

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 13/12/2018.



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

DIEGO GUILHERME DIAS DE RABELLO

**ENDOTOXINAS NAS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS: revisão
sistemática com metanálise e ensaio clínico randomizado**

2016

DIEGO GUILHERME DIAS DE RABELLO

**ENDOTOXINAS NAS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS: revisão
sistemática com metanálise e ensaio clínico randomizado**

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.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Canato Martinho

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).

Rabello, Diego Guilherme Dias de

Endotoxinas nas infecções endodônticas: revisão sistemática com metanálise e ensaio clínico randomizado. / Diego Guilherme Dias de Rabello. - São José dos Campos : [s.n.], 2016.

79 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2016.

Orientador: Frederico Canato Martinho.

1. Endotoxinas. 2. Periodontite periapical . 3. Revisão sistemática . 4. Metanálise. 5. Tratamento do canal radicular. I. Martinho, Frederico Canato, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V.Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Frederico Canato Martinho (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Aletéia Massula de Melo Fernandes

Faculdade Anhanguera

Campus de São José dos Campos

Prof. Adj. Ana Paula Martins Gomes

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 13 de dezembro de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

À Deus, obrigado por suas graças durante minha jornada. Minha vida tem sido marcada por maravilhas, que muitas vezes não dou o devido valor, mas eu sei que a benção do Senhor está presente em toda minha existência.

À minha esposa, Nádia, minha companheira e meu amor por todo seu apoio em mais uma etapa que temos caminhado juntos nestes 23 anos. Estar ao seu lado sempre será a melhor parte da minha vida.

Aos meus pais, Osvaldo e Teresinha, por todo carinho e dedicação. Através de muito esforço e trabalho nos deram tudo que precisamos e sempre nos ensinaram o caminho do bem.

Às minhas queridas irmãs, Letícia e Carmem, de quem eu tenho tanto orgulho pela coragem e determinação. Vocês foram os presentes mais especiais que nossos pais poderiam me dar.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Frederico Canato Martinho, que tem me guiado nesta linda e dura estrada da ciência, sempre com muita sabedoria de alguém que, apesar de muito jovem, demonstra ser um grande pesquisador e um grande professor, sempre me ensinando a buscar a excelência.

Ao Instituto de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista em nome do Coordenador do Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, Prof. Dr. Alexandre Luiz Souto Borges, por oferecer a possibilidade de poder evoluir como profissionais, com muito respeito e admiração por todos os funcionários que sempre nos ajudaram.

À Prof. Tit. Dra. Márcia Carneiro Valera Garakis. Obrigado pela oportunidade de me especializar, e pela dedicação ao nosso ensino ao longo do mestrado.

À Prof. Dra. Ana Paula Martins Gomes por aceitar fazer parte de minha banca, e assim como nas clínicas, desde a época de especialização, sempre disposta a acrescentar com seu enorme conhecimento e experiência nos atendimentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Ribeiro Camargo e Prof. Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho, com quem eu já havia aprendido tanto durante a especialização e que continuam à dividir as experiências sempre que estamos juntos em clínicas e nas salas de aula.

À Prof. Dra. Aletéia Massula de Melo Fernandes, por fazer parte desta banca e que, certamente, ajudará em muito nas críticas e sugestões deste trabalho.

Aos Professores Colaboradores Prof. Dr. Mauro Pedrine Santamaria da Periodontia ICT/Unesp e Prof. Dr. Gustavo Giacomelli Nascimento da UfPel pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

Aos Professores da Clínica Integrada, Prof. Dr. Tit. Clovis Pagani, Prof. Dra.

Flávia Goulart da Rosa Cardoso, Prof. Dra. Karen Cristina Kazue Yui. Foi uma enorme satisfação e alegria termos divididos as clínicas de integrada.

Ao meu amigo e companheiro de pós-graduação Carlos Henrique Ferrari por ter confiado em meu trabalho ao assumir a difícil missão de ensinar os alunos da Faculdade de Ciências de Guarulhos e minha amiga e companheira de pós-graduação e de muitas clínicas e salas de aula na Facig, Alessandra Manchini Cardoso, pela amizade, profissionalismo e alegria da convivência. Aos meus amigos da pós-graduação, Amjad Abu Hasna, Cássia Cestari Toia, Cláudia Luísa Ribeiro Ferreira, Daiana Cavalli, Esteban Isai Flores Orozco, Felipe de Souza Matos, Fernanda Carvalho Pelegrine, Monique Costa Moreira França, Rayana Duarte Khoury e Tatiane Sampaio Bittencourt. Vocês são amigos especiais e é sempre uma alegria estarmos juntos. Fizeram todas as dificuldades do mestrado ficarem menos árduas quando estavam presentes. Obrigado pela amizade e ajuda de cada um. Sucesso à todos nós.

À Dra. Luciana Louzada Ferreira por dividir seus conhecimentos e esforços no momento de fazer a revisão sistemática e nas demais pesquisas.

Às minhas primeiras coorientadas de iniciação científica, Bruna Jordão Motta Corazza e Vanessa de Faria. Vocês são jovens brilhantes com futuro muito promissor. Nosso time sempre me encheu de orgulho pela responsabilidade e harmonia. Foi uma grande honra poder trabalhar com vocês.

Aos alunos da graduação, que se esforçam tanto para serem ótimos profissionais. Vocês são a razão de tentarmos melhorar a cada dia o meu aprender para ser professor.

À FOB/USP pela minha formação acadêmica em nome do meu querido professor e amigo Dr. Carlos Ferreira dos Santos que tanto me influenciou no rumo da minha vida.

À UniBonn em nome do Prof. Dr. Soren Jepsen, Dr. Jochen Winter, Dr. Dominic Kraus e Dr. Henrik Dommisch por me possibilitar a mergulhar no mundo da pesquisa.

Aos pacientes, pela paciência e calma em nossos atendimentos. Meu respeito sempre.

“Senhor, dai-me força para mudar o que pode ser mudado...

Resignação para aceitar o que não pode ser mudado...

E sabedoria para distinguir uma coisa da outra”.

(São Francisco de Assis)

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	11
2 ARTIGOS	14
2.1 Artigo – Martinho FC, Rabello DGD, Ferreira LL, Nascimento GG. Endotoxina em infecção canal radicular: uma revisão sistemática e metanálise / <i>Endotoxin in root canal infection: a systematic review and meta- analysis</i> *	14
2.2 Artigo – Rabello DGD, Corazza BJ, Gomes APM, Ferreira LL, Santamaria MP, Martinho FC. A terapia fotodinâmica suplementar otimiza a desinfecção de bactérias e endotoxinas em uma e duas visitas no tratamento endodôntico? Um ensaio clínico randomizado. <i>Does supplemental photodynamic therapy optimize the disinfection of bacteria and endotoxins in one-visit and two-visit root canal therapy? A randomized clinical trial</i> *	32
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	52
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICE	60
ANEXOS	73

Rabello DGD. Endotoxinas nas infecções endodônticas: revisão sistemática com metanálise e ensaio clínico randomizado [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2016.

RESUMO

Sabe-se que as endotoxinas provenientes das bactérias grã-negativas desempenham um importante papel nas infecções endodônticas se relacionando à sinais e sintomas clínicos/radiográficos. Sendo assim, a redução ou eliminação de endotoxinas é fundamental para a resolução da inflamação periapical. Os objetivos do presente estudo foram: **Artigo 1** - realizar uma revisão sistemática com metanálise com o intuito de avaliar a relação entre níveis de endotoxinas e a presença de sinais e sintomas clínicos, bem como de sinais radiográficos em pacientes com infecção endodôntica primária; **Artigo 2** - fazer um ensaio clínico randomizado para avaliarmos estratégias clínicas para otimizar a eliminação microbiana e de lipopolissacarídeos (LPS) utilizando a Terapia Fotodinâmica (PDT) como tratamento suplementar ao PQM nas modalidades de terapia endodôntica em única e múltiplas sessões. Métodos: **Artigo 1** - para a revisão sistemática uma busca eletrônica foi realizada por dois autores, no idioma inglês, nas bases de dados Medline/PubMed, Embase, Cochrane Library, Scielo, Science Direct, Web of Knowledge e Scopus. Após seleção dos artigos foi realizado uma metanálise com análises de sinais e sintomas clínicos/radiográficos. **Artigo 2** - Selecionou-se 24 casos de dentes com infecção endodôntica primária que foram aleatoriamente divididos em 2 grupos (n=12): SU - sessão única e SM – sessão múltipla. Foram realizadas coletas microbiológica e de endotoxinas dos canais radiculares utilizando cone de papel estéril/ apirogênico em diferentes momentos operatórios. Foi realizado cultura microbiana para determinar a carga bacteriana em UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias/mL) e para quantificação de endotoxinas foi realizado o teste KQCL de “Lisado de Amebócito Limulus” (LAL). Resultados: **Artigo 1** - A metanálise revelou que indivíduos com dor à percussão (TTP) ($P=0,04$; I^2 57%) e episódio de dor prévio (PEP) ($P=0,001$; I^2 81%) apresentaram maior nível de endotoxina que os casos que não apresentaram nenhum destes sintomas. O tamanho da área radiolúcida (SRL) > 2 mm ($P=0,02$; I^2 68%) e presença de exudação (EX) ($P=0,0007$; I^2 0%) estavam associados com maior nível de endotoxinas. **Artigo 2** - Para carga microbiana, a suplementação do tratamento em sessão única com PDT reduziu significativamente os níveis bacterianos ($p<0,05$), mas não nos casos de duas sessões ($p>0,05$). Para os níveis de endotoxinas, na sessão única e de duas sessões, não houve diferença significativa após uso de PDT ($p>0,05$). Foi possível concluir que **Artigo 1** – A metanálise mostrou forte evidência que endotoxina está relacionada com a presença de sinais e sintomas clínicos/radiográficos em pacientes com infecção endodôntica. **Artigo 2** - A terapia fotodinâmica melhorou o desempenho da desinfecção bacteriana dos canais radiculares em uma visita, mas não para a modalidade de 2 visitas após uso de medicação à base de Ca(OH)_2 . PDT não foi efetivo contra endotoxinas.

Palavras-chave: Periodontite periapical. Tratamento do canal radicular. Desinfecção. Endotoxina. Revisão sistemática. Metanálise.

Rabello DGD. *Endotoxins in endodontic infection: a systematic review with meta-analysis and a clinical trial [dissertation]*. São José dos Campos (SP): Sao Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2016.

ABSTRACT

Endotoxins originating from gram negatives bacterias are related to signals and clinical/radiographic symptoms. Therefore, reduction or elimination of endotoxins is essential to solve periapical inflammation. The aim of this dissertation was: **Article 1** - To relate endotoxin levels and presence of clinical signs/symptoms and radiographic features in endodontic infection. **Article 2** - To evaluate the effectiveness of supplemental photodynamic therapy (PDT) in optimizing the removal of bacteria and endotoxins from primarily infected root canals after one-visit and two-visit treatments. Methodology: **Article 1** - Electronic searches were performed on Medline/PubMed, Embase, Cochrane Library, Scielo, Science Direct, Web of Knowledge and Scopus databases for identification of relevant studies published up to July 2016. Only reports in English were included. The selected literature was reviewed by two authors and classified as either suitable or unsuitable for inclusion in this review. The relationship between endotoxin levels and presence of clinical signs/symptoms and radiographic features were determined. Additionally, a meta-analysis was performed. **Article 2** - 24 primarily infected root canals with apical periodontitis were selected and randomly divided into one-visit (n=12) and two-visit (n=12). Samples were collected before and after root canal procedures. Endotoxins were quantified by chromogenic limulus amebocyte lysate assay. Culture techniques were used to determine bacterial colony-forming unit counts. The systematic review and meta-analysis aimed to evaluate the relationship between endotoxin levels and presence of clinical signs/symptoms and radiographic features in patients with endodontic infection. Results: **Article 1** - Among the 285 articles identified in the initial search, 29 were included for full-text appraisal and only eight studies met the inclusion criteria for this systematic review. Meta-analysis revealed that individuals having teeth with tenderness to percussion (TTP) ($P=0.04$; I^2 57%) and previous episode of pain (PEP) ($P=0.001$; I^2 81%) had higher levels of endotoxin than their counterparts. Size of radiographic lesion (SRL) > 2 mm ($P=0.02$; I^2 68%) and presence of root canal exudation (EX) ($P=0.0007$; I^2 0%) were associated with higher levels of endotoxin. **Article 2** - Bacteria and endotoxins were detected in 100% of the initial samples, with median values of 1.97×10^5 CFU/mL and 24.983 EU/mL, respectively. The CMP using single-file reciprocating technique was effective in the reduction of bacteria and endotoxins (All, $p < .05$). The supplemental PDT was effective in reducing bacterial load in the one-visit ($p < .05$) but not in the two-visit treatment after use of Ca(OH)_2 medication for 14 days ($p > .05$). In the two-visit group, after 14 days of inter- appointment medication with Ca(OH)_2 , a significant reduction in the median levels of endotoxins was found in comparison to CMP alone (from 1.041 to 0.094 EU/mL) ($p < .05$). Despite the type of treatment, the supplemental PDT was not effective against endotoxins ($p > .05$). Conclusion: **Article 1** - This meta-analysis provides strong evidence that endotoxin are related with the presence of clinical signs/symptoms and radiographic features in patients with endodontic infection. **Article 2** - The photodynamic therapy optimized the disinfection of bacteria from root

canals in one-visit but not for two visit treatment modality with the accomplishment of calcium hydroxide medication. Thus, PDT is not effective against endotoxins.

Keywords: Bacterial reduction. Disinfection. Endodontic treatment. PDT. Photodynamic therapy. Endotoxins. Systematic review. Meta-analysis.

1 INTRODUÇÃO

Microrganismos e seus subprodutos atuam como fatores de desenvolvimento e perpetuação das lesões pulpares e perirradiculares (Takehashi *et al.*, 1965).

A maioria das bactérias capazes de infectar os canais radiculares é oriunda da cavidade oral (Loesche, 1976). Entretanto o ambiente seletivo do canal radicular faz com que apenas alguns microrganismos sejam capazes de colonizar este sistema. Os microrganismos residentes do canal radicular são selecionados através de fatores locais e sistêmicos tais quais : temperatura, pH, acesso à nutrientes, capacidade de defesa do hospedeiro, tensão de oxigênio (Sundqvist, 1992).

As infecções endodônticas primárias polimicrobianas são dominadas por bacilos Gram-negativos anaeróbios estritos (Fabricius *et al.*, 1982) que possuem na composição da membrana externa, os lipopolissacarídeos (LPS), também conhecidos como endotoxinas, que podem ser liberados nos processos de multiplicação ou morte bacteriana (Gomes *et al.*, 1994; Martinho *et al.*, 2010). O lipídio A é o componente bioativo do LPS responsável pela maioria da respostas imunes.

Uma alta concentração de endotoxinas têm sido associada à maior destruição óssea em casos de infecção endodôntica (Horiba *et al.*, 1991) Endotoxinas estimulam reabsorção óssea em cultura de células (Norton *et al.*, 1970; Hong *et al.*, 2004; Bandow *et al.*, 2010; Kassem *et al.*, 2015).

Alguns estudos clínicos detectaram a presença de LPS bacteriano em canais radiculares de dentes com infecções endodônticas primárias e lesão periapical indicando sua possível participação numa maior destruição óssea perirradicular (Martinho *et al.*, 2012, 2014; Xavier *et al.*, 2013; Cardoso *et al.*, 2016).

Existem trabalhos clínicos que mostram a associação da concentração de endotoxinas com sinais e sintomas clínicos relacionados à dor tais quais dor espontânea, dor à percussão, dor à palpação. (Schein, Schilder, 1975; Martinho, Gomes, 2008; Martinho *et al.*, 2010, 2011; Gomes *et al.*, 2012, Herrera *et al.*, 2016). Além do mais, a penetração através do foramen apical pode perpetuar periodontite apical (Horiba *et al.*, 1991; Vianna *et al.*, 2007).

O acúmulo de componentes bacterianos em área infectada, particularmente endotoxinas (incluindo ácido lipoteicoico, peptidoglicanas, lipopolissacarídeos) podem estimular o lançamento de citocinas pró-inflamatórias por diferentes vias tais quais ativação de TLR – 2, TLR- 4. (Hong *et al.* 2004; Horiba *et al.*, 1989). O tecido inflamatório presente nas lesões perirradiculares é ocupada predominantemente por macrófagos (Hosoya, Matsushima, 1997; Matsuo *et al.*, 1992) que são as maiores fontes de IL -1 β (Stashenko *et al.*, 1987) e produtor quase exclusivo do TNF- α (Beutler, Cerami,1986) quando na presença de bactérias e/ou LPS.

Endotoxinas são potentes agentes inflamatórios com vias de ativação clássica e do sistema complemento. (Morrison, Kline, 1977; Seltzer, Farber, 1994). O sistema complemento libera peptídeos biologicamente ativos, que liberam um número de aspectos do processo inflamatório (Morrison, Kline, 1977). LPS pode provocar dor através da ativação do fator Hageman ou através propriedades neurotóxicas quando ativam terminos dos nervos pré-sinápticos (Ferraz *et al.*, 2015).

Uma rede mais complexa entre diferentes mediadores inflamatórios parecem implicar em desenvolvimento de sinais e sintomas clínicos e radiográficos (Martinho *et al.*, 2012).

Devido à estas evidências científicas, foi realizado uma revisão sistemática com metanálise com o intuito de avaliar a relação entre níveis de endotoxinas e a presença de sinais e sintomas clínicos, bem como de sinais radiográficos em pacientes com infecção endodôntica.

Sabe-se que uma desinfecção do sistemas de canais radiculares efetiva consiste não apenas na eliminação de bactérias, de restos pulpares, mas também desbridamento e eliminação de biofilmes (Clarkson *et al.*, 2012; Guneser *et al.*, 2015; Case *et al.*, 2012) assim como eliminação e neutralização de fatores de virulência (Martinho, Gomes, 2008; Xavier *et al.*, 2013).

Apesar dos avanços nas técnicas de instrumentação com uso de limas reciprocantes (Martinho *et al.*, 2010, 2014, Neves *et al.* 2016) ou de limas rotatórias NiTi em rotação continua (Cardoso *et al.*, 2015; Neves *et al.*, 2016), estudos que preconizaram sessão única estão falhando em demonstrar uma desinfecção completa do sistemas de canais (Martinho *et al.*, 2010, 2014; Xavier *et al.*, 2013; Vera *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2015).

Na busca por métodos suplementares para otimizar a desinfecção do canal radicular, a terapia fotodinâmica (PDT) tem sido considerado recentemente (Bonsor *et al.* 2006, Garcez *et al.*, 2008, 2010; Fimple *et al.*, 2008; Soukos *et al.*, 2006; Cherpa *et al.*, 2014). Contudo, poucos estudos clínicos avaliaram a efetividade do PDT na desinfecção do sistema de canais radiculares (Bonsor *et al.*, 2006; Garcez *et al.*, 2008, 2010). Além disto, não há estudos clínicos avaliando a efetividade do PDT na redução e/ou eliminação de endotoxinas dos canais radiculares com lesão periapical primária.

Um dos motivos para a utilização do PDT é o alto índice atual da resistência bacteriana aos antibióticos que acabou gerando maior interesse em terapias antimicrobianas alternativas (Karkwal *et al.*, 2011) . O PDT, por sua ação antimicrobiana, pode representar uma opção de tratamento no controle de patógenos resistentes, e pode vir a ser uma opção como possível abordagem para tratar infecções multirresistentes (Oliveira *et al.*, 2015). No entanto, a sua efetividade é dependente de alguns fatores, tais quais: dose, tempo de incubação, local em que será aplicado o agente de fotossensibilização, disponibilidade de oxigênio no local, comprimento de onda utilizado, densidade da potência da luz e fluência de energia da luz (Chrepa *et al.*, 2014).

A fim de elucidar o papel das endotoxinas nas infecções endodônticas primárias, este estudo buscou avaliar a efetividade da suplementação da terapia fotodinâmica (PDT) em otimizar a remoção bacteriana e de endotoxinas dos canais de infecções endodônticas primárias após tratamento em uma e duas visitas.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Dentre os nossos estudos sobre infecção do canal radicular, foi realizado uma revisão sistemática com metanálise com o intuito de avaliar a relação entre níveis de endotoxinas e a presença de sinais e sintomas clínicos, bem como de sinais radiográficos em pacientes com infecção endodôntica.

Para isto uma busca eletrônica foi realizada por dois autores, no idioma inglês, nas bases de dados Medline/PubMed, Embase, Cochrane Library, Scielo, Science Direct, Web of Knowledge e Scopus. Entre 285 artigos identificados, 29 foram incluídos para leitura completa e 8 artigos foram incluídos por estarem dentro dos critérios de inclusão.

Os dados obtidos neste estudo revelaram que indivíduos com dor à percussão apresentaram maior concentração de endotoxinas que aqueles que não apresentaram este sintoma. De acordo com glossário AAE, percussão é o método de diagnóstico usado para avaliar a condição de parte do corpo através de leves toques, cuja resposta à dor indica uma inflamação periradicular (American Association of Endodontists, 2015) O dente que é sensível à percussão, tem o diagnóstico de periodontite periapical assintomática (Zero *et al.*, 2011; Owatz *et al.*, 2007). Também correlação foi encontrada entre maiores níveis de endotoxinas e episódio prévio de dor. Estas correlações são consistentes com a hipótese que LPS em infecções clínicas é relacionado com a produção de dor e mecanismo de alodínia. Esta hipótese é fortalecida por estudos pré-clínicos demonstrando que injeções de LPS em ratos provocam comportamento nocifensivo e mecanismo de alodínia. (Cahill *et al.*, 1998)

Há diferentes mecanismos que podem provocar dor devido ao LPS bacteriano (Ferraz *et al.*, 2011; Diogenes *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2008). É bem aceito que resposta imune inata contra conteúdo bacteriano inicia a liberação de diferentes mediadores inflamatórios, incluindo interleucina 1- beta (IL-1 β), prostaglandinas E2 (PGE2) e fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) que podem sensibilizar nociceptores. Maiores níveis de PGE2 tem sido associado com sintomatologia clínica (Martinho *et al.*, 2013; Takayama *et al.*, 1996; McNicholas *et al.*, 1991). Martinho e colaboradores em 2010, encontraram maiores níveis de PGE2

em macrófagos estimulados com sobrenadantes de conteúdo bacteriano com dentes mostrando dor à percussão. Então, maiores concentrações de IL-1 β tem sido também detectados em dentes com sintomatologia (Lim *et al.*, 1994; Kuo *et al.*, 1998). Portanto, IL-1 β é um potente estimulante para lançamento de PGE-2 (46).

A metanálise revelou que indivíduos com dor à percussão e episódio de dor prévio (PEP) apresentaram maior nível de endotoxina que os casos que não apresentaram nenhum destes sintomas. O tamanho da área radiolúcida (SRL) > 2 mm e presença de exudação (EX) estavam associados com maior nível de endotoxinas. Esta metanálise mostra evidência de que endotoxina está relacionado com presença de sintomas e sinais clínicos e radiográficos em pacientes com infecção endodôntica.

No ensaio clínico randomizado, dentre os resultados obtidos nesta pesquisa, verificou-se que o PQM foi capaz de diminuir significativamente os níveis de carga microbiana total e de endotoxinas em dentes com infecções endodônticas primárias e lesão periapical. No entanto, mesmo obtendo uma redução significativa de carga bacteriana da ordem de 10⁵ para 10² UFC/mL, bactérias cultiváveis foram recuperadas de 50% dos canais radiculares nos tratamentos de sessão única. Esta limitação já havia sido demonstrado em estudos prévios (Xavier *et al.* 2013; Martinho *et al.*, 2014; Neves *et al.*, 2016). É importante relatar que maiores taxas de sucesso são encontrados em dentes com cultura bacteriana ausentes (Molander *et al.*, 2007; Sjögren *et al.*, 1997). Portanto, a persistência de bactérias cultiváveis no momento da obturação diminui o índice de sucesso (Sjögren *et al.*, 1997; Molander *et al.*, 2007).

Considerando que o PQM não é capaz de eliminar por completo microrganismos e seus subprodutos presentes nas infecções endodônticas, foi proposta um ensaio clínico randomizado utilizando a Terapia Fotodinâmica (PDT) como tratamento suplementar ao PQM. Seu mecanismo de ação é baseado na aplicação e retenção de um agente de fotossensibilização (FS) empregado em tecidos-alvo. Essa técnica utiliza espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidos por moléculas desses corantes não-tóxicos ou FS na presença de luz visível (com comprimentos de onda específicos), após a irradiação com luz o FS sofre transição a partir de baixo nível de energia "estado fundamental" para um consumo de energia mais elevado. A ação do PDT é baseada no uso do agente fotossensibilizador com

luz de baixa energia para a produção de espécies radicais livres (Hamblin, Hasan, 2004) que é altamente reativo e é bem conhecido a agir em diferentes alvos de diferentes partes das bactérias, incluindo parede celular, DNA e membranas protéicas (George, Kishen, 2008). Tudo isto confere vantagens de ter atividade antimicrobiana de alto espectro e baixo risco de resistência.

A efetividade do PDT depende de diferentes aspectos, tais quais, agente de fotossensibilização, tempo de aplicação comprimento de onda, tipo de laser (Cherpa et al., 2014), e energia, tempo de emissão de laser, tipo de infecção bacteriana e modo de crescimento bacteriano (Upadya, Kishen, 2010).

Em relação ao agente de fotossensibilização, fenoatiazines e xantenos são os dois tipos comumente testados na eficácia antibacteriana (Soukos et al., 2006, Shrestha, Kishen, 2012). Foi selecionado o azul de metileno que pertence à categoria dos fenotiazinos e é efetivo contra diferentes bactérias como *Enterococcus* ssp e cepas resistentes à antibióticos (Wainwright, 1990; Soukos et al., 2006; George, Kishen, 2008). O alto efeito antibacteriano do azul de metileno é atribuído ao seu poder hidrofílico, baixo peso molecular, cationicidade (George, Kishen, 2008) e alta produção de oxigênio singlete (Shrestha, Kishen, 2012).

Particularidades do mecanismo de inativação bacteriana pelo azul de metileno foi previamente descrito na literatura (Wainwright et al., 1999), que é devido em grande parte ao corante fenotiazina (Wainwright et al., 1999; Tardivo et al., 2005).

De relevância clínica, nossos dados demonstraram que o PQM mais o PDT (aplicação de azul de metileno por 60 segundos exposto ao laser diodo com 660 nm de comprimento de onda e potência de 60 mW por 120 segundos) em sessão única reduziu consideravelmente o nível bacteriano (de 7.01×10^5 para 1.16×10^2 CFU/mL). Vale ainda ressaltar, que o NaOCl 2,5%, utilizado na presente pesquisa, apresenta alta atividade antimicrobiana e que a terapia com PDT na sessão única, aumentou o número de casos de cultura bacteriana negativa.

A suplementação da terapia endodôntica com PDT melhorou a descontaminação da carga microbiana total tanto na terapia de sessão única quanto múltipla. Entretanto, a terapia com PDT não foi capaz de melhorar a redução de endotoxinas alcançada com o PQM na sessão única e com a medicação à base de hidróxido de cálcio na sessão múltipla.

REFERÊNCIAS*

- American Association of Endodontists (AAE). Glossary of Endodontic terms [internet]. 9. ed. Chicago: American Association of Endodontists; 2015. [acesso em 2016 Dez 01]. Disponível em: <http://www.nxtbook.com/nxtbooks/aae/endodonticglossary2016/#/0>
- Artese L, Piattelli A, Quaranta M, Colasante A, Musani P. Immunoreactivity for interleukin 1-beta and tumor necrosis factor-alpha and ultrastructural features of monocytes/macrophages in periapical granulomas. *J Endod.* 1991;17:483–7. doi: 10.1016/S0099-2399(06)81794-2
- Bandow K, Maeda A, Kakimoto K, Kusuyama J, Shamoto M, Ohnishi, T, et al. Molecular mechanisms of the inhibitory effect of lipopolysaccharide (LPS) on osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;402:755-61. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.10.103.
- Beutler B, Cerami A. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature.* 1986;320:584–8. doi:10.1038/320584a0
- Cardoso FG, Ferreira NS, Martinho FC, Nascimento GG, Manhães LR, Rocco MA, et al. Correlation between volume of apical periodontitis determined by cone-beam computed tomography analysis and endotoxin levels found in primary root canal infection. *J Endod.* 2015;41:1015-9. doi: 10.1016/j.joen.2015.02.005.
- Cardoso FG, Chung A, Martinho F, Camargo C, Carvalho C, Gomes BA, et al. Investigation of Bacterial Contents From Persistent Endodontic Infection and Evaluation of Their Inflammatory Potential. *Braz Dent J.* 2016;27(4):412-8. doi: 10.1590/0103-6440201600520
- Chrepa V, Kotsakis GA, Pagonis TC, Hargreaves KM. The effect of photodynamic therapy in root canal disinfection: a systematic review. *J Endod.* 2014;40(7):891-8. doi: 10.1016/j.joen.2014.03.005
- Diogenes A, Ferraz CC, Akopian AN, Henry MA, Hargreaves KM. LPS sensitizes TRPV1 via activation of TLR4 in trigeminal sensory neurons. *J Dent Res.* 2011;90:759-64. doi: 10.1177/0022034511400225
- Endo MS, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz, CC, Almeida, JF, Gomes BP. Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:2575-83. doi: 10.1007/s10096-012-1598-6

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

Fabricius L, Dahlén G, Holm SE, Möller AJ. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res*. 1982;90:200–6. PMID:7051261

Ferraz CC, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* sensitizes capsaicin-sensitive nociceptors. *J Endod*. 2011;37:45-8. doi: 10.1016/j.joen.2007.07.001

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. PMID:7751061

Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J*. 1996;29:69-75. PMID:9206427

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

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;35:1350-3. doi: 10.1016/j.joen.2009.06.011

Herrera DR, Martinho FC, de-Jesus-Soares AJ, Zaia A A, Ferraz CC, Almeida J F, et al., Clinical efficacy of EDTA ultrasonic activation in the reduction of endotoxins and cultivable bacteria. *Int End J*. 2016 Oct 24. doi: 10.1111/iej.12713. [Epub ahead of print]

Hong CY, Lin SK, Kok SH, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med*. 2004;33:162-9. PMID:15128058

Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, et al. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1991;71:492–5 PMID:2052336

Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, et al. Cytotoxicity against various cell lines of lipopolysaccharides purified from bacteroides, fusobacterium, and veillonella isolated from infected root canals. *J Endod*. 1989;15:530–4. DOI: 10.1016/S0099-2399(89)80195-5

Hosoya S, Matsushima K. Stimulation of interleukin-1 beta production of human dental pulp cells by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *J Endod*. 1997;23:39–42. DOI: 10.1016/S0099-2399(97)80205-1

Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, et al. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol*. 2005;54:777-83. DOI: 10.1099/jmm.0.45976-0

Kakehashi S, Stanley H R, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pat.* 1965;20.3:340-9. PMID:14342926.

Kassem A, Henning P, Lundberg P, et al. *Porphyromonas gingivalis* Stimulates Bone Resorption by Enhancing RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) through Activation of Toll-like Receptor 2 in Osteoblasts. *J Biol Chem.* 2015;290:20147-58. doi: 10.1074/jbc.M115.655787.

Khan AA, Diogenes A, Jeske NA, Henry MA, Akopian A, Hargreaves KM. Tumor necrosis factor alpha enhances the sensitivity of rat trigeminal neurons to capsaicin. *Neuroscience.* 2008;155:503-9. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.05.036.

Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg Med.* 2011;43(7):755-67. doi: 10.1002/lsm.21080.

Kuo ML, Lamster IB, Hasselgren G. Host mediators in endodontic exudates. I. Indicators of inflammation and humoral immunity. *J Endod.* 1998;24:598-603. DOI:10.1016/S0099-2399(98)80118-0.

Lim GC, Torabinejad M, Kettering J, et al. Interleukin 1 b in symptomatic and asymptomatic human periradicular lesions. *J Endod.* 1994;20:225–7. DOI: 10.1016/S0099-2399(06)80282-7

Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev.* 1976; 9():65-107.

Marinho AC, Martinho FC, Leite FR, Nascimento GG, Gomes BP. Proinflammatory activity of primarily infected endodontic content against macrophages after different phases of the root canal therapy. *J Endod.* 2015;41:817-23. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.017

Martinho FC, Chiesa WM, Leite FRM, Cirelli JA, Gomes BP. Antigenicity of Primary Endodontic Infection against Macrophages by the Levels of PGE2 Production. *J Endod.* 2011;37:602-7. doi: 10.1016/j.joen.2010.12.005

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

Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Correlation between Clinical/Radiographic Features and Inflammatory Cytokine Networks Produced by Macrophages Stimulated with Endodontic Content. *J Endod.* 2012;38:740-5. doi: 10.1016/j.joen.2012.02.021

Martinho FC, Gomes BP. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root

canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod*. 2008;34:268-72. doi: 10.1016/j.joen.2007.11.015

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 Invest*. 2014;18:2095-102. doi: 10.1007/s00784-014-1198-1

Matsuo T, Ebisu S, Shimabukuro Y, Ohtake T, Okada H. Quantitative analysis of immunocompetent cells in human periapical lesions: correlations with clinical findings of the involved teeth. *J Endod*. 1992;18:497-500. doi: 10.1016/S0099-2399(06)81350-6

McNicholas S, Torabinejad M, Blankenship J, Bakland L. The concentration of prostaglandin E2 in human periradicular lesions. *J Endod*. 1991;17:97-100. doi:10.1016/S0099-2399(06)81737-1

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

Norton LA, Proffit WR, Moore RR. In vitro bone growth inhibition in the presence of histamine and endotoxins. *J Periodontol*. 1970;41:153-7. DOI: 10.1902/jop.1970.41.3.153

Oliveira BP, Aguiar CM, Câmara AC, Albuquerque MM, Correia AC, Soares MF. The efficacy of photodynamic therapy and sodium hypochlorite in root canal disinfection by a single-file instrumentation technique. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015;12(3):436-43. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.05.004

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

Owatz CB, Khan AA, Schindler WG, Schwartz SA, Keiser K, Hargreaves KM. The incidence of mechanical allodynia in patients with irreversible pulpitis. *J Endod* 2007. 33:552-6. doi: 10.1016/j.joen.2007.01.023

Richards D, Rutherford RB. The effects of interleukin 1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal-ligament and gingival fibroblast. *Arch Oral Biol*. 1988;33:237-43. PMID: 3261162

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

Rôças IN, Siqueira JF Jr. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *J Endod*. 2010;36:45-52. doi:

10.1016/j.joen.2009.10.022

Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod*. 1975;1:19–21. doi:10.1016/S0099-2399(75)80244-5

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

Silva E, Ferreira, VM, Silva, CC, Herrera, DR, De-Deus, G, Gomes, BP. Influence of apical enlargement and complementary canal preparation with the Self-Adjusting File on endotoxin reduction in retreatment cases. *Int End J*. 2016;Jul 12. doi: 10.1111/iej.12677. [Epub ahead of print]

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

Stashenko P, Dewhirst FE, Rooney ML, Desjardins LA, Heeley JD. Interleukin-1 beta is a potent inhibitor of bone formation in vitro. *J Bone Miner Res*. 1987;2:559–65. doi: 10.1002/jbmr.5650020612

Takayama S, Miki Y, Shimauchi H, Okada H. Relationship between prostaglandin E2 concentrations in periapical exudates from root canals and clinical findings of periapical periodontitis. *J Endod*. 1996;22:677-80. PMID: 9220754

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

Vianna ME, Hartz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22:411–8. doi:10.1111/j.1399-302X.2007.00379.x

Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BP. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23:282–90. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00425.x

Xavier AC, Martinho FC, Chung A, Oliveira LD, Jorge AO, Valera MC, et al. One-visit versus two-visit root canal treatment: effectiveness in the removal of endotoxins and cultivable bacteria. *J Endod*. 2013;39:959–64. doi: 10.1016/j.joen.2013.04.027

Zero DT, Zandona AF, Vail MM, Spolnik KJ. Dental caries and pulpal disease. *Dent Clin North Am* 2011;55:29-46. doi: 10.1016/j.cden.2010.08.010.