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

DAIANA CAVALLI

ESTUDO COMPARATIVO DE SISTEMAS ROTATÓRIO, RECIPROCANTE E HÍBRIDO NO PREPARO DE CANAIS RADICULARES EM DENTES COM INFECÇÃO ENDODÔNTICA PRIMÁRIA: perfil microbiano e quantificação de endotoxinas

2016

DAIANA CAVALLI

ESTUDO COMPARATIVO DE SISTEMAS ROTATÓRIO, RECIPROCANTE E HÍBRIDO NO PREPARO DE CANAIS RADICULARES EM DENTES COM INFECÇÃO ENDODÔNTICA PRIMÁRIA: perfil microbiano e quantificação de endotoxinas

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

Orientadora: Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera Garakis
Coorientador: Profa. Dra. Flávia Goulart da Rosa Cardoso

São José dos Campos
2016

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2016]. Disponível em http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao

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

Cavalli, Daiana
Estudo comparativo de sistemas rotatório, reciprocante e híbrido no preparo de canais radiculares em dentes com infecção endodôntica primária: perfil microbiano e quantificação de endotoxinas / Daiana Cavalli. - São José dos Campos : [s.n.], 2016.
98 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2016.
Orientadora: Marcia Carneiro Valera
Coorientadora: Flavia Goulart da Rosa Cardoso

1. Endotoxina. 2. Instrumentação. 3. Microbiota. I. Valera, Marcia Carneiro , orient. II. Cardoso, Flavia Goulart da Rosa, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Profa Leila Novaes - Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação (STATI) do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera Garakis (Orientador)
Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

Prof. Adj. Claudio Talge Carvalho
Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

Prof. Adj. Flaviana Bombarda de Andrade
Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru (USP)
Campus de Bauru

São José dos Campos, 16 de dezembro de 2016.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Sergio e Tereza Cavalli, e minha irmã, Juliana Cavalli.

Ao meu noivo, Israel Pereira.

AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui foi uma decisão minha, porém inúmeras pessoas foram fundamentais neste processo.

Inicialmente Deus, que me guiou durante toda minha vida.

Aos meus pais, as pessoas mais importantes da minha vida. Vocês me ensinaram a correr atrás dos meus objetivos, a não desistir quando as coisas ficam difíceis, a persistir e acreditar sempre no melhor. Me incentivaram a minha vida toda, e todas as minhas conquistas são de vocês também. Tudo que faço dedico a vocês.

À minha irmã, Juliana. Você me inspira através de exemplos. Isso começou desde pequenas, quando você passou na Federal, quando você entrou no mestrado, quando você sonha em ser feliz. Obrigada por estar na minha vida!

Ao meu noivo Israel, meu maior incentivador nesses dois anos de mestrado. Sou imensamente grata por tudo que você fez por mim durante este tempo, e sou muito feliz por ter sido escolhida e ter escolhido você para dividir a vida e formar nossa família. Eu amo você.

À professora Marcia Carneiro Valera Garakis. Tenho muito a agradecer à senhora. Por ter confiado em mim e me orientado durante esses dois anos, por ter me incentivado e me cobrado sempre que necessário. Seu amor pela docência é inspirador, e além de ótima professora e orientadora, se mostrou uma pessoa muito humana. Eu aprendi muito com a senhora. Muito obrigada!

À minha coorientadora, Professora Flavia Goulart da Rosa Cardoso. Além de co-orientadora, minha professora na Especialização. Obrigada pela disponibilidade sempre, pela parceria, pela amizade. Você é uma pessoa iluminada e uma professora excelente. Obrigada por tudo, Fla.

Ao professor Claudio Talge Carvalho, por ter aceitado fazer parte da minha banca, e por todo conhecimento compartilhado durante esses dois anos, por ter sempre um sorriso no rosto e uma palavra amiga. Obrigada professor.

À professora Flaviana Bombarda, por ter aceito prontamente fazer parte da minha minha banca, e ser sempre muito simpática nas nossas conversas. É uma honra ter a senhora na minha banca.

A todos os professores do Departamento de Odontologia restauradora, em especial ao Prof. Carlos Henrique Camargo, Profa. Ana Paula Martins, Prof Frederico Martinho, Prof. Eduardo Bresciani, por todos os ensinamentos e convivência durante esses dois anos. Ao Prof. Renato Miotto Palo, que me ajudou na aquisição dos materiais e em quem sempre pude contar durante a execução desta pesquisa.

Aos meus colegas e amigos do mestrado, Cassia Cestari Toia e Esteban Isai Flores Orozco. Fomos parceiros nesta pesquisa, e acho que fizemos um trabalho muito bom. Obrigada pela amizade, parceria e pela paciência, vocês foram fundamentais para mim nestes dois anos. Vou sentir muita falta da nossa convivência, mas a amizade continuará a mesma. Obrigada trio!

A colega e amiga Rayana Khoury, que ingressou no nosso grupo esse ano, e se mostrou uma amiga e parceira maravilhosa. Ray, eu admiro muito sua força de vontade, persistência e disponibilidade para ajudar os outros. Não vou esquecer tudo que você fez por mim nesse ano, muito obrigada!

Aos demais colegas da Pós-Graduação: Fernanda Carvalho Pelegrini, Claudia Luisa Ribeiro Ferreira, Alessandra Machini, Diego Rabelo, Felipe Matos, Amjad Abu Hasna, Monique Costa Moreira França, Tatiane Sampaio Bittencourt, Carlos Henrique Ferrari, Marina Gullo, Débora Dantas, Ingrid Fernandes, Érica Crastechini, Lucélia Gonçalves, Laura Meirelles, Maria José pela amizade e por toda a aprendizagem. Foi muito bom conhecer e conviver com vocês.

Ao pessoal da UnG, Profa. Luciene Figueiredo e à técnica de laboratório Izilvânia Barreto pela disponibilidade de nos ajudar na parte prática do trabalho e por me receber na Universidade, muito obrigada.

Ao Prof. Marco Antonio Rocco, parceiro nas análises tomográficas, obrigada.

A todos os funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP, as técnicas do departamento Fernanda Brito e Josiana Carneiro, as secretárias do departamento, Liliane e Rosangela, ao pessoal da Secretaria da Pós-Graduação, Bruno, Ivan e Sandra, ao pessoal da triagem, que nos ajudou muito nesta pesquisa clínica, aos funcionários da radiologia, da esterilização e as faxineiras, todos vocês tornaram possível a realização desta pesquisa, muito obrigada.

Aos pacientes da pesquisa, por confiarem no nosso trabalho.

A todos que de alguma forma auxiliaram na execução deste trabalho,

Muito obrigada!

"Todo sopro que apaga uma chama, reacende o que for para ficar."

Fernando Anitelli

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS 9
LISTA DE QUADROS 11
LISTA DE TABELAS 12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 13
RESUMO 14
ABSTRACT 16
1 INTRODUÇÃO 18
2 REVISÃO DE LITERATURA 22
2.1 Microbiota endodôntica 22
2.2 Endotoxinas 26
2.3 Sistemas de Instrumentação 31
3 PROPOSIÇÃO 36
4 MATERIAL E MÉTODOS 37
4.1 Procedimentos clínicos 37
4.1.1 Seleção de pacientes 37
4.1.2 Seleção dos casos 37
4.1.3 Intervenção odontológica 38
4.1.4 Coletas do Canal Radicular 39
4.1.5 Preparo biomecânico 40
4.1.6 Medicação Intracanal 41
4.1.7 Obturação dos canais radiculares 43
4.2 Quantificação de endotoxinas 44
4.3 Análise por *checkerboard* 45
4.3.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento 45
4.3.2 Isolamento do DNA e preparo das sondas 46
4.3.3 *Checkerboard DNA-DNA hybridization* 48
4.4 Volumetria dos canais radiculares 50
4.6 Análise estatística 52
5 RESULTADO 53
5.1 Quantificação e monitoramento do perfil bacteriano e de endotoxinas durante as diferentes fases do tratamento endodôntico 53

5.2 Associação de micro-organismos e endotoxinas com sinais e sintomas clínicos em dentes com infecção endodôntica primária..... 62
5.3 Relação entre volumetria do canal radicular (mm^3) com níveis de endotoxinas, micro-organismos, complexos bacterianos e características microbianas 64
6 DISCUSSÃO 68
7 CONCLUSÃO 76
REFERÊNCIAS..... 77
APÊNDICES..... 90
ANEXOS 95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Início da intervenção endodôntica 39

Figura 2 - Intervenção endodôntica 42

Figura 3 - Esquema do atendimento clínico 43

Figura 4 - Teste checkerboard DNA-DNA hybridization 50

Figura 5 - Imagem da TCFC da verificação pré-operatória transferidos para o software Nemotec® após criação das medidas do canal radicular nos diferentes planos de corte, formando um polígono que abrangesse todo o limite do canal 51

Figura 6 - Gráfico de barras de frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano encontradas na primeira coleta de dentes com infecção endodôntica primária 54

Figura 7 - Gráfico de barras de frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano encontradas na segunda coleta de dentes com infecção endodôntica primária 55

Figura 8 - Gráfico de barras de frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano encontradas na terceira coleta de dentes com infecção endodôntica primária 56

Figura 9 - Gráfico de linhas mostrando a diferença entre o valor médio da carga bacteriana balanceado pelo número de pacientes para todas as espécies pesquisadas, nas três coletas realizadas durante o tratamento endodôntico 58

Figura 10 - Gráfico de barras mostrando o número médio de espécies microbianas por coleta, em cada grupo estudado 59

Figura 11 - Gráfico de barras mostrando o número médio de espécies microbianas por grupo estudado 60

Figura 12 - Gráfico de linhas evidenciando a redução dos níveis de endotoxinas (EU/mL) durante o tratamento endodôntico nos três grupos pesquisados 61

Figura 13 - Média dos níveis de endotoxinas (EU/mL) para cada coleta, nos diferentes grupos experimentais..... 62

Figura 14 - Imagem da TCFC pré-operatória transferidos para o software Nemotec® após criação das medidas do canal radicular nos diferentes planos de corte, formando um polígono que abrange todo o limite do canal, sendo possível o cálculo do volume do canal radicular em cm^3..... 65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sistemas de instrumentação utilizados durante preparo biomecânico ... 41

Quadro 2 - Relação das cepas bacterianas, o metabolismo respiratório e a coloração Gram das bactérias utilizadas para o desenvolvimento da sonda de DNA bacteriano, divididas por complexos 47

Quadro 3 - Frequência em números de casos de detecção dos micro-organismos pesquisados durante o tratamento endodôntico 57

Quadro 4 - Associações positivas entre sinais e sintomas 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média do número de espécies microbianas encontradas em cada grupo nas diferentes fases do tratamento endodôntico 59

Tabela 2 - Média dos níveis de endotoxinas (EU/mL) encontradas em cada grupo, nas diferentes etapas do tratamento endodôntico 60

Tabela 3 - Sinais e sintomas clínicos nos diferentes grupos experimentais 62

Tabela 4 - Frequência e valor de p para estudo da associação entre sinais e sintomas clínicos e níveis de endotoxinas 64

Tabela 5 - Associações positivas entre espécies bacterianas e volume do canal radicular em dentes com infecção endodôntica primária 66

Tabela 6 - Associações positivas entre complexos bacterianos e características bacterianas e volume do canal radicular em dentes com infecção endodôntica primária 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$Ca(OH)_2$	Hidróxido de cálcio
CPO	Comprimento Pré-odontométrico
CT	Comprimento de trabalho
DICOM	*Digital Image na Comunication in Medicine*
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EU/mL	Unidade de Endotoxina por Mililitro
FOV	*Field of View*
IL	Interleucina
LAL	Lisado de Amebócitos de *Limulus*
LPS	Lipopolissacarídeos
LTA	Ácido Lipoteicóico
MIC	Medicação Intracanal
MPR	Multiplanar
NaOCl	Hipoclorito de Sódio
NiTi	Níquel-titânio
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PMN	Polimorfonucleares
PBM	Preparo Biomecânico
RNA	Ácido Ribonucléico
TCFC	Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFC/mL	Unidade Formadora de Colonia por Mililitro
VMGA	V*iability Medium Goteborg Anaerobically*

Cavalli D. Estudo comparativo de sistemas rotatório, reciprocante e híbrido no preparo de canais radiculares em dentes com infecção endodôntica primária: perfil microbiano e quantificação de endotoxinas [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2016.

RESUMO

Os objetivos deste trabalho são: 1) Quantificar por *checkerboard* a carga microbiana e pelo método de LAL endotoxinas (EU/mL) nas infecções endodônticas primárias; 2) Realizar o monitoramento dos níveis de endotoxinas (EU/mL) e de carga microbiana antes do tratamento, após o preparo biomecânico com sistemas de instrumentação rotatória, reciprocante e híbrida e após o uso da medicação intracanal; 3) Relacionar sinais e sintomas clínicos com níveis de endotoxinas, micro-orgnismos e com complexos bacterianos; 4) Relacionar volumetria dos canais radiculares por meio de TCFC com níveis de endotoxina, micro-organismos e complexos bacterianos. Trinta dentes com infecção endodôntica primária e presença de lesão periapical foram submetidos a TCFC antes do tratamento e avaliados quanto a presença de sinais e sintomas clínicos. Após abertura coronária, foi realizada a coleta inicial nos canais radiculares, e em seguida, procedeu-se com o tratamento endodôntico, sendo os dentes divididos em diferentes grupos experimentais de acordo com o sistema de instrumentação utilizado (n=10): rotatório Mtwo (MTWO), reciprocante Reciproc (REC), e híbrido Genius (GEN). Durante o preparo biomecânico, os canais foram irrigados com 24 mL de NaOCl 2,5%. Foram realizadas coletas do conteúdo dos canais radiculares: logo após a abertura coronária (1 col), após a instrumentação (2 col), e após a MIC por 14 dias, realizada com pasta de hidróxido de cálcio associada a solução salina fisiológica (3 col). A detecção de micro-organimos foi realizada pelo teste *checkerboard DNA-DNA hybridization*. A quantificação de endotoxinas foi realizada pelo teste cinético cromogênio do lisado de amebócito de *Limulus*. As volumetrias dos canais radiculares foram realizadas com auxílio do software Nemotec®. Todos os dados foram analisados estatisticamente. Os resultados mostraram a detecção de micro-organismos e endotoxinas em 100% das amostras iniciais, sendo as bactérias *C. ochracea* e *F. nucleatum* as mais prevalentes (53%). Após o PBM, os micro-organismos mais encontrados foram *F. nucleatum* e *L. buccalis* (50%); e após a MIC *C. gracilis* (53,3%). Não houve diferença estatística entre os grupos quanto à redução da carga microbiana. Quanto as endotoxinas, logo após o PBM, o grupo que mais reduziu foi o MTWO, seguido por GEN e REC; após a MIC, o grupo que mais reduziu foi o GEN, seguido pelo MTWO e REC, porém todos os grupos se comportaram de maneira semelhante. Dor espontânea foi relacionada com *P. nigrescens*; dor a percussão com *P. gingivalis, V. parvula, S. sputigena, P. nigrescens* e *E. saburreum*; presença de fístula foi relacionada com o complexo laranja, Gram-positivas e anaeróbios facultativos, e micro-organismos *E. corrodens, P. micra, C. showae* e *E. saburreum.* O maior volume do canal radicular foi correlacionado fortemente com anaeróbios estritos, com o complexo laranja e o

micro-organismo *P. micra*. O PBM foi efetivo na redução de bactérias e endotoxinas do canal radicular, mas sem diferença estatística entre os três sistemas utilizados. Conclui-se que o PBM com NaOCl 2,5% é eficaz na redução de endotoxinas e na remoção de micro-organimos do canal radicular; sinais e sintomas são relacionados com micro-organismos, assim como a volumetria do canal radicular.

Palavras-chave: Endotoxina. Instrumentação. Microbiota.

Cavalli D. Comparative estudy of rotatory, reciprocating and hybrid systems on the instrumentation of root canals in teeth with primary endodontic infection: microbiological profile and endotoxin quantification [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2016.

ABSTRACT

The aims of this study are: 1) Quantify by checkerboard test the microbial load and endotoxins through LAL method (EU/ml) in primary endodontic infections; 2) To monitore levels of endotoxin (EU/ml) and microbial load before treatment, after biomechanical preparation with rotatory, reciprocating and hybrid instrumentation systems, and after use of intracanal medication; 3) To associate clinical signs and symptoms with endotoxin levels, microorganism and bacterial complexes; 4) To relate volumes of root canals through cone beam computed tomography (CBCT), with endotoxin levels, microorganisms and bacterial complexes. Thirty teeth with primary endodontic infection and periapical lesion were submitted to endodontic treatment after CBCT and evaluated the presence of clinical signs and symptoms. After coronary opening, the initial samples were collected to verify the presence of infection in root canals. Then, teeth were divided into different experimental groups according to the instrumentation system used (n=10): rotatory Mtwo (MTWO), reciprocating Reciproc (REC), and hybrid Genius (GEN). During biomechanical preparation, the canals were irrigated with 24 mL of 2.5% NaOCl. Samples were collected: after coronary opening (S1), after the instrumentation (S2) and after intracanal medication for 14 days with calcium hydroxide paste and physiological saline solution (S3). The detection of microorganisms was performed by checkerboard DNA-DNA hybridization technique. The endotoxin quantification was performed by chromogenic kinetic test of the Limulus amoebocyte lysate. The root canal volumetries were performed by Nemotec® software. All data were analyzed statistically. The results showed the detection of microorganisms and endotoxins in 100% of the S1, with the most prevalent bacteria being C. ochracea and F. nucleatum (53%). After biomechanical preparation, the most found microorganisms were F. nucleatum and L. buccalis (50%); And after intracanal medication C. gracilis (53.3%). There was no statistical difference between the groups regarding the reduction of the microbial load. In relation to endotoxins, after biomechanical preparation, the group with greatest reduction was MTWO, followed by GEN and REC; after intracanal medication, the group with greatest reduction was GEN, followed by MTWO and REC, but there was no statistical difference between them. Spontaneous pain was associated to P. nigrescens; tenderness to percussion with P. gingivalis, V. parvula, S. sputigena, P. nigrescens and E. saburreum; sinus tract was related to the orange complex, Gram-positive and facultative anaerobes, and microorganisms E. corrodens, P. micra, C. showae and E. saburreum. The root canal volume was strongly correlated with strict anaerobes, with the orange complex and the P. micra microorganism. Biomechanical preparation was effective in decreasing

bacteria and endotoxin, but with no statistical difference were found between the three systems. Microorganisms are related to signs and symptoms and to root canal volume. In conclusion, biomechanical preparation with 2.5% NaOCl was effective on reducing endotoxins and decreasing microorganisms from root canals; signs and symptoms are related to microorganisms as well as root canal volumetry.

Keywords: Endotoxin. Instrumentation. Microbiota.

1 INTRODUÇÃO

A infecção pulpar, decorrente na maioria das vezes da cárie dentária, provoca injúrias irreversíveis na polpa dental que, por seu espaço limitado de paredes inelásticas, leva a necrose, permitindo uma infecção no canal radicular, com colônias microbianas podendo se estendendo à região extrarradicular (Nair, 2004). O tratamento endodôntico tem por função sanar o sistema de canais radiculares (SCR) de micro-organismos e seus produtos, e impedir que novas bactérias cheguem ao periápice, promovendo condições para a cura. O sucesso do tratamento depende de inúmeros fatores, como a condição prévia do elemento dental, presença de infecção no momento da obturação, presença de sintomatologia clínica e de lesão periapical, e a utilização de diferentes técnicas operatórias para sanificação de micro-organimos e seus produtos, impedindo ou limitando a proliferação microbiana (Matsumoto *et al.*, 1987; Sjogren *et al.*, 1990).

A microbiota presente na infecção endodôntica primária é bastante diversificada, com presença de micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, com predomínio de micro-organismos anaeróbios (Nair, 2004; Siqueira *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2006). Bactérias anaeróbias Gram-negativas tem uma variedade de fatores de virulência, incluindo proteases, fímbrias e lipopolissacarídeos (LPS) (Xing *et al.*, 2015). O LPS, também conhecido como endotoxinas, estimula a reabsorção óssea atuando na síntese e liberação de citocinas que ativam os osteoclastos, estando diretamente ligado a formação de lesões periapicais (Torabinejad *et al.*, 1985; Jiang *et al.*, 2003; Cardoso *et al.*, 2015). Na presença de infecção endodôntica primária, bactérias e seus produtos atingem os tecidos periapicais através do forame apical, provocando uma resposta inflamatória na tentativa de barrar a infecção. Essa inflamação tem características celulares e moleculares, e ocorre com a ativação de células como macrófagos, linfócitos T e B, polimorfonucleares (PMN) e osteoclastos, citocinas, e mediadores moleculares como Interleucinas (IL) IL-1, IL-6 e IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF) (Nair, 2004).

Associações de bactérias presentes em infecções periodontais foram descritas por Socransky et al. (1998), que classificaram 5 complexos microbianos: vermelho, laranja, roxo, verde e amarelo. Essas associações podem estar

envolvidas na etiologia das doenças periapicais, pois, apesar da microbiota do canal radicular não ser tão complexa quanto a microbiota encontrada em placa subgengival, essas espécies também estão presentes em infecções radiculares (Ozbec SM, Ozbec A, 2010).

Uma vez no canal radicular, os micro-organismos adentram a todo SCR e túbulos dentinários, sendo necessário, durante o tratamento endodôntico, a remoção da dentina contaminada, criando condições para que agentes irrigantes cheguem mais profundamente nos túbulos dentinários e em toda a extensão do SCR. Para isso, substâncias químicas auxiliares tem sido utilizadas com o intuito de lubrificar o canal radicular e servir como agente químico no combate aos micro-organismos e seus produtos, sendo que o mais comumente utilizado na endodontia é o hipoclorito de sódio (NaOCl), com concentrações que variam de 0,5% a 6% (Nadalin et al., 2009). O NaOCl possui excelentes propriedades, dentre elas a capacidade de dissolução do material necrótico, ação antimicrobiana de grande espectro, baixa tensão superficial e ação detergente (Siqueira et al., 1998; Ercan et al., 2004).

A etapa de preparo biomecânico (PBM) é considerado uma fase importante para a eliminação de micro-organismos e deve ser realizada com instrumentos que alargam e modelam os canais radiculares (Neves *et al.*, 2016). Os sistemas de instrumentação mecanizada utilizando instrumentos de níquel-titânio (NiTi) tem sofrido constrante processo de evolução, surgindo novos instrumentos, composto de diferentes ligas, designs e técnicas com objetivo de tornar a etapa PBM mais rápida, além de preservar a forma original do canal, diminuindo a possibilidade de iatrogenias (Peters, 2004; Gambarini, 2005).

O sistema rotatório Mtwo (VDW, Munique, Alemanha) possui uma sequência de limas com conicidades variadas, corte transversal em formato de S que cortam em profundidade e lateralidade, sem corte na ponta. As duas arestas de corte possuem ângulo positivo, cortando a dentina de forma eficaz além de possuir maior passo a partir da ponta do instrumento, evitando rosqueamento do mesmo no canal e reduzindo o acúmulo de debris para a região apical (Bürklein *et al.*, 2011).

O conceito de limas de NiTi que utilizam diferentes cinemáticas foi introduzido nas últimas décadas (Yared, 2008), utilizando um único instrumento para o preparo do canal radicular. Um dos instrumentos lançados foi o Sistema Reciproc® (VDW, Munique, Alemanha) que utiliza movimentos rotatórios de forma alternada

(Wan *et al.*, 2011). Esse sistema é produzido com uma liga de NiTi M-Ware®, mais resistente à fratura, apresentando ângulo de rotação de 150º no sentido anti-horário, onde a dentina é excisada, e posteriormente 30º no sentido horário, com velocidade constante de 300 rpm. O sistema possui 3 números de instrumentos que variam na conicidade e no diâmetro da ponta, para serem usadas de acordo com a anatomia inicial do canal radicular. Esse sistema de lima única deve ser descartada imediatamente após o uso (Plotino *et al.*, 2012).

Para maximizar as vantagens dos movimentos reciprocantes, o sistema híbrido Genius (Ultradent, South Jordan, Utah, USA) surgiu com movimento reciprocante diferenciado, com ângulo de rotação de 50º no sentido horário e 170º no sentido anti-horário, excisando dentina no sentido horário. A hibridização ocorre no início do protocolo para o preparo, pois utiliza-se um instrumento em movimento rotatório com conicidade 0,8 mm que amplia a entrada do canal, removendo interferências, enquanto que as limas utilizadas no terço médio e apical são usadas com o movimento reciprocante, e estas possuem corte transversal em formato de S de conicidade de 0,4 mm.

Vale ressaltar que durante a instrumentação, a lima excisa dentina contaminada, formando debris que podem extravasar através do forâme apical. O extravasamento de debris para a região periapical está relacionado com dor pós-operatória e com a ocorrência de flare ups, uma vez que tecido contaminado é conduzido par região periapical provocando uma inflamação aguda (Siqueira *et al.*, 2002a). Estudos mostram que instrumentos que excisam dentina no sentido horário auxiliam na remoção desses debris, pois estes são empurrados na direção coronal, sendo mais fácil a remoção dos mesmos. Por outro lado, instrumentos que excisam dentina no sentido anti-horário, tendem para que os debris sejam empurrados apicalmente, favorecendo sua extrusão para o periapice podendo causar a agudização do processo inflamatório (Bürklein e Schäfer, 2012b; Gambarini *et al.*, 2013).

No entando, muitas vezes o preparo biomecânico e as substâncias químicas auxiliares não conseguem neutralizar completamente micro-organismos e seus produtos, sendo necessário a utilização de uma medicação intracanal (MIC) para combater a infecção e propiciar condições de cura aos tecidos periapicais. O hidróxido de cálcio [$Ca(OH)_2$] tem sido indicado como MIC por possuir ação

antimicrobiana devido a sua capacidade de alcalinizar o meio e torná-lo inviável ao crescimento bacteriano (Midena *et al.*, 2015), induzir a mineralização, possuir ação de dissolução tecidual, além de reduzir endotoxinas (Xavier *et al*., 2013; Borsatto *et al.*, 2016).

Rotineiramente, compara-se o reparo de uma lesão periapical e consequentemente o sucesso do tratamento endodôntico por meio das radiografias periapicais inicial e de proservação. Porém, estudos mostram que nem sempre a radiografia periapical evidencia a real situação do periápice, uma vez que a espessura do osso cortical e a sobreposição de estruturas anatômicas causam perda na precisão de interpretação (Bender, 1997; Bender, Seltzer, 2003; Cardoso *et al.*, 2015), não tendo capacidade de avaliar o volume da lesão, que normalmente é maior do que observado na radiografia de diagnóstico (Tsai P *et al.*, 2012; Cardoso *et al.*, 2015). A tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) veio como um importante método de obtenção de imagens para avaliar lesões presentes na estrutura maxilar e mandibular, dar detalhamento dessas estruturas, bem como de estruturas anatômicas presentes (Cotti *et al.*, 1999; Janner *et al.*, 2011). Relatos de casos *in vivo* mostrou que apenas com a TCFC foi possível visualizar a lesão latente no periápice, uma vez que com a radiografia já não era possível a visualização da lesão (Garcia De Paula-Silva *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2015). Desta forma, a TCFC torna-se uma grande aliada no planejamento de casos de tratamento endodôntico e cirúrgico, bem como para o acompanhamento e proservação dos mesmos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiota endodôntica

A primeira evidência de que alterações periapicais estão relacionadas com micro-organismos veio do estudo de Kakehashi *et al.* (1965), que realizaram abertura coronária de molares em ratos *germ free* e ratos convencionais, e constataram que apenas nos ratos onde a polpa foi exposta ao meio bucal contaminado houve necrose pulpar, abscesso ou granuloma periapical. Isso foi confirmado mais tarde com o estudo de Moller *et al.* (1981), que induziram a necrose pulpar em macacos e após 7 meses confirmaram histologicamente que apenas os dentes mantidos assépticos não apresentavam sinais de reação inflamatória, enquanto que os dentes contaminados apresentaram condições clínicas, radiográficas e histológicas de inflamação periapical.

Comprovado que as doenças periapicais provém de micro-organismos, estudos vieram na tentativa de identificar os mais prevalentes no canal radicular, bem como suas características. Brown e Rudolph (1957) isolaram bactérias de dentes traumatizados que não tiveram contato com saliva, e viram que apenas 24% dos micro-organismos isolados eram anaeróbios e que em 51% prevaleciam micro-organismos facultativos, sendo que o gênero mais encontrado foi Streptococcus. Porém, com avanços na técnica de cultivos de anaeróbios, Sundqvist (1976) percebeu que, de 32 dentes com a coroa intacta e necrose pulpar por trauma,19 deles apresentavam bactérias, sendo encontradas em torno de 1 a 12 espécies em cada canal infectado. 88 cepas de bactérias foram isoladas e dessas, 94,3% delas eram espécies anaeróbias. Foi constatado também que nos casos de maior sintomatologia e tamanho da lesão periapical, maior era a densidade e número de bactérias presente no canal infectado. As bactérias mais encontradas foram Fusobacterium, Eubacterium e Peptostreptococcus.

Em uma revisão de literatura sobre o tema, Farber e Seltzer (1988) perceberam que até o momento, todos os trabalhos que haviam coletado material do

interior de canais radiculares de dentes com polpa necrótica, e que haviam sido expostos a cavidade pulpar, mostraram presença de bactérias nas culturas; cerca de 50% dos canais onde houve necrose pulpar, mas sem exposição ao meio bucal, apresentara cultura bacteriana negativa. Atualmente, todos os dentes investigados com necrose pulpar e presença de lesão periapical, mesmo sem ter sido exposto ao meio bucal, apresentam cultura positiva para bactérias (Cardoso et al., 2015; Ferreira et al., 2015). Isso nos mostra que, para que ocorra lesão periapical, há presença de micro-organismos que induzem a inflamação no periapice dental; estes micro-organismos são provenientes de micro fraturas no tecido duro, do sulco gengival ou de bolsas periodontais (Grossman, 1967; Nair, 2004).

Em 1994, Gomes *et al.* correlacionaram a presença de dor com as espécies Prevotella e Peptostreptococcus. Realizaram coleta de 30 canais com infecção primária, foram isoladas bactérias anaeróbias em 93% dos casos com dor, e em 53% dos casos que não apresentavam dor. Jacinto *et al.* (2003), num estudo com dentes sintomáticos e assintomáticos, foram isoladas bactérias dos canais radiculares infectados e, dentre elas, 70% eram anaeróbias. Os dentes sintomáticos também apresentaram mais bactérias anaeróbias e número maior de espécies; os autores sugeriram relação entre micro-organismos específicos, especialmente anaeróbios Gram-negativos, e a presença de sinais e sintomas clínicos.

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, novos micro-organismos e uma nova microbiota endodôntica foi identificada, principalmente micro-organismos anaeróbios estritos Gram-negativos (Siqueira, 2003; Siqueira, Rôças, 2005b; Gomes *et al.*, 2006), permitindo correlacionar os sinais e sintomas do paciente com a microbiota presente.

Métodos de cultura e *Polymerase Chain Reaction* (PCR) foi utilizado por Rolph *et al.* (2001) em dentes com infecção primária e secundária, e mostraram que 44% das bactérias foram detectadas por meio de cutura, e 68% por PCR. Dessas amostras, 8 delas foram realizadas clonagem e sequenciamento, mostrando que em 2 casos de infecção primária, foram encontrados sequencias relacionas as bactérias do gênero Enterococcus, Propionibacterium, Lactobacillus e Streptococcus. Já em infecções secundárias, 5 casos relacionaram a bactérias do gênero Capnocytophaga, Cytophaga, Dialister, Eubacterium, Fusobacterium, Gemella, Mogibacterium, Peptostreptococcus, Prevotella, Propionibacterium, Selenomonas,

Solobacterium, Streptococcus e Veillonella.

Bactérias produtoras de pigmento negro foram pesquisadas por Gomes *et al.* (2005) em dentes com necrose pulpar e dentes com necessidade de retratamento endodôntico, utilizando métodos de cultura e PCR. *Prevotela nigrescens* foi detectado em 22% dos casos por PCR e 13% dos casos por cultura; *Porphyromonas endodontalis* foi detectada apenas por PCR em 25% dos casos; *Porphyromonas gingivalis* foi identificado 38% dos casos por PCR e 1% dos casos por cultura; *Prevotela intermedia* foi detectado em 33% dos casos por PCR e 13% por cultura. Elas foram mais frequentemente encontradas nas infecções primárias. Esse estudo nos mostra como as técnicas moleculares são mais sensíveis nas detecções de espécies microbiológicas.

Sakamoto *et al.* (2006) investigaram a diversidade da microbiota de pacientes com infecção endodôntica sintomática e assintomática através da análise da porção 16S do RNA, e comparando a comunidade microbiológica nessas duas condições. Em casos sintomáticos, houveram maior porção do fragmento de RNA, sendo essa diferença estatisticamente diferente dos casos assintomáticos. Também verificaram maior diversidade da microbiota endodôntica do que com os métodos de cultura, e que existem diferenças nos casos sintomáticos e assintomáticos. Pode-se perceber que as bactérias presentes na infecção endodôntica varia muito de paciente para paciente, e que há em torno de 10 a 30 espécies de bactérias por canal infectado (Siqueira, Rôças, 2005b).

Sassone *et al.* (2007) usou o método de *checkerboard DNA-DNA hybridization,* que permite a detecção simultânea de diversas espécies bacterianas em múltiplas amostras, para analisar 111 canais necrosados, verificando que as bactérias mais prevalentes foram *Enterococcus faecalis* (89.3%), *Campylobacter gracilis* (89.3%), *Leptotrichia buccalis* (89.3%), *Neisseria mucosa* (87.5%), *Prevotella melaninogenica* (86.6%), *Fusobacterium nucleatum ssp. vincentii* (85.7%), *Eubacterium saburreum* (75.9%), *Streptococcus anginosus* (75%), e *Veillonella parvula* (74.1%). Sassone *et al.* (2008b) correlacionaram a bactéria *Tannarella forsythia* com a presença de dor, e depois investigaram que as bactérias mais presentes em casos de fístula, que foram *P. gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum sp. nucleatum*, *L. buccalis* e *P. endodontalis* (Sassone *et al.,* 2008a). Blome et al. (2008) investigaram a presença e número das espécies em canais com lesão

periapical crônica, 20 pacientes com infecção primária e 20 pacientes com lesão secundária, através do PCR quantitativo. Canais com infeção primária tinham mais bactérias quando comparado com a lesão secundária, sendo que o preparo biomecânico e a MIC reduziram significativamente o número de bactérias. Os micro-organismos mais encontrados foram *Parvimonas micros* e *P. endodontalis*.

Saito et al. (2009) investigaram a presença de *P. gingivalis* e *T. forsythia*, que são bactérias anaeróbias, em dentes com infecção primária sintomáticos e assintomáticos através de PCR. *P. gingivalis* foi encontrada em 28% dos casos; *T. forsythia* em 66% dos casos, e a associação de ambas em 22% dos casos. Foi concluído que não há relação destas bactérias com a manifestação de sintomatologia nos casos de necrose pulpar.

Em um estudo comparando a microbiota presente em casos sintomáticos (agudos) e assintomáticos (crônicos), Santos *et al.* (2011) observaram maior variedade microbiológica em dentes com sintomatologia; 20 gêneros foram encontrados exclusivamente em dentes com sintomatologia, contra 18 gêneros exclusivos de casos sem sintomatologia. Nos casos sintomáticos, os micro-organismos mais encontrados foram Firmicutes (52%), Fusobacteria (17%) e Bacteroidetes (13%), enquanto que em infecções assintomáticas, os mais encontrados foram Firmicutes (59%), Bacteroidetes (14%) e Actinobacteria (10%). Fusobacterias foram mais prevalentes em casos agudos (89%) do que em casos crônicos (50%).

Graças aos novos métodos de identificação de micro-organismos, Rôças et al. (2014) identificaram a presença de *Bacteroidaceae sp. HOT- 272* e *Fretibacterium fastidiosum* em dentes com necrose pulpar através da reação de PCR. Elas foram encontradas em 24% e 20% dos casos, respectivamente, após a abertura coronária, e ambas tiveram uma redução estatisticamente significativa após o preparo químico-mecânico.

Ferreira *et al.* (2015) traçaram um perfil microbiológico de bactérias resistentes a MIC em casos de infecção endodôntica primária, usando o método de *checkerboard DNA-DNA hybridization.* Foram realizadas coletas em 20 dentes antes e após o uso da pasta de $Ca(OH)_2$ com soro (n=10) e pasta de $Ca(OH)_2$ com clorexidina (n=10). O grupo com maior redução de espécies bacterianas foi com a pasta de $Ca(OH)_2$ e clorexidina. As espécies mais encontradas nas amostras iniciais

foram *Capnocytophaga ochracea* (70%) e *F.nucleatum* ssp. *vincentii* (70%). Após o preparo químico-mecânico, a espécie mais encontrada foi *Enterococcus faecium* (60%), e após o uso de MIC as espécies mais encontradas foram *F. nucleatum* ssp*. vicentii* (90%) e *E. faecium* (40%).

Pinheiro *et al.* (2016) levantaram a questão que o PCR quantitativo não distingue células vivas de células mortas, quando amplifica o DNA para identificação de micro-organismos. Assim, ela testou o PMA (*propidium monoazide*), que se liga no DNA de células que tiveram sua membrana lisada, impedindo sua amplificação, pois em células viáveis a permeabilidade seletiva da membrana não o deixa entrar no interior da célula. Foi feita suspensões de *E. faecalis* viáveis e não viáveis, e tratadas com concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL antes da extração de DNA. Foi feito o teste de PCRq com primers de *E. faecalis,* com controle positivo de suspensões de bactérias sem PMA. Houve diferença significativa entre os grupos tratados com PMA quando comparado com os grupos não tratados, mostrando que ele é efetivo para a inibir a amplificação de células mortas, exaltando a detecção de células viáveis de *E. faecalis*.

2.2 Endotoxinas

Endotoxinas são lipopolissacarídeos presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas, que são liberadas quando ocorre a morte ou multiplicação celular, gerando vários eventos biológicos importantes que levam a uma resposta inflamatória do hospedeiro (Rietschel, Brade, 1992). Conduzem à reabsorção óssea, contribuindo para o desenvolvimento e perpetuação de lesões periapicais (Torabinejad *et al.*, 1985; Cardoso *et al.*, 2015).

As endotoxinas foram primeiramente descritas por Pfeiffer, enquanto estudava a *Vibrio cholerae,* como uma substância resistente ao calor liberada pela bactéria, dando o nome de endotoxina. Mais tarde, estudos mostraram que essa substância estava presente em sua membrana e não em seu interior. Em um estudo na Itália, uma toxina extraída da *Salmonella typhi* causava febre em ratos, e foi

descrita como sendo encontrada em muitas espécies de bactérias, apresentando as mesmas particularidades. Ambos os estudos tratavam da endotoxina. (Westphal, 1975; Rietschel, Brade, 1992; Ferrari, Bombana, 2010).

A endotoxina é um polissacarídeo hidrofílico (LPS), formada por três partes: polissacarídeo O (antígeno-O), oligossacarídeo do núcleo (*core*) e um componente glicolipídico chamado lípide A. É este último que está em contato com a membrana externa da parede celular das bactérias Gram-negativas, e é onde está localizada a toxicidade da endotoxina (Galanos, 1975; Morrison, Kline, 1977). O mecanismo de ação das endotoxinas também é muito estudado, pois quando liberadas, não causam danos teciduais diretos, mas estimulam células como os macrófagos, neutrófilos e fibroblastos a liberarem mediadores químicos, como o TNF, IL e prostaglandinas (Munford, Hall, 1986; Farber, Seltzer, 1988; Rietschel, Brade, 1992; Matsushita *et al.*, 1999).

Mattison *et al.* (1987) compararam os efeitos da endotoxina com água destilada. Esse estudo foi feito em cães, que em dentes sadios foi realizada a abertura coronária, pulpectomia e preparo biomecânico em 56 raízes, e dessas, 42 foram preenchidas com endotoxinas de *Eikenella corrodens*, 6 com endotoxinas de *Escherichia coli*, e 6 com água destilada. 90,4% das raízes inoculadas com endotoxinas de *E. corrodens* e 75% das raízes inoculadas com endotoxina de *Escherichia coli* apresentaram lesões periapicais ao fim de 4 semanas, enquanto que as raízes com água destilada apresentaram leve espessamento periodontal. Em análise histopatológica, houve intenso infiltrado inflamatório agudo, reabsorção óssea periapical e reabsorção radicular externa nas raízes com endotoxina em seu interior. Isso nos leva a crer que as endotoxinas tem um grande papel na formação e perpetuação de lesão periapical.

Farber e Seltzer (1988), em um estudo de revisão da literatura, organizaram alguns dos efeitos biológicos causados pela estimulação de células pelas endotoxinas: degranulação de mastócitos liberando histamina e heparina; ativação do sistema complemento sem a presença de anticorpos; liberação de colagenases e TNF; liberação de IL-1 pelos macrófagos, podendo causar febre; aderência de células epiteliais causando a liberação de radicais de oxigênio e proteases, conduzindo a destruição tecidual. Nos canais radiculares, as endotoxinas contribuem para a liberação de vasoativos e mediadores químicos, como a bradicinina, um

potente mediador químico ligado diretamente a sensação de dor.

Horiba *et al.* (1991) estudaram a relação entre sinais e sintomas com a quantificação de endotoxinas nos canais radiculares. Foram 30 dentes de 27 pacientes, onde foi realizada a endodontia e coleta radicular. A quantidade de endotoxinas foi significantemente maior em dentes com sintomatologia, com lesão periapical visível em radiografia e em dentes com presença de exudato, quando comparados com dentes sem sintomatologia, sem lesão periapical e sem exudato, respectivamente. Este mesmo autor, em 1992, isolaram de dentes com infecção primária, três bactérias Gram-negativas (*P. endodontalis, V. parvula* e *F. nucleatum*) para avaliar a ativação do sistema complemento por purificação do LPS dessas bactérias. Foi adicionado quantidades crescentes de LPS previamente purificado em uma solução com eritrócitos de carneiro, e mensurado com o uso do espectofotômetro. Todas as bactérias ativaram o sistema complemento, sugerindo que o LPS tem uma ação pró inflamatória através da ativação do sistema complemento nos tecidos periapicais (Horiba et al., 1992).

As endotoxinas conseguem ativar macrófagos, fazendo-os liberar mediadores químicos como radicais de oxigênio livres, IL-1, IL-6 e IL-8, TNF α, interferon α, β, e ϒ, e prostaglandinas, e esses são os fatores que levam a reabsorção óssea periapical. O LPS também pode induzir a liberação de bradicinina, um mediador da dor, causando maior sintomatologia em dentes com maior quantidade de endotoxinas (Seltzer, Farber, 1994).

Num estudo de Safavi e Nichols (1994), o LPS foi estudado através de dois grupos: tratado com $Ca(OH)_2$ ou puro sobre células macróficas, e foi percebido que, no grupo com $Ca(OH)_2$, menos prostaglandina E2 foi liberada, que está diretamente ligada a reabsorção óssea, indicando a degradação da porção lipídica do LPS, quando tratado com $Ca(OH)_2$.

Khabbaz *et al.* (2001) compararam tecido pulpar de 28 dentes cariados, destes 15 com sintomatologia e 13 sem sintomas, e avaliou a quantidade de endotoxinas, comparando também com 5 polpas extraídas de dentes sem lesão cariosa. Ele constatou que todas as amostras continham endotoxinas, exceto a do grupo controle, mas que nos casos com sintomatologia, a quantidade de endotoxinas foi significantemente maior do que nos casos sem sintomatologia, sugerindo que quanto maior a quantidade de endotoxina presente, maior a

severidade da dor relatada pelo paciente.

Outro estudo clínico comparou a quantidade de endotoxinas e atividade microbiana com sinais e sintomas em dentes com polpa necrosada. Foram 50 pacientes que tiveram coletado o conteúdo do canal radicular, e todos apresentaram crescimento microbiano no teste de UFC/mL. Endotoxinas também estiveram presentes em todas as amostras, sendo que em pacientes com sintomatologia, a média de endotoxinas foi de 18540.0 EU/mL, e em pacientes sem dor, a média foi de 12030.0 EU/mL (Jacinto *et al*., 2005). Novamente vemos a relação positiva que quantidade de endotoxina está diretamente relacionada a sintomatologia dolorosa do paciente.

Com o objetivo de investigar o efeito de substâncias químicas auxiliares sobre endotoxinas, de Oliveira *et al.* (2007) inocularam in vitro endotoxina de *E. coli* em 84 canais, e dividiram em 7 grupos (n=14): NaOCl 2,5%; NaOCl 5,25%; Clorexidina 2%; $Ca(OH)_2$ 0,14%; Polimixina B; controle positivo, com solução salina; controle negativo (sem endotoxina), e foram coletadas amostras logo após a instrumentação e irrigação, e após 7 dias. Os resultados mostraram que o grupo com $Ca(OH)_2$ e polimixina B alteraram as propriedades do LPS, enquanto que os grupos com NaOCl 2,5% e 5,25%, e da clorixidina 2% não neutralizaram as endotoxinas.

Martinho e Gomes, (2008) avaliaram a atividade microbiana e a quantidade de endotoxinas antes e após o preparo biomecânico (PBM) usando como solução química auxiliar o NaOCl 2,5%. Foi coletado amostras de 24 pacientes, e todas as amostras iniciais tiveram crescimento microbiano e presença de endotoxinas. O resultado mostrou que os maiores níveis de LPS foram detectados em dentes com sintomatologia, e que houve uma redução de 59,99% na quantidade de endotoxinas da amostra e de 99,78% na atividade microbiana após o PBM, levando a conclusão de que o PBM é efetivo na remoção de bactérias do canal radicular, mas menos efetivo na neutralização das endotoxinas, e que há uma associação significante entre altos níveis de endotoxinas e sintomatologia clínica.

Martinho *et al*. (2010) avaliaram o efeito do PBM com limas de NiTi do sistema Mtwo e irrigação de NaOCl 2,5% e ácido etilenodiamino tetra-acético 17% (EDTA) na remoção de endotoxinas em dentes com infecção endodôntica primária. Todas as etapas do tratamento foram realizadas com isolamento absoluto e sem

contato com o meio bucal. Coletas foram realizadas logo após a abertura coronária e após o PBM. Endotoxinas estavam presentes em 100% dos canais radiculares, e após o PBM houve uma diminuição significativa desse número, concluindo que o PBM é efetivo na redução de endotoxinas do canal radicular.

Maekawa *et al.* (2011) avaliaram a eficácia de substancias químicas auxiliares e MIC em dentes extraídos e contaminados com *E. coli*. Foram três grupos divididos de acordo com a substância química auxiliar: NaOCl 2,5%; Clorexidina gel 2%; Solução apirogênica. Em seguida, os grupos foram subdivididos de acordo com a MIC: pasta de $Ca(OH)_2$ Calen®; Polimixina B; Pasta de $Ca(OH)_2$ com clorexidina gel 2%; Solução salina. O resultado mostrou que o grupo NaOCl 2,5% e cloredina 2% foram eficazes em remover a *E. coli* do canal radicular, e de reduzir o número de endotoxinas quando comparado com a solução salina, porém apenas as MIC foram significantemente efetivas na redução de endotoxinas do canal radicular.

Em outro estudo, Maekawa *et al.* (2013) estudaram a efetividade do extrato de gengibre, própolis glicólico, $Ca(OH)_2$ e clorexidina gel como MIC sobre endotoxinas e três tipos de micro-organismos, que foram contaminados em dentes unirradiculares. Os grupos foram: pasta de $Ca(OH)_2$ com solução salina fisiológica; clorexidina gel; pasta de $Ca(OH)_2$ com clorexidina gel; própolis glicólico; própolis glicólico com $Ca(OH)_2$; extrato de gengibre; extrato de gengibre com $Ca(OH)_2$; solução salina fisiológica. Todos os grupos eliminaram micro-organismos no canal radicular e diminuíram a quantidade de endotoxinas, mas o $Ca(OH)_2$ foi o mais efetivo na neutralização de endotoxinas, apesar de ser menos efetivo sobre os micro-organismos estudados.

Ainda no estudo do extrato de gengibre Valera *et al.* (2015) o compararam como substância química auxiliar seguido de diferentes MIC sobre micro-organismos e endotoxina in vitro. Foram seis grupos (n=12): clorexidina gel; $Ca(OH)_2$ com clorexidina gel; extrato glicólico de gengibre; $Ca(OH)_2$ com extrato glicólico de gengibre; $Ca(OH)_2$ com solução salina fisiológica; e solução salina fisiológica (controle). Foram feitas 4 coletas do canal radicular: após a contaminação (S1), após a intrumentação (S2), 7 dias após a instrumentação (S3), após 14 dias com MIC (S4) e 7 dias após a remoção da MIC (S5). Houve uma redução significativa de micro-organismos e endotoxinas nas coletas S2 e S3, e nas coletas S4 e S5 houve eliminação completa de micro-organismos e uma significante diminuição de

endotoxinas, mostrando que o extrato glicólico de gengibre como substância química auxiliar é efetivo contra micro-organismos, assim como as MIC, sendo que ambos não foram capazes de eliminar completamente as endotoxinas.

Podemos perceber que as endotoxinas são difíceis de neutralizar sem associações com instrumentação, substância química auxiliar e medicação intracal, mostrando-se mais resistente que micro-organismos e quase sempre sem sua total remoção do canal radicular.

Uma revisão sistemática sobre soluções químicas auxiliares foi feita por Gonçalves *et al.* (2016) que analisaram 5 estudos clínicos comparando o NaOCl e a clorexidina. Dois estudos apresentaram redução similar de micro-organismos nos dois irrigantes. O NaOCl foi mais efetivo na redução de microrganismo do que a clorexidina em um estudo, e em outro estudo, o resultado encontrado foi ao contrário. Ambos os irrigantes não foram efetivos na remoção de endotoxinas em um estudo. Como conclusão, os resultados são escassos e não consistentes, e se faz necessário mais estudos nessa área.

2.3 Sistemas de Instrumentação

Os instrumentos endodônticos foram padronizados por Ingle e Levine em 1958, e aceitos pela Associação Americana de Endodontia em 1962. Eram fabricados em aço carbono e aço inoxidável, até que em 1988, a Americal Dental Association (ADA) especificou que o aço inoxidável seria o metal usado para fabricação dos instrumentos usados na endodontia (New American Dental Association, 1976; Lopes, Siqueira Jr, 2004). Os aços inoxidáveis são ligas de ferro com teor de cromo superior a 12%, e a adição de elementos à liga podem alterar suas características, como resistência a fratura e corrosão. Podem ser classificados de acordo com sua estrutura, podendo ser austeníticos, ferríticos e martensíticos (Chiaverini, 1979; Lopes, Siqueira Jr, 2004).

A liga de Níquel-titânio foi inserida na endodontia por Walia *et al.* (1988) com limas 15 produzidas experimentalmente com fios ortodônticos. Foram denominadas NiTiNOL, e quando flexionadas ou torcidas, apresentavam elasticidade duas a três

vezes maior que as limas de número 15 correspondentes de aço inoxidável. De acordo com Serene *et al.* (1995), as ligas NiTi de uso endodôntico possui grande elasticidade e alta resistência à deformação e fratura. Isso permite que o instrumento acompanhe com facilidade a curvatura do canal radicular, reduzindo o deslocamento apical e a alteração de sua forma original.

Com isso, vários trabalhos foram publicados comparando a qualidade da limpeza feita por instrumentos de NiTi, e sua capacidade de se manter fiel as características anatômicas iniciais do canal radicular. Schäfer *et al.* (2006) compararam o sistema Mtwo, K3 e Race, durante a instrumentação de canais curvos. Foram 60 raízes de molares, com grau de curvatura de 25º a 35°, divididos em três grupos com 20 raízes cada. Radiografias foram feitas com o instrumento inicial inserido no canal, como um controle da anatomia inicial do canal radicular, e também durante e após a instrumentação, e analisadas por um programa de análise de imagens. A quantidade de debris e *smear layer* foi quantificado por microscopia eletrônica de varredura, através de um score. Quanto a remoção de smear layer, todos obtiveram resultados similares, mas Mtwo obteve resultados significativamente melhores quanto a remoção de debris e em manter a anatomia inicial do canal radicular, além de ser mais rápido que os outros instrumentos.

Os instrumentos endodônticos produzidos com a liga de NiTi ganharam diferentes secções transversais, com o objetivo de melhorar o corte, a elasticidade, e resistência a fratura. Xu *et al.* (2006) compararam 6 limas endodônticas com secção transversal distintas: ProTaper (secção transversal convexa), Hero642 (secção transversal tripla hélice), Mtwo (secção transversal em S), ProFile (secção transversal em triplo U), Quantec (secção transversal tipo Z) e NiTiflex (secção transversal triangular). Modelos matemáticos foram feitos, seguindo a conicidade de 0.04 e com o mesmo diâmetro de 0,4 mm, e foram analisados no software ANSYS inicialmente sobre o torque de 480 Mpa e ao fim com o torque de 755 Mpa. Os melhores resultados foram encontrados com a secção convexa e de tripla hélice, enquanto que os piores resultados foram com a secção triangular e tipo Z, mostrando que a secção transversal tem influência significativa sobre o comportamento mecânico de limas de NiTi.

A eficiência de corte de instrumentos de liga NiTi também foi estudada por Schäfer e Oitzinger (2008), quando compararam o sistema Mtwo com limas Alpha-

File, FlexMaster, ProFile e Race. Os instrumentos comparados foram .06/25 e .04/35, sendo 12 limas cada grupo. Foi confeccionado amostras plásticas com canais cilíndricos, e a profundidade de penetração na luz do canal foi o critério de eficiência de corte. Os instrumentos .06/25 que obtiveram uma penetração significante perante os outros grupos foram as limas do sistema Mtwo e Race, e os instrumentos .04/35 os resultados significativos ficaram com os grupos Mtwo, Race e FlexMaster, sendo que o pior valor de penetração foi com a lima ProFile.

Bürklein *et al.* (2011) compararam dois sistemas de instrumentação quanto a limpeza do canal radicular e a capacidade de manter a forma original do mesmo: Mtwo e EasyShape. A limpeza do canal radicular foi avaliada por score quanto a quantidade de debris e smear layer, e realizada por microscopia eletrônica de varredura. Durante a instrumentação, duas limas EasyShape fraturaram no canal radicular. Quanto a manter a curvatura original dos canais radiculares, não houve diferença entre os sistemas; porém quanto a velocidade de trabalho e a limpeza dos canais radiculares, o Mtwo apresentou significativa superioridade quanto ao EasyShape. Os sistemas com movimento reciprocante vieram com a proposta de aumentar a vida útil do instrumento, por trabalhar diminuindo a fadiga quando comparado a instrumentos rotatórios. Lopes *et al.* (2013) comprovam isso em seu estudo quando comparam limas Mtwo e Reciproc com teste de flexão e teste de fadiga dinâmica e em repouso. O Reciproc, por ser composto de uma liga de NiTi M-Wire, torna-se mais flexível, e isso pode influenciar para que haja uma maior resistência a fadiga, quando comparado com a liga de NiTi convencional.

Quanto a redução de bactérias do canal radicular, Machado *et al.* (2013) compararam in vitro sistemas reciprocantes (Reciproc e WaveOne) com sistemas rotatórios (ProTaper e Mtwo). 60 canais radiculares foram contaminados com *Enterococcus faecalis*, divididos em 5 grupos de acordo com o sistema de instrumentação e o grupo controle. As coletas foram feitas imediatamente após a instrumentação e 7 dias depois. Todos os grupos apresentaram diminuição de contagem de bactéria, com posterior aumento das mesmas, na coleta após 7 dias, sem diferença entre os grupos. Bürklein também comparou esses mesmos instrumentos quanto a capacidade de manter a anatomia inicial do canal radicular e efetividade de limpeza em canais com curvatura acentuada, mostrando que o sistema Reciproc foi o mais rápido que os outros instrumentos, seguido do

WaveOne. Quanto a remoção de debris, Mtwo e Reciproc apresentaram os melhores resultados no terço apical, enquanto que no terço coronal e médio não houve diferença entre Reciproc, WaveOne e Mtwo, mas o grupo ProTaper mostrou a maior produção de debris. Logo, todos os quatro sistemas mantiveram a curvatura original do canal radicular, e o grupo Mtwo e Reciproc apresentaram melhores resultados na limpeza do terço apical quando comparados com WaveOne e ProTaper (Bürklein *et al.*, 2012a).

Resultados semelhantes foram encontrados por Marinho *et al.* (2015), que avaliaram os sistemas Reciproc, Mtwo, ProTaper Universal e FKG-Race, num estudo in vitro onde 40 dentes foram contaminados com *E. coli* por 21 dias, e divididos em 4 grupos de acordo com o sistema, e coletas foram realizadas antes e após a instrumentação, para a presença de bactérias pelo teste de UFC/mL e quantificação de endotoxinas pelo método cinético cromogênico do lisado de amebócitos de Limulus. Todos os grupos foram eficazes, mas não houve diferença estatística entre os grupos, mostrando que o Reciproc é tão efetivo quanto sistemas rotatórios na remoção de bactéria e de endotoxinas do canal radicular.

Com a proposta de obter o melhor das duas cinemáticas, rotatório e reciprocante, limas com sistema híbrido passaram a surgir no mercado. Twisted Files Adaptive (Axis/SybronEndo Orange, CA, USA) usa o movimento rotatório no canal até encontrar resistência, e passa a fazer o movimento reciprocante. Num estudo de Karatas *et al.* (2015) avaliaram *in vitro* a remoção de *E. faecalis* com diferentes sistemas de instrumentação: ProTaper Next, TF Adaptive, SAF, Wave one, Reciproc e OneShape. Foi feita análise de Unidade Formadora de Colonia (UFC/mL) e foi visto que todos os sistemas removeram *E faecalis* do interior dos canais radiculares, mas que os sistemas ProTaper Next, TF Adaptive, Wave one, Reciproc, e OneShape foram mais eficazes que o SAF.

Silva *et al.* (2015) avaliaram a capacidade de manter a anatomia original do canal usando o TF Adaptive e ProTaper Universal. Foram usados 30 blocos de resina simulando canais curvos, e foram usandos o TF Adaptive na função rotatória, na função adaptive (rotação e reciprocante quando encontra resistência), e ProTaper Universal. A avaliação da transposição do canal foi feita na parte retilínea e curva do canal, avaliada por imagens estereoscópicas. Na parte reta do canal, o TF adaptive produziu uma menor transposição do canal que o ProTaper Universal; na parte

curva, o TF no movimento rotatório foi o que menos transpôs o canal radicular, seguido pelo TF na função adaptive e pelo ProTaper; em geral a transposição do canal ocorreu na porção de curvatura. Logo, o sistema ProTaper foi o que mostrou maior transposição do canal.

Quanto ao poder de corte, Tocci *et al.* (2015) avaliou o sistema TF adaptive e o sistema reciprocante WaveOne Primary, usando um dispositivo de ensaio de corte com um suporte de plástico móvel e um bloco de Plexiglas, contra o qual os instrumentos foram testados. O TF Adaptive foi significantemente melhor que o Wave One, chegando a penetrar até 8,7 mm contra 6,4 mm do WaveOne, comprovando o melhor desempenho do TF Adaptive quanto o poder de corte.

O sistema Genius é híbrido por possuir uma lima de abertura cervical com cinemática rotatória, e limas que trabalham no comprimento de trabalho (CT) com movimento reciprocante. O sistema Genius é novo no mercado, sendo este um dos primeiros estudos realizados com esse sistema, portanto, não conseguimos fazer referências anteriores.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

a) Quantificar por DNA-DNA *checkerboard hybridization* a carga microbiana e, pelo método de LAL, endotoxinas (EU/mL) nas infecções endodônticas primárias;
b) Realizar o monitoramento dos níveis de endotoxinas (EU/mL) e de carga microbiana antes do tratamento, após o preparo biomecânico com sistemas de instrumentação rotatória, reciprocante e híbrida e após o uso da MIC de $Ca(OH)_2$;
c) Relacionar sinais e sintomas clínicos com níveis de endotoxinas, micro-organismos e com complexos bacterianos;
d) Relacionar volumetria dos canais radiculares por meio de TCFC com níveis de endotoxina, micro-organismos e complexos bacterianos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Procedimentos clínicos

Os procedimentos descritos a seguir foram realizados em pacientes encaminhados para a Clínica de Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos (UNESP), e este projeto foi submetido a aprovedo pelo Comitê de Ética deste Instituto, por meio da Plataforma Brasil, protocolo nº 1.824.172 (ANEXO A).

4.1.1 Seleção de pacientes

Foram pré-selecionados 200 pacientes atendidos na Clínica de Endodontia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP, que procuraram atendimento para realização de tratamento endodôntico. Triagens foram realizadas com anamnese, exame clínico e radiográfico, selecionando pacientes que apresentavam dentes com necrose pulpar, lesão periapical visível radiograficamente, condições de saúde favoráveis, e que assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A), aceitando fazer parte do estudo e cumprir as condições estabelecidas para a pesquisa. Destes, foram selecionados 30 dentes para a execução da pesquisa.

.

4.1.2 Seleção dos casos

Critérios de inclusão e exclusão foram utilizados para a seleção dos casos. Foi realizado um exame clínico verificando todas as características clínicas referente ao dente investigado como: presença de restaurações, cáries, fístulas, dor à

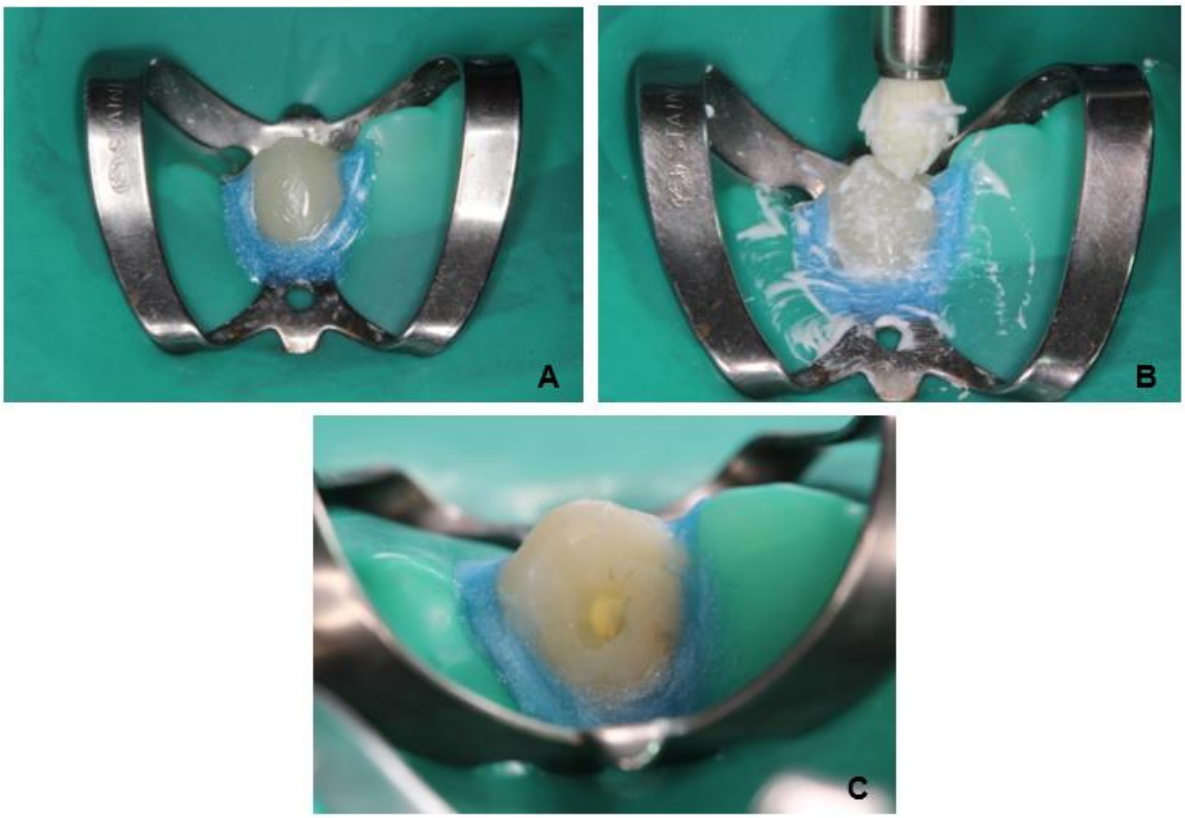
palpação e percussão, mobilidade e dor prévia (APÊNDICE B). Foram incluídos na pesquisa dentes com necrose pulpar e lesão periapical, com ou sem exposição da câmara pulpar na cavidade oral. A condição pulpar também foi avaliada pela realização de testes térmicos de sensibilidade pulpar e foram realizadas radiografias periapicais para constatar a presença de lesão periapical. Foram selecionados 30 dentes, sendo que os pacientes foram submetidos a TCFC Classic I-Cat (Imaging Science International, Hatchfield, EUA) na região dos dentes selecionados, antes da intervenção odontológica, confirmando a presença de destruição óssea periapical. Foram excluídos da pesquisa pacientes que apresentavam doença periodontal, fratura radicular, presença de MIC, pacientes que fizeram uso de antifúngicos e antibióticos nos últimos 3 meses, impossibilidade de isolamento absoluto e de inserção do cone de papel no canal radicular em seu comprimento aparente (CAD), dentes com evidência radiográfica de reabsorção interna e dentes submetidos a tratamento endodôntico prévio.

4.1.3 Intervenção odontológica

Todos os instrumentais utilizados nesta pesquisa foram submetidos à esterilização por radiação gama com cobalto 60 (dose 20 KGy por 6 horas) pela CBE (CBE Empresa Brasileira de Radiação, Cotia, SP, Brasil) e todos os passos subsequentes foram realizados de forma asséptica. Os pacientes foram anestesiados, em seguida foi realizado o isolamento absoluto, com vedamento da interface coroa/lençol utilizando resina fotopolimerizável (Top Dam - FKG Dentaire – Labordental), seguido de profilaxia com escova Robinson (Microdont – Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e pasta profilática (Vigodent S/A Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Após, os dentes foram lavados com solução salina fisiológica (Laboratório Sanobiol, Pouso Alegre, MG, Brasil). O campo operatório foi desinfectado utilizando swabs (Jiangsu Medical Materials Co. Ltd., Jiangsu, China) estéreis umedecidos em água oxigenada 30 volumes (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) seguido de NaOCl 2,5% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) e na sequência foi realizada

neutralização do NaOCl utilizando tiossulfato de sódio 5% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil). A abertura coronária foi realizada com o auxílio de brocas acionadas em alta rotação, sob refrigeração de solução salina fisiológica apirogênica. Após a abertura coronária foi feita a 1ª coleta do conteúdo do canal radicular (Figura 1).

Figura 1 - Início da intervenção endodôntica



Legenda: a) isolamento absoluto e colocação de barreira fotopolimerizável; b) profilaxia realizada com escova Robson e pasta profilática; c) abertura coronária.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.4 Coletas do Canal Radicular

Foram realizadas coletas do conteúdo do canal radicular: 1) imediatamente após a abertura coronária (1 col); 2) após a instrumentação do canal radicular (2

col); 3) após a remoção da MIC (3 col). Para cada coleta, 4 cones de papel absorventes (Dentsply Maillefer Ind. E Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil) apirogênicos foram utilizados, e foram introduzidos, um de cada vez, no interior do canal radicular no comprimento pré-odontométrico (CPO = comprimento aparente radiográfico subtraído em 3 mm) permanecendo nesta posição por 60 segundos. O primeiro cone de papel introduzido no canal radicular foi armazenado em um microtubo (2 mL) estéril e apirogênico contendo 1 mL de água apirogênica (Equiplex Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil), para posterior análise de endotoxinas. Os outros 3 cones foram armazenados em 1 mL de *Viability Medium Goteborg Anaerobically* (VMGA) III, para posterior análise microbiológica.

4.1.5 Preparo biomecânico

Após a primeira coleta, foi realizada a neutralização do conteúdo séptico do canal radicular e posterior PBM utilizando NaOCl 2,5% como substância química auxiliar. O comprimento de trabalho (CT) foi estabelecido com o uso do localizador apical (Root ZX II – JMorita do Brasil), e confirmado radiograficamente com o uso de RX digital, 1 mm aquém do comprimento total do dente.

Os dentes foram divididos em três grupos experimentais (n=10), por meio de sorteio realizado no dia do atendimento (Quadro 1). O primeiro grupo foi instrumentado com limas do Sistema Rotatório Mtwo (MTWO) (RomiBras LTDA, Rio de Janeiro, Brasil), utilizando o kit 701 e 702, que são limas rotatórias com conicidades variadas, terminando a instrumentação com a lima 40.04. A instrumentação foi realizada com movimentos de bicada até que o instrumento atingisse o CT, com irrigação de 3 mL de NaOCl 2,5% a cada troca de lima, totalizando 24 mL de substância química auxiliar. O segundo grupo foi instrumentado pelo Sistema Reciprocante Reciproc® (REC) (VDW, Munich, Germany) utilizando o instrumnto R 40 (40.06). A instrumentação foi realizada por terços (cervical, médio e apical) no sentido coroa-ápice, associado com irrigação de NaOCl 2,5%, sendo 8 mL para cada terço instrumentado, totalizando 24 mL. O terceiro grupo foi instrumentado pelo Sistema Híbrido Genius (GEN) (Ultradent,

South Jordan, Utah, USA); por meio de preparo cervical utilizando um instrumento rotatório (30.08) para remoção de interferências cervical, e em seguida, foram utilizadas limas reciprocantes 25.04 e 40.04 até o CT. A cada troca de lima o canal foi irrigado com 8 mL de NaOCl 2,5%, totalizando 24 mL.

Quadro 1 - Sistemas de instrumentação utilizados durante preparo biomecânico

Grupo	Sistemática	Instrumentos	Instrumentação	Irrigação
MTWO	Rotatório	Kit 701 – limas 10.04, 15.05, 20.06, 25.06. Kit 702 – limas 25.07, 30.05, 35.04, 40.04	Todas as limas no CT	3 mL de NaOCl 2,5% a cada troca de lima.
REC	Reciprocante	Lima única (40.06)	Terço cervical Terço médio Terço apical	8 mL de NaOCl 2,5% a cada terço.
GEN	Híbrido	Preparo cervical rotatória (30.08) Reciprocante (25.04) Reciprocante (40.04)	Lima inicial no terço cervical, limas restantes no CT.	8 mL de NaOCl 2,5% a cada troca de lima.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao final do PBM, foi realizado o desbridamento foraminal no comprimento do dente, com instrumento LK 30. Os canais foram irrigados com 5 mL de tiossulfato de sódio 5% para neutralização da solução de NaOCl (Möller, 1966). A irrigação final foi feita com 10 mL de solução salina fisiológica apirogênica e estéril, e em seguida, foi realizada a 2ª coleta da mesma forma descrita anteriormente (Figura 2).

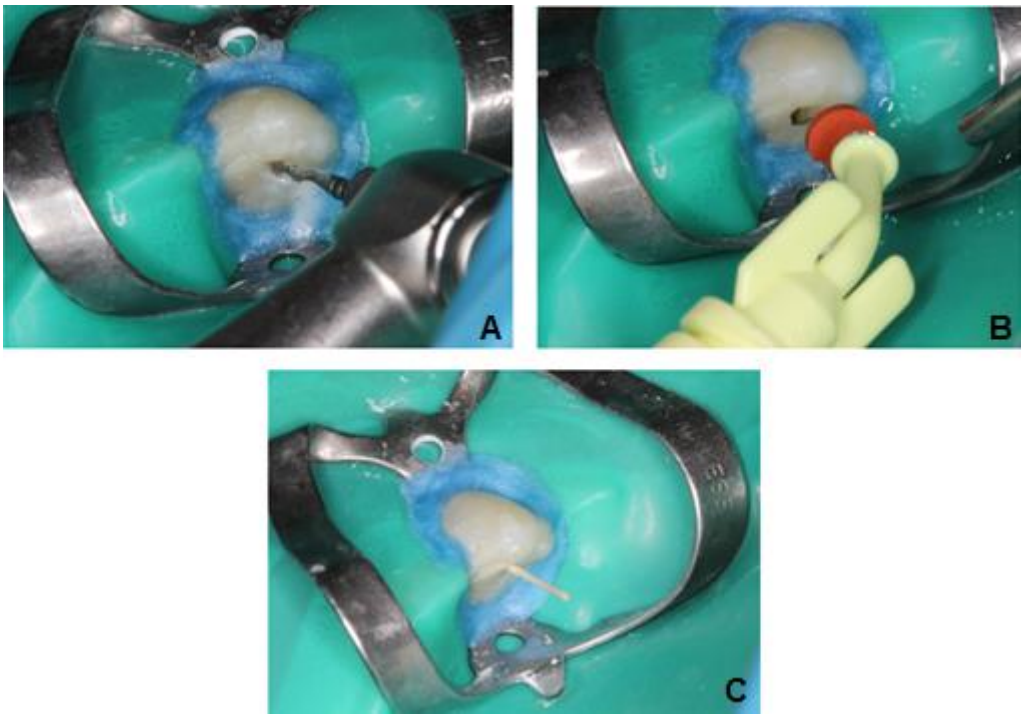
4.1.6 Medicação Intracanal

Após a segunda coleta, os canais foram preenchidos com solução de EDTA 17% (Inodon, Porto Alegre, RS, Brasil) por 5 minutos, lavados com 10 mL de solução salina fisiológica apirogênica e estéril para colocação de MIC. Os canais foram secos com cones de papel absorventes estéril e, em seguida, preenchidos

com pasta de $Ca(OH)_2$ (Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA, Paraná, Brasil) manipulado em associação com solução salina fisiológica, na concentração de 1:1 em volume, que foi inserida no canal com o auxílio de brocas lentulo (Dentsply/Maillefer Instruments AS, Ballaigues, Swistzerland). Em seguida, os dentes foram selados com uma camada de coltosol (Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e restaurados provisoriamente com cimento de ionômero de vidro (S.S. White Artigos Dentários Ltda, RJ, Brasil).

Após 14 dias do atendimento inicial, o paciente foi novamente submetido à anestesia, isolamento e antissepsia do campo operatório, remoção do selamento coronário, remoção do MIC com lima Kerr #30 (Dentsply/Maillefer Instruments AS, Ballaigues, Swistzerland) e irrigação com 10 mL de solução salina fisiológica apirogênica e estéril. Em seguida, foi realizada a 3ª coleta do canal radicular como descrito anteriormente.

Figura 2 - Intervenção endodôntica



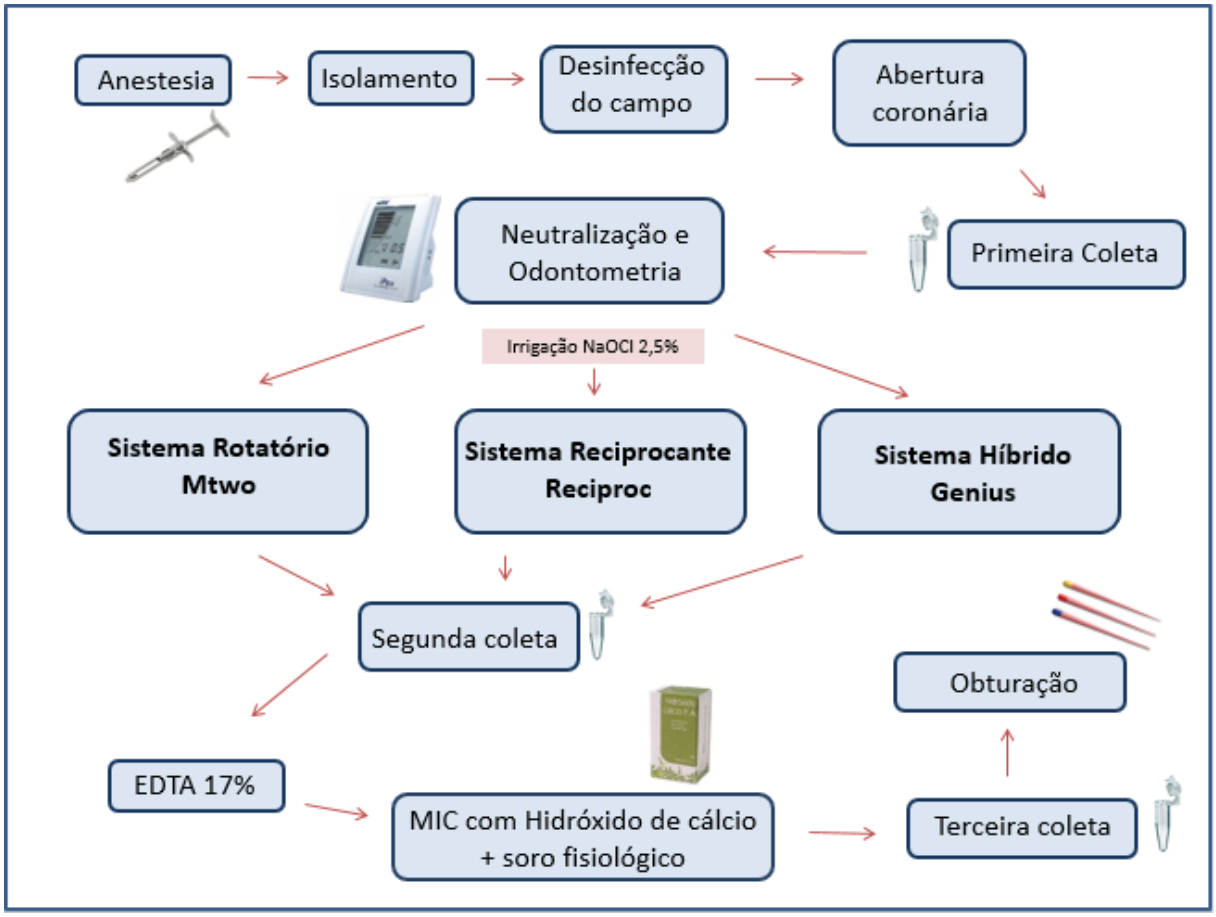
Legenda: a) Instrumentação do canal radicular; b) irrigação com NaOCl 2,5% usando pontas NaviTip (Ultradent, South Jordan, Utah, USA); c) coleta do canal radicular usando pontas de papel absorvente, após a irrigação final com solução salina fisiológica.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.7 Obturação dos canais radiculares

Foi realizada nova anamnese e exame clínico para verificar a presença de dor ou qualquer outro sinal persistente. Os casos que se apresentaram sem dor, sem odor e secos, foram obturados pela técnica de cone único com cone de guta-percha (Dentsply Maillefer Ind. Com. Ltda. Petrópolis, RJ, Brasil) e cimento obturador AH Plus (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz). A confirmação do preenchimento em lateralidade da obturação do canal foi realizada por meio de radiografia periapical digitalizada.

Os passos dos procedimentos clínicos estão esquematizados na Figura 3.

Figura 3 - Esquema do atendimento clínico



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Quantificação de endotoxinas

As amostras coletadas do canal radicular foram submetidas à análise quantitativa de LPS pelo método cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (cinético QCL - LAL). Este teste foi realizado em quadruplicata para todas as coletas do conteúdo do canal radicular.

Sempre que um kit do teste cromogênico QCL do LAL foi iniciado, foi realizada uma curva-padrão. O controle padrão de endotoxina (CPE) de *E. coli* foi reconstituído com um volume especificado, no Certificado de Qualidade, de água apirogênica. Esta suspensão contém 50 EU/mL. Foram realizadas diluições a partir deste padrão de endotoxina em diferentes concentrações (50; 5; 0,5; 0,05; 0,005 EU/ml). Para cada amostra, foi realizado um controle positivo (amostra do conteúdo do canal radicular adicionada de uma quantidade conhecida de endotoxina).

Em uma placa apirogênica de 96 poços, foram adicionados 100 μL de água apirogênica (branco da reação), os padrões de endotoxina, as amostras coletadas do canal radicular e os controles positivos. A placa foi incubada no leitor cinético QCL (Lonza, Walkersville, MD, EUA) a 37±1ºC por 10 minutos, o qual estava acoplado a um microcomputador com *software Wink QCL* específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Após, foram adicionados em cada poço da placa 100 μL do reagente cinético cromogênico do LAL, com uma micropipeta multicanal e ponteiras apirogênicas. Após o início do ensaio cinético, o *software* da leitora de microplacas monitora, de forma contínua todo o ensaio, a absorbância a 405 nm em cada poço da microplaca. O leitor determinou o tempo necessário para aumentar a absorbância de cada poço a 0.200 unidades de absorbância, que foi denominado tempo de reação. O *software WinkQCL* automaticamente calculou uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Os parâmetros da curva-padrão foram salvos no relatório de impressão.

4.3 Análise por *checkerboard*

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

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

4.3.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento

A lista das 40 cepas bacterianas utilizadas neste estudo para o preparo das sondas de DNA está apresentada no quadro 2. As espécies avaliadas foram selecionadas devido à sua associação as infecções endodônticas ou a sua presença em outras infecções orais e saliva. Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (Americam Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA) ou do Forsyth Institute (Boston, MA, EUA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de Mycoplasma (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e cultivado em Agar-triptose de soja (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) contendo 5% de sangue desfibrinado de ovelha (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, EUA) a 35 ºC sob condição de anaerobiose. Algumas bactérias foram cultivadas em

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

4.3.2 Isolamento do DNA e preparo das sondas

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

Quadro 2 - Relação das cepas bacterianas, o metabolismo respiratório e a coloração Gram das bactérias utilizadas para o desenvolvimento da sonda de DNA bacteriano, divididas por complexos

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

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.3 *Checkerboard DNA-DNA hybridization*

As suspensões contendo as amostras coletadas foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 mL de acetato de amônia (C2H7NO2) a 5 M. Com isto, as células bacterianas foram lisadas e o DNA ficou suspenso na solução. Uma membrana de *nylon* (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences, Chicago, IL- USA) foi montada em Minislot 30® (Immunetics, Cambridge, MA – USA).

Suspensão de cada amostra contendo DNA livre foi depositada nas fendas do *Minislot* 30® e o DNA permaneceu depositado na membrana de *nylon*. As duas últimas canaletas do *Minislot* 30® foram reservadas para a colocação dos controles, contendo uma mistura das espécies dos micro-organismos que foram investigados pelas sondas de DNA, em duas concentrações, 105 e 106 células bacterianas, ou seja, 0,001 µg e 0,01 µg de cada espécie, respectivamente.

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

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

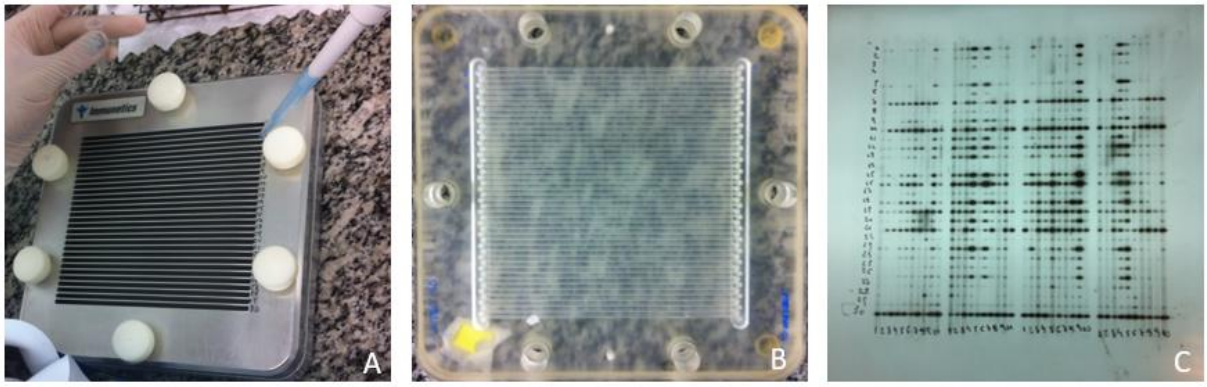
com as sondas e o DNA das amostras bacterianas fixadas, foram colocados dentro de um saco plástico umedecido para evitar a desidratação das mesmas e incubado a 42 °C para que a hibridização ocorresse. A hibridização das membranas com as sondas ocorreu durante um período mínimo de 12 horas (*overnight*).

Após a hibridização com as sondas, as membranas foram removidas do *Miniblotter* 45® e lavadas por 40 minutos a 65 °C, numa solução adstringente composta por 1% de SDS, 1 mM de EDTA e 20 mM de Na2HPO4, a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por 1 hora sob agitação, em uma solução bloqueadora contendo 1% de ácido maleico (Vetec), 3 M NaCl, 0,2 M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína (pH 8,0) e, logo após, por 30 minutos na mesma solução contendo anticorpo anti-digoxigenina (*Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments* – Roche Diagnostics GmbH, Mannheim – Germany) conjugado à fosfatase alcalina (Roche), em uma concentração de 1:10000. As membranas foram, então, lavadas 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1 M ácido maleico, 3 M NaCl, 0,2 M NaOH, 0,3% Tween 20, pH 8,0, e uma vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1 M de Tris HCl, 0,1 M de NaCl (pH 9,5). Para detecção dos sinais as membranas foram incubadas por 45 minutos a 37 ºC em uma solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina, *CDP-Star Detection Reagent*® (Amershan Biosciences UK Limited, Buckinghamshire – UK). Em seguida, as membranas foram colocadas em um cassete, Chassi Radiográfico 30 x 40 cm (Konex, São Paulo, SP, Brasil) sob um filme radiográfico (Kodak® X-OMAT Kodak Brasileira Com. E Ind. Ltda, São José dos Campos, SP) e foi radiografado por aproximadamente 40 minutos. Os filmes foram posteriormente revelados manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com as orientações do fabricante (Figura 4).

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, calibrado e cego para as terapias empregadas. A leitura foi realizada 2 vezes, em dias diferentes, para conferência de resultados. Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra dos canais radiculares foi comparado, em intensidade, ao sinal produzido pela mesma sonda nas 2 linhas de controles contendo 10^5 e 10^6 células bacterianas. A intensidade de hibridização foi dividida em 6 classes diferentes em relação aos níveis observados de contagem: (0) não

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

Figura 4 - Teste *checkerboard DNA-DNA hybridization*



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

4.4 Volumetria dos canais radiculares

Com as TCFC realizadas antes do tratamento endodôntico, foi verificada a volumetria dos canais radiculares (mm^3) com infecção primária.

Dois examinadores independentes (um endodontista e um radiologista) avaliaram todos os exames. O volume de cada canal radicular foi medido pelo radiologista e confirmado pelo endodontista seguindo o mesmo procedimento de segmentação no software Nemotec® e salvos em um arquivo do Programa Microsoft Office Excel.

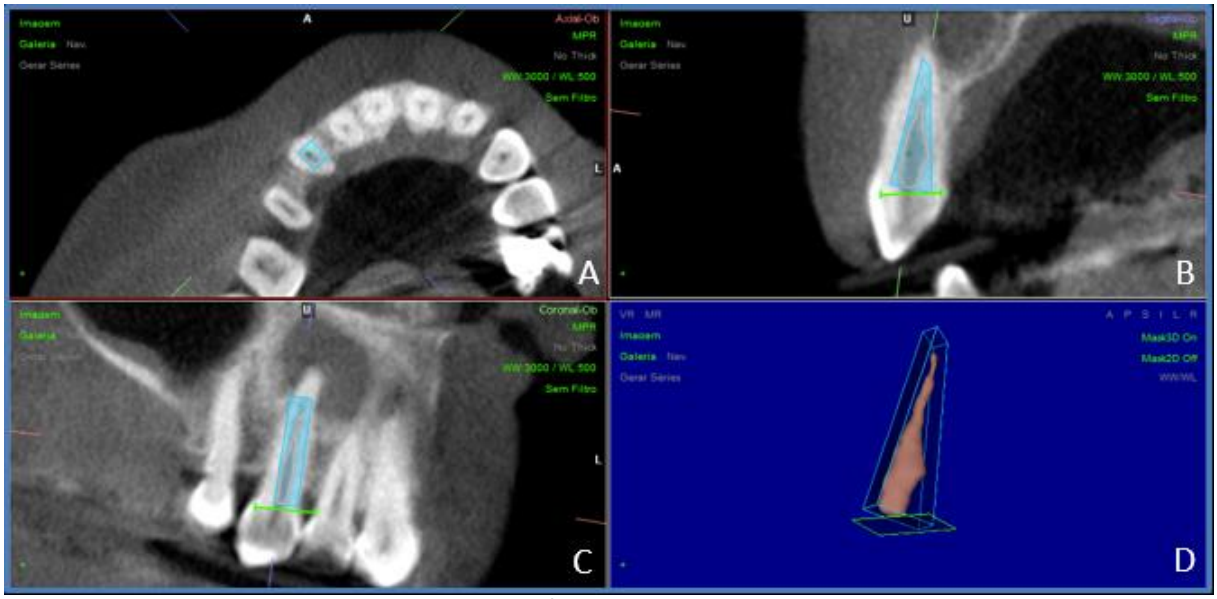
O processo de segmentação e as medições volumétricas foram feitas usando o longo eixo do dente como referência, seguindo as seguintes etapas:

a) De posse da tela de reconstrução MPR foi realizado o posicionamento das coordenadas “X”, “Y” e “Z” nos planos axial, coronal e sagital, de acordo com o dente a ser avaliado: corte axial – perpendicular ao longo

eixo do dente, corte sagital – paralelo ao longo eixo do dente, alinhado ao rebordo alveolar, corte coronal – alinhado ao longo eixo do dente;

b) Realização da segmentação 2D e medidas dos canais radiculares em todos os 3 planos (axial, sagital e coronal) para determinar a área radiolúcida que delimita o canal radicular;
c) Após a criação das medidas nos planos de corte sagital, coronal e axial, foi determinado uma forma que abranja todo o limite do canal radicular, com margem de segurança, para formatação da reconstrução 3D da radiolucência do canal;
d) Os limites do canal foram inspecionados para verificar se está contemplada na forma gerada;
e) Utilizou-se a opção “detectar volume” do software para automaticamente calcular os volumes dos canais radiculares (Figura 5).

Figura 5 - Imagem da TCFC da verificação pré-operatória transferidos para o software Nemotec® após criação das medidas do canal radicular nos diferentes planos de corte, formando um polígono que abrangesse todo o limite do canal



Legenda: Volumetria do canal radicular (mm^3): a) plano axial; b) plano sagital; c) plano coronal; d) reconstrução 3D da radiolucência do canal radicular.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram montados em planilhas excel e todos os cálculos foram feitos por meio do sistema SAS (SAS Institute Inc. The SAS System, release 9.3. SAS Institute Inc., Cary:NC. 2011). Foi realizado análise descritiva a fim de possibilitar a visualização e distribuição dos dados.

O teste de Qui quadrado foi utilizado para comprovar a não casualidade entre todos os sinais e sintomas, comprovando a significância dos dados obtidos. Isoladamente, o teste exato de Fischer foi ulitizado para verificar as associações positivas entre os sinais e sintomas com a microbiota encontrada no canal radicular.

Foi realizado o teste de Tukey para avaliar o efeito no preparo biomecânico na redução da detecção de micro-organismos e de endotoxinas ao longo das diferentes etapas do tratamento endodôntico.

Para associação da volumetria do canal radicular, foi usado o teste de correlação de Pearson, que gera um coeficiente que permite quantificar a natureza (direta ou inversamente proporcional) e a magnitude da associação (forte ou fraca) como segue: correlação muito forte (>0,80); forte (0,80 – 0,60); intermediário (0,60-0,40); fraco (<0,40).

5 RESULTADO

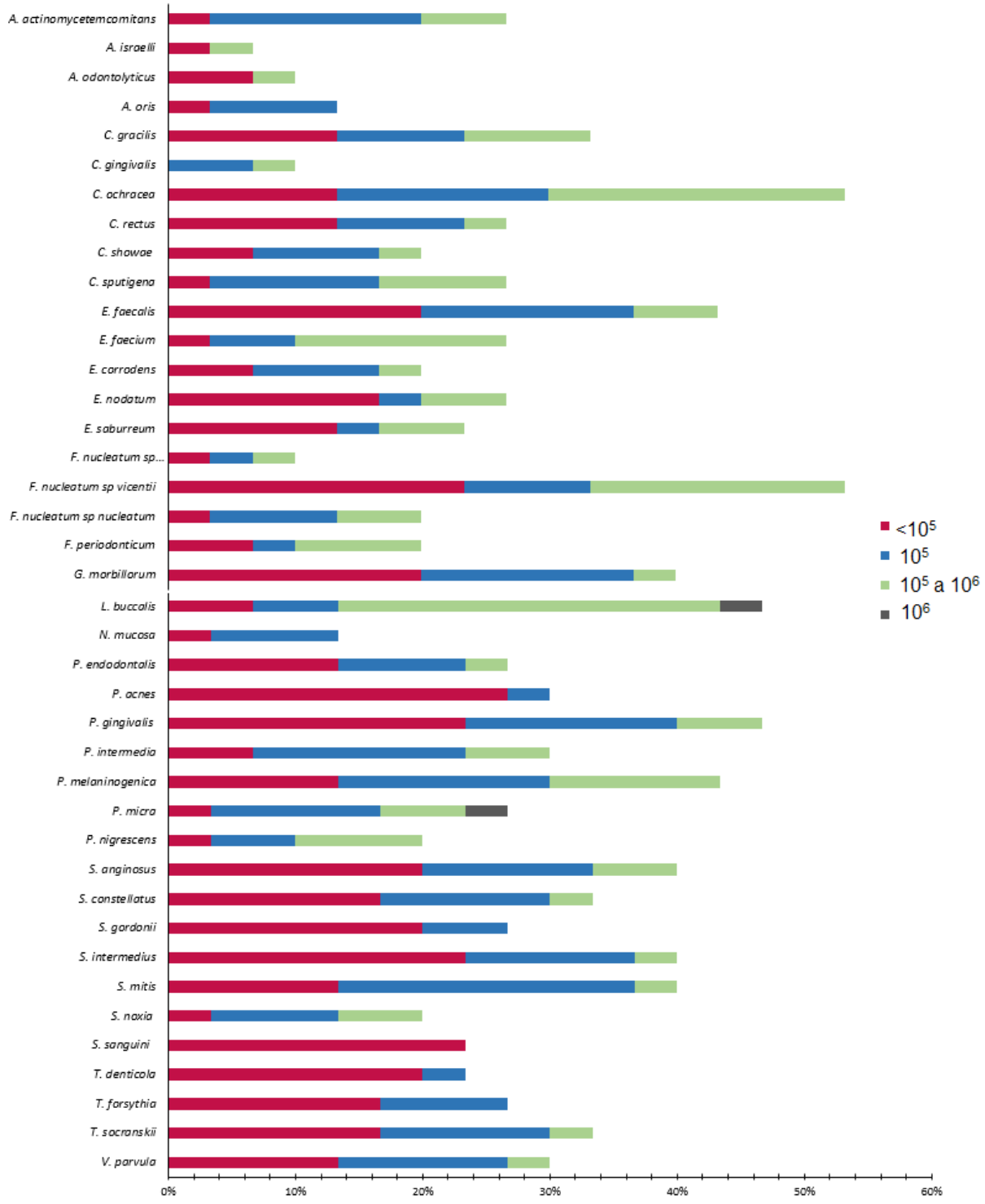
5.1 Quantificação e monitoramento do perfil bacteriano e de endotoxinas durante as diferentes fases do tratamento endodôntico

Todas as 30 amostras iniciais (30/30) apresentaram presença de DNA bacteriano. Na primeira coleta, o número de espécies bacterianas variou de 1 a 36 espécies por canal, tendo em média 11,3 espécies. Os micro-organismos mais frenquentementes encontrados foram: *C. ochracea* (53,33%), *F. nucleatum ssp vicentii* (53,33%), *L. buccalis* (46,67%) e *P. gingivalis* (46,67%), como demonstrado na figura 6. O grupo MTWO, foram encontrados de 5 a 36 espécies bacterianas na coleta inicial, com uma média de 17 espécies; o grupo REC apresentou na coleta inicial de 1 a 18 espécies bacterianas, com média de 10,2 espécies por canal; o grupo GEN, foram encontradas de 2 a 10 espécies bacterianas na coleta inicial, com uma média de 6,7 espécies por canal.

Na segunda coleta, o número de espécies bacterianas variou de 1 a 28 por canal, tendo média de 10,1 espécies. As bactérias mais frenquentes foram a *F. nucleatum ssp vicentii* (50%) e *L. buccalis* (50%), seguido de *P. gingivalis* (46,7%) e *S. mitis* (43,3%), como evidenciado na figura 7. O grupo MTWO, coleta após o PBM, foram encontrados de 2 a 28 espécies bacterianas, com média de 12,5 espécies por canal; o grupo REC, na coleta após o PBM, de 1 a 21 espécies bacterianas foram encontradas, com média de 8,5; o grupo GEN apresentou 5 a 17 espécies bacterianas, com uma média de 9,4 espécies por canal.

Na terceira coleta dos canais radiculares, foram encontradas de 1 a 34 espécies bacterianas por canal, com uma média de 11,43 espécies. Os micro-organismos mais frequentes foram *C. gracilis* (53,3%), seguido de *C. ochracea* (46,7%), *L. buccalis* (43,3%), *S. constellatus* (43,3%) e *S. intermedius* (43,3%), conforme observado na figura 8. O grupo MTWO, na coleta após a MIC, foram encontrados de 1 a 34 espécies, com média de 16,8 espécies; no grupo REC foram encontradas de 1 a 23 espécies na coleta após a MIC, com média de 9,8 espécies; o grupo GEN, após a MIC, 4 a 11 espécies foram encontradas, com uma média de 7,7 espécies bacterianas por canal.

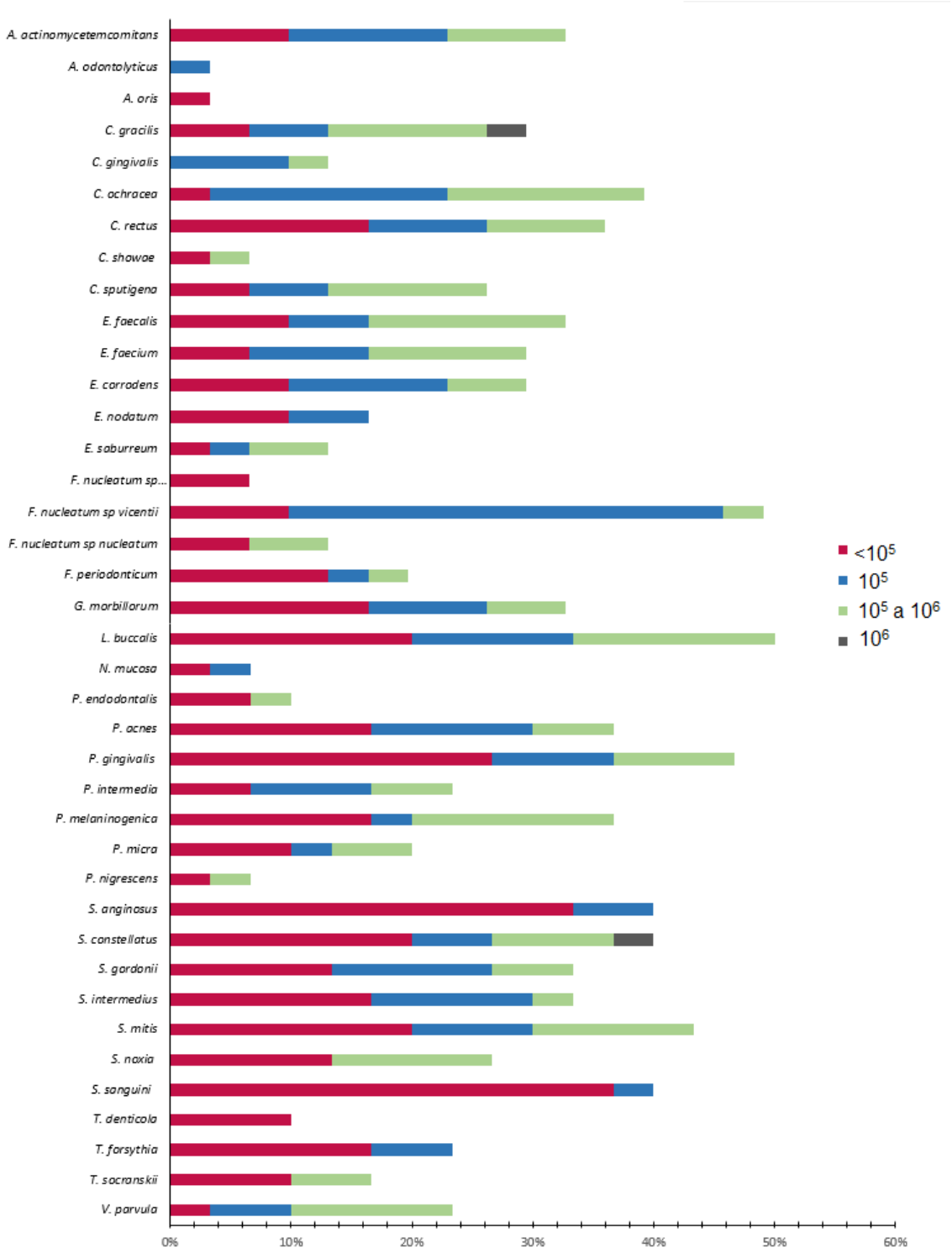
Figura 6 - Gráfico de barras de frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano encontradas na primeira coleta de dentes com infecção endodôntica primária



Legenda: o comprimento total de cada barra indica a porcentagem de amostras positivas, e cores diferentes indicam a porcentagem dessas amostras contendo diferentes concentrações de DNA bacteriano

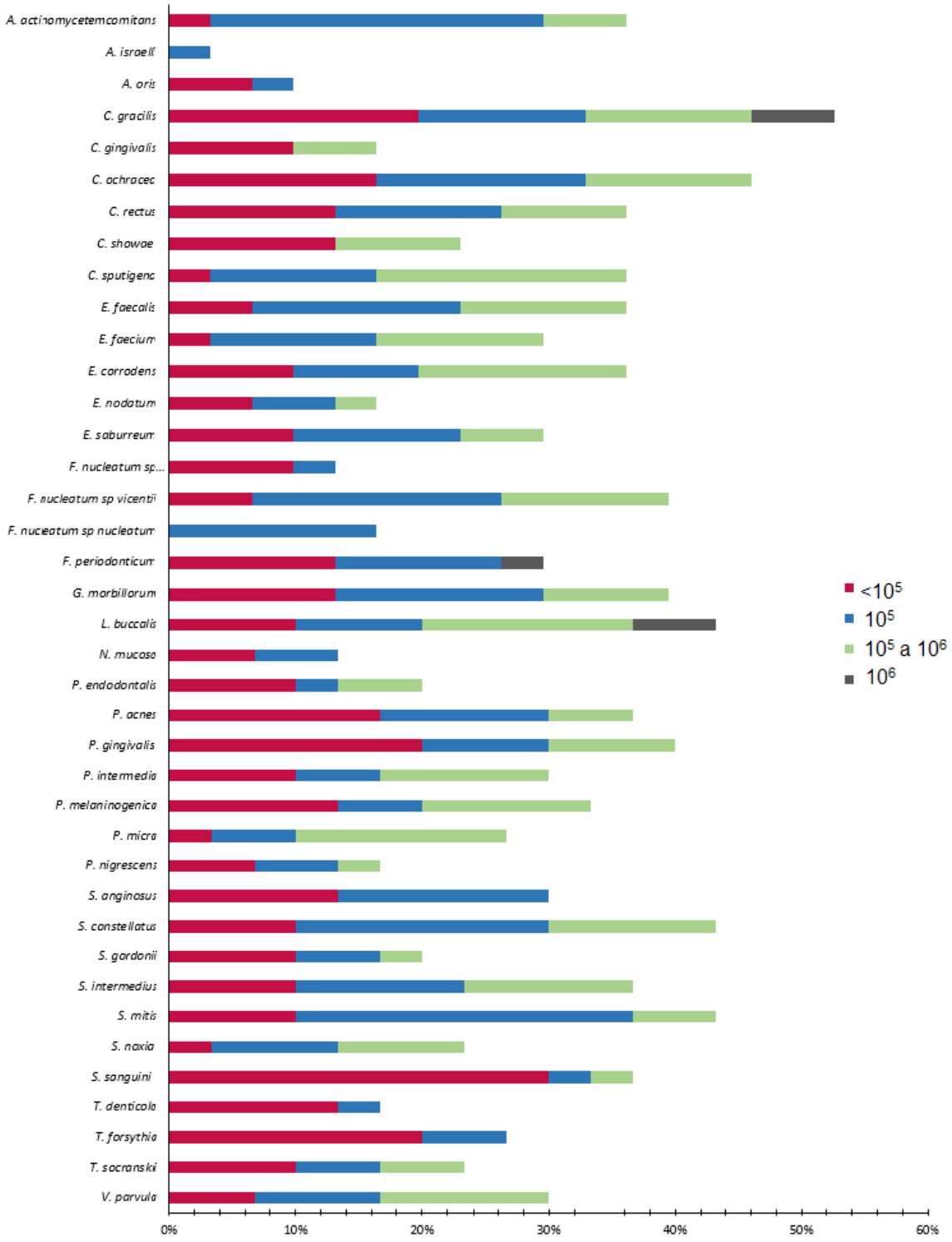
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 - Gráfico de barras de frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano encontradas na segunda coleta de dentes com infecção endodôntica primária



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

Figura 8 - Gráfico de barras de frequência de detecção e concentração de DNA bacteriano encontradas na terceira coleta de dentes com infecção endodôntica primária



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

O quadro 3 evidencia a redução da frequência de detecção dos micro-organismos durante o tratamento endodôntico, antes e após o PBM com diferentes sistemas de instrumentação e após MIC de $Ca(OH)_2$.

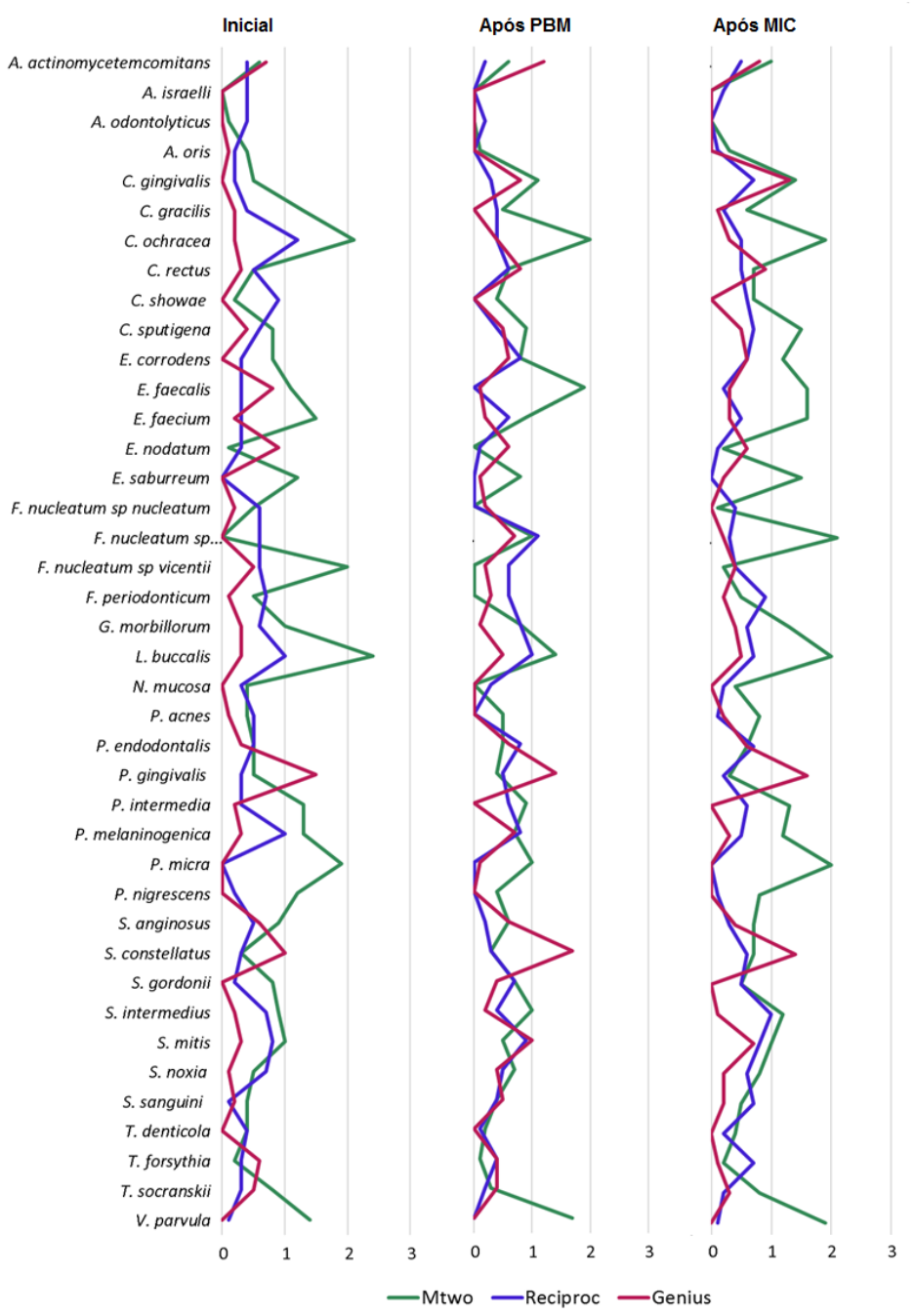
Quadro 3 - Frequência em números de casos de detecção dos micro-organismos pesquisados durante o tratamento endodôntico

Espécies	Inicial	Após PBM			Após MIC		
		Genius	Mtwo	Reciproc	Genius	Mtwo	Reciproc
A.actinomycetemcomitans	8	6	3	1	4	5	2
A.israelli	2	0	0	0	0	0	1
A.odontolyticus	3	0	0	1	0	0	0
A.oris	4	0	1	0	0	2	1
C.gracilis	10	4	4	1	6	4	6
C.ochracea	16	2	8	2	2	8	4
C.rectus	8	4	4	3	4	4	3
C.showae	6	0	2	0	0	3	4
C.sputigena	8	2	4	2	2	5	4
E.corrodens	6	2	4	3	3	6	2
E.faecalis	13	2	4	4	3	5	3
E.faecium	8	1	8	0	2	6	1
E.nodatum	8	4	0	1	3	1	1
E.saburreum	7	1	3	0	1	8	0
F.nucleatum sp nucleatum	6	2	0	2	2	1	2
F.nucleatum sp polymorphum	3	2	0	0	0	1	3
F.nucleatum sp vicentii	16	5	5	5	2	9	1
F.periodonticum	6	3	0	3	2	3	4
C.gingivalis	3	0	2	2	1	2	2
G.morbillorum	12	1	5	4	2	6	4
L.buccalis	14	4	5	6	2	6	5
N.mucosa	4	0	0	2	0	2	2
P.acnes	9	3	3	5	3	4	4
P.endodontalis	8	0	3	0	1	4	1
P.gingivalis	14	7	4	3	8	3	1
P.intermedia	9	0	4	4	0	5	4
P.melaninogenica	13	3	3	5	3	5	2
P.micra	8	1	5	0	0	8	0
P.nigrescens	6	0	2	0	0	4	1
S.anginosus	12	6	4	2	3	4	2
S.constellatus	10	8	3	1	7	4	2
S.gordonii	8	2	4	4	0	4	2
S.intermedius	12	2	5	3	1	5	5
S.mitis	12	5	4	4	4	5	4
S.noxia	6	2	3	3	1	4	2
S.sanguinis	7	5	4	3	2	5	4
T.denticola	7	0	2	1	0	4	1
T.forsythia	8	3	1	3	1	2	5
T.socranskii	10	2	1	2	2	3	2
V.parvula	9	0	7	0	0	8	1

Fonte: Elaborado pelo autor.

Observando a figura 9, é possível verificar a diferença entre o valor médio da carga bacteriana balanceado pelo número de pacientes para todas as espécies pesquisadas, nas três coletas estudadas.

Figura 9 - Gráfico de linhas mostrando a diferença entre o valor médio da carga bacteriana balanceado pelo número de pacientes para todas as espécies pesquisadas, nas três coletas realizadas durante o tratamento endodôntico



Fonte: Elaborado pelo autor.

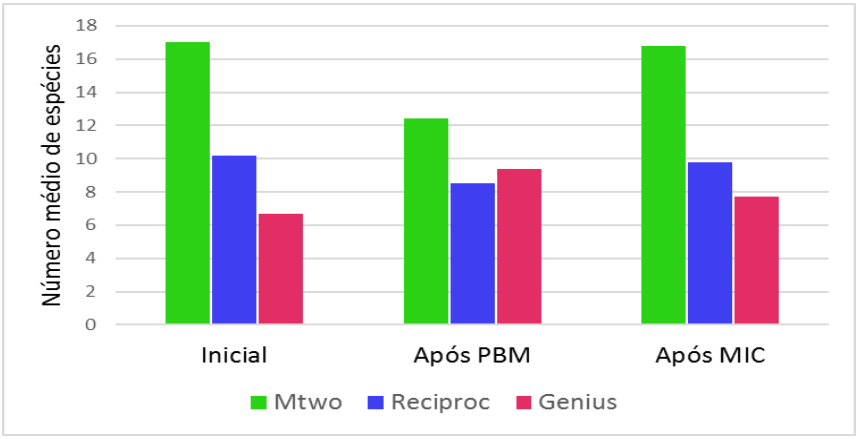
Embora os tratamentos tenham diminuido o número de espécies microbianas, não houve diferenças estatísticas entre as diferentes etapas do tratamento endodôntico (Tabela 1 e Figura 10). Entretanto, quando comparamos o número de espécies entre os diferentes grupos experimentais, percebe-se que o grupo MTWO diferencia significativamente do grupo GEN (p=0,03), como evidenciado na figura 11 e tabela 1.

Tabela 1 - Média do número de espécies microbianas encontradas em cada grupo nas diferentes fases do tratamento endodôntico

Grupos	Inicial (média / min-max)	Após PBM (média / min-max)	Após MIC (média / min-max)
MTWO	17 (5-36) **Aa**	12,4 (2-28) **Aa**	16,8 (1-34) **Aa**
REC	10,2 (1-18) **ABa**	8,5 (1-21) **ABa**	9,8 (1-23) **ABa**
GEN	6,7 (2-10) **Ba**	9,4 (5-17) **Ba**	7,7 (4-11) **Ba**

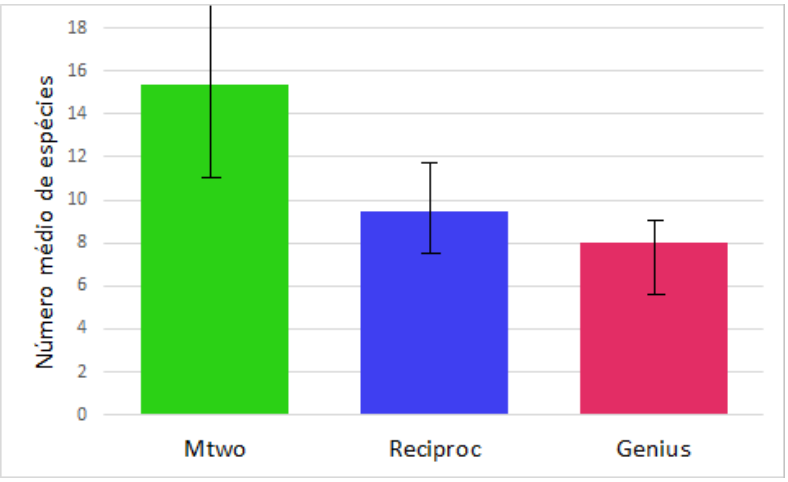
*Letras maiúsculas indicam diferença entre as linhas (inter-grupos) e letras minúsculas indicam diferença nas colunas (intra-grupos).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 - Gráfico de barras mostrando o número médio de espécies microbianas por coleta, em cada grupo estudado



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 - Gráfico de barras mostrando o número médio de espécies microbianas por grupo estudado



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na tabela 2, observa-se a redução dos níveis de endotoxinas nos diferentes grupos experimentais, comparando as coletas entre si e entre os grupos, durante as diferentes etapas do tratamento endodôntico.

Tabela 2 - Média dos níveis de endotoxinas (EU/mL) encontradas em cada grupo, nas diferentes etapas do tratamento endodôntico

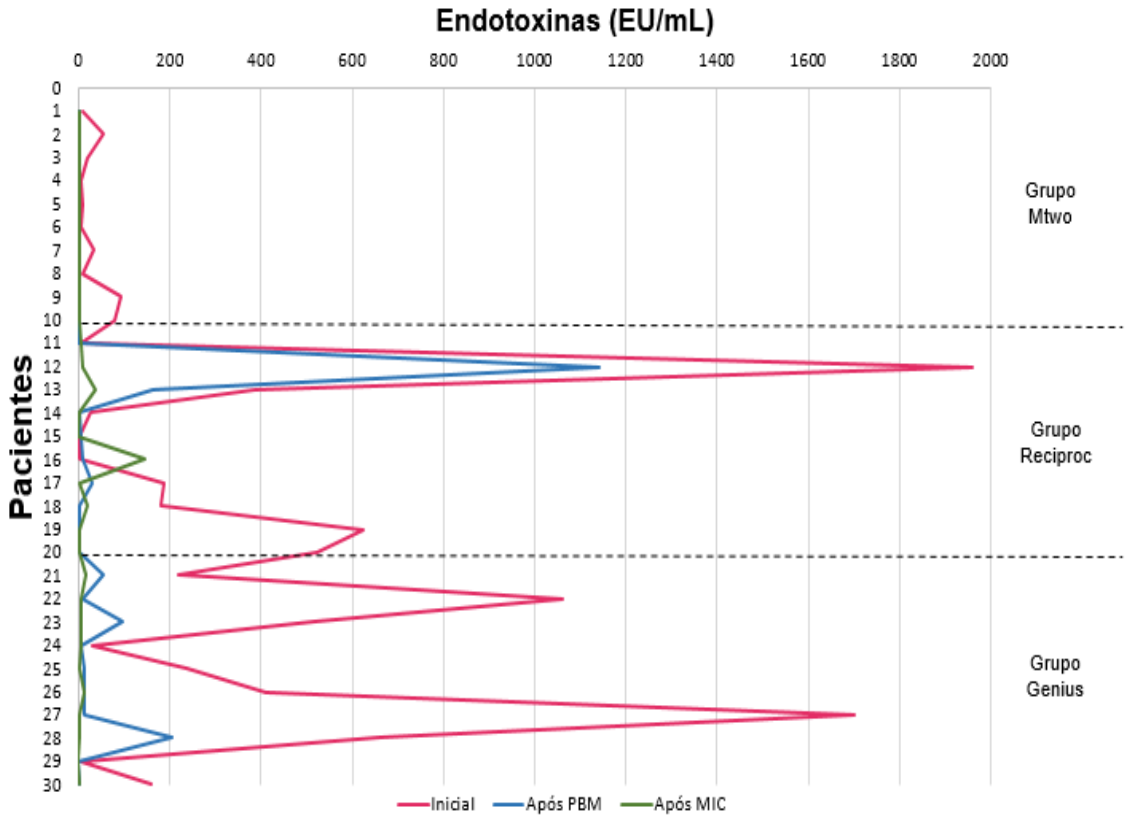
Coletas		**GRUPOS**		
		Mtwo	**Reciproc**	**Genius**
INICIAL	Média (EU/mL)	32,12	390,11	500,61
	(Min-Max)	(5,95 – 93)	(1,76-1960)	(5,24 – 1700)
	Letras*	Aa	ABa	Ba
APÓS PBM	Média (EU/mL)	1,58	135,76	40,77
	(Min-Max)	(0 – 3,59)	(0,39 – 1143)	(0,4-204)
	Letras*	Ab	Ab	Ab
APÓS MIC	Média (EU/mL)	1,18	22,27	5,23
	(Min-Max)	(0,71-1,92)	(0,49 – 146)	(0,41-15,5)
	Letras*	Ab	Ab	Ab

*Letras maiúsculas indicam diferença entre as linhas (inter-grupos) e letras minúsculas indicam diferença nas colunas (intra-grupos).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Todos os grupos reduziram significativamente o número de endotoxinas após o PBM, sendo que o grupo MTWO foi o que apresentou os melhores resultados (95,05%), seguido pelo grupo GEN (91,85%) e REC (64,68%). Quando comparado a coleta inicial com coleta após a MIC, o grupo que mais reduziu endotoxinas foi o GEN (98,95%), seguido pelo MTWO (96,32%) e REC (94,29%). Quando comparado a coleta após o PBM com a coleta após a MIC, o grupo que mais reduziu foi o GEN (87,17%), seguido pelo REC (83,59%) MTWO (25,31%).

A figura 12 mostra a redução dos níveis de endotoxinas para cada amostra, durante todo o tratamento endodôntico.

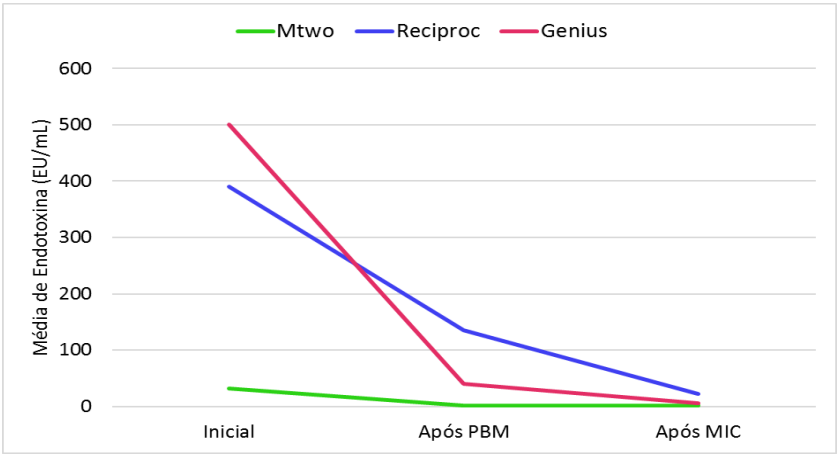
Figura 12 - Gráfico de linhas evidenciando a redução dos níveis de endotoxinas (EU/mL) durante o tratamento endodôntico nos três grupos pesquisados



Fonte: Elaborado pelo autor

A figura 13 ilustra a redução do nível de endotoxinas durante as diferentes fases do tratamento endodôntico, nos diferentes grupos experimentais.

Figura 13 - Média dos níveis de endotoxinas (EU/mL) para cada coleta, nos diferentes grupos experimentais



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Associação de micro-organismos e endotoxinas com sinais e sintomas clínicos em dentes com infecção endodôntica primária

Os dentes tratados foram: incisivos centrais (11/30), incisivos laterais (7/30), caninos (5/30) e segundos pré-molares (7/30). Durante anamnese 6/30 relataram dor prévia. Clinicamente, foi observado 23,3% dos pacientes (7/30) apresentavam dor a percussão, 13,3% (4/30) dor a palpação; 16,6% (5/30) apresentaram fístula e a presença de exsudato foi observada em 6,6% (2/30) dos pacientes (Tabela 3).

Tabela 3 - Sinais e sintomas clínicos nos diferentes grupos experimentais

Grupo	Dor Prévia	Percussão	Palpação	Fístula	Exudato
MTWO	3 (10)	4 (10)	1 (10)	4 (10)	1 (10)
REC	2 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)
GEN	1 (10)	2 (10)	2 (10)	0 (10)	0 (10)
TOTAL	**6 (30)**	**7 (30)**	**4 (30)**	**5 (30)**	**2 (30)**

Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise pelo teste exato de Fischer mostrou que a presença de dor prévia foi relacionada com *P. nigrescens* (p=0,014). A dor a percussão foi relacionada com *P. gingivalis* (p=0,007), *V. parvula* (p=0,041), *C. sputigena* (p=0,014), *P. nigrescens* (p=0,009) e *S. saburreum* (p=0,01). A presença de fístula foi relacionada com as espécies *E. corrodens* (p=0,018), *P. micra* (p=0,007), *C. showae* (p=0,055) e *E. saburreum* (p=0,007).

As associações de micro-organismos também foram analisadas, sendo encontradas relações entre a presença de fístula com micro-organismos Gram-positivos (p=0,032), anaeróbios facultativos (p=0,027) e com o complexo laranja (p=0,023).

O quadro 4 mostra as associações positivas entre sinais e sintomas clínicos com espécies microbianas, complexos e suas características.

Quadro 4 - Associações positivas entre sinais e sintomas

Sinais e Sintomas	**Associações positivas**		
	Complexos bacterianos	**Características bacterianas**	**Espécies de micro-organismos**
Dor prévia	Sem associação	Sem associação	*Prevotella nigrescens*
Dor à percussão	Sem associação	Sem associação	*Porphyromonas gingivalis* *Veillonella parvula* *Capnocytophaga sputigena* *Prevotella nigrescens* *Eubacterium saburreum*
Fístula	Laranja	Gram + Anaeróbio facultativo	*Eikenella corrodens* *Parvimona micra* *Campylobacter showae* *Eubacterium saburreum*

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quando associado endotoxinas com sinais e sintomas clínicos por meio do teste exato de Fischer, não foram encontradas associações positivas, conforme observado na tabela 4.

Tabela 4 - Frequência e valor de p para estudo da associação entre sinais e sintomas clínicos e níveis de endotoxinas

Sinais e sintomas clínicos	Endotoxina (Mediana: 5,60)		Teste Exato de Fisher (valor p)
	<= mediana	> mediana	
DOR			
Não	4 (16,67)	20 (83,33)	0,5569
Sim	0 (0,00)	6 (100,00)	
PERCUSSÃO			
Não	4 (17,39)	19 (82,61)	0,5476
Sim	0 (0,00)	6 (100,00)	
PALPAÇÃO			
Não	3 (11,54)	23 (88,46)	0,4545
Sim	1 (25,00)	3 (75,00)	
FÍSTULA			
Não	3 (12,00)	22 (88,00)	0,5384
Sim	1 (20,00)	4 (80,00)	
EXUDATO			
Não	3 (10,71)	25 (89,29)	0,2529
Sim	1 (50,00)	1 (50,00)	

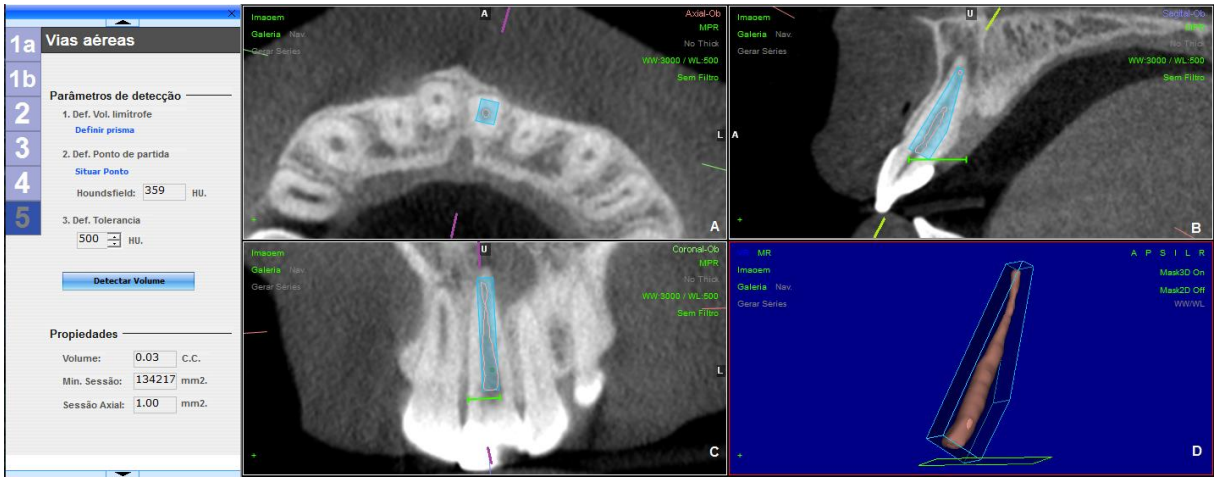
Fonte: Elaborado pelo autor

5.3 Relação entre volumetria do canal radicular (mm^3) com níveis de endotoxinas, micro-organismos, complexos bacterianos e características microbianas

Através do teste de correlação de *Pearson* foi possível relacionar o volume do canal radicular (mm^3) com níveis de endotoxinas (EU/mL), micro-organismos, bem como suas características e complexos microbianos. O volume do canal radicular foi obtido em cm^3, e convertido para mm^3, através do software Nemotec®, como exemplificado na figura 14.

Verificou-se que micro-organismos e seus complexos se mostram diretamente proporcional ao volume do canal radicular. Na tabela 5 observa-se as associações positivas encontradas entre a volumetria do canal radicular com os micro-organismos estudados.

Figura 14 - Imagem da TCFC pré-operatória transferidos para o software Nemotec® após criação das medidas do canal radicular nos diferentes planos de corte, formando um polígono que abrange todo o limite do canal, sendo possível o cálculo do volume do canal radicular em cm^3



Legenda: A) plano axial: linha roxa acompanha o longo eixo do dente; B) plano sagital: linha verde acompanha o longo eixo do dente; C) plano coronal: linha roxa acompanha o longo eixo do dente; D) reconstrução 3D da radiolucência do canal radicular.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Quando associa-se a volumetria do canal radicular com os complexos microbianos e as características de respiração celular e coloração Gram dos micro-organismos, encontra-se associações positivas entre os complexos roxo, verde, laranja, laranja periférico e amarelo, entre aeróbios e anaeróbios, e entre Gram-positivos e Gram-negativos, como visto na tabela 6.

Tabela 5 - Associações positivas entre espécies bacterianas e volume do canal radicular em dentes com infecção endodôntica primária

Espécies de Micro-organismo	**Coeficiente de Correlação de Pearson**	**Associação**	**Valor p**
Parvimonas micra	0,69	Forte	<0,0001
Eubacterium saburreum	0,59		0,0005
Veillonella parvula	0,56		0,0011
Leptotrichia buccalis	0,52		0,0027
Fusobacterium nucleatum ssp vicentii	0,52		0,0032
Neisseria mucosa	0,51		0,004
Eikenella corrodens	0,47		0,0074
Enterococcus faecalis	0,47		0,0079
Enterococcus faecium	0,46	Intermediária	0,0089
Actinomyces oris	0,46		0,0103
Streptococcus sanguini	0,45		0,0114
Prevotella nigrescens	0,45		0,0125
Campylobacter gracilis	0,44		0,0133
Capnocytophaga ochracea	0,44		0,0134
Prevotella intermedia	0,42		0,0184
Streptococcus gordonii	0,38		0,0373
Fusobacterium periodonticum	0,37	Fraca	0,0440

Fonte: Elaborado pelo autor.

Não houve associação positiva entre endotoxinas e volumetria do canal radicular (p>.05).

Tabela 6 - Associações positivas entre complexos bacterianos e características bacterianas e volume do canal radicular em dentes com infecção endodôntica primária

		Coeficiente de correlação de Pearson	Associação	Valor p
Complexos bacterianos	Laranja	0,61	Forte	0,0003
	Verde	0,58	Intermediário	0,0007
	Roxo	0,50		0,0041
	Amarelo	0,39	Fraco	0,0299
	Laranja periférico	0,37		0,0386
Características bacterianas	Anaeróbio estrito	0,63	Forte	0,0002
	Gram-negativo	0,58		0,0006
	Gram-positivo	0,57	Intermediário	0,0009
	Anaeróbio facultativo	0,52		0,0027

Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado com o intuito de traçar um perfil microbiológico em dentes com infecção endodôntica primária e comparar a ação antimicrobiana do PBM utilizando NaOCl e diferentes sistemas de instrumentação mecanizada, seguido de MIC de $Ca(OH)_2$. Para combater a infecção presente no interior dos canais radiculares, é necessário conhecer os patógenos mais frequentes, mais agressivos e também os mais resistentes ao tratamento endodôntico, a fim de buscar soluções para o combate à infecção, objetivando maior sucesso da terapia endodôntica.

Com o avanço da biologia molecular, a identificação de micro-organimos presentes nas infecções endodônticas se tornou mais fácil, uma vez que o DNA de células bacterianas é utilizado para a identificação de micro-organismo. O método de *checkerboard DNA-DNA hydridization* é bastante recomendado com o objetivo de traçar o perfil bacteriano em infecções polimicrobianas, pois permite identificar simultaneamente, em 28 amostras, 40 bactérias em apenas uma membrana. É um teste rápido, que identifica micro-organismos não cultiváveis, e não necessita de ampliação ou diluição da amostra, sendo que os dados quantitativos apontados pelo teste são fiéis e confiáveis (Socransky *et al.,* 2004). Ele funciona utiliza sondas que contém fragmentos de DNA de cadeia simples, marcados com uma enzima, que pode ser um componente quimioluminescente ou um isótopo radioativo, que se ligam as suas sequências complementares de ácidos nucléicos, usando genes específicos, que permite identificar espécies e subespécies (Siqueira, Roças, 2005a).

O método também apresenta algumas desvantagens, como a possibilidade de detectar DNA bacteriano de micro-organimos que foram recentemente mortos, por ainda terem seu DNA íntegro na amostra. Além disso, o uso de NaOCl e de MIC com $Ca(OH)_2$ podem degradar ou oxidar o DNA dos micro-organimos, respectivamente, podendo interferir nos resultados (Sakamoto *et al.,* 2007).

As 40 espécies bacterianas escolhidas para identificação foram micro-organismos anaeróbios facultativos ou estritos, Gram-positivos e Gram-negativos, e que são comumente estudados em casos de doeças periodontais e/ou

endodônticas, que foi confirmado principalmente após os estudos moleculares feitos na área (Siqueira, Roças, 2005b; Ferreira et al., 2015).

No presente estudo, verificou-se que nas coletas iniciais haviam presença de pelo menos duas espécies de micro-organismos em todos os canais radiculares, o que sustenta o fato de que as infecções endodônticas primárias são polimicrobianas (Siqueira *et al.*, 2002b), com predomínio de bactérias Gram-negativas (Nóbrega *et al.*, 2016). Algumas espécies bacterianas já foram relacionadas à dentes com infecção endodôntica primária, sendo gêneros como Porphyromonas e Fusobacterium alguns dos mais prevalentes (Siqueira *et al.*, 2002b; Gomes *et al.,* 2004, Ferreira *et al.*, 2015). No presente estudo, estas bactérias foram encontradas em 46,67% e 53,33% respectivamente, das coletas iniciais. Os resultados revelaram que *C. ochracea* e *F. nucleatum* foram as espécies mais prevalentes na coleta inicial, seguida de *P. gingivalis* e *LF. buccalis.* Ferreira *et al.* (2015) também detectaram maior prevalência de *C. ochracea* e *F. nucleatum* em dentes com infecção endodôntica primária, corroborando com os resultados encontrados neste estudo. *C. ochracea* é uma bactéria Gram-negativa reconhecida por causar sepses em pacientes imunocomprometidos (Desai *et al.,* 2007), além de ser associada com a doença periodontal severa e avançada. Estudos em peridontia relatam a possibilidade de bactérias envolvidas na doença periodontal alcançarem a corrente sanguínea resultando em bacteremia (Ciantar *et al.*, 2005). Entretanto, pouco se sabe sobre este assunto na endodontia. Capnocytophaga é um patógeno relevante pois no presente estudo foi detectado em 53,33% dos canais radiculares na coleta inicial, e mesmo após a MIC, ainda persistia em 46,7% dos casos, o que deve ser levado em consderação em estudos posteriores na endodontia.

F. nucleatum também foi detectado em 53,33% dos casos e se manteve presente nos canais independente dos tratamentos realizados. Sabe-se que este micro-organismo possui grande importância na formação de biofilmes, pois é uma bactéria adesiva e que coagrega várias espécies bacterianas, uma vez que possui proteínas de adesão celular em sua membrana externa, favorecendo a interação com outras espécies (Kaplan *et al.,* 2009*,* 2014). A eliminação deste patógeno pode ser um importante aspecto para remoção de biofilme intracanal.

P. gingivalis também foi observada como uma das espécies mais prevalentes na coleta inicial, estando presente em 46,67% dos casos, e é um

colonizador intracanal que pode interagir com *F. nucletaum,* que é um facilitador da colonização do *P. gingivalis* (Ahn *et al.,* 2016). Esta bactéria é Gram-negativa anaeróbia estrita, que apresenta vários fatores de virulência, como a presença de fímbrias, que são proteínas extracelulares relacionadas com a formação do biofilme; além destas, o LPS, proteinases e hemaglutininas, produtos desta bactéria, também estão relacionadas a vários estágios da doença periapical (Holt *et al.,* 1999; Enersen *et al.,* 2013). Além disto, *P. gingivalis* já foi relacionada a doenças sistêmicas, como doenças cardíacas coronárias, diabete *mellitus*, acidente vascular cerebral e parto prematuro de bebes com baixo peso (Li *et al.,* 2000) que torna significante importante a eliminação deste patógeno nas infecções endodônticas.

Outro micro-organismo encontrado em 46,67% dos casos foi *L. buccalis*, bactéria anaeróbia estrita Gram-negativa, que possui em sua membrana o LPS, e está relacionada com casos de febre, septicemia, necrose tumoral, choque e aborto, principalmente em pacientes com neutropenia, estando relacionada com endocardite bacteriana (Eribe, Olsen, 2008). Essa bactéria também foi detectada com alta prevalência em outros estudos em casos de infecções endodônticas primárias (Sassone *et al.,* 2008a, 2007).

Uma vez que dentes com infecção endodôntica possuem micro-organismo capazes de causar efeitos tão destrutivos, durante o tratamento endodôntico é necessário sanar o canal radicular com objetivo de eliminar esses patógenos que compõem o biofilme intraradicular, criando condições para que o organismo cure a infecção e a normalidade perirradicular seja restabelecida, devolvendo função ao elemento dental acometido pela infecção. Para isso, utilizam-se meios mecânicos e químicos durante as etapas do PBM. Neste trabalho, foi avaliado a ação de três diferentes sistemas mecanizados que possuem instrumentos com diferentes conicidades, cinemáticas e sequência. Quando comparados os resultados, verificou-se que os três sistemas se comportaram de forma semelhante na remoção de micro-organimos do canal radicular, muito embora nenhum deles tenha conseguido eliminar a microbiota endodôntica. O grupo MTWO apresentou um número médio maior de espécies microbianas que diferenciou estatisticamente do grupo GEN; isso pode ter ocorrido por ser uma pesquisa realizada em pacientes randomizados, e como qualquer estudo em humanos, há variáveis incontroláveis específicas para cada paciente (Zehnder, Belibasakis, 2015). Já o grupo REC não diferenciou quando

comparado com os outros dois grupos. Foi realizado comparação de cada grupo, após o PBM e após a MIC, com sua respectiva coleta inicial, não sendo observado diferença entre eles.

O NaOCl como solução química auxiliar tem sido amplamente utilizado na endodontia por suas propriedades de dissolução de matéria orgânica, ação antimicrobiana, baixa tensão superficial, entre outras (Baumgartner, Cuenin, 1992). Estudos mostram que sua ação sobre micro-organimos e sobre remanescentes orgânicos no canal radicular é efetiva (Alves *et al.*, 2015; Ferreira *et al.,* 2015), porém não promove total desinfecção do canal, sendo necessário o emprego de uma MIC para obter resultados satisfatórios (Valera *et al.*, 2009). Além da ação do NaOCl, o uso do EDTA 17% como protocolo de irrigação final no tratamento endodôntico também é necessário para a remoção da *smear layer* formada nas paredes do canal radicular durante a ação mecânica dos instrumentos no PBM. O EDTA promove a exposição dos túbulos dentinários, melhorando a limpeza do canal radicular, permitindo a ação da MIC nos túbulos, e um melhor embricamento mecânico do cimento endodôntico na obturação do canal radicular (Valera *et al.,* 2010). Nossos resultados mostraram uma diminuição do número médio de espécies bactérias após o PBM, exceto no grupo GEN.

O $Ca(OH)_2$ é a medicação mundialmente mais utilizada entre sessões do tratamento endodôntico, principalmente por sua ação antimicrobiana, ao liberar íons cálcio no meio e torná-lo alcalino, deixando-o inóspito para a sobrevivência de algumas espécies microbianas (Mori *et al.*, 2009). Foi utilizado durante 14 dias pois é sabido que com esse período de tempo tem-se a maior liberação de íons cálcio, tornando seu uso prolongado mais efetivo do que por apenas 7 dias (Camargo *et al.,* 2006). A associação de MIC de $Ca(OH)_2$ para a desinfecção do canal radicular tem sido amplamente relatada, sendo eficaz na remoção de micro-organimso e seus produtos (Valera *et al.,* 2009; Ferreira *et al.,* 2015). Apesar disso, o número médio de espécies bacterianas aumentou levemente após a MIC, exceto no grupo GEN, quando comparado com a coleta após o PBM.

Avaliando a associação da microbiota presente aos sinais e sintomas clínicos encontrados, os resultados mostram que *P. nigrescens,* uma bactéria Gram-negativa e anaeróbia estrita, estava associada à dor espontânea. Resultados semelhantes foram encontrados por Gomes *et al.* (2004, 2008) e Jacinto *et al.*

(2003), que também relacionaram o gênero Prevotella e Peptostreptococcus com dor espontânea (Gomes *et al.,* 1994). *P. nigrescens* é uma bactéria produtora de pigmento negro frequentemente associada a dentes com infecção endodôntica primária (Baumgartner *et al.,* 1999; Tomazinho, Avila-Campos, 2007). Essas bactérias são conhecidas por serem patógenos importantes na doença periodontal e estarem relacionadas com processos infecciosos severos (Tsai CY *et al.,* 2016; Martinho *et al.,* 2014). Sua endotoxina também foi relacionada com destruição óssea apical, sendo mais potente do que a endotoxina padrão da *E. coli,* podendo estar relacionada com o precosso de diferenciação de osteoclastos (Chung *et al.,* 2006).

Ao analisarmos dor a percussão, verificou-se que *P. gingivalis* (Gram-negativa), *P. nigrescens* (Gram negativa)*, V. parvula* (Gram negativa)*, C. sputigena* (Gram-negativa) *e E. saburreum* (Gram-positiva) foram diretamente relacionadas. Gomes *et al.* (2007) também encontraram associação entre *P. gingivalis* e dor à percussão, relatando que essa bactéria contém alto fator de virulência e patogenicidade, estando frequentemente associada a etiologia de abscessos periapicais. Sassone *et al.* (2008a) também encontrou altos níveis de Prevotela e Capnocytophaga em dentes sintomáticos

Quando se analisou presença de fistula, apenas 5 pacientes dos 30 atendidos neste trabalho apresentaram este sinal, havendo relação entre presença de fístula com bactérias Gram-positivas e anaeróbias facultativas. Sabemos que nas infecções endodônticas primárias há um predomínio de bactérias Gram-negativas (Nóbrega *et al.,* 2016), entretando, bactérias Gram-positivas também foram relacionadas com casos de infecção persistente com presença de fístula em estudos de Signoretti *et al.* (2011).

Nosso estudo também mostrou a associação de fístula com o complexo laranja, que tem sido associado a lesões endo-periodontais (Didilescu *et al.*, 2012) e casos com bolsa periodontal (Socransky *et al.,* 1998). Quando as espécies bacterianas estão agrupadas por complexos, ocorrem interações que podem favorecer a sobrevivência de outras bactérias e permitir a coexistência de espécies num ambiente onde talvez, não fosse possível a sobrevivência de determinada espécie individualmente. Das espécies bacterianas que compõe o complexo laranja, a *P. micra* também foi relacionada à presença de fístula, que concorda com estudos de Newman e Sims (1979). *Sassone et al.* (2008a) verificaram que bactérias

associadas a fístula eram pertencentes ao complexo laranja do gênero Fusobacterium. Ainda, os achados de Sassone *et al.* (2008a), apesar de não apresentarem diferença estatística entre dentes com e sem presença de fístula, mostraram *E. saburreum* como uma das espécies mais prevalentes nos casos de fístula. Isto concorda como o presente trabalho, que mostra *E. saburreum* associada à presença de fístula.

Verificou-se ainda que *E. corrodens, P. micra* e *C. showae* também foram relacionados à fístula. *E. corrodens,* bactéria anaeróbia facultativa, foi encontrada em 20% das amostras iniciais, e é comumente encontrada em casos de infecção endodôntica primária, sintomática ou assintomática (Siqueira *et al.,* 2001; de Souza *et al.,* 2005; Rôças, Siqueira, 2006), está presente na placa subgengival de pacientes saudáveis e com doença periodontal e pode estar relacionada com infecções extra-orais, em infecções mistas ou como principal patógeno. Sua etiologia na doeça periodontal e endodôntica não é bem compreendido (Chen, Wilson, 1992), mas relatos de abscessos no fígado, pulmão, cabeça e pescoço causados por *E. corrodens* já foram descritos na literatura médica (Morante *et al.,* 2015).

Todos os 30 dentes estudados apresentaram endotoxina em todas as coletas. Após o PBM, para todos os grupos, houve diminuição significativa de endotoxinas. As endotoxinas são lipopolissacarídeos presente na membrana celular de bactérias Gram negativas, e são liberadas quando ocorre a lise da membrana bacteriana (morte ou divisão bacteriana), levando a inflamação periapical e reabsorção óssea (Torabinejad *et al.*, 1985; Cardoso *et al.*, 2015). Estudos mostram que apenas a solução química auxiliar não é capaz de eliminar as endotoxinas do canal radicular, sendo necessário sempre a associação da mesma com os meios mecânicos (Gomes *et al.*, 2009). Quando analisamos os sistemas de instrumentação utilizados neste trabalho, o grupo que mais reduziu endotoxinas após o PBM, foi o grupo Mtwo (1,58 EU/mL), seguido pelo grupo Genius (40,77 EU/mL) e pelo grupo Reciproc (135,76 EU/mL). O sistema Mtwo é composto por 8 limas com conicidades variadas, sendo que a finalização do preparo foi feita com a lima com ponta 0,40 mm e com uma conicidad 0,04. Marinho *et al.* (2015), num estudo semelhante comparando o sistema Mtwo e Reciproc, não encontrou diferenças significante entre esses grupos, entretando, as limas que finalizaram o PBM foram de diâmetros menores (30.04 e 25.08). No presente estudo, devido ao maior calibre da ponta ativa

do instrumento, ocorre remoção de maior quantidade de dentina contaminada. O sistema Reciproc mostra menor dimunuição de endotoxinas dos canais radiculares, possivelmente por ser um sistema com apenas uma lima. O sistema Genius, composto de três limas, realiza previamente uma ampliação da entrada do canal com uma lima rotatória de conicidade 0,08, que facilita a inserção dos demais instrumentos, bem como uma melhor penetração de solução química auxiliar no terço médio e apical; as limas do PBM fazem um movimento reciprocante, permitindo que os debris formados pela instrumentação sejam removidos mais facilmente, evitando sua extrusão apical (De-Deus *et al.,* 2015). Este mecanismo de ação contribui para melhor limpeza do canal radicular com maior penetração de solução irrigadora.

Quando analisamos a coleta após a MIC com $Ca(OH)_2$, o grupo que mais reduziu endotoxinas foi o sistema Genius, com uma redução de 87,17% em relação a segunda coleta. A medicação de escolha foi o $Ca(OH)_2$ com solução salina fisiológica, que, entre outras propriedades, é capaz de neutralizar endotoxinas por alterar a conformação química da macromolécula de endotoxina, agindo no lipídeo A (Safavi, Nichols, 1994). O grupo Mtwo, embora desde a coleta inicial apresentou menor número de endotoxinas, reduziu 25,31% de endotoxinas em relação a segunda coleta. O grupo Reciproc também reduziu endotoxinas após a MIC, porém sem diferença estatística em relação a coleta após o PBM.

Os pacientes submetidos ao tratamento endodôntico neste trabalho realizaram o exame de TCFC com o objetivo de examinar a volumetria (mm^3) dos canais radiculares e correlacionar este dado com micro-organismos investigados, suas características, complexos bacterianos e endotoxinas. A média da volumetria dos canais radiculares foi de 19,5 mm^3, variando de 5 a 50 mm^3. Correlações positivas foram encontradas com bactérias Gram positivas e negativas, anaeróbios facultativos e estritos, bem como com os complexos roxo, verde, laranja, laranja periférico e amarelo, sendo que as associações mais fortes foram encontradas com anaeróbios estritos e o complexo laranja.

Verificou-se que quanto maior o volume do canal radicular, mais está presente a espécie bacteriana relacionada. Siqueira (2003) diz que vários fatores podem estar relacionados aos sinais e sintomas e a presença de bactérias na infecção endodôntica, dentre elas o número de células bacterianas. Também a

diversidade bacteriana pode estar associada à presença de lesão periapical; isto se deve ao fato de que tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, anaeróbios estritos ou facultativos possuem fatores de virulência. Yang *et al.* (2016), utilizando como modelo ácido lipoteicóico de *E. faecalis* verificaram que o ácido lipoteicóico, fator de virulência de micro-organismos Gram-positivos, manteve a capacidade inflamatória e fagocitária de macrófagos, contribuindo para periodontite apical refratária. Em contrapartida, o LPS presente em bactérias Gram-negativa estimula a reabsorção óssea, estando também diretamente ligado a formação de lesões periapicais (Torabinejad *et al.,* 1985; Jiang *et al.,* 2003).

Sendo assim, o volume do canal, a quantidade e a diversidade bacteriana, podem ser dependentes para a ocorrência de periodontite apical, sendo necessário reduzir os micro-organismos bem como fatores de virulência dos mesmos para se obter o sucesso endodôntico.

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto, pode-se concluir que:

a) Dentes com infecção endodôntica primária possuem bacterias presentes no canal radicular;
b) O preparo biomecânico dimunui o número de espécies bacterianas do canal radicular, independente do sistema de instrumentação utilizado;
c) Quanto a redução de endotoxinas, o preparo biomecânico reduz o número de endotoxinas do canal radicular, independente do sistema de instrumentação utilizado;
d) Sinais e sintomas clínicos estão relacionados a micro-organismos específicos;
e) A volumetria dos canais radiculares foi correlacionada com espécies microbianas, suas características e a alguns complexos microbianos.

REFERÊNCIAS*

Ahn SH, Song JE, Kim S, Cho SH, Lim YK, Kook JK, *et al*. NOX1/2 activation in human gingival fibroblasts by Fusobacterium nucleatum facilitates attachment of Porphyromonas gingivalis. Arch Microbiol. 2016 Aug;198(6):573-83. doi: 10.1007/s00203-016-1223-7. PubMed PMID: 27071620.

Alves DR, Cunha RS, da Silveira Bueno CE, de Alencar AH, de Araújo Estrela CR, dos Santos TO, *et al*. Antibacterial Potential of 2.5% Sodium Hypochlorite in Distinct Irrigation Protocols on Enterococcus faecalis Biofilm. J Contemp Dent Pract. 2015 May 1;16(5):340-6. PubMed PMID: 26162251.

Baumgartner JC, Cuenin PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. J Endod. 1992 Dec;18(12):605-12. doi: 10.1016/S0099-2399(06)81331-2. PubMed PMID: 1298800.

Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. J Endod. 1999 Jun;25(6):413-5. PubMed PMID: 10530240.

Bender IB, Seltzer S. Roentgenographic and direct observation of experimental lesions in bone: I. 1961. J Endod. 2003 Nov;29(11):702-6; discussion 701. PubMed PMID 14651274.

Bender IB. Factors influencing the radiographic appearance of bony lesions. J Endod. 1997 Jan;23(1):5-14. PubMed PMID: 9594738.

Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol. 2008 Oct;23(5):384-90. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00440.x. PubMed PMID 18793361.

Borsatto MC, Correa-Afonso AM, Lucisano MP, Bezerra da Silva RA, Paula-Silva FW, Nelson-Filho P, *et al*. One-session root canal treatment with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): an in vivo study. Int Endod J. 2016 Jun;49(6):511-8 doi: 10.1111/iej.12486. PubMed PMID: 26100850.

Brown LR, Rudolph CE Jr. Isolation and identification of microorganisms from unexposed canals of pulp-involved teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1957 Oct;10(10):1094-9. PubMed PMID: 13465123.

Bürklein S, Hiller C, Huda M, Schäfer E. Shaping ability and cleaning effectiveness of Mtwo versus coated and uncoated EasyShape instruments in severely curved root canals of extracted teeth. Int Endod J. 2011 May;44(5):447-57. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01850.x. PubMed PMID: 21276014.

Bürklein S, Hinschitza K, Dammaschke T, Schäfer E. Shaping ability and cleaning effectiveness of two single-file systems in severely curved root canals of extracted teeth: Reciproc and WaveOne versus Mtwo and ProTaper. Int Endod J. 2012a May;45(5):449-61. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01996.x. PubMed PMID: 22188401.

Bürklein S, Schäfer E. Apically extruded debris with reciprocating single-file and full-sequence rotary instrumentation systems.J Endod. 2012b Jun;38(6):850-2. doi: 10.1016/j.joen.2012.02.017. PubMed PMID: 22595125.

Camargo CH, Bernardineli N, Valera MC, de Carvalho CA, de Oliveira LD, Menezes MM, *et al*. Vehicle influence on calcium hydroxide pastes diffusion in human and bovine teeth. Dent Traumatol. 2006 Dec;22(6):302-6. doi: 10.1111/j.1600-9657.2005.00326.x. PubMed PMID: 17073921.

Cardoso FG, Ferreira NS, Martinho FC, Nascimento GG, Manhães LR Jr, Rocco MA, *et al*. Correlation between volume of apical periodontitis determined by cone-beam computed tomography analysis and endotoxin levels found in primary root canal infection. J Endod. 2015 Jul;41(7):1015-9. doi: 10.1016/j.joen.2015.02.005. PubMed PMID: 25935504.

Chen CK, Wilson ME. Eikenella corrodens in human oral and non-oral infections: a review. J Periodontol. 1992 Dec;63(12):941-53. doi: 10.1902/jop.1992.63.12.941. PubMed PMID: 1474466.

Chiaverini V. Aços e ferros fundidos. 4. ed. São Paulo: ABM; 1979.

Chung YH, Chang EJ, Kim SJ, Kim HH, Kim HM, Lee SB, *et al*. Lipopolysaccharide from Prevotella nigrescens stimulates osteoclastogenesis in cocultures of bone marrow mononuclear cells and primary osteoblasts. J Periodontal Res. 2006 Aug;41(4):288-96. doi: 10.1111/j.1600-0765.2006.00876.x. PubMed PMID: 16827722.

Ciantar M, Gilthorpe MS, Hurel SJ, Newman HN, Wilson M, Spratt DA. Capnocytophaga spp. in periodontitis patients manifesting diabetes mellitus. J Periodontol. 2005 Feb;76(2):194-203. doi: 10.1902/jop.2005.76.2.194. PubMed PMID: 15974842.

Cotti E, Vargiu P, Dettori C, Mallarini G. Computerized tomography in the management and follow-up of extensive periapical lesion. Endod Dent Traumatol. 1999 Aug;15(4):186-9. PubMed PMID: 10815569.

de Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Valera MC. In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007 Jul;104(1):135-42. PubMed PMID: 17376712.

de Souza CA, Teles RP, Souto R, Chaves MA, Colombo AP. Endodontic therapy associated with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiologic evaluation by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. J Endod. 2005 Feb;31(2):79-83. PubMed PMID: 15671813.

De-Deus G, Neves A, Silva EJ, Mendonça TA, Lourenço C, Calixto C, *et al*. Apically extruded dentin debris by reciprocating single-file and multi-file rotary system. Clin Oral Investig. 2015 Mar;19(2):357-61. doi: 10.1007/s00784-014-1267-5. PubMed PMID: 2495060.

Desai SS, Harrison RA, Murphy MD.Capnocytophaga ochracea causing severe sepsis and purpura fulminans in an immunocompetent patient.J Infect. 2007 Feb;54(2):e107-9. doi: 10.1016/j.jinf.2006.06.014. PubMed PMID: 16882454.

Didilescu AC, Rusu D, Anghel A, Nica L, Iliescu A, Greabu M, *et al*. Investigation of six selected bacterial species in endo-periodontal lesions. Int Endod J. 2012 Mar;45(3):282-93. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01974.x. PubMed PMID: 22077868.

Enersen M, Nakano K, Amano A. Porphyromonas gingivalis fimbriae. J Oral Microbiol. 2013 May 6;5. doi: 10.3402/jom.v5i0.20265. PubMed PMID: 23667717.

Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gül K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. J Endod. 2004 Feb;30(2):84-7. PubMed PMID: 14977302.

Eribe ER, Olsen I. Leptotrichia species in human infections. Anaerobe. 2008 Jun;14(3):131-7. doi: 10.1016/j.anaerobe.2008.04.004. PubMed PMID: 18539056.

Farber PA, Seltzer S. Endodontic microbiology. I. Etiology. J Endod. 1988 Jul;14(7):363-71. PubMed PMID: 3075233.

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

Ferrari PHP, Bombana AC. A Infecção Endodôntica e sua Resolução. São Paulo, SP: Livraria Santos Editora; 2010.

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

Galanos C. Physical state and biological activity of lipopolysaccharides. Toxicity and immunogenicity of the lipid A component. Z Immunitatsforsch Exp Klin Immunol. 1975 Jul;149(2-4):214-29. PubMed PMID: 126555.

Gambarini G, Testarelli L, De Luca M, Milana V, Plotino G, Grande NM, *et al*. The influence of three different instrumentation techniques on the incidence of postoperative pain after endodontic treatment.Ann Stomatol (Roma). 2013 Mar 20;4(1):152-5. doi: 10.11138/ads.0152. PubMed PMID: 23741536.

Gambarini G. The K3 rotary nickel titanium instrument system. Endod Top. 2005;10:179–82.

Garcia de Paula-Silva FW, Hassan B, Bezerra da silva LA, Leonardo MR, Wu MK. Outcome of root canal treatment in dogs determined by periapical radiography and cone-beam computed tomography scans. J Endod. 2009 May;35(5):723-6. doi: 10.1016/j.joen.2009.01.023. PubMed PMID: 19410092.

Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Associations of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. Int Endod J. 1994 Nov;27(6):291-8. PubMed PMID: 7751061.

Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, *et al*. Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas endodontalis, Prevotella intermedia and Prevotella nigrescens in endodontic lesions detected by culture and by PCR. Oral Microbiol Immunol. 2005 Aug;20(4):211-5. PubMed PMID: 15943764.

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

Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. J Endod. 2009 Oct;35(10):1350-3. doi: 10.1016/j.joen.2009.06.011. PubMed PMID: 19801228.

Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Polymerase chain reaction of Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia in primary endodontic infections. J Endod. 2007 Sep;33(9):1049-52. doi: 10.1016/j.joen.2007.05.017. PubMed PMID: 17931930.

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

Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. J Endod. 2008 May;34(5):537-40. doi: 10.1016/j.joen.2008.01.016. Epub 2008 Mar 4. PubMed PMID: 18436030.

Gonçalves LS, Rodrigues RC, Andrade Junior CV, Soares RG, Vettore MV. The Effect of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine as Irrigant Solutions for Root Canal Disinfection: A Systematic Review of Clinical Trials. J Endod. 2016 Apr;42(4):527-32. doi: 10.1016/j.joen.2015.12.021. PubMed PMID: 26852149.

Grossman LI. Origin of microorganisms in traumatized, pulpless, sound teeth. J Dent Res. 1967 May-Jun;46(3):551-3. PubMed PMID: 4961087.

Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of Porphyromonas gingivalis. Periodontol 2000. 1999 Jun;20:168-238. PubMed PMID: 10522227.

Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1991 Apr;71(4):492-5. PubMed PMID: 2052336.

Horiba N, Maekawa Y, Yamauchi Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Complement activation by lipopolysaccharides purified from Gram-negative bacteria isolated from infected root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1992 Nov;74(5):648-51. PubMed PMID: 1437068.

Jacinto RC, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. Oral Microbiol Immunol. 2003 Oct;18(5):285-92. PubMed PMID: 12930519.

Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. J Med Microbiol. 2005 Aug;54(Pt 8):777-83. PubMed PMID: 16014432.

Janner SF, Jeger FB, Lussi A, Bornstein MM. Precision of endodontic working length measurements: a pilot investigation comparing cone-beam computed tomography scanning with standard measurement techniques. J Endod. 2011 Aug;37(8):1046-51. doi: 10.1016/j.joen.2011.05.005. PubMed PMID: 21763892.

Jiang J, Zuo J, Chen SH, Holliday LS. Calcium hydroxide reduces lipopolysaccharide-stimulated osteoclast formation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003 Mar;95(3):348-54. PubMed PMID: 12627109.

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

Kaplan A, Kaplan CW, He X, McHardy I, Shi W, Lux R. Characterization of aid1, a novel gene involved in Fusobacterium nucleatum interspecies interactions. Microb Ecol. 2014;68:379–87. doi: 10.1007/s00248-014-0400-y. PubMed PMID: 24643713.

Kaplan CW, Lux R, Haake SK, Shi W. The Fusobacterium nucleatum outer membrane protein RadD is an arginine-inhibitable adhesin required for inter-species adherence and the structured architecture of multispecies biofilm. Mol Microbiol. 2009;71:35–47. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06503.x. PubMed PMID: 19007407.

Karataş E, Gültekin E, Arslan H, Kirici DÖ, Alsancak M, Topçu MÇ. Evaluation of instrumentation systems in reducing E. faecalis from root canals: TF adaptive and ProTaper next versus single file systems. Int J Artif Organs. 2015 Mar;38(3):161-4. doi: 10.5301/ijao.5000397. PubMed PMID: 25867700.

Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001 May;91(5):587-93. PubMed PMID: 11346740.

Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. Clin Microbiol Rev. 2000 Oct;13(4):547-58. PubMed PMID: 11023956.

Lopes HP, Elias CN, Vieira MV, Siqueira JF Jr, Mangelli M, Lopes WS, *et al*. Fatigue Life of Reciproc and Mtwo instruments subjected to static and dynamic tests. J Endod. 2013 May;39(5):693-6. doi: 10.1016/j.joen.2012.11.048. PubMed PMID: 23611393.

Lopes HP, Siqueira Jr JF. Endodontia: biologia e técnica. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI: Guanabara Koogan; 2004.

Machado ME, Nabeshima CK, Leonardo MF, Reis FA, Britto ML, Cai S. Influence of reciprocating single-file and rotary instrumentation on bacterial reduction on infected root canals. Int Endod J. 2013 Nov;46(11):1083-7. doi: 10.1111/iej.12108. PubMed PMID: 23566213.

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

Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Jorge AO. In vitro evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on Escherichia coli and its endotoxin in root canals. J Appl Oral Sci. 2011 Apr;19(2):106-12. PubMed PMID: 21552710.

Marinho AC, Martinho FC, Gonçalves LM, Rabang HR, Gomes BP. Does the Reciproc file remove root canal bacteria and endotoxins as effectively as multifile rotary systems? Int Endod J. 2015 Jun;48(6):542-8. doi: 10.1111/iej.12346. PubMed PMID: 25070009.

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

Martinho FC, Gomes BP. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. J Endod. 2008 Mar;34(3):268-72. doi: 10.1016/j.joen.2007.11.015. PubMed PMID: 18291273.

Martinho FC, Leite FR, Nascimento GG, Cirelli JA, Gomes BP. Clinical investigation of bacterial species and endotoxin in endodontic infection and evaluation of root canal content activity against macrophages by cytokine production. Clin Oral Investig. 2014 Dec;18(9):2095-102. doi: 10.1007/s00784-014-1198-1. PubMed PMID 24535073.

Matsumoto T, Nagai T, Ida K, Ito M, Kawai Y, Horiba N, *et al* . Factors affecting successful prognosis of root canal treatment. J Endod. 1987 May;13(5):239-42. PubMed PMID: 3473180.

Matsushita K, Tajima T, Tomita K, Takada H, Nagaoka S, Torii M. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. J Endod. 1999 Dec;25(12):795-9. PubMed PMID: 10726523.

Mattison GD, Haddix JE, Kehoe JC, Progulske-Fox A. The effect of Eikenella corrodens endotoxin on periapical bone. J Endod. 1987 Dec;13(12):559-65. PubMed PMID: 3329211.

Midena RZ, Garcia RB, Cavenago BC, Marciano MA, Minotti PG, Ordinola-Zapata R, *et al*. Analysis of the reaction of subcutaneous tissues in rats and the antimicrobial activity of calcium hydroxide paste used in association with different substances. J Appl Oral Sci. 2015 Oct;23(5):508-14. doi: 10.1590/1678-775720140049. PubMed PMID: 26200527.

Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. Scand J Dent Res. 1981 Dec;89(6):475-84. PubMed PMID: 6951246.

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

Morante AP, Sanjuanbenito A, Mendía E, Giordano PG, Angarita FG. Liver abscess by Eikenella corrodens. Rev Esp Enferm Dig. 2015 Sep;107(9):574-5. PubMed PMID: 26334468.

Mori GG, Ferreira FC, Batista FR, Godoy AM, Nunes DC. Evaluation of the diffusion capacity of calcium hydroxide pastes through the dentinal tubules. Braz Oral Res. 2009 Apr-Jun;23(2):113-8. PubMed PMID: 19684943.

Morrison DC, Kline LF. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). J Immunol. 1977 Jan;118(1):362-8. PubMed PMID: 318670.

Munford RS, Hall CL. Detoxification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) by a human neutrophil enzyme. Science. 1986 Oct 10;234(4773):203-5. PubMed PMID: 3529396.

Nadalin MR, Perez DE, Vansan LP, Paschoala C, Souza-Neto MD, Saquy PC. Effectiveness of different final irrigation protocols in removing debris in flattened root canals. Braz Dent J. 2009;20(3):211-4. PubMed PMID: 19784466.

Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. Crit Rev Oral Biol Med. 2004 Nov 1;15(6):348-81. PubMed PMID: 15574679.

Neves MA, Provenzano JC, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Clinical antibacterial effectiveness of root canal preparation with reciprocating single-instrument or continuously rotating multi instrument systems. J Endod. 2016 Jan;42(1):25-9. doi: 10.1016/j.joen.2015.09.019. PubMed PMID: 26549221.

New American Dental Association Specification no. 29 general specification for hand instruments. Council on Dental Materials and Devices. J Am Dent Assoc. 1976 Oct;93(4):818-23. PubMed PMID: 1067347.

Newman MG, Sims TN. The predominant cultivable microbiota of the periodontal abscess. J Periodontol. 1979 Jul;50(7):350-4. doi: 10.1902/jop.1979.50.7.350. PubMed PMID: 38308.

Nóbrega LM, Montagner F, Ribeiro AC, Mayer MA, Gomes BP. Molecular Identification of Cultivable Bacteria From Infected Root Canals Associated With Acute Apical Abscess. Braz Dent J. 2016 May-Jun;27(3):318-24. doi: 10.1590/0103-6440201600715. PubMed PMID: 27224567.

Ozbek SM, Ozbek A. Real-time polymerase chain reaction of "red complex" (Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia, and Treponema denticola) in periradicular abscesses. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Nov;110(5):670-4. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.07.001. PubMed PMID: 20955954.

Peters OA. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. J Endod. 2004 Aug;30(8):559-67.

Pinheiro ET, Neves VD, Reis CC, Longo PL, Mayer MP. Evaluation of the Propidium Monoazide-quantitative Polymerase Chain Reaction Method for the Detection of Viable Enterococcus faecalis. J Endod. 2016 May 11. doi: 10.1016/j.joen.2016.04.003. PubMed PMID: 27179593.

Plotino G, Grande NM, Testarelli L, Gambarini G. Cyclic fatigue of Reciproc and WaveOne reciprocating instruments. Int Endod J. 2012 Jul;45(7):614-8. doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02015.x. PubMed PMID: 22268461.

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

Rôças IN, Neves MA, Provenzano JC, Siqueira JF Jr. Susceptibility of as-yet-uncultivated and difficult-to-culture bacteria to chemomechanical procedures. J Endod. 2014 Jan;40(1):33-7. doi: 10.1016/j.joen.2013.07.022. PubMed PMID: 24331987.

Rôças IN, Siqueira JF Jr. Culture-independent detection of Eikenella corrodens and Veillonella parvula in primary endodontic infections. J Endod. 2006 Jun;32(6):509-12. doi: 10.1016/j.joen.2005.07.004. PubMed PMID: 16728238.

Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L, *et al*. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. J Clin Microbiol. 2001 Sep;39(9):3282-9. PubMed PMID: 11526164.

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

Saito D, Coutinho LL, Borges Saito CP, Tsai SM, Hofling JF, Gonçalves RB. Real-time polymerase chain reaction quantification of Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythia in primary endodontic infections. J Endod. 2009 Nov;35(11):1518-24. doi: 10.1016/j.joen.2009.08.005. PubMed PMID: 19840640.

Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. Oral Microbiol Immunol. 2006 Apr;21(2):112-22. PubMed PMID: 16476021.

Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. Oral Microbiol Immunol. 2007 Feb;22(1):19-23. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00315.x. PubMed PMID: 17241166.

Santos AL, Siqueira, JF Jr, Rôças IN, Jesus EC, Rosado AS, Tiedje JM. Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections. PLoS One. 2011;6(11):e28088. doi: 10.1371/journal.pone.0028088. PubMed PMID: 22132218.

Sassone LM, Fidel R, Figueiredo L, Fidel S, Faveri M, Feres M. Evaluation of the microbiota of primary endodontic infections using *checkerboard DNA-DNA hybridization*. Oral Microbiol Immunol. 2007 Dec;22(6):390-7. PubMed PMID: 17949342.

Sassone LM, Fidel R, Faveri M, Fidel S, Figueiredo L, Feres M. Microbiological evaluation of primary endodontic infections in teeth with and without sinus tract. Int Endod J. 2008a Jun;41(6):508-15. doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01397.x. PubMed PMID: 18422583.

Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, Guerra R, Figueiredo L. Fidel SR, *et al*. A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infections. J Endod. 2008b May;34(5):541-5. doi: 10.1016/j.joen.2008.02.004. PubMed PMID: 18436031.

Schäfer E, Erler M, Dammaschke T. Comparative study on the shaping ability and cleaning efficiency of rotary Mtwo instruments. Part 2. Cleaning effectiveness and shaping ability in severely curved root canals of extracted teeth. Int Endod J. 2006 Mar;39(3):203-12. PubMed PMID: 16507074.

Schäfer E, Oitzinger M. Cutting efficiency of five different types of rotary nickel-titanium instruments. J Endod. 2008 Feb;34(2):198-200. doi: 10.1016/j.joen.2007.10.009. PubMed PMID: 18215681.

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

Serene TP, Adams JD, Saxena A. Nickel-Titanium Intruments. Applications in Endodontic. St. Louis: Ishiyaku Euroamerica; 1995.

Signoretti FG, Endo MS, Gomes BP, Montagner F, Tosello FB, Jacinto RC. Persistent extraradicular infection in root-filled asymptomatic human tooth: scanning electron microscopic analysis and microbial investigation after apical microsurgery. J Endod. 2011 Dec;37(12):1696-700. doi: 10.1016/j.joen.2011.09.018. PubMed PMID: 22099908.

Silva EJ, Tameirão MD, Belladonna FG, Neves AA, Souza EM, De-Deus G. Quantitative Transportation Assessment in Simulated Curved Canals Prepared with an Adaptive Movement System. J Endod. 2015 Jul;41(7):1125-9. doi: 10.1016/j.joen.2015.02.028. PubMed PMID: 25841956.

Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, De Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented Gram-negative anaerobes and facultative bacteria. J Endod. 1998 Jun;24(6):414-6. PubMed PMID: 9693585.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Alves FR, Santos KR. Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: a molecular investigation. J Endod. 2004 Sep;30(9):638-43. PubMed PMID:15329567.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Machado AG, Gahyva SM, Oliveira JC, *et al*. Incidence of postoperative pain after intracanal procedures based on an antimicrobial strategy. J Endod. 2002a Jun;28(6):457-60. PubMed PMID: 12067129.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Lopes HP. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002b Feb;93(2):174-8. PubMed PMID: 11862207.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001 Oct;92(4):451-7. PubMed PMID: 11598583.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. J Endod. 2005a Jun;31(6):411-23. PubMed PMID: 15917679.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota. J Endod. 2005b Jul;31(7):488-98. PubMed PMID: 15980706.

Siqueira JF Jr. Taxonomic changes of bacteria associated with endodontic infections. J Endod. 2003 Oct;29(10):619-23. PubMed PMID: 14606780.

Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. J Endod. 1990 Oct;16(10):498-504. PubMed PMID: 2084204.

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

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998 Feb;25:134-44. PubMed PMID: 9495612.

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

Sundqvist G. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps. [dissertação]. Sweden: University of Umea; 1976.

Tocci L, Plotino G, Al-Sudani D, Rubini AG, Sannino G, Piasecki L, *et al*. Cutting efficiency of instruments with different movements: a comparative study. J Oral Maxillofac Res. 2015 Mar 30;6(1):e6. doi: 10.5037/jomr.2014.6106. PubMed PMID: 25937877.

Tomazinho LF, Avila-Campos MJ. Detection of Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas endodontalis, Prevotella intermedia, and Prevotella nigrescens in chronic endodontic infection. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007 Feb;103(2):285-8. doi: 10.1016/j.tripleo.2006.05.010. PubMed PMID: 17234549.

Torabinejad M, Eby WC, Nairdorf IJ. Inflammatory and immunological aspects of the pathogenesis of human periapical lesions. J Endod. 1985 Nov;11(11):479-88. PubMed PMID: 3913729.

Tsai CY, Tang CY, Tan TS, Chen KH, Liao KH, Liou ML. Subgingival microbiota in individuals with severe chronic periodontitis. J Microbiol Immunol Infect. 2016 May 13. doi: 10.1016/j.jmii.2016.04.007. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27262209.

Tsai P, Torabinejad M, Rice D, Azevedo B. Accuracy of cone-beam computed tomography and periapical radiography in detecting small periapical lesions. J Endod. 2012 Jul;38(7):965-70. doi: 10.1016/j.joen.2012.03.001. PubMed PMID: 22703662.

Valera MC, Cardoso FG, Maekawa LE, Camargo CH, de Oliveira LD, Carvalho CA. In vitro antimicrobial and anti-endotoxin action of Zingiber Officinale as auxiliary chemical and medicament combined to calcium hydroxide and chlorhexidine. Acta Odontol Scand. 2015;73(7):556-61. doi: 10.3109/00016357.2014.949846. PubMed PMID: 25892281.

Valera MC, Chung A, Menezes MM, Fernandes CE, Carvalho CA, Camargo SE, *et al*. Scanning electron microscope evaluation of chlorhexidine gel and liquid associated with sodium hypochlorite cleaning on the root canal walls. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Nov;110(5):e82-7. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.04.051. PubMed PMID: 20692188.

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

Walia HM, Brantley WA, Gerstein H. An initial investigation of the bending and torsional properties of Nitinol root canal files. J Endod. 1988 Jul;14(7):346-51. PubMed PMID: 3251996.

Wan J, Rasimick BJ, Musikant BL, Deutsch AS. A comparison of cyclic fatigue resistance in reciprocating and rotary nickel-titanium instruments. Aust Endod J. 2011 Dec;37(3):122-7. doi: 10.1111/j.1747-4477.2010.00222.x. PubMed PMID: 22117719.

Westphal O. Bacterial endotoxins. The second Carl Prausnitz Memorial Lecture. Int Arch Allergy Appl Immunol. 1975;49(1-2):1-43. PubMed PMID: 1095497.

Xavier ACC, Martinho FC, Chung A, Oliveira LD, Jorge AOC, Valera MC, *et al*. One-visit versus two-visit root canal treatment: effectiveness in the removal of endotoxins and cultivable bacteria. J Endod. 2013 Aug;39(8): 959-64. PubMed PMID: 23880258.

Xing H, Taguchi Y, Komasa S, Yamawaki I, Sekino T, Umeda M, *et al*. Effect of porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide on bone marrow mesenchymal stem cell osteogenesis on a titanium nanosurface. J Periodontol. 2015 Mar;86(3):448-55. doi: 10.1902/jop.2014.140386. PubMed PMID: 25494660.

Xu X, Eng M, Zheng Y, Eng D. Comparative study of torsional and bending properties for six models of nickel-titanium root canal instruments with different cross-sections. J Endod. 2006 Apr;32(4):372-5. PubMed PMID: 16554216.

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

Yared G. Canal preparation using only one Ni-Ti rotary instrument: preliminary observations. Int Endod J. 2008 Apr;41(4):339-44. PubMed PMID: 18081803.

Zehnder M, Belibasakis GN. On the dynamics of root canal infections-what we understand and what we don't. Virulence. 2015;6(3):216-22. doi:10.4161/21505594.2014.984567. PubMed PMID: 25654162.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Caro(a) Senhor(a)

Eu, Marcia Carneiro Valera, professora Titular da Disciplina de Endodontia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP, portadora do CPF 039.137.548-22, estabelecido à Avenida Eng. Francisco José Longo, 777, na cidade de São José dos Campos-SP, telefone para contato (12) 3947 9048, sou responsável pela pesquisa cujo título é "**Preparo dos canais radiculares com sistemas rotatório, reciprocante e híbrido: detecção de micro-organismos e quantificação de endotoxinas e sua relação com sinais/sintomas em dentes com infecção endodôntica primária".**

O objetivo deste estudo é avaliar a eficácia de diferentes métodos de preparo que serão utilizados durante o tratamento de canal com a finalidade de eliminar micro-organismos e produtos destes micro-organismos, responsáveis pelas falhas no tratamento de canal. Para esta avaliação, será coletado material do interior do canal dos dentes a serem tratados e, em seguida, em laboratório, o material coletado será submetido a análise, avaliando os micro-organismos e seus produtos presentes nos canais radiculares; estes serão identificados e quantificados durante o tratamento. Além dessas coletas, o tratamento de canal será realizado de forma convencional, utilizando equipamentos de última geração para otimizar o tratamento, buscando um resultado adequado e satisfatório.

O projeto proposto poderá acarretar em riscos mínimos ao paciente por se tratar de um procedimento invasivo; podem ocorrer imprevistos durante o atendimento em função do próprio tratamento. No caso de algum imprevisto, o paciente será amparado e receberá todos os cuidados necessários para controlar quaisquer eventualidades. Os medicamentos a serem utilizados possuem comprovação científica de ausência de efeitos tóxicos para o organismo. Além disso, todo o tratamento de canal será realizado dentro das normas de biossegurança e serão realizados por profissionais altamente capacitados; os resultados obtidos trarão benefícios para outras pessoas uma vez que a pesquisa irá gerar avanços científicos com melhoras no tratamento de canal realizado na atualidade. Serão necessários de 2 a 4 atendimentos (3 horas cada atendimento) até a conclusão do tratamento. O responsável pelo tratamento é a Cirurgiã Dentista e aluna de Pós Graduação Daiana Cavalli, (celular: 981639926 email: daiana.cavalli@gmail.com), e em caso de dúvida ou necessidade de intervenção, deve-se entrar em contato com ela, ou com outros participantes da pesquisa. Os pacientes serão chamados para acompanhamento radiográfico após 1 ano do tratamento finalizado.

Se houver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, o participante poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do ICT-UNESP, Av.

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

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

NOME _____

RG_____CPF_____

ENDEREÇO COMPLETO _____

_____

_____ _____

Assinatura Paciente Assinatura Pesquisador

Termo de Assentimento para Menores de Idade

Devido a sinais e sintomas identificados pelo Cirurgião Dentista e confirmados com radiografia, há a necessidade de realizar um tratamento de canal no dente envolvido. Esse tratamento é realizado em isolamento absoluto (uso de um lençol de borracha que evita que materiais e líquidos utilizados no dente caiam na boca), e o dente será aberto e limpo, colocado um medicamento no interior do dente, e em outra sessão, o dente será obturado e restaurado, impedindo que mais micro-organismos entrem no dente envolvido, restaurando a saúde do paciente.

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

NOME DO PACIENTE _____

RESPONSÁVEL_____

RG_____CPF_____

ENDEREÇO COMPLETO _____

_____

_____ _____

Assinatura Responsável Assinatura Pesquisador

_____

Assinatura do paciente

APÊNDICE B - Ficha Clínica

Nome:_____

Data: _____/_____/_____ **DENTE** _____

HISTÓRIA MÉDICA

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

HISTÓRIA CLÍNICA

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

EXAME CLÍNICO LOCAL

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

TESTES

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

EXAME RADIOGRÁFICO

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

TRATAMENTO RADICAL

Medida aparente do dente no RX inicial:

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

Diâmetro do I.A.F. (n° do instrumento):
Diâmetro do I.A.I. (n° do instrumento):
Diâmetro cirúrgico do canal:
Escalonamento até:
Irrigação:
Curativo de demora:
Obturação (técnica e material):
Selamento:

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

CONTROLES RADIOGRÁFICOS

Data	Observações
1º	
2º	

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

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

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS E QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINAS E SUA RELAÇÃO COM SINAIS /SINTOMAS APÓS PREPARO DOS CANAIS COM DIFERENTES SISTEMAS: ANÁLISE POR TCFC APÓS 1 ANO DE TRATAMENTO

Pesquisador: Marcia Carneiro Valera

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 54713416.1.0000.0077

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

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.824.172

Apresentação do Projeto:

Identificação de microrganismos e quantificação de endotoxinas e sua relação com sinais /sintomas após preparo dos canais com diferentes sistemas: análise por TCFC após 1 ano de tratamento.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto visa avaliar os efeitos do preparo com os novos sistemas de instrumentação no sucesso do tratamento endodôntico por meio da eliminação dos microrganismos presentes no interior do canal radicular de forma eficiente, relacionando a volumetria da lesão periapical no início do tratamento e após um ano, e a volumetria do canal radicular antes e após o tratamento endodôntico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa envolve uma série de procedimentos invasivos, logo, existem riscos que podem ocorrer em função de tais procedimentos. Por outro lado, a pesquisa poderá proporcionar benefícios indiretos à outras pessoas, através dos avanços científicos que a tal pesquisa poderá gerar.

Em comparação com a versão anterior do projeto de pesquisa, a atual versão avalia/contempla adequadamente tais riscos e benefícios.

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

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de pesquisa de mestrado que será realizado no programa de pós-graduação em odontologia, no Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP, no campus de São José dos Campos. A versão anterior deste projeto, avaliado por este comitê de ética em outubro ano, apresentava inadequações com relação ao projeto e ao TCLE. Tais inadequações foram devidamente verificadas e a versão atual do projeto não apresenta maiores problemas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sem maiores considerações.

Recomendações:

A pesquisadora deverá apresentar relatório parcial/final, para não incorrer na penalidade de não ter futuras submissões analisadas por este CEPh.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências apontadas sobre a versão anterior do projeto foram sanadas. O projeto em sua forma atual atende aos quesitos éticos necessários.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado confirma o parecer do relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_616741.pdf	25/10/2016 20:53:14		Aceito
Outros	tclereformulado2.doc	25/10/2016 20:52:31	Marcia Carneiro Valera	Aceito
Outros	projetoreformulado2.docx	25/10/2016 20:51:27	Marcia Carneiro Valera	Aceito
Outros	projetoreformulado.pdf	29/09/2016 16:17:27	Marcia Carneiro Valera	Aceito
Outros	tclereformulado.pdf	29/09/2016 16:16:37	Marcia Carneiro Valera	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	29/03/2016 15:15:15	Marcia Carneiro Valera	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_consentimento_projeto_Daiana.doc	27/10/2015 16:28:25	Marcia Carneiro Valera	Aceito
Projeto Detalhado	Projeto_mestrado_Daiana.docx	27/10/2015	Marcia Carneiro	Aceito

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

Continuação do Parecer: 1.824.172

/ Brochura Investigador	Projeto_mestrado_Daiana.docx	16:18:57	Valera	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 17 de Novembro de 2016

Assinado por:
Denise Nicodemo
(Coordenador)

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