bacterianas ocorre com o passar do tempo. Canais radiculares infectados por saliva são, inicialmente, infectados por anaeróbios facultativos. Subsequentemente, ocorre um aumento de número de bactérias, notando-se uma predominância de anaeróbios. As inter-relações bacterianas e o suprimento nutricional são a chave para o desenvolvimento da infecção. Os tratamentos endodônticos, além de eliminar a maior quantidade possível de bactérias, devem interferir na delicada ecologia ali instalada e eliminar o substrato para a sua sobrevivência.

Safavi & Nichols⁵⁹, em 1993, avaliaram o efeito do hidróxido de cálcio sobre a endotoxina bacteriana *in vitro*. Para a avaliação, foi utilizada suspensão aquosa de *Salmonella typhimurium* associada a hidróxido de cálcio. Como controle positivo, foi utilizada a endotoxina pura, e a água foi o controle negativo. O estudo mostrou a liberação de grande quantidade de ácidos graxos no grupo de endotoxina tratada com hidróxido de cálcio. Isso levou os autores a concluir que o hidróxido de cálcio foi capaz de hidrolisar a molécula da endotoxina, resultando na liberação de ácidos graxos livres.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, um ano mais tarde, novamente Safavi & Nichols⁶⁰, em 1994, investigaram a produção de prostaglandina₂ (PG₂) em cultura de células (monócitos), em presença de endotoxina associada ao hidróxido de cálcio. Foram utilizadas endotoxina de *Salmonella typhimurium* e

Prevotella intermedia. A análise da presença de PG2 foi através do uso de cromatografia por espectrofotômetro a gás. PG2 foi identificada em cultura de células com endotoxina e não foi identificada em cultura de células com endotoxina associada ao hidróxido de cálcio. Os autores concluíram que a endotoxina tratada com hidróxido de cálcio perde suas propriedades biológicas, resultando em detoxicação da endotoxina pela quebra da cadeia de ácidos graxos contidas no seu lípide A.

Em 1995, Nakane et al.⁴⁶ avaliaram o efeito da endotoxina em polpas dentais humanas, pela medida do conteúdo de DNA, conteúdo protéico e atividade de fosfatase alcalina pelas células. O experimento foi feito em culturas de células de polpas humanas (fibroblastos), removidas de polpas de dentes recém extraídos e colocadas em cultura *in vitro*. Foram utilizadas endotoxina de amostras de *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Fusobacterium nucleatum*, e *Escherichia coli* (usado como controle positivo). Na concentração de 1µg/ml, nenhuma endotoxina causou mudança na produção de DNA e proteína; com 10µg/ml houve aumento da quantidade de DNA; e, em 100µg/ml, foi observada inibição. A síntese de proteína diminuiu tanto com endotoxina a 10 quanto a 100µg/ml, enquanto a atividade da fosfatase alcalina não mudou em nenhuma concentração testada.

No mesmo ano, Nissan et al.⁴⁷, em 1995, investigaram a capacidade de difusão da endotoxina em finas camadas de dentina, por difusão na ausência de pressão; também determinaram, quantitativamente, e quanto de endotoxina é capaz de passar pela dentina durante 24 horas. Para realização do experimento, foi

utilizada amostra de *Actinonobacillus actinomycetemcomitans*, um cocobacilo gram-negativo, conhecido pela sua endotoxina extremamente potente. Também foram utilizados cinco terceiros molares extraídos e armazenados em 0,05% de hipoclorito de sódio. As raízes foram removidas, e o conteúdo das câmaras pulpares foi retirado para que pudessem receber 0,1 ml de líquido em seu interior. Em cada dente, foi confeccionado um preparo de classe I, com profundidade suficiente para deixar uma fina camada de dentina de, aproximadamente, 0,5 mm, separando a cavidade oclusal da câmara pulpar. Os dentes eram colocados em caixas de plástico de modo que se pudesse rodá-los em 180°, possibilitando inverter os espécimes. Foi colocado 0,1 ml de endotoxina na caixa oclusal, na concentração de 100µg/ml, e, na câmara pulpar, foi colocado 0,1 ml de água. Após 15, 30 minutos e de 30 em 30 minutos até completar 5 horas, era removido 0,1 ml da caixa pulpar. A amostra final foi retirada 24 horas após o início do experimento, resultando em 13 amostras. As amostras colhidas eram analisadas pelo teste Limulus lysate. O resultado mostrou que, em 4 espécimes, a endotoxina começou a aparecer após 15 min; em 2 espécimes, a concentração da endotoxina ficou nivelada em, aproximadamente, 5 horas; em 2, a concentração continuou aumentando com o tempo de experimento; em 1 espécime, nenhuma endotoxina foi detectada. Esse estudo mostrou que a endotoxina é capaz de passar por 0,5mm de espessura de dentina.

Assed et al.¹, em 1996, avaliaram a presença de microrganismos anaeróbios em canais radiculares humanos, com lesão periapical crônica. Foram utilizados 25 incisivos centrais e laterais superiores, com evidência de lesão

periapical crônica radiográfica. As câmaras pulpare foram abertas sob condições de assepsia, e amostras dos canais foram colhidas com auxílio de cones de papel esterilizados, que eram colocados dentro do canal e, posteriormente, dispensados em tubos teste contendo “reduced transport medium”(RTF). Secaram-se alíquotas dessa mistura, e fez-se imunofluorescência, para identificação de *Actinomyces viscosus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. Os resultados mostraram reação de imunofluorescência indireta positiva em 24 das 25 amostras. 14 amostras foram positivas para *Actinomyces viscosus*, 12 foram positivas para *Prevotella intermedia*, 10 para *Fusobacterium nucleatum* e 4 para *Porphyromonas gingivalis*. A avaliação semiquantitativa foi facilmente implementada para a avaliação do grau de infecção por organismos, em cada caso.

Com objetivo de investigar a ação do hidróxido de cálcio sobre a endotoxina Barthel et al.³, em 1997, associaram *in vitro* essas duas substâncias, incubadas juntamente com monócitos humanos. A endotoxina utilizada foi *Escherichia coli* 055:B5, nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 η g/ml, dissolvida em água esterilizada. À metade das amostras, foram adicionados 25 mg de hidróxido de cálcio p.a.; e, como controle, foi utilizada água esterilizada, associada ou não ao hidróxido de cálcio. Os monócitos foram obtidos pela doação de sangue de indivíduos saudáveis e foram plaqueados. Os aderentes foram incubados por 4 dias, a 37°C, com 5% de CO₂, em meio M199, com 10% de soro autólogo. As diferentes soluções de endotoxina foram adicionadas aos monócitos após o 5º dia. Depois de 4 horas, os sobrenadantes foram coletados e

quantificados, avaliando-se a presença de FNT- α , usando-se o kit ELISA. Os resultados indicaram que o hidróxido de cálcio é eficaz para eliminar a habilidade da endotoxina de *E.coli* em estimular a produção de TNF- α pelos monócitos.

Könönen et al.³¹, em 1999 avaliaram a colonização de bactérias anaeróbias no primeiro ano de vida, foi um estudo longitudinal onde 44 crianças caucasianas foram acompanhadas aos 2, 6 e 12 meses. Foram realizados teste de cultura em agar Bricella e outros testes para identificação de microrganismos anaeróbios utilizando-se saliva não estimulada. O microrganismo mais freqüente encontrado em crianças com 2 meses de idade foi *Veillonella spp.* *Prevotella melaninogenica* está presente nos primeiros meses de vida, porém sua presença é aumentada no primeiro ano. *Prevotella intermédia* mostrou ter colonização mais tardia. *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella spp* e *Prophyromonas catoniae* foram mais freqüentes em 1 ano de idade, sendo o *Fusobacterium nucleatum* a mais freqüente espécie anaeróbia em 1 ano de idade. A freqüência de microrganismos facultativos, microaerófilos e *Capnocytophaga* começa a aumentar em torno de 1 ano de idade. Foi verificado que uma vez o microrganismo tenha se estabelecido, ele tende a permanecer como persistente na boca das crianças.

Haight-Ponce et al.²⁴, em 1999 realizaram um estudo para avaliar a atividade de ligação da endotoxina à dentina após a aplicação de soluções irrigantes utilizadas em endodontia, para este estudo os autores utilizaram o teste Limulus lysate. Foi usado pó de dentina pré-tratada com 10% de hipoclorito de sódio e 3% de peróxido de hidrogênio em períodos de tempo de 30, 10 e 1 minuto.

A endotoxina foi diluída em solução de 100mg/ml. A ligação da endotoxina a dentina foi menor nas dentinas tratadas com hipoclorito de sódio 10% que a tratada com peróxido de hidrogênio 3% aos 10 e 1 minuto. Aos 30 minutos a endotoxina mostrou Ter pouca ligação à dentina para as duas soluções irrigantes.

Opal et al.⁵⁰,1999 avaliou a relação entre os níveis de LPS no plasma e nas proteínas que se ligam ao LPS em pacientes com septicemia grave ou choque séptico. Foram utilizadas amostras de endotoxina do plasma de 253 pacientes randomizados e em fase III do processo de septicemia, as amostras foram obtidas 24 horas após o início da infecção. As amostras foram diluídas e a avaliação da endotoxina foi feita pelo método Limulus lysate. Para determinação das proteínas que se ligam ao LPS foi feito o teste ELISA. Como grupo controle foram utilizadas amostras de sangue de 33 pacientes do ambulatório. Foi verificado que os níveis de endotoxina foram 78,3% maiores em pacientes com septicemia e os níveis de proteínas que se ligam ao LPS foram 97% maiores nos pacientes com septic que o controle. Porém não foi encontrada nenhuma correlação entre os níveis de endotoxina e os níveis de proteínas que ligam ao LPS.

Como a literatura já tem demonstrado que a endotoxina pode estimular a produção de mediadores químicos do processo inflamatório. Matsushita et al.³⁷, em 1999, examinaram a indução na produção de interleucinas, IL-1 β , IL-6, e IL-8 pela endotoxina de bactérias endodônticas e também avaliaram a produção de anticorpos no soro e saliva, em presença da endotoxina. O estudo foi realizado em cultura de células de sangue humano, obtidas de 16 pacientes que foram divididos em 3 grupos: no primeiro grupo (4 pacientes): indivíduos que apresentavam mais

de dez grandes lesões periapicais evidentes radiograficamente; no segundo grupo (6 pacientes): indivíduos que apresentavam uma ou duas pequenas lesões periapicais evidentes radiograficamente; e o terceiro grupo (6 voluntários saudáveis): sem lesão periapical. Às culturas de células foram acrescentadas endotoxinas de *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Porphyromonas gingivallis* 381, e *Phorphyrimonas endodontalis* ATCC 27067. Utilizou-se *Escherichia coli* k12 como controle, para a indução das interleucinas. Para o exame da indução da produção de citocinas, foi utilizado o teste ELISA. Para a avaliação e quantificação dos anticorpos, foram utilizadas amostras de soro e saliva dos grupos de pacientes analisados. Nesse estudo, os autores mediram IgG do soro e IgA da saliva, em resposta à endotoxina bacteriana pelo teste ELISA. Foi observada a produção de IL-1 β , IL-6 e IL-8 em todos os grupos, na presença da endotoxina, porém o grupo com grande lesões apresentou maior produção das três citocinas, principalmente de IL-8. Em relação à produção de anticorpos, observou-se que houve produção de IgG, especialmente em reação à endotoxina de *P. gingivalis*, e produção IgA em todas as amostras de saliva, porém não existiu correlação com o tamanho das lesões. Com isso, os autores concluíram que a endotoxina bacteriana pode estar envolvida em inflamação periapical pois induz a produção de citocinas e resposta imune.

Silva et al.⁶⁷, em 2001, avaliou *in vivo* o efeito da endotoxina (*Escherichia coli* na concentração de 10 mg/ml) associada ou não ao hidróxido de cálcio, sobre os tecidos apicais e periapicais de dentes de cães, por meio de avaliação histopatológica. Foram utilizados pré-molares de cães, para se realizar

biopulpectomia com posterior preenchimento do canal com endotoxina (grupo 1); endotoxina associada ao hidróxido de cálcio (grupo 2), soro fisiológico (grupo 3) e no último grupo (4) foram induzidas lesões periapicais pela exposição pulpar. Decorrido o período experimental de 30 dias, os animais foram sacrificados e as análises histopatológicas demonstraram que, tanto no grupo da endotoxina como no grupo em que se induziu lesão, houve intenso infiltrado inflamatório e reabsorções cementárias, dentinárias e ósseas. Os grupos de endotoxina associada com hidróxido de cálcio e o grupo do soro fisiológico mostraram tecido conjuntivo periapical íntegro, sem áreas de reabsorção, concluindo-se que o hidróxido de cálcio foi capaz de inativar os efeitos tóxicos da endotoxina bacteriana, mesmo em altas concentrações.

Buck et al.⁷, 2001 avaliou o efeito de irrigantes endodônticos (água oxigenada - controle, EDTA, etanol, clorexidina a 0,12%, hipoclorito e clorexidina associado ao hipoclorito de sódio) e hidróxido de cálcio sobre endotoxina (lipopolissacáride) através de análises com cromatografia gasosa e espectrometria de massa avaliando através de quantificação do ácido 3-hidrotetradecanóico (3-HMA). As amostras ficaram expostas em tempos diferentes que variavam de 10 minutos para o grupo clorexidina + hipoclorito de sódio, 30 minutos para todos os irrigantes e o hidróxido de cálcio, e 1, 2 e 5 dias para o hidróxido de cálcio. Foi observado que as soluções alcalinas degradam mais LPS. Os grupos com Clorexidina, EDTA, etanol, hipoclorito mostraram resultados similares à da água oxigenada (controle). A associação clorexidina + hipoclorito 10 minutos mostrou níveis maiores de 3-HMA que o controle e as

amostras de hidróxido de cálcio 2 e 5 dias mostraram níveis muito maiores de 3-HMA. O resultado deste estudo mostrou que a porção biologicamente ativa de do LPS, lipide A, é hidrolisada pelo hidróxido de cálcio e a mistura clorexidina e hipoclorito, e EDTA, hipoclorito, clorexidina, etanol e água oxigenada mostrou pequena ou nenhuma habilidade de detoxicar o lipide A.

Jiang et al.²⁹, 2003 avaliaram o efeito da endotoxina sobre a osteoclastogênese e a habilidade do hidróxido de cálcio em inibir a formação de osteoclastos estimulado pela endotoxina. Foi realizada cultura de células (células RAW) com o ligante do receptor ativador recombinante NF- κ B (RANKL) por 72 horas. Este RANKL estimula a osteoclastogênese e atividade osteoclastica através da ligação ao receptor RANK, na superfície das células precursoras dos osteoclastos. Após as 72 horas, o RANKL foi removido e as células foram tratadas com 0,1; 10 ou 100 η g/ml de LPS e LPS tratado com hidróxido de cálcio (25mg/ml) por 48 horas. Posteriormente as células foram fixadas e coradas para análise histoquímica para detecção da formação dos osteoclastos. Foi observado que o LPS induziu a formação de osteoclastos e esta indução é dose-dependente e o hidróxido de cálcio inibiu a habilidade do LPS em formar osteoclastos.

Proposição

A proposta deste trabalho é avaliar histologicamente a resposta dos tecidos periapicais de dentes de macacos à presença de endotoxina associada ou não ao formocresol.

As hipóteses a serem testadas serão:

H0: A endotoxina associada ao formocresol não influencia a resposta dos tecidos periapicais.

H1: A endotoxina associada ao formocresol influencia a resposta dos tecidos periapicais.

Material e método

O parecer do Comitê de Ética encontra-se em anexo.

Preparo da solução de endotoxina e da associação endotoxina/formocresol

No fluxo laminar, um frasco contendo 100mg de endotoxina de *Escherichia coli* (Lipopolysaccharide *E.coli* serotype 055:B5^{*}) foi suspenso em 10 mL de solução salina tamponada fosfatada (PBS), originando uma solução na concentração de 10mg/mL.

Estes 10 mL de solução foram divididos em 10 porções de 1mL cada, que foram aliquotados e acondicionado em ependorfs estéreis. Estes ependorfs foram mantidos em freezer a aproximadamente - 4°C.

Em um dos ependorfs com 1ml de solução de endotoxina, foi adicionado 1ml de formocresol^{**} para obter-se a mistura de 2 ml de endotoxina/formocresol na proporção 1:1. A associação formocresol/endotoxina foi preparada um dia antes do procedimento operatório (Figura 1).

^{*} Sigma Aldrich Química Brasil

^{**} Formocresol de Buckley - Sultan



FIGURA1- Preparo da solução de endotoxina e mistura endotoxina/formocresol

Procedimentos operatórios

Para o experimento foram utilizados 3 macacos *Cebus apella libidinosus* do Núcleo de Procriação de Macaco-Prego do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP. Foram selecionados os primeiros, segundos e terceiros pré-molares superiores e inferiores.

Em cada animal foram testados todos os grupos experimentais em sistema de rodízio.

Foram utilizados 36 dentes, dos quais 12 dentes foram destinados ao grupo I (mistura endotoxina/formocresol), 15 dentes para o grupo II (endotoxina e curativo com formocresol) e 9 dentes para o grupo III controle (endotoxina). A quantidade de dentes utilizada no trabalho está de acordo com a literatura revisada (Dwyer & Torabinejad¹⁷,1981; Mattison et al.³⁵,1987; Silva et al.⁶⁷, 2002).

O procedimento operatório foi realizado sob anestesia geral, através de injeção intraperitoneal de tiopental sódico* na dosagem de 30 mg/kg de peso corporal e injeção intramuscular de diazepínico** na dosagem de 0,12 mg/kg de peso corporal.

Todo o instrumental e material utilizados nos procedimentos operatórios foram esterilizados em autoclave a 120°C, por 20 minutos (Figura 2).

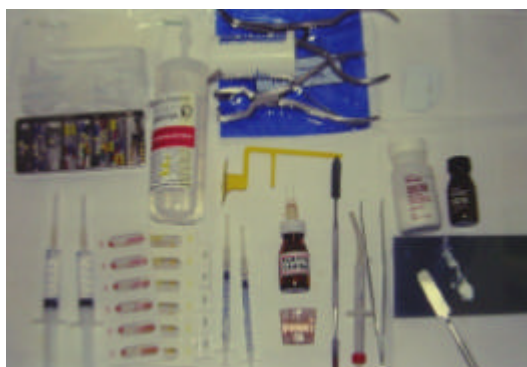


FIGURA 2 - Materiais para o procedimento operatório)

A seguir foi efetuado o isolamento absoluto com dique de borracha, anti-sepsia do campo operatório com álcool iodado a 0,3%, neutralização com solução de álcool/éter, em partes iguais (Figura 3).

* Thionembutal - Abbot Laboratórios do Brasil Ltda. - RJ

** Diazepan – Furp

Em seguida, foi iniciada a abertura coronária dos dentes pela face oclusal, com ponta diamantada esférica*, montada em turbina de alta rotação, sob refrigeração (Figura 4).

Após acesso à câmara pulpar, remoção da polpa coronária e irrigação, foi executada a pulpectomia com lima estirpa nervo** com o diâmetro compatível ao canal radicular; a irrigação/aspiração foi feita com soro fisiológico à temperatura ambiente.



FIGURA 3 - Isolamento absoluto



FIGURA 4 - Abertura coronária

A determinação do comprimento de trabalho foi obtida através de odontometria do canal radicular em radiografias de crânio seco de macaco prego, em função da dificuldade da tomada radiográfica devido a dimensão reduzida das arcadas dentárias dos animais.

Abundante irrigação/aspiração foi realizada com soro fisiológico após a pulpectomia e o canal foi seco com papel absorvente esterilizado. Em seguida os dentes receberam os materiais.

* Ponta diamantada 1012 - KG Sorensen

** Estirpa nervo - Maillefer

Grupo I (12 dentes): foi colocado no interior do canal a mistura previamente preparada de 0,01 mL de solução de endotoxina/formocresol de Buckley com o auxílio de seringa de insulina* e agulha hipodérmica**.

A seguir, o dente foi fechado com bolinha de algodão esterilizado e cimento IRM***.

Grupo II (15 dentes): foram injetados 0,01 mL de solução de endotoxina previamente preparada utilizando seringa de insulina e agulha hipodérmica. Após isto, foi colocado uma bolinha de algodão com solução de formocresol de Buckley e o dente foi fechado com bolinha de algodão esterilizado e cimento IRM.

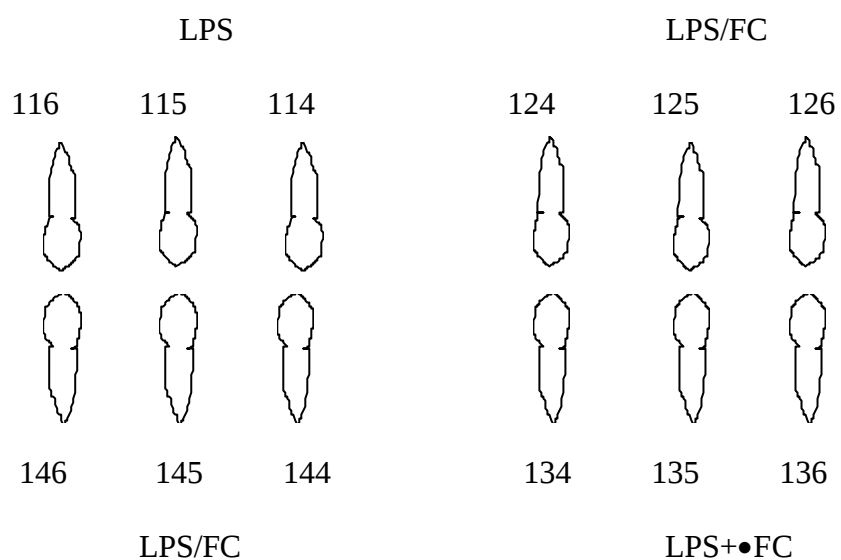
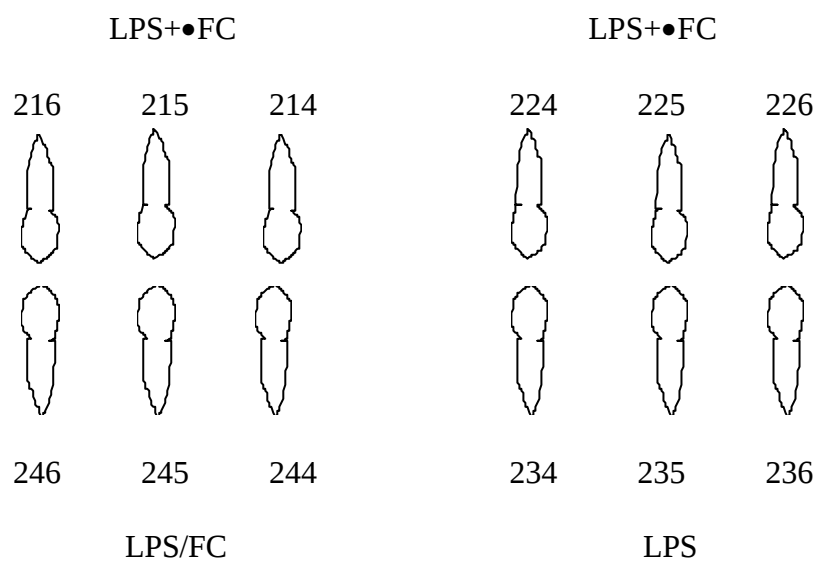
Grupo III (Controle - 9 dentes): foram injetados 0,01 mL de solução de endotoxina previamente preparada utilizando seringa de insulina e agulha hipodérmica. Em seguida, o dente foi fechado com bolinha de algodão esterilizado e cimento IRM.

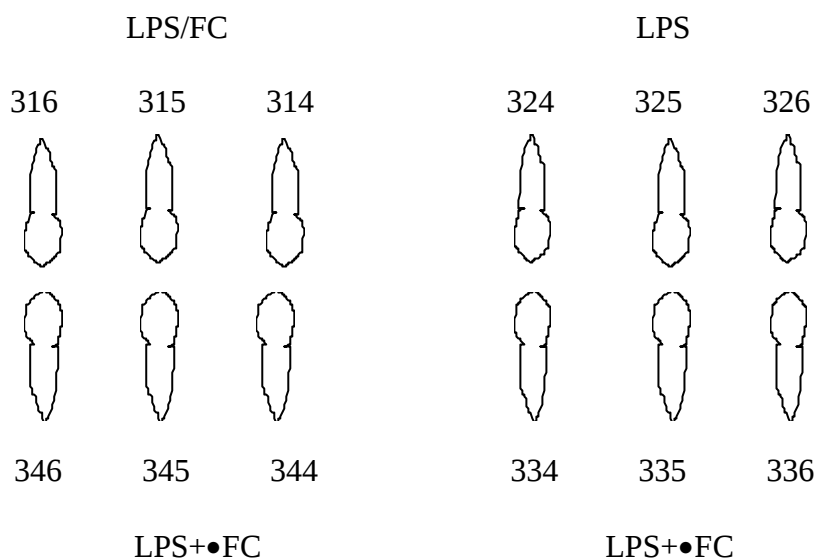
Os pré-molares foram nomeados baseado no odontograma humano, sendo que os terceiros pré-molares receberam a numeração do primeiro molar humano. A esquerda desses números foi acrescido o número referente ao macaco utilizado no experimento. O esquema de rodízio seguiu a seguinte ordem:

* Seringa de insulina Ibragama

** Agulha hipodérmica precisionslide 30G1/2 13x3

*** IRM - Dentsply

ANIMAL 1**ANIMAL 2**

ANIMAL 3

Após os procedimentos, foram aplicados por via intramuscular 0,7ml de Diclofenaco de potássio (Cataflan) 75 mg. Foi também administrado 2 gotas de Paracetamol (Tylenol) 2 vezes ao dia durante 2 dias por via oral. Após os 2 dias os animais receberam a mesma alimentação que os outros animais do Núcleo.

Os animais foram mantidos no Núcleo de Procriação de Macacos-Prego durante 55 dias e decorrido este período foram sacrificados sob anestesia e perfusão com paraformaldeído em diferentes pHs.

Procedimento histológico

As maxilas e mandíbulas foram removidas, imediatamente radiografadas e recortadas para separação dos dentes e as peças imersas em formol de Lillie tamponado, pH 7,2³⁴ permanecendo em processo de fixação por 96 horas.

A seguir as peças foram lavadas em água corrente durante 24 horas, imersas em desmineralizador de Morse⁴¹ por 45 dias com trocas a cada 3 dias. Salienta-se que as maxilas ficaram envoltas em compressas de gaze, presas com fitilho a fim de permanecerem suspensas no líquido. Após completa desmineralização, as peças foram neutralizadas em solução de sulfato de sódio durante 24 horas.

Os dentes passaram por processo de desidratação em álcoois crescentes (70%, 90% e absoluto), diafanização em xilol, embebição em parafina, confecção do bloco e microtomia em micrótomo rotatório, obtendo-se cortes semi-seriados de 6µm de espessura.

Durante o recorte das peças não foi possível a separação de alguns dentes para a confecção de blocos individuais devido a proximidade dos seus ápices radiculares. Ficaram unidos em um único bloco o 1º e 2º pré-molar superior direito do macaco 1 (grupo III), 1º e 2º pré-molar superior esquerdo do macaco 3 (grupo III), 1º e 2º pré-molar superior esquerdo do macaco 1 (grupo I) e 1º e 2º pré-molar inferior direito do macaco 1 (grupo I).

Coloração

Todo o material foi corado com hematoxilina-eosina para análise morfológica. Coloração pelo Tricrômico de Masson para análise da substância intercelular amorfa e fibrosa, e coloração de Brown e Brenn para verificar a presença de bactérias.

A análise das lâminas foi realizada com auxílio microscópio óptico comum* e todos os eventos relevantes foram fotografados para posterior arquivamento.

Análise histopatológica

Os eventos histopatológicos avaliados foram intensidade de resposta inflamatória e presença de bactérias. Estes eventos histopatológicos foram graduados como descrito nos quadros 1 e 2.

* Fotomicroscópio óptico - Zeiss, modelo Jenaval

Quadro 1 – Escores atribuídos aos eventos histopatológicos

Escore	Observação
0 – Sem inflamação	Nenhuma inflamação
1- Inflamação leve	As amostras mostram células inflamatórias difusas, predominantemente crônicas e as características estruturais da polpa residual ainda identificáveis
2 – Inflamação moderada	As amostras demonstram acúmulos focais das células inflamatórias, mas nenhuma necrose no tecido e desaparecimento das características estruturais da polpa residual e dos tecidos periapicais e nenhuma necrose tecidual
3 – Inflamação severa	Substituição extensiva da polpa residual ou dos tecidos periapicais por um infiltrado inflamatório celular
4 – Abscesso	Formação de abscesso

ISO²⁷, 1997

Quadro 2 - Presença de bactérias

Escore	Observação
0	Ausente
1	Presente no interior do canal radicular
2	Presente no forame apical e/ou região periapical

ISO²⁷, 1997

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, utilizando-se o teste Kruskal-Wallis, pois foram estudados 3 grupos de dados ordinais, não emparelhados (Doria Filho¹⁵, 1999).

Para esta análise, foi utilizado o software GMC 2002, desenvolvido pelo Prof. Dr. Geraldo Maia Campos, do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

Resultado

Grupo I (mistura de endotoxina e formocresol)

Os 12 dentes utilizados no experimento resultaram em 10 blocos para análise histológica, sendo que 8 dentes foram arranjados em blocos individuais e 4 dentes em blocos com dois dentes cada.

Este grupo apresentou a região apical e periapical com reação inflamatória severa na maioria dos dentes pulpectomizados e com canal preenchido com a mistura de endotoxina e formocresol.

A reação inflamatória foi classificada como severa, caracterizada pela presença de grande número células inflamatórias, especialmente células plasmócitos, macrófagos, neutrófilos e células gigantes multinucleadas (Figura 5).

Os vasos sanguíneos apresentam-se hiperemiados, com a luz repleta de hemáceas e marginação leucocitária. Este evento proporcionou um aumento na concentração de leucócitos, na sua maioria mononucleares espalhados pela região apical em meio a células residentes do tecido conjuntivo e substância intercelular fibrosa (Figuras 6 e 7).

Foi observado também grande número de capilares linfáticos. Não foi encontrada contaminação por bactérias (Figura 8).

Todos os blocos deste grupo apresentaram esta classificação de inflamação.

Grupo II (introdução de endotoxina no canal e curativo com formocresol)

Este grupo foi formado por 15 dentes que foram conformados em blocos individuais.

A reação inflamatória foi classificada como severa, caracterizada pela presença de grande número de leucócitos polimorfonucleares na região central das lesões, rodeadas por macrófagos muitas vezes ativos (Figuras 9, 10 e 11).

Mais distante da região central das lesões observou-se presença de células mononucleares e cápsula fribrosa rodeado as lesões.

Os sistemas vasculares sanguíneo e linfático apresentaram-se com dilatação acentuada.

Não foi encontrada contaminação por bactérias (Figura 12).

Este quadro foi observado em 11 dos 15 espécimes observados. Em 2 espécimes foram observadas reação inflamatória moderada e 2 sem reação inflamatória.

Grupo III (endotoxina) - controle

Os 9 dentes utilizados no experimento resultaram em 7 blocos para análise histológica, sendo que 5 dentes foram arranjados em blocos individuais e 2 dentes em blocos com dois dentes cada.

Na região periapical pode-se observar reação inflamatória de leve a moderada (Figura 13).

Esta reação estava bem representada pela presença de leucócitos mononucleares macrófagos, plasmócitos e em alguns espécimes polimorfonucleares restritos à região central da reação (Figura 14 e 15).

Rodeando os leucócitos, foi observado grande concentração de capilares sangüíneos, e o periápice apresentava-se com edema e dilatação do sistema vascular sangüíneo e linfático.

Não foi encontrada contaminação por bactérias (Figura 16).

Cinco espécimes foram classificados como inflamação moderada e 2 como sem inflamação.

Tabela dos eventos histopatológicos

Tabela 1 – Frequência dos resultados da análise histopatológica com relação à intensidade do infiltrado inflamatório.

Tipo de Inflamação	Grupo I (LPS/FC)	Grupo II (LPS+●FC)	Grupo III (LPS)
Sem inflamação		2	2
Leve			
Moderada		2	5
Severa	10	11	
Abcesso			

RESULTADOS

GRUPO I

RESULTADOS

GRUPO II

RESULTADOS

GRUPO III

Análise estatística

Os grupos I (LPS/FC), II (LPS e curativo com FC) e III (LPS) foram confrontados dois a dois, utilizando-se o teste Kruskal-Wallis pois foram estudados 3 grupos de dados ordinais, não emparelhados (Doria Filho, 1999).

Tabela 2 – Resultados do teste Kruskal-Wallis

Valor (H) de Kruskal-Wallis calculado	16.5697
Valor do χ^2 para 2 graus de liberdade	16.56
Probabilidade ao H0 para esse valor	0,03%
Significante ao nível de 1 % (alfa = 0,01)	

O valor de H aparece repetido como χ^2 porque a sua significância, avaliada pela tabela do qui-quadrado.

Tabela 3 - Comparações entre médias dos postos das amostras

Amostras comparadas (comparações 2 a 2)	Diferenças entre as médias	Valor críticos (à)			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Grupo I X Grupo II	4.4667	4.6417	6.2556	8.3052	ns
Grupo II X Grupo III	15.5714	5.6031	7.5512	10.0254	0,1%
Grupo I X Grupo III	11.1048	5.2044	7.0139	9.3120	0,1%

Os dados contidos na Tabela 3 mostram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos I (mistura LPS e FC) e grupo II (LPS e curativo com FC). E houve diferença estatisticamente significativa em 0,1% entre os grupo I e o grupo III, e entre o grupo II e o grupo III.

Discussão

Da metodologia

Neste trabalho foi utilizado macaco como animal experimental, esta escolha teve como fundamentação científica, a proximidade com a raça humana na escala filogenética e ainda pelas características de suas estruturas dentais, em especial o forame apical. (Estrela¹⁸,2001).

Sabe-se que o efeito da endotoxina é dose-dependente e várias concentrações já foram testadas. Dwyer & Torabinejad¹⁷, em 1981 utilizaram 1, 10 e 100 µg/ml; Pitts et al.⁵², em 1982 utilizou 1 mg/ml, Dahlén et al.¹⁴, em 1981 e Silva et al.⁶⁷, em 2002 utilizaram 10 mg/ml. Silva et al.⁶⁷, 2002 observaram que a concentração de 10mg/ml, mesmo sendo uma concentração elevada, foi capaz de ser inativada pelo hidróxido de cálcio, assim sendo a concentração da endotoxina utilizada neste trabalho foi de 10mg/ml.

No presente trabalho foi utilizada a endotoxina da enterobactéria *E. coli* por ser representativa da maioria das endotoxinas, pela sua toxicidade e pela sua ampla utilização em trabalhos de pesquisa (Dahlén et al.¹⁴, em 1981, Mattison³⁸, 1987; Barthel³, 1997; Silva, 2002).

Existem diversas pesquisas sobre o formocresol, destaca-se trabalhos de avaliação clínica e radiográfica (Droter¹⁶,1963; Rölling et al.⁵⁸,1976; Boeve & Dermaut⁶, 1982; van Amerongen et al.⁷⁹,1986; Mulder et al.⁴²,1987; Nunn et

al.⁴⁸,1996) e estudos histopatológicos e histoquímicos sobre a sua toxicidade (Myers et al.⁴⁴, 1978; Pashley et al.⁵¹, 1980; Myers et al.⁴⁵, 1983; Gazi et al.²², 1981; Jeng et al.²⁸, 1987; Yamasaki et al.⁸³, 1994; Matsumoto et al.³⁸, 1998). É o medicamento mais utilizado em terapias endodônticas na dentadura decídua tanto para pulpotomias vitais como em casos de pulpectomias e necrose pulpar, porém até o ano de 2000 nenhum estudo havia realizado relacionando este medicamento com a endotoxina. Sant'Anna et al.⁶², 2000 avaliaram o efeito da associação endotoxina formocresol em tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos. Foi utilizada a mistura de formocresol e endotoxina em partes iguais, sendo que a endotoxina estava na concentração de 10 mg/ml. A mistura formocresol e endotoxina provocou no tecido subcutâneo de camundongos inflamação aguda e necrose.

Dos resultados

Kononen et al.³¹, em 1999 verificaram a presença de microorganismos anaeróbios na cavidade bucal de crinaças no primeiro ano de vida. No processo de cárie, o que se verifica inicialmente é uma contaminação por microorganismos aeróbios e facultativos. Com a evolução do processo observa-se a exposição e contaminação pulpar, dentro da polpa observa-se uma mudança no tipo bacteriano (“shift” microbiano), havendo uma predominância de microorganismos anaeróbios e gram-negativos disseminados por todo o sistema de canais radiculares, especialmente em dentes com necrose pulpar e reação periapical (Shein & Shilder⁶³, 1975). Isto se deve a diferenças nutricionais e de tensão de oxigênio que ocorrem ao se penetrar no interior dos canais radiculares (Sundqvist⁷³, 1992). As bactérias gram-negativas são constituídas de membrana citoplasmática e membrana esquelética, sendo esta última formada por proteínas, lipoproteínas e lipopolissacárides (LPS) também denominado endotoxina (Dahlén et al.¹⁴, em 1981, Mattison³⁸, 1987; Pitts et al.⁵², 1982; Rietchield & Brade⁵⁷, 1992).

A endotoxina é liberada durante a multiplicação ou a lise da bactéria promovendo repostas biológicas no tecido periapical como inflamação e reabsorção óssea. O processo inflamatório é desencadeado pela ativação de macrófagos, neutrófilos, sistema complemento e metabolismo do ácido aracdônico. Esta atuação desencadeia a liberação de mediadores químicos como as interleucinas (1 α , 1 β , 6 e 8) e Fator de necrose tumoral pelos macrófagos e ativam a osteoclastogênese aumentando o efeito inflamatório local e reabsorção

óssea (Raiz⁵⁵,1974, Morrison & Kline⁴⁰,1977; Dwyer & Torabinejad¹⁷,1981; Pitts et al.⁵²,1982; Mattison et al.³⁸,1987; Stashenko⁷⁰,1990; Safavi & Rossomando⁶¹,1991; Wang & Stashenko⁸⁰,1991, Horiba et al.²⁵,1991; Rietchield & Brade⁵⁷,1992, Safavi & Nichols⁵⁹,1993; Jiang et al.²⁹, 2003).

Muitos trabalhos foram realizados mostrando o efeito tóxico da endotoxina nos tecidos apicais e periapicais em animais experimentais. Foi observado que a aplicação de endotoxina em canais radiculares após pulpectomia, em concentrações variadas promove lesão periapical visível radiograficamente (Dahén et al.¹⁴,1981; Dwyer & Torabinejad¹⁷,1981; Pitts et al.⁵²,1982; Mattison³⁸, 1987; Silva et al.⁶⁷, 2002).

Em contraste, Munford & Hall, 1986 demonstraram que os neutrófilos liberam enzimas que reduzem a toxicidade tecidual da endotoxina, mostrando que o próprio organismo é capaz de se defender contra a ação deste antígeno.

Os resultados do grupo da endotoxina (III) confirmam os relatos da literatura, uma vez que aos 55 dias foi observada inflamação moderada no tecido periapical, presença de neutrófilos e macrófagos no local. Comparando este grupo com os outros grupos experimentais, observa-se uma melhora no quadro inflamatório, o que sugere que o organismo do animal estava reagindo, iniciando o processo de reparo.

Já nos grupos experimentais (I e II) o que se observou foi um atraso no processo de reparo, uma vez que a inflamação foi classificada como severa. Isso aconteceu provavelmente pela presença do formocresol. Nossos resultados concordam com aqueles obtidos por vários investigadores quando relatam que o

formocresol é citotóxico e retarda o processo de reparo (Yamasaki, 1998; Matsumoto et al., 1998, Sant'Anna et al., 2000).

Porém a dúvida permanece, pois o formocresol tem comprovada efetividade clínica e radiográfica para o tratamento endodôntico de dentes decíduos, tanto nos casos de biopulpectomia como necropulpectomia. (Droter¹⁶,1963; Röling et al.⁵⁸,1976; Boeve & Dermaut⁶,1982; van Amerongen et al.⁷⁹,1986; Mulder et al.⁴²,1987; Nunn et al.⁴⁸,1996).

Apesar do grupo experimental II tentar simular os procedimentos realizados durante o ato clínico, alguns fatores podem ter interferido no resultado, pois no presente trabalho o curativo com formocresol permaneceu no interior da câmara pulpar por 55 dias, o que não condiz com a realidade clínica, uma vez que o curativo com formocresol não deve permanecer mais que 7 dias no interior da câmara pulpar. Isto pode justificar a presença de uma reação inflamatória severa.

Os grupos experimentais I e II utilizaram-se do formocresol associado à endotoxina porém de formas diferentes, o grupo I na forma de mistura e o grupo II a introdução da endotoxina e curativo com formocresol. Foram observados resultados iguais para os dois grupos, ou seja os dois apresentaram reação inflamatória severa. À primeira vista, espera-se que no grupo I (mistura) o resultado deva ser mais desfavorável quando comparado ao grupo II (curativo), uma vez que no grupo I o formocresol misturado à endotoxina foi introduzido no interior do canal radicular, porém o que se observou foi uma igualdade na resposta dos tecidos periapicais. Uma explicação para este resultado é que o formocresol é

um medicamento volátil e age a distância, produzindo os mesmos efeitos citotóxicos quando introduzido diretamente no interior do canal radicular.

Uma possível resposta para esta diferença entre os resultados relatados na literatura e o presente trabalho poderia ser que no procedimento clínico utiliza-se dois curativos de formocresol com trocas semanais e em seguida obtura-se a entrada do canal com óxido de zinco-eugenol, com isso promove-se uma descontaminação dos canais e as possíveis reações inflamatórias que possam estar ocorrendo no tecido periapical serão reparadas pelo próprio organismo, através da ativação de seu sistema imune.

O único medicamento capaz de inativar a endotoxina é o hidróxido de cálcio. Esta inativação já foi comprovada em estudos químicos (Safavi & Nichols⁵⁹, 1993), em culturas de células (Barthel et al.³, 1997; Buck et al.⁷, 2001; Jiang et al.²⁹, 2003) e estudos *in vivo* (Silva et al.⁷, 2002).

Não é possível determinar através deste estudo qual a interação química entre a endotoxina e o formocresol. Este trabalho teve a função de observar a capacidade do formocresol em atuar sobre a endotoxina através de uma estudo *in vivo* e o que pode-se concluir é que o formocresol parece não inativar os efeitos tóxicos da endotoxina, ou até a interação formocresol/endotoxina produziu inflamação tecidual mais severa que a endotoxina sozinha.

Fica então aberta a possibilidade de novos trabalhos para a verificação do real atuação do formocresol sobre a endotoxina bacteriana, uma vez que o formocresol é ainda um dos medicamentos mais populares e ainda o mais utilizado para o tratamento endodôntico de dentes decíduos.

Conclusão

Dentro das condições experimentais do trabalho, os resultados obtidos permitem concluir que:

- A associação endotoxina e formocresol, sendo ela na forma de mistura (grupo I) ou por introdução de endotoxina no canal e curativo de formocresol (grupo II) influenciaram a resposta dos tecidos periapicais. Isto ficou demonstrado pois a associação promoveu o desenvolvimento de lesão periapical severa, enquanto que a endotoxina sozinha (grupo III) provocou reação periapical moderada.

Referências*

1. ASSED, S. et al. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth chronic apical periocontitis detected by indirect immunofluorescence. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.12, n.2, p.66-69, Apr. 1996.
2. AVRAM, D.C.; PULVER, F. Pulpotomy medicaments for vital primary teeth. Surveys to determine use and attitudes in pediatric dental practice and in dental schools throughout the world. **ASDC J. Dent. Child.**, Fulton, v.56, n.6 p.426-434, Nov./Dec.1989.
3. BARTHEL, C.R. et al. M. TF-alfa in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.30, n.3, p.155-159, May 1997.
4. BENGTON, A.L.; GUEDES-PINTO, A.C.; BENGTON, L.G. Uso do formocresol diluído 1/5 em dentes decíduos com vitalidade. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v.40, n.6, p.424-426, nov./dez. 1986.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2002. 24p

5. BLOCK, R.M. et al. Systemic distribution of ^{14}C labeled paraformaldehyde incorporated within formocresol following pulpotomies in dogs. **J. Endod.**, Baltimore, v.9, n.5, p.176-189, May 1983.
6. BOEVE, C.; DERMAUT, L. Formocresol pulpotomy in primary molars: a long-term radiographic evaluation. **ASDC J. Dent. Child.**, Fulton, v.49, n.3, p.191-196, May/June 1982.
7. BUCK, R.A. et al. Detoxication of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. **J. Endod.**, Baltimore, v.27, n.5, p.325-327, May, 2001.
8. BUCKLEY, J.P. The chemistry of pulp decomposition, with a rational treatment for this condition and its sequelae. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.3, p.764-771, Nov. 1904.
9. COODLIDGE, E.D. Reaction of dog tissue to drugs used in root canal treatment. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.19, p.747-759, 1932.
10. COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Robbins- Patologia estrutural e funcional**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1231p.

11. CUNNINGHAM, K.W.; LAZARI, E.P.; RANLY, D.M. The effect of formocresol and glutaraldehyde on certain enzymes in bovine dental pulp. **Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol.**, St. Louis, v.54, n.1, p.100-103, July 1982.
12. CURZON, M.S. et al. Primary pulpotomies. **Br. Dent. J.**, London, v.189, n.5, p.235, Sept. 2000.
13. DAHLÉN, G.; BERGENHOLTZ, G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.59, n.3, p.1033-1040, June 1980.
14. DAHLÉN, G.; MAGNUSSON, B.C.; MOLLER, A. Histological and histochemical study of the influence of lipopolysaccharide extracted from *Fusobacterium nucleatum* on the periapical tissues in the monkey *Macaca fascicularis*. **Arch. Oral. Biol.**, Oxford, v.26, n.7, p.591-598, 1981.
15. DORIA FILHO, U. **Introdução à bioestatística**. 4.ed. São Paulo: Negócio Editora, 1999. 158p.
16. DROTTER, J.A. Formocresol in vital and non-vital teeth. A clinical study. **ASDC J. Dent. Child.**, Fulton, v.30, p.239-242, 1963.

17. DWYER, T.G.; TORABINEJAD, M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat. **J. Endod.**, Baltimore, v.7, n.1, p.31-35, Jan.1981.
18. ESTRELA, C. **Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. 482p.
19. FAROOQ, N.S. et al. Success rates of formocresol pulpotomy and indirect pulp therapy in the treatment of deep dentinal caries in primary teeth. **Pediatr. Dent.**, Illinois, v.22, n.4, p.278-286, July/Aug. 2000.
20. FEIGAL, R.J.; MESSER, H.H. A critical look at glutaraldehyde. **Pediatr. Dent.**, Illinois, v.12, n.2, p.69-71, Apr./May 1990.
21. FRIEDBERG, B.H.; GARTNER, L.P. Embryotoxicity and teratogenicity of formocresol on developing chick embryos. **J. Endod.**, Baltimore, v.16, n.9, p.434-437, Sept., 1990.
22. GAZI, H.A.; NAYAK, R.G.; BHAT, K.S. Tissue-irritation potencial of dilute formocresol. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.51, n.1, p.74-85, Jan. 1981.

23. GUELMANN, M. et al. The success of emergency pulpotomies in primary molars. **Pediatr. Dent.**, Illinois, v.24, n.3, p.217-220, May/June 2002.
24. HAIGHT-PONCE, E.; ENDO, H.; HORIUCHI, H. Endotoxin activity measured by limulus assay. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.15, n.3, p.109-112, June 1999.
25. HORIBA, N. et al. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infested root canals. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.71, n.4, p.492-495, Apr. 1991.
26. HORIBA, N.O. et al. Complement activation by lipopolysaccharides purified from gram-negative bacteria isolated from infected root canals. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.74, n.5, p.648-651, Nov. 1992.
27. INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO/7405-1997:** Dentistry - Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry - Test methods for dental materials, 1997.
28. JENG, H.W.; FEIGAL, R.J.; MESSEER, H.H. Comparison of the cytotoxicity of formocresol, formaldehyde, cresol, and glutaraldehyde using human pulp fibroblast cultures. **Pediatr. Dent.**, Illinois, v.9, n.4, p.295-300, Oct. 1987.

29. JIANG, J. et al. Calcium hydroxide reduces lypopolysaccharide-stimulated osteoclast formation. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** St. Louis, v.95, n.3, p.348-354, Mar. 2003.
30. KING, S.A.; McWHORTER, A.G.; SEALE, N.S. Concentration of formocresol used by pediatric dentists in primary tooth pulpotomy. **Pediatr. Dent.**, Illinois, v.24, n.2, p.157-159, Mar./Apr. 2002.
31. KÖNÖNEN, E. et al. Establishment of oral anaerobes during the first year of life. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 78, n.10, p. 1634-1639, Oct. 1999.
32. LEWIS, B. Formaldehyde in dentistry: a review for the millennium. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, Birmingham, v.22, n.2, p.167-177, Winter 1998.
33. LEWIS, B.B.; CHESTNER, S.B. Formaldehyde in dentistry: a review of mutagenic and carcinogenic potencial. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.103, n.3, p.429-434, Sept. 1981.
34. LILLIE, R.D. **Histopathologic tecnic and practical histochemistry.** New York: McGrawHill, 1954.

35. LLEWELYN, D.R. UK National Clinical Guidelines in Paediatric Dentistry. The pulp treatment of the primary dentition. **Int. J. Paediatr. Dent.**, Oxford, v.10, n.3, p. 248-252, Sept. 2000.
36. MATSUMOTO, A.; ANAN, H.; MAEDA, K. Na immunohistochemical study of the behavior of cells expressing interleukin-1 α and interleukin-1 β within experimentally induced periapical lesions in rats. **J. Endod.**, Baltimore, v.24, n.12, p.811, Dec. 1998.
37. MATSUSHITA, K. et al. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. **J. Endod.**, Baltimore, v.25, n.12, p.795-799, Dec. 1999.
38. MATTISON, G.D. et al. The effect of Eikenella corrodens endotoxin on periapical bone. **J. Endod.**, Baltimore, v.13, n.12, p.559-565, Dec. 1987.
39. MORAWA, A.P. et al. Clinical evaluation of pulpotomies using dilute formocresol. **ASDC J. Dent. Child.**, Fulton, v.42, n.5, p.360-363, Sept./Oct. 1975.

40. MORRISON, D.C.; KLINE, L.F. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharide. **J. Immunol.**, Baltimore, v.118, n.1, p.362-368, Jan. 1977.
41. MORSE, A. Formic acid sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. **J. Dent. Res.**, Washington, DC, v.24, p.143-153, 1945.
42. MULDER, G.R.; van AMERONGEN, W.E.; VINGERLING, P.A. Consequences of endodontic treatment of primary teeth Part II. A clinical investigation into the influence of formocresol pulpotomy on the permanent successor. **ASDC J. Dent. Child.**, Fulton, v.54, n.1, p.35-39, Jan./Feb. 1987.
43. MUNFORD, R.S.; HALL, C.L. Detoxification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) by a human neutrophil enzyme. **Science**, Washington, DC, v.234, n.4773, p.203-205, Oct. 1986.
44. MYERS, D.R. et al. Distribution of ¹⁴C-formaldehyde after pulpotomy with formocresol. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.96, n.5, p.805-813, May 1978.
45. MYERS, D.R. et al. Tissue changes induced by the absorption of formocresol from pulpotomy sites in dogs. **Pediatr. Dent.**, Illinois, v.5, n.1, p.6-8, May 1983.

46. NAKANE, A. et al. Effects of lipopolysaccharides on human dental pulp cells. **J. Endod.**, Baltimore, v.21, n.3, p.128-130, Mar. 1995.
47. NISSAN, R. et al. Ability of bacterial endotoxin to diffuse through human dentin. **J. Endod.**, Baltimore, v.21, n.2, p.62-64, Feb. 1995.
48. NUNN, J.H.; SMEATON, I.; GILROY, J. The development of formocresol as a medicament for primary molar pulpotomy procedures. **ASDC J. Dent. Child.**, Fulton, v.63, n.1, p.51-53, Jan./Feb. 1996.
49. OHARA, P.; TORABINEJAD, M.; KETTERING, J.D. Antibacterial effects of various endodontic medicaments on selected anaerobic bacteria. **J. Endod.**, Baltimore, v.19, n.10, p.498-550, Oct. 1993.
50. OPAL, S.M. et al. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.180, n.5, p.1584-1589, Nov. 1999.
51. PASHLEY, E.L. et al. Systemic Distribution of ¹⁴C-formaldehyde from formocresol-treated pulpotomy sites. **J. Dent. Res.**, Washington, DC, v.59, n.3, p.603-608, Mar. 1980.

52. PITTS, D.L.; WILLIAMS, B.L.; MORTON JR, T.H. Investigation of role of endotoxin in periapical inflammation. **J. Endod.**, Baltimore, v.8, n.1, p.10-18, Jan. 1982.
53. PRIMOSCH, R.E.; GLOMB, T.A.; JERRELL, R.G. Primary tooth pulp therapy as taught in predoctoral pediatric dental programs in the United States. **Pediatr. Dent.**, Illinois, v.19, n.2, p.118-122, Mar./Apr. 1997.
54. QURESHI, N. et al. Position of ester groups in the lipid A backbone of lipopolysaccharides obtained from *Salmonella typhimurium*. **J. Biol. Chem**, Baltimore, v.258, n.21, p.12947-12951, Nov. 1983
55. RAIZ, L.G. et al. Complement-dependent stimulation. **Science**, Washington, DC, v.185, n.4153, p.789-791, 1974.
56. RANLY, D.M.; GARCIA-GODOY, T. Reviewing pulp treatment for primary teeth. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.122, n.10, p.83-85, Sept. 1991.
57. RIETCHIELD,I; BRADE,H. Bacterial endotoxin. **Sci. Am.**, New York, v.267, n.2, p.54-61, Aug. 1992.

58. RÖLLING, I. HASSELGREN, G.; TRONSTAD, L. Morphologic and enzyme histochemical observations on the pulp of human primary molars 3 to 5 years after formocresol treatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.42, n.42, p.518-528, Oct. 1976.
59. SAFAVI, K.E.; NICHOLS, F. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. **J. Endod.**, Baltimore, v.19, n.2, p.76-78, Feb. 1993.
60. SAFAVI, K.E.; NICHOLS, F.C. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. **J. Endod.**, Baltimore, v.20, n.3, p.127-129, Mar. 1994.
61. SAFAVI, K.E.; ROSSOMANDO, E.F. Tumor necrosis factor identified in periapical tissue exsudates of teeth with apical periodontitis. **J. Endod.**, Baltimore, v.17, n.1, p.12-14, Jan. 1991.
62. SANT'ANNA, A.T. **Avaliação do efeito do formocresol sobre a endotoxina (LPS) em subcutâneo de camundongos Mus musculus. Avaliação histológica.** 2000. 118f. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
63. SCHEIN, B.; SCHILDER, H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. **J. Endod.**, Baltimore, v.1, n.1, p.19-21, Jan. 1975.

64. SCHONFELD, S.E. et al. Endotoxin activity in periapical lesions. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.53; n.1; p.82-87, Jan. 1982.
65. SEGURA, J.J.; JIMENEZ-RUBIO, A.; CALVO, J.R. Effects of formocresol alone vs. formocresol with eugenol on macrophage adhesion to plastic surfaces. **Pediatr. Dent.**, Illinois, v.20, n.3, p.177-180, May/June 1998.
66. 's-GRAVENMADE, E.J. Some biochemical considerations of fixation in endodontics. **J. Endod.**, Baltimore, v.1, n.1, p.233-237, July 1975.
67. SILVA, L.A.B. et al. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin *in vivo*. **J. Endod.**, Baltimore, v.28, n.2, p.94-98, Feb. 2002.
68. SQUIRE, R.A.; CAMERON, L.L. An analysis of potencial carcinogenic risk from formaldehyde. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, Duluth, v.4, n.2, p.107-120, June 1984.
69. SIQUEIRA JR., J.F. **Inflamação:** aspectos biodinâmicos das respostas inflamatória e imunológica. 1ª ed. Rio de Janeiro: Pedro Primeiro, 1996. 190p.
70. STASHENKO, P. Role of immune cytotoxins in the pathogenesis of periapical lesions. **Endod. Dent. Traumol.**, Copenhagen, v.6, n.3, p.89-96, June 1990.

71. STRAFFON, L.H.; HAN, S.S. Effects of varying concentrations of formocresol on RNA synthesis of connective tissues in sponge implants. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.29, n.6, p.915-925, June 1970.
72. STRANGE, D.M. et al. Outcome of formocresol/ZOE sub-base pulpotomies utilizing alternative radiographic success criteria. **Pediatr. Dent.**, Illinois, v.23, n.4, p.331-336, July/Aug. 2001.
73. SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. **J. Endod.**, Baltimore, v.18, n.9, p.427-430, Sept., 1992.
74. SWEET, C.A. Procedure for treatment of exposed and pulpless deciduous teeth. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.17, p.1150, 1930.
75. TCHAOU, W.S. et al. Inhibition of pure cultures of oral bacteria by root canal filling materials. **Pediatr. Dent.**, Illinois, v.18, n.7, p.444-449, Nov./Dec. 1996.
76. TENCATE, A.R. **Histologia bucal**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 439p.

77. TORABINEJAD, M.; EBY, W.C.; NAIDORF, I.J. Inflammatory and immunological aspects of the pathogenesis of human periapical lesions. **J. Endod.**, Baltimore, v.11, n.11, p.479-486, Nov. 1985.
78. TROPE, M. Relationship of intracanal medicaments to endodontic flare-up. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.6, n.5, p.226-229, Oct. 1990.
79. van AMERONGEN, W.E.; MULDER, G.R.; VINGERLING, P.A. Consequences of endodontic treatment in primary teeth Part I. A clinical and radiographic study of the influence of formocresol pulpotomy molars. **ASDC J. Dent. Child.**, Fulton, v.53, n.5, p.364-370, Sept./Oct. 1986.
80. WANG, C.Y.; STASHENKO, P. Kinetics of bone-resorbing activity in developing periapical lesions. **J. Dent. Res.**, Washington, DC, v.70, n.10, p.1362-66, Oct. 1991.
81. WATERHOUSE, P.J. Formocresol and alternative primary molar pulpotomy medicaments: a review. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.11, n.4, p.157-162, Aug. 1995.
82. WESTPHAL, O. Bacterial endotoxins. The second Carl Prausnitz Memorial Lecture. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, Brasil, v.49, n.1/2, p.1-43, 1975.

83. YAMASAKI, M., NAKAMURA, H., KAMEYAMA, Y. Irritating effect of formocresol after pulpectomy in vivo. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.27, n.27, p.245-251, Sept. 1994.

SANT'ANNA, A.T. **Avaliação histológica da resposta dos tecidos periapicais de dentes de macaco à endotoxina associada ao formocresol.** 2003 104f. Tese (Doutorado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da endotoxina associada ao formocresol em tecidos periapicais de dentes de macaco, por meio de avaliação histológica. Foram utilizados 36 pré-molares de 3 macacos, que após a abertura coronária e biopulpectomia, foram preenchidos com diferentes medicamentos: Grupo I (12 dentes): mistura de endotoxina/formocresol; Grupo II (15 dentes): endotoxina e curativo de formocresol; Grupo III (controle - 9 dentes): endotoxina. Decorridos 55 dias, os animais foram sacrificados, as peças removidas e submetidas a processamento histológico. Os resultados demonstraram que a associação endotoxina e formocresol, sendo ela na forma de mistura (grupo I) ou por introdução de endotoxina no canal e curativo de formocresol (grupo II) ocasionaram desenvolvimento de inflamação periapical severa, enquanto que a endotoxina sozinha (grupo III) provocou reação periapical moderada. De acordo com a análise estatística não houve diferença nos resultados entre o grupo I e grupo II. E foi observada diferença estatisticamente significante entre os grupos experimentais (grupo I e II) e o grupo controle (grupo III).

Palavras-chave: endodontia, dentes decíduos, endotoxina

SANT'ANNA, A.T. **Histological evaluation of the effect of endotoxin associated with formocresol on the periapical tissues from monkeys teeth.** 2003. 104f. Tese (Doutorado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of endotoxin associated with formocresol on the periapical tissues from monkeys teeth, by using histological evaluation. Thirty-six premolar teeth from 3 monkeys have been used, and after the coronary opening and pulpectomy, they were filled with different medicaments: Group I (12 teeth): endotoxin associated with formocresol; Group II (15 teeth): endotoxin and cotton pullet of formocresol; Group III (control - 9 teeth): endotoxin. After 55 days, the animals were sacrificed and the teeth removed and then submitted to histological processing. The results obtained shown severe inflammation on periapical tissue on group I and on group II, and group III shown moderate inflammation on periapical tissue.

Keywords: endodontics, deciduous tooth, endotoxin