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

FERNANDA CARVALHO PELEGRINI

INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO ULTRASSÔNICA DO GEL DE HIPOCLORITO DE SÓDIO 3%, E DA MEDICAÇÃO INTRACANAL COM HIDRÓXIDO DE CÁLCIO SOBRE MICRO-ORGANISMOS E ÁCIDO LIPOTEICÓICO

2017

FERNANDA CARVALHO PELEGRINI

INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO ULTRASSÔNICA do GEL DE HIPOCLORITO DE SÓDIO 3%, E DA MEDICAÇÃO INTRACANAL COM HIDRÓXIDO DE CÁLCIO SOBRE MICRO-ORGANISMOS E ÁCIDO LIPOTEICÓICO

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. Adj. Claudio Antonio Talge Carvalho

São José dos Campos

2017

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

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

Pelegrini, Fernanda Carvalho
Influência da ativação ultrassônica do gel de hipoclorito de sódio 3%, e da medicação intracanal com hidróxido de cálcio sobre micro-organismos e ácido lipoteicóico / Fernanda Carvalho Pelegrini. - São José dos Campos : [s.n.], 2017.
64 f. : il.

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

1. Toxinas bacterianas. 2. Hipoclorito de sódio. 3. Ultrassom. I. Carvalho, Claudio Antônio Talge , orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

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

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

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

Prof. Dr. Renato Miotto Palo

São José dos Campos, 07 de fevereiro de 2017.

Dedicatória

À minha mãe, Fátima, que me ensinou a ter sonhos, a correr atrás deles, ou seja, torná-los realidade, e sempre esteve comigo me apoiando, ajudando, lado a lado nessa corrida.

Tenho certeza que sem esse apoio minhas conquistas não teriam o mesmo valor. É impossível traduzir em palavras todo sentimento de agradecimento, carinho, amor e admiração que tenho.

Ao Paulo, meu marido, pelo amor, carinho, amizade e respeito que tem comigo e com meus sonhos, estando presente como grande incentivador.

Sem você ao meu lado, a vida não teria a mesma graça. Te amo!

Agradecimentos especiais

Ao meu orientador, Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho, pelos conhecimentos transmitidos, pelo incentivo e apoio para a realização deste trabalho, fazendo-se presente desde sua elaboração até sua conclusão final.

Agradeço a convivência saudável que estabelecemos durante esses dois anos. Além da parte científica, fica como aprendizado para mim que é possível desempenhar um trabalho sério, mas sempre contribuindo para um ambiente de trabalho agradável, sendo gentil, simpático e solicito com as outras pessoas. Muito obrigada por tudo!

À Profa. Tit. Márcia Carneiro Valera, pelos conhecimentos e ensinamentos que repartiu comigo. Agradeço por desde a graduação ser uma referência profissional e de caráter para nós alunos. Posso dizer que ao longo desses dois anos, nossa maior convivência no mestrado só aumentaram o carinho e admiração que tenho pela senhora. Muito obrigada por tudo!

À colega de mestrado Cláudia Luísa Ribeiro Ferreira, pelo companheirismo e amizade que desenvolvemos ao longo desta caminhada. Tenho certeza que nossa parceria não só possibilitou a realização deste trabalho, como tornou o trabalho diário menos penoso. Muito obrigada!

Agradecimentos

Ao **Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, ICT-UNESP**, instituição na qual fiz minha graduação e agora o curso de mestrado, e além de me proporcionar uma carreira, me proporcionou ao longo desses anos crescimento e amadurecimento pessoal e grandes laços de amizade. Me sinto orgulhosa de fazer parte dessa instituição.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora**.

A **Capes**, pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos **professores da disciplina de Endodontia** desta instituição, Prof Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo, Profa Adj. Ana Paula Martins Gomes, Prof. Frederico Canato Martinho, Prof. Adj. Cláudio Antônio Talge Carvalho e Profa Tit. Márcia Carneiro Valera, aos quais atribuo o interesse que senti pela endodontia lá na graduação, que de lá pra cá se tornou minha especialidade. Agradeço por terem plantado essa semente em mim, através das aulas, da disponibilidade e vontade de ensinar, dos bons exemplos, da boa convivência. Boas impressões que tive na graduação, que só aumentaram durante o curso de mestrado.

À Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira, pela imensa colaboração com a minha pesquisa, tanto na elaboração, quanto na parte experimental.

Ao Prof. Msc. Felipe Eduardo de Oliveira, por ter transmitido seus conhecimento de microbiologia, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, além da ajuda com estatística.

À Profa. Dra. Flávia Goulart da Rosa Cardoso, pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei, em solucionar minhas dúvidas e transmitir seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Renato Miotto Palo, por ter aceitado prontamente ser banca da minha dissertação e, também pela ajuda imprescindível com a aquisição de materiais para esta pesquisa.

As empresas **Ultradent e Helse**, pela colaboração com a doação de materiais utilizados na pesquisa.

Aos funcionários dos departamentos de Odontologia Restauradora e Ciências Básicas e Diagnóstico Bucal, assim como os funcionários da Seção técnica de Pós-graduação, pela disponibilidade em ajudar sempre que possível.

Aos colegas da minha turma de mestrado: Alessandra Manchini, Cássia Tóia, Cláudia Ferreira, Daiana Cavalli, Diego Rabelo e Esteban Orozsco, pela ótima convivência que tivemos. Agradeço por ter conhecido e convivido com pessoas tão especiais, e termos formado um grupo amigo e equilibrado.

Aos colegas de Pós- graduação: Rayana, Tatiana, Amjad, Monique, Carlos Henrique, Felipe, Rafaela, Tereza, Camila.

Aos amigos de Passa Quatro que comemoram minhas conquistas como se fossem a deles. Aos amigos que fiz na FOSJC, em especial a turma 54, por estarem presentes nas minhas melhores memórias desde que nos conhecemos. Aos amigos que a odontologia me deu.

A minha família: minha vó Regina, que me ensinou entre outras coisas, a importância de se fazer presente na vida de quem amamos. Meus tios e primos, que sempre me mimaram e torcem por mim. Minhas tias-avós, que deram pra mim e para os meus primos as melhores lembranças de infância. A família do Paulo, que hoje também é minha.

À Renata, da biblioteca, que contribuiu para correção do meu trabalho.

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

E principamete a **Deus**, que possibilita que todo dia seja vivido, que sonhos se tornem realidade, e dessa maneira possibilitou e me orientou na execução deste trabalho. Agradeço pela sua presença em minha vida!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS 10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 11
RESUMO 12
ABSTRACT 13
1 INTRODUÇÃO 14
2 REVISÃO DE LITERATURA 17
2.1 Microbiota das infecções endodônticas 17
2.2 Ácido Lipoteicóico 18
2.3 Hipoclorito de sódio 20
2.4 Ativação ultrassônica 23
3 PROPOSIÇÃO 28
4 MATERIAL E MÉTODOS 29
4.1 Preparo dos espécimes 29
4.2 Contaminação dos espécimes 31
4.3 Preparo biomecânico 32
4.4 Divisão dos grupos experimentais 33
4.5 Coletas do conteúdo dos canais radiculares 35
4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana 36
4.7 Detecção e quantificação de ácido lipoteicóico 36
4.8 Análise estatítica 37
5 RESULTADO 38
5.1 Análise microbiológica - Eficácia do hipoclorito de sódio 3% gel agitado ou não por ultrassom, sobre micro-organismos 38
5.1.1 Sobre *E. faecallis* 38
5.1.2 Sobre *E. Coli* 38
5.2 Análise microbiológica - Eficácia da agitação ultrassônica da MIC sobre micro-organismos 39
5.2.1 Sobre *E. Faecallis* 39
5.2.2 Sobre *E. Coli* 41
5.3 Detecção e Quantificação de LTA 43

5.3.1 Eficácia da agitação ultrassônica do hipoclorito de sódio 3% gel sobre LTA 43
5.3.2 Eficácia da agitação ultrassônica da MIC sobre LTA 45
5.3.3 Eficácia dos tratamentos propostos para redução de LTA 46
6 DISCUSSÃO 48
6.1 Sobre o tema da pesquisa 48
6.2 Da Metodologia 49
6.3 Dos resultados 51
7 CONCLUSÃO 54
REFERÊNCIAS 55
ANEXO 63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Placa de cultura celular de 24 poços com espécimes fixados com resina acrílica quimicamente ativada.....30

Figura 2 - Hipoclorito de sódio 3% gel utilizado no experimento.....32

Figura 3 - Organização do fluxo laminar para realização dos experimentos 33

Figura 4 - Coleta do canal radicular 35

Figura 5 - Placas com colônias de micro-organismos.....36

Figura 6 - Reação revelada utilizando tetrametilbenzidina (TMB). Adição da solução stop (ácido sulfúrico 2 N).....37

Figura 7 - Gráficos em barras do percentual de redução de E. faecalis das 1ª e 2ª coleta, dos grupos com e sem agitação com ultrassom da substância química auxiliar.....38

Figura 8 - Gráficos em barras do percentual de redução de E. coli das 1ª e 2ª coleta, dos grupos com e sem agitação com ultrassom da substância química auxiliar 39

Figura 9 - Gráficos em barras dos resultados obtidos pela contagem de UFC/ml, das quatro coletas dos grupos 1, 2, 3 e 4 40

Figura 10 - Gráficos em barras dos resultados obtidos pela contagem de UFC/ml, das quatro coletas dos grupos 5,6,7 e 8 41

Figura 11 - Gráficos em barras dos resultados obtidos pela contagem de UFC/ml, das quatro coletas dos grupos 1, 2, 3 e 4 42

Figura 12 - Gráficos em barras dos resultados obtidos pela contagem de UFC/ml, das quatro coletas dos grupos 5,6,7 e 8 43

Figura 13 - Gráfico em barras da média da primeira e segunda coletas dos grupos 1, 2,3 e 4, nos quais foi realizada a agitação do NaOCl 3% gel 44

Figura 14 - Gráfico em barras da média da primeira e segunda coletas dos grupos 5, 6, 7 e 8, nos quais não foi realizada a agitação do NaOCl 3% gel.....44

Figura 15 - Gráficos em barras dos resultados obtidos pelo teste de Elisa, das quatro coletas dos grupos 1, 2, 3 e 4.....45

Figura 16 - Gráficos em barras dos resultados obtidos pelo teste de Elisa, das quatro coletas dos grupos 5,6,7 e 8.....46

Figura 17 - Gráfico em barras das médias de LTA na 4ª coleta de todos os grupos 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Infusão de cérebro e coração
$Ca(OH)_2$	Hidróxido de Cálcio
CPE	Controle Padrão de Endotoxina
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acétio
IP-10	Proteína 10 induzível por interferon gama
LPS	Endotoxinas
LTA	Ácido Lipoteicóico
MIP-1α	Proteína inflamatória de macrófago-1α
MIC	Medicação Intracanal
NaOCl	Hipoclorito de Sódio
PBM	Preparo Biomecânico
PUI	Ativação ultrassônica passiva
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral α

Pelegrini FC. Influência da ativação ultrassônica do gel de hipoclorito de sódio 3%, e da medicação intracanal de hidróxido de cálcio sobre micro-organismos e ácido lipoteicóico [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a ação do gel de hipoclorito de sódio (NaOCl) 3 % e da medicação intracanal (MIC) de hidróxido de cálcio ($CaOH_2$), agitados ou não por ultrassom sobre *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e ácido lipoteicóico (LTA). Para isso 80 dentes humanos unirradiculares tiveram suas coroas removidas padronizando seu comprimento em 16 mm +- 0,5 mm, sendo seus canais instrumentados inicialmente até instrumento R25 (Reciproc). Os canais foram contaminados com suspensões de *E. faecalis e E. coli.* Os canais foram instrumentados utilizando-se instrumento R40, sob irrigação com 2 ml de NaOCl 3% gel seguida de irrigação com 10 ml de solução salina estéril e apirogênica. Após os canais foram irrigados com EDTA 17%, seguido de irrigação com 5 ml de solução salina estéril e apirogênica, sendo por último preenchidos com medicação intracanal de hidróxido de cálcio mantida durante 7 ou 14 dias. Os espécimes foram divididos inicialmente em 2 grupos (n=40) de acordo com a agitação ultrassônica (US) ou não da substância química auxiliar. Sendo novamente divididos de acordo com a agitação ultrassônica ou não da medicação intracanal (MIC) e o tempo de ação desta (n=10): 1) NaOCl + $Ca(OH)_2$ (7 dias). 2) NaOCl + $Ca(OH)_2$ (14 dias). 3) NaOCl + $Ca(OH)_2$ com US (7 dias) 4) NaOCl + $Ca(OH)_2$ com US (14 dias). 5) NaOCl com US + $Ca(OH)_2$ (7 dias). 6) NaOCl com US + $Ca(OH)_2$ (14dias) 7) NaOCl com US + $Ca(OH)_2$ com US (7dias). 8) NaOCl com US + $Ca(OH)_2$ com US (14 dias). Foram realizadas coletas do canal radicular 28 dias após o início da contaminação dos espécimes (1ª coleta), logo após o preparo biomecânico (PBM) (2ª coleta), logo após o preenchimento com EDTA (3ª coleta) e após o tempo de ação da MIC (4ª coleta). Para todas as coletas foram avaliadas a atividade antimicrobiana (UFC/ml) e quantificação de LTA pelo teste de Elisa. Os resultados foram submetidos aos testes estatísticos Kruskal-Wallis e Dunn (5%). Verificou-se pela análise microbiana e quantificação de LTA, que o NaOCl 3% gel foi capaz de eliminar quase completamente os micro-organismos dos canais radiculares, mas não o ácido lipoteicóico, independente da ativação ultrassônica. A ativação da MIC de $Ca(OH)_2$ não exerceu efeito sobre micro-organismos. Sobre LTA, a ativação da MIC de $Ca(OH)_2$ não foi eficaz, sendo os grupos com maior percentual de redução os que não sofreram agitação da MIC, nem do NaOCl. Conclui-se que o NaOCl 3% gel boa tem capacidade antimicrobina, independente da ativação ultrassônica. O PBM não foi capaz de detoxificar o LTA dos canais radiculares. A MIC com ativação ultrassônica não foi eficiente na redução de LTA.

Palavras-chave: Toxinas bacterianas. Hipoclorito de sódio. Ultrassom.

Pelegrini FC. Influence of activation by ultrasound on sodium hypochlorite 3% gel and an intracanal medication of calcium hydroxide on microrganisms and lipotheicoic acid. [dissertation] São José dos Campos (SP): São Paulo University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate in vitro the action of sodium hypochlorite (NaOCl) 3% gel and calcium hydroxide as an intracanal medication, both activated by ultrasound on the reduction of E. faecalis e E. coli and lipotheicoic acid (LTA). Eight human single-rooted teeth with standardized size of 16 mm were prepared initially to R25 instrument (Reciproc) and distributed in microplate (n = 10). After sterilization (Co60 gamma radiation), the infection was carried out 8 microlitres of E. coli suspension, and after 7 days 8 microlitres of E. faecalis suspension, maintained for 21 days. Following the collection confirmation was performed (1st collection), then the root were instrumented using R40 instrument, irrigation with 2 ml of NaOCl 3% gel followed by washing with 10 ml of saline. The specimens were divided into 8 groups (n = 10) according to different ultrasonic irrigation protocols and different periods exposed to intracanal medication: 1) NaOCl + $Ca(OH)_2$(7 days). 2) NaOCl + $Ca(OH)_2$ (14 days). 3) NaOCl + $Ca(OH)_2$ with PUI (7 dias) 4) NaOCl + $Ca(OH)_2$ with PUI (14 days). 5) NaOCl with PUI + $Ca(OH)_2$ (7 days). 6) NaOCl with PUI + $Ca(OH)_2$ (14 days) 7) NaOCl with PUI + $Ca(OH)_2$ (7 days). 8) NaOCl with PUI + $Ca(OH)_2$ with PUI (14 days). Were made to sample colections of content of root canals, after instrumentation (2nd sample), after the use of EDTA (3rd sample) and after the $Ca(OH)_2$ (4th Collection) . Microbiological culture and LTA quantification revealed that 3 % NaOCl gel was capable to eliminate E. faecalis and E. coli almost completely from root canals, but not lipotheicoic acid, regardless the use of ultrasonic activation. The ultrasonic activation of intracanal medication ($Ca(OH)_2$) was not effective in removing neither microorganisms nor LTA. In addition, the groups with greatest reduction were the ones with no ultrasonic activation either of intracanal medication or NaOCl. It was concluded that 3% NaOCl gel is effective on antimicrobial activity regardless the use of ultrasonic activation. Biomechanical preparation was not capable to detoxify LTA from root canals. Ultrasonic activation of intracanal medication was not effetive on LTA reduction.

Keywords: Bacterial toxins. Sodium hypochlorite. Ultrassound.

1 INTRODUÇÃO

Nos tratamentos endodônticos de dentes com necrose pulpar limpeza e desinfecção são fatores fundamentais para o sucesso deste tratamento, uma vez que micro-organismos são os principais causadores de patologias pulpares, e os responsáveis pela propagação de periodontites apicais (Kakehashi et al., 1965)

Além dos micro-organismos, seus fatores de virulência, podem contribuir para indução e manutenção de lesões periapaicais. Na parede celular das bactérias Gram-negativas estão presentes lipopolissacarídeos (LPS), também chamados de endotoxinas. O LPS é liberado durante multiplicação ou morte celular, causando efeitos biológicos diversos que resultam em reações inflamatórias e imunológicas (Oliveira et al., 2012), sendo considerados fatores etiológicos para patologias pulpares e periapicais. (Horiba et al.,1991; Baik et al., 2008b)

As bactérias Gram-positivas por sua vez possuem em sua parede celular o ácido lipoteicóico (LTA), o qual é semelhante a endotoxina, em estrutura e em suas propriedades imunológicas, estando também envolvido na resposta inflamatória (Baik et al., 2008b).

O preparo biomecânico (PBM) consegue eliminar grande parte dos micro-organismos presentes no interior dos canais de dentes com necrose pulpar (Vianna et al., 2007), sendo capaz de reduzir a carga microbiana e endotoxinas presentes no interior dos canais, mas não em sua totalidade. (Xavier et al., 2013; Martinho et al., 2014), não havendo trabalhos que avaliam sua ação sobre LTA.

Durante o PBM são utilizadas substâncias químicas auxiliares ou soluções irrigadoras. Diferentes substâncias químicas auxiliares estão disponíveis no mercado, sendo a mais utilizada em endodontia o hipoclorito de sódio (NaOCl), devido sua capacidade antimicrobiana e capacidade de dissolução tecidual. (Zehnder, 2006; Mohammadi, 2008).

O NaOCl está disponível em diversas concentrações, sendo que concentrações mais altas têm demonstrado melhores resultados quanto à ação antimicrobiana. (Cunningham, Joseph, 1980b). No entanto, o hipoclorito de sódio não é considerado biocompatível, sendo tóxico aos tecidos perirradiculares. Sua utilização clínica em concentrações elevadas exige habilidade, além de cuidados por

parte cirurgião-dentista, a fim de evitar a ocorrência de acidentes como o extravasamento através do ápice durante a irrigação intracanal. Estes acidentes podem trazer complicações e grande desconforto ao paciente. Por esse motivo muitas vezes opta-se por utilizar concentrações mais baixas, que dão maior segurança ao cirurgião-dentista mas com menor eficiência do irrigante.

A formulação em gel do NaOCl é uma alternativa que pode associar as boas propriedades já conhecidas do NaOCl com a segurança da irrigação com um gel, uma vez que diminui a possibilidade de extravazamento. Com o gel de NaOCl o canal é preenchido de forma passiva, seguido de lavagem abundante e vigorosa com soro fisiológico. Embora existam poucos estudos na literatura sabe-se que o NaOCl gel é tão eficiente quanto à solução na remoção de *smear layer* (Zand et al., 2010).

Embora o PBM utilizando substâncias químicas seja capaz de reduzir grande parte dos micro-organismos planctônicos, ainda é um desafio a remoção destas bactérias organizadas em biofilme intracanal. Para isto, o uso do ultrassom tem sido utilizado e recomendado. Estudos demonstraram que sua utilização promove maior limpeza das paredes radiculares devido a maior remoção de *smear layer*. (Van der Sluis et al., 2010; Plotino et al., 2007)

O maior poder de limpeza, utilizando ativação da solução irrigadora com ultrassom, pode ser observado também em regiões inacessíveis do SCR ou áreas pouco tocadas durante a instrumentação, como áreas de istmos. (Burleson et al., 2007), podendo auxiliar de forma significativa para a redução microbiana durante o tratamento endodôntico. (De Almeida et al., 2014)

Entretanto o PBM não é capz de eliminar todos os micro-organismos do sistema de canais radiculares (SCR), o uso de uma medicação intracanal é importante para maior eliminação de micro-organismos e toxinas (Xavier et al., 2013). A medicação intracanal mais indicada é o hidróxido de cálcio. Estudos mostram que a agitação ultrassônica de pastas de hidróxido de cálcio pode ocasionar maior penetração intra-dentinária, com consequente melhor ação antimicrobina (Arias, 2013).

A literatura não apresenta estudos que avaliem a ação da ativação ultrassônica do gel de hipoclorito de sódio, e também estudos relacionando os efeitos do PBM e MIC sobre LTA.

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o poder de desinfecção do NaOCl gel, através da quantificação de micro-organismos e LTA, além de verificar a possível potencialização da ação da substância química auxiliar e da medicação intracanal pelo uso do ultrassom.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiota das infecções endodônticas

Miller, em 1894, propôs a correlação entre a presença de bactérias no interior de canais radiculares e a etiologia de patologias periapicais. Após bacterioscopia do esfregaço de material coletado de dentes com polpa necrosada, relatou ter encontrado três tipos morfológicos: cocos, bacilos e espirilos.

O que Miller propôs pode ser comprovado por um estudo pioneiro de Kakehashi et al. (1965) com polpas dentais de ratos convencionais e *germ-free* expostas ao meio bucal durante 14 dias, tratados com alimentação estéril. Em análise histológica, os animais convencionais apresentaram dentes com tecido pulpar totalmente necrosado, com tecido inflamatório crônico e formação de abscesso na região periapical, enquanto que no grupo *germ-free* não foi observado necrose pulpar nem formação de abscesso, apenas um pequeno infiltrado inflamatório, demonstrando, que o desenvolvimento de lesões perirradiculares acontece somente quando há presença de micro-organismos.

Moller et al. (1981) também demonstraram o papel dos micro-organismos na etiopatogenia de lesões perirradiculares, induzindo necrose pulpar séptica e asséptica em dentes de macacos. Após 6 a 7 meses, análises clínicas, radiográficas, microbiológicas e histopatológicas demonstraram que somente nos casos de dentes com polpas infectadas houve o desenvolvimento de lesões perirradiculares. Enquanto que nos casos de polpas necrosadas não infectadas havia ausência de inflamação e sinais de reparo.

Conhecido o papel dos micro-organismos nas infecções endodônticas, coube então a detecção e identificação destes. Com o advento de métodos moleculares de detecção e identificação de micro-organismos, foram contornadas falhas dos métodos de cultura (Siqueira, Rôças, 2005) e então pôde-se confirmar achados anteriores e expandir a lista de patógenos endodônticos.

As infecções endodônticas têm caráter polimicrobiano. No entanto infecções primárias e secundárias podem apresentar características diferentes. Segundo

Narayanan e Vaishnavi (2010) e Martinho et al. (2010) as infecções primárias tem predomínio de bactérias Gram-negativas.

Por sua vez, nas infecções secundárias e/ou persistentes dos canais radiculares, as bactérias Gram-positivas são predominantes. (Murad et al, 2014; Barbosa-Ribeiro et al., 2016a). Barbosa-Ribeiro et al. (2016b) observaram a presença de bactérias Gram-positivas em todas as fases do retratamento endodôntico, e que *E Faecalis* foi a espécie mais encontrada. As infecções secundárias apresentam perfil complexo e misto de micro-organismos pertencentes aos gêneros Enterococcus, Actinomyces, Streptococcus, Lactobacillus, Candida, Propionibacterium, Staphylococcus, Eubacterium e Bifidobacterium. Espécies como *Pseudoramibacter alactolyticus, Parvimonas micra, Filifactor alocis e Olsenella uli* também podem estar presentes nestas infecções (Narayanan, Vaishnavi, 2010; Rôças, Siqueira Jr, 2012).

Segundo Narayanan e Vaishnavi (2010), *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* são espécies comumente identificadas em casos de retratamento endodôntico, sendo que *E. faecalis* possui características que o tornam um sobrevivente excepcional no canal radicular, como: capacidade de sobreviver em ambiente pobre em nutrientes, ambientes com baixo pH, salinidade elevada e altas temperaturas, na presença de medicamentos e substâncias químicas auxiliares, sendo capaz de adquirir resistência a estes.

Love (2001) observou a capacidade *Enterococcus faecalis* de invadir túbulos dentinários e aderir ao colágeno presente. Tennert et al. (2014) observaram *Enterococcus faecalis* como o mais frequentemente isolado (33%) de infecções endodônticas secundárias.

2.2 Ácido Lipoteicóico

As bactérias Gram-negativas, durante multiplicação ou morte, liberam lipopolissacarídeos (LPS) de sua parede celular, os quais apresentam importantes efeitos citotóxicos. A presença deste fator de virulência em canais radiculares infectados tem papel na indução e manutenção das alterações pulpares e

periapicais (Schein,Schilder, 1975; Oliveira et al., 2012). Já as bactérias Gram-positivas liberam o ácido lipoteicóico (LTA).

LPS e LTA possuem propriedades patogênicas semelhantes. (Wang JE et al., 2003). Mas diferem tanto na estrutura, quanto na transcrição gênica. (Ryu et al., 2009). Segundo Siqueira Jr e Rôças (2007), o LTA um polímero aniônico e um dos principais componentes da parede celular da bactéria Gram-positiva, representando até 50% de seu peso seco. O LTA apresenta estrutura anfipática formada pela ligação de poliglicerofosfatos a ácidos graxos e está envolvido com resposta inflamatória, síndrome séptica, formação de biofilme e adesão ao dente devido sua atividade adsortiva à hidroxiapatita, que é uma característica relacionada a sua penetração nos túbulos dentinários (Siqueira Jr, Rôças, 2007; Lee et al., 2009).

Costa et al. (2003) observaram que o LTA pode atuar no desenvolvimento de um processo inflamatório periapical, por possuir características físico-químicas que lhe permitem atuar como um fator imunogênio. O LTA pode se acumular nos tecidos no qual reside, como nas lesões periapicais, isso devido sua alta afinidade a hidroxiapatita, quando liberado pode acumular e residir persistentemente nos túbulos dentinários, promovendo estimulação contínua nos tecidos adjacentes (Baik, 2008a). Altos níveis de LTA podem ser responsáveis pela manutenção de um processo inflamatório na região apical, e consequente falha no tratamento endodôntico. (Ryu et al., 2009; Baik et al., 2011).

Segundo Baik et al. (2008a) o LTA pode ser modificado pelo hidróxido de Cálcio. Este estudo demonstrou que o pré-tratamento do LTA com hidróxido de cálcio anulou sua capacidade de induzir liberação de TNF-α e, deixando-o incapaz de estimular receptor TLR-2.

Baik et al. (2011) demonstraram que o tratamento de LTA com hidróxido de cálcio por 24 horas inibiu significativamente a produção de óxido nítrico, MIP-1α (proteína inflamatória de macrófago-1α) e IP-10 (proteína 10 induzível por interferon gama) em cultura de macrófagos e, ainda, foram detectados ácidos graxos livres liberados de LTA tratado com hidróxido de cálcio.

Barbosa-Ribeiro et al. (2016b), quantificou os níveis de LTA em todas fases do retratamento endodôntico, e observou significativa redução após o preparo biomecânico e após uso de uma medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio.

Segundo Yang et al. (2016), LTA de *Enterococcus faecalis,* pode inibir a diferenciação dos macrófagos em osteoclastos e, assim, manter as capacidades fagocíticas e inflamatórias dos macrófagos, contribuindo potencialmente para a periodontite apical. Wang et al. (2016) observaram que o inflamassoma NLRP3 tem papel na inflamação periapical causada por *E. faecalis* e que LTA é o principal fator de virulência de *E. faecalis*, sendo capaz de induzir diretamente NLRP3 que está associada a ativação do NF-kB (factor nuclear kappa B), que desempenha papel na regulação da resposta imune.

2.3 Hipoclorito de sódio

O Hipoclorito de sódio foi utilizado inicialmente na medicina. Dakin, em 1915, estudou sua ação antibacteriana, apontando-o como uma boa substância antisséptica para feridas.

Seu emprego em endodontia foi sugerido por Blass, e Grossman foi um dos responsáveis, por difundir sua utilização no preparo biomecânico. (Leonardo MR, 2002a). Hoje o hipoclorito de sódio é a substância química auxiliar mais utilizada em Endodontia, em diferentes concentrações. A preferência por essa substância química auxiliar se deve às propriedades que ela apresenta. Dentre estas, destacam-se a capacidade de dissolução tecidual e a atividade antimicrobiana. (Zehnder, 2006; Mohammadi, 2008)

Grossman e Meiman (1941) avaliaram diferentes agentes químicos quanto à dissolução de tecido pulpar, verificaram que o Hipoclorito de sódio 4-6% foi o mais eficaz. A dissolução deste tecido pelo Hipoclorito de Sódio foi observada num intervalo de 20 minutos a 2 horas. Demonstrando sua ação de dissolvente de matéria orgânica.

A dissolução tecidual promovida pelo hipoclorito de sódio faz com que fragmentos de tecido pulpar sejam liquefeitos, facilitando sua remoção no interior do sistema de canais radiculares. (Lopes, Siqueira, 2010) Essa remoção é fundamental, considerando que restos necróticos podem fornecer um fonte de nutrição para micro-organismos sobreviventes à terapia endodontica.

A capacidade de dissolução de tecidos necróticos não foi observada em outros materiais irrigantes do canal radicular, como demonstrou Naenni et al (2004). Neste estudo, amostras de tecido necrótico foram obtidas a partir de palatos suínos. Estas foram incubadas em diferentes soluções irrigantes. Com exceção do hipoclorito de sódio, nenhuma solução demonstrou capacidade de dissolução do tecido.

Além da dissolução de tecidos necróticos, o NaOCl é capaz de promover dissolução do tecido dentinário, sendo que o aumento do tempo de exposição e da concentração da solução de NaOCl conduzem a um aumento na dissolução do tecido dentinário, através da desproteinização do colágeno dentinário (Tartari et al., 2016)

Karunakaran et al. (2012) analisaram em MEV o efeito de diferentes irrigantes sobre a superfície de dentina intra-radicular. As soluções irrigantes testadas foram: Solução salina, água deionizada, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 17%, hipoclorito de sódio (NaOCl) 5%, NaOCl 5% com agitação ultrassônica, peróxido de hidrogênio 3%, clorexidina (CHX) 2%, MTAD, e MTAD com agitação ultrassônica. As amostras preparadas foram colocadas na solução irrigante durante 3 min, subsequentemente desidratadas, revestidas de carga elétrica, e observadas em MEV. As imagens foram posteriormente analisadas quanto às modificações de superfície de dentina. NaOCl 5% foi eficiente na remoção de detritos orgânicos, mas incapaz de remover toda a camada de esfregaço.

A atividade antimicrobiana do NaOCl e da Clarexidina foi observada por Gomes e colaboradores, em 2001, num estudo *in vitro* que comparou diferentes concentrações de NaOCl (0,5 %, 1%, 2,5%, 4 % e 5,25%) e CLX em duas formas, gel e líquido, e três concentrações diferentes 0,2% , 1 % e 2%, sobre *Enterococcus faecalis.* O tempo para eliminação do micro-organismo foi observado. Todos os irrigantes foram eficazes. No entanto NaOCl 5,25% e CLX líquida 1% e 2% levaram menos tempo para eliminação de *E. faecallis.* Observaram ainda que a atividade antimicrobiana do Hipoclorito de Sódio está diretamente relacionada a sua concentração, quanto mais alta sua concentração menos tempo para eliminar o micro-organismo.

O Hipoclorito de Sódio, no entanto, apresenta alta citotoxidade. Podendo causar danos aos tecidos periapicais. (Gatot et al., 1991).Devido essa citotoxidade,

novos irrigantes vêm sendo estudados, afim de propor o uso de uma substância alternativa, que possua efeitos antimicrobianos e que seja biocompatível. (Valera et al., 2015)

Considerando que a característica de ser citotóxico, somente é evidenciada quando a substância química entra em contato com tecidos periapicais e mucosas, em casos de acidentes, e que estes, são considerados raros. O uso de uma forma em gel, utilizada no preparo biomecânico de forma passiva, requer menor volume do irrigante e maior volume de soro fisiológico, sendo então mais segura, podendo minimizar os riscos da utilização do Hipoclorito de Sódio.

Zand et al. (2010), compararam a capacidade de remoção de *smear layer* do Hipoclorito de sódio 2,5% solução e gel, associados a EDTA 17%. 40 dentes unirradiculares humanos extraídos foram utilizados, estes foram divididos em 3 grupos: Grupo NaOCl solução (n=15) - durante a instrumentação os canais foram irrigados com 5 ml de hipoclorito de sódio 2,5%, Grupo NaOCl Gel (n=15) - os canais foram preenchidos com hipoclorito gel 2,5% e irrigados com solução salina. Nestes dois grupos, após a instrumentação, que foi feita com sistema rotatório Race (5 instrumentos), todos os canais eram inundados com EDTA 17% durante 2 minutos, e após lavados com 5 ml de água destilada. No grupo Salina (n=10), (controle positivo), todos os canais foram lavados com solução salina durante a instrumentação, e com lavados ao final com 5 ml de água destilada. Após instrumentados os dentes foram clivados e preparados para análise em MEV. Dois endodontistas avaliaram de forma cega, as imagens obtidas, dos terços cervical, médio e apical de cada canal, segundo os seguintes critérios: (1) nenhuma camada de esfregaço: nenhuma camada de manchas sobre a superfície, todos os túbulos limpos e abertos; (2) camada de esfregaço moderada: nenhuma camada de mancha na superfície, mas túbulos que contêm detritos; e (3) camada de esfregaço pesada: camada de esfregaço que cobre a superfície e os túbulos. Os resultados foram analisados estatisticamente e concluíram que não houve diferença significativa nos três terços entre a solução de hipoclorito de sódio e o gel. O grupo salina apresentou mais *smear layer* comparado com os outros grupos. Concluíram que o gel de hipoclorito de sódio pode ser eficaz em remover a camada de esfregaço, e os efeitos negativos do uso de solução de hipoclorito de sódio pode ser evitada com a utilização do gel.

do Nascimento et al. (2015) avaliaram a presença de resíduos de formulações em gel nas paredes de dentina radicular após a irrigação de canais. Hipoclorito de sódio 5,5% gel, clorexidina 2% gel e EDTA 24% gel radiculares foram avaliados. 48 dentes unirradiculares foram preparados com sistema reciprocante e 5 ml de solução salina, todos os dentes foram irrigados com 3 ml EDTA 17% e ativados passivamente com ultrassom durante 1 minuto. Após, os dentes foram divididos em 4 grupos experimentais (n=12), de acordo com a formulação em gel utilizada, e um grupo controle negativo, onde nenhuma substância foi utilizada. Cada irrigante foi deixado dentro dos canais durante 30 minutos, e após os canais foram lavados com 6 ml de solução salina, ativada passivamente com ultrassom durante 1 minuto, seguida de lavagem com 2 ml de solução salina. As raízes foram seccionadas para análise em MEV associado ao sistema EDS, chamado de sistema SEM-EDS, que permite a detecção dos elementos químicos presentes nas amostras. Quando comparados ao controle, todos os grupos apresentaram maiores porcentagens de elementos químicos. O que sugere que estas formulações ficam aderidas as paredes do canal, podendo causar danos para adesão do cimento endodôntico.

2.4 Ativação ultrassônica

O tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar requer ação sobre micro-organismos. Já é sabido que o PBM não é suficiente para proporcionar assepsia ao sistema de canais radiculares (SCR), necessitando de etapas conjuntas e complementares para maior eliminação de micro-organismos. (Bystrom, Sundqvist, 1981) Isso se deve principalmente a complexa anatomia do SCR, que são compostos por áreas irregulares como achatamentos, istmos e deltas apicais. (Nair et al., 2005)

O uso do ultrassom pode ser uma ação complementar útil na limpeza dos canais radiculares, uma vez que a vibração ultrassônica, promove um movimento contínuo do irrigante no interior do SCR possibilitando uma limpeza eficaz deste espaço. (Ahmad et al., 1987) Uma irrigação eficiente baseia-se tanto na ação

mecânica de lavagem quanto na capacidade química dos irrigantes. (Lee SJ et al., 2004)

O ultrassom foi utilizado pela primeira vez em Endodontia por Richman (1957), com o intuito de preparar e debridar os canais mecanicamente, o que na prática mostrou-se inviável, pela impossibilidade de controlar o corte da dentina das paredes dos canais, podendo causar perfurações e formas irregulares. (Van der Sluis et al., 2007) Já o uso do ultrassom como auxiliar na limpeza dos canais, com o conceito de irrigação ultrassônica passiva (PUI) foi sugerido por Weller et al. (1980)

A PUI baseia-se na transmissão por meio de ondas ultrassônicas, de energia através de uma lima ou ponta que oscila em um irrigante no interior do canal radicular. (Ahmad et al., 1987)

Cheung e Stock (1993) avaliaram a capacidade de remoção de *smear layer* de diferentes substâncias químicas auxiliares para o PBM, utilizando ultrassom ou não. Após análise qualitativa dos espécimes, observaram que nenhuma das substâncias auxiliares foi capaz de deixar as paredes intra-radiculares livres de *smear layer* em sua totalidade. No entanto a capacidade de remover a camada de manchas foi maior, para todos os irrigantes testados quando estes foram ativados ultrassonicamente, e quando a ponta de ultrassom foi colocada no interior dos canais próxima ao comprimento de trabalho.

van der Sluis et al. (2005) simularam na dentina intra-radicular de caninos extraídos ranhuras, onde foram depositados artificialmente debris de dentina, simulando a formação de *smear layer* durante a instrumentação dos canais. Antes e após o PBM e irrigação com e sem a utilização de PUI, foram realizadas imagens para avaliar qualitativamente a quantidade de dentina nas ranhuras. Foi possível observar que nos dentes onde foi realizada a PUI a remoção dos detritos de dentina foi mais eficaz.

Burleson et al. (2007) avaliaram in *vivo,* através de análise histológica, o poder de limpeza de dentes submetidos ao PBM com e sem ativação ultrassônica do irrigante. 48 pacientes que apresentavam molares inferiores com necrose pulpar participaram deste estudo. Estes foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: Grupo 1 (n=20) , os dentes foram instrumentados com limas do tipo K (Dentsply Maillefer, Tulsa, OK) e limas rotatórias ProFile GT (Dentsply TulsaDental, Tulsa OK). Grupo 2 (n=20), os dentes foram instrumentados com limas do tipo K (Dentsply Maillefer,

Tulsa, OK) e limas rotatórias ProFile® GT® (Dentsply TulsaDental, Tulsa OK), seguida de ativação ultrassonica por 1 minuto. Para ambos os grupos foi utilizado como irrigante NaOCl 6%. Grupo 3 (n=8) dentes recém extraídos que não receberam tratamento endodôntico, que serviram como controles histológicos. Os dentes tratados foram extraídos e preparados histológicamente. Foi avaliada a limpeza das raízes mesiais, em toda a extensão do canal, e também em áreas de istmos, nos terços cervical, médio e apical. A análise estatística revelou que, utilizando a ativação ultrassônica, a limpeza dos canais foi maior em todos os terços, e que em relação às áreas de istmo esta limpeza foi significativamente mais elevada.

Al-Jadaa et al. (2009) avaliaram *in vitro* a capacidade de dissolução de tecido necrótico em canais radiculares acessórios irrigados com técnica convencional e PUI utilizando como solução irrigadora NaOCl 2,5%. Considerando que a PUI pode aumentar a temperatura do irrigante, esta foi medida a cada minuto durante a irrigação, e equilibrada para os dois tratamentos. Modelos de canais radiculares com canais acessórios foram criados com resina epóxi. Os canais acessórios foram preenchidos com tecido pulpar necrótico de dentes bovinos. Os canais foram irrigados com a técnica convencional durante 5 minutos, e com PUI, durante 5 minutos, com renovação a cada 1 minuto. Foram realizadas fotografias digitais antes e após os tratamentos, através de análise qualitativa, pôde-se concluir que PUI causou aumento da temperatura do irrigante, e foi eficaz quanto à dissolução tecidual.

Cachovan et al., em 2013, verificaram *in vitro* os efeitos bactericidas de um sistema hidrodinâmico (RinsEndo) e PUI, para isto 250 dentes unirradiculares extraídos foram contaminados com suspensões de *Enterococcus faecalis*. Foram avaliados os efeitos antibacterianos do sistema hidrodinâmico, da PUI e da irrigação manual com seringas (controle), utilizando como irrigante soro fisiológico. Após essa análise, foi realizada em outras amostras irrigação com as três técnicas avaliadas associadas a irrigantes: 1,5% de NaOCl isoladamente e a associação de NaOCl + 0,2% de clorexidina (CHX). O efeito antibacteriano foi avaliado por UFC/ml de amostras dos canais radiculares. Ambos os sistemas de irrigação foram mais eficientes quanto à redução do número de bactérias do que a irrigação manual. Com soro fisiológico, PUI foi mais eficiente que o sistema hidrodinâmico. E a maior

redução bacteriana foi demonstrada na utilização de NaOCl + CHX para ambos os sistemas.

Joy et al. (2015), compararam, *in vitro*, a eficiência da irrigação convencional e da PUI quanto a eliminação de bactérias em biofilmes. Biofilmes foram simulados utilizando uma solução de colágeno orgânico. Quarenta incisivos centrais permanentes humanos, extraídos, com raízes retas e canais únicos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos para irrigação convencional e PUI. Os canais radiculares foram preparados usando instrumentos do sistema GT (Dentsply Malliefer, Switerzland). Os dentes foram divididos longitudinalmente em dois, as superfícies de dentina intra-radicular foram manchadas com colágeno, os dentes foram remontados, e irrigados com as duas técnicas propostas, com 9, 18, 27 e 36 ml de hipoclorito de sódio 2,5%. Imagens digitais da superfície de dentina foram tomadas antes e após a irrigação dos canais. As imagens digitais foram analisados utilizando o software ImageJ (National Institute of Health, EUA) para quantificar a camada residual de colágeno existente. Os dados foram analisados estatisticamente. A mancha de colágeno não foi completamente removida por nenhuma das duas técnicas de irrigação, mas a PUI foi mais efetiva na remoção de colágeno, especialmente na terço apical do canal radicular.

Além de proporcionar melhores efeitos quando usado no momento da irrigação, sob a substância química auxiliar, tem sido sugerido o uso do ultrassom sobre a MIC, com o intuito de promover maior penetração nos túbulos dentinários do medicamento utilizado, e assim maior desinfecção (Duarte et al., 2012).

Duarte et al. (2012) observou *in vitro* que a ativação ultrassônica de pastas de hidróxido de cálcio ocasionou um aumento do pH e maior liberação de cálcio em raízes com reabsorções externas simuladas.

Arias (2013) avaliou *in vitro* a influência da ativação ultrassônica na atividade antimicrobiana e penetrabilidade de pastas de hidróxido de cálcio com propilenoglicol, com e sem extrato etanólico de própolis. Para isso, 72 tubos de dentina bovina foram infectados com *E. faecalis.* Após o período de contaminação, foram divididos em 4 grupos de acordo com a MIC utilizada e o uso ou não do ultrassom. Os tubos receberam a medicação, nos casos em que esta foi agitada com ultrassom, foi estipulado para ativação o tempo de 1 minuto. Em todos os espécimes a MIC foi mantida durante 15 dias. Através de Microscopia Confocal de

Varredura a laser e cultura microbiológica de raspas de dentina coletadas, foi possível concluir que a agitação ultrassônica das pastas de Hidróxido de Cálcio aumentou sua atividade antimicrobiana e possibilitou maior penetração intratubular, com preenchimento de túbulos dentinários.

Almeida (2016) avaliou o efeito do uso de curativo intracanal de hidróxido de cálcio associado à própole a 10% seguida da agitação ultrassônica em reimplante tardio de dentes de rato, comparado a pasta de hidróxido de cálcio com e sem agitação ultrassônica e hidróxido de cálcio associado à própole a 10% sem agitação ultrassônica. Não houve diferença estatística entre os grupos, demonstrando que o uso do curativo intracanal de hidróxido de cálcio associado à própole a 10% seguido da agitação ultrassônica não se mostrou mais efetivo que o Ca(OH)2 no processo de reparo do reimplante tardio de dentes de rato.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste estudo foi avaliar a eficácia do hipoclorito de sódio 3% gel e medicação intracanal com hidróxido de cálcio, agitados ou não com ultrassom, sobre *E. faecalis* e *E. coli* e, sobre Ácido Lipoteicóico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia – UNESP, sob protocolo número 1.504.962. (ANEXO A).

4.1 Preparo dos espécimes

Foram selecionados 80 dentes humanos unirradiculares extraídos em consultórios particulares de São José dos Campos - SP, que após exodontia foram mantidos imersos em solução fisiológica até o momento do uso. Os dentes foram selecionados pela semelhança morfológica das raízes, sendo escolhidas raízes retas com diâmetros semelhantes.

As coroas foram seccionadas com disco de carburundum, para padronizar o comprimento dos espécimes em 16 +/- 0,5 mm, utilizando um paquímetro digital para confirmação do comprimento. A exploração inicial e patência foraminal foram realizadas utilizando limas do Tipo Kerr #10 (Dentsply Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil). Em seguida, os canais radiculares foram previamente instrumentados no comprimento de trabalho, para padronização do diâmetro inicial utilizando limas R25 do Sistema Reciproc® (VDW, Munich, Germany), acopladas em motor elétrico VDW Silver (VDW, Munich, Germany), no modo Reciproc, seguindo orientações do fabricante. O comprimento de trabalho foi estabelecido no comprimento real do dente (16 mm).

Inicialmente foi realizado preparo do terço cervical, e os canais foram irrigados com 5 ml de solução salina fisiológica. Em seguida foi realizado o preparo dos terços médio e apical, sendo que após o preparo de cada terço, os canais foram copiosamente irrigados com 5 ml de solução salina fisiológica, totalizando 15 ml de solução. Sendo que após o preparo de cada terço foi realizada exploração com lima do tipo K #15. E após a instrumentação a smear layer foi removida preenchendo-se

os canais com 3 ml de EDTA 17% (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil), mantidos por 3 minutos e irrigados com 5 ml de solução salina fisiológica.

Em seguida, foi realizado o vedamento da região apical dos dentes com resina composta fotopolimerizável Z-100 (3M ESPE, Dental Products, Saint Paul, USA). Após as raízes foram impermeabilizadas externamente com uma camada de adesivo epóxi (Brascola, São Paulo, SP, Brasil), exceto a região da abertura cervical.

Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em 8 placas de cultura celular de 24 poços (Costar, New York, NY, USA), com 10 dentes em cada e fixados com resina acrílica quimicamente ativada (Dencor Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 1). As placas foram tampadas e embaladas.

Todos os materiais e instrumentais utilizados nesta pesquisa foram esterilizados por radiação gama com cobalto 60 (20 KGy por 6 h) para neutralizar endotoxinas pré-existentes (Csako et al., 1983). Esta esterilização foi realizada pela EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiação, Cotia, SP, Brasil).

Figura 1 - Placa de cultura celular de 24 poços com espécimes fixados com resina acrílica quimicamente ativada

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Contaminação dos espécimes

Os micro-organismos utilizados foram *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Foi realizada a verificação da pureza das cepas, utilizando meios seletivos para crescimento de cada micro-organismo, e também foi realizada coloração de Gram e avaliação microscópica. Os micro-organismos foram semeados em placas de Petri contendo ágar infusão de cérebro e coração (BHI Agar) (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) para *E. faecalis* e *E. coli*, sendo mantidas em estufa microbiológica a 37ºC ± 1°C por 48 horas, e 24 horas respectivamente.

A partir do crescimento nas placas, foram preparadas suspensões em solução salina fisiológica estéril e apirogênica contendo 10^6 céls/ml, comprovadas pela leitura em espectrofotômetro (modelo B-582, Micronal S/A, Sao Paulo, SP, Brasil). Em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar) (VecoFlow Ltda. – Campinas, SP, Brasil), os canais radiculares foram contaminados com 10 microlitros (µl) da suspensão de *E. coli* e 10 µl de caldo infusão de cérebro e coração (BHI Broth) (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia). Na entrada dos canais foi colocada uma bolinha de algodão apirogênica embebida em caldo BHI. Os poços vazios da placa de 24 poços foram preenchidos com soro fisiológico estéril e apirogênico. Os espécimes foram mantidos em estufa a $37^o \pm 1^oC$, por 7 dias, sendo que a cada 2 dias, foi adicionado caldo BHI no interior dos canais radiculares.

Após 7 dias, foram adicionados aos canais radiculares 10 µl da suspensão de E. faecalis e 10 µl de caldo BHI. Na entrada dos canais, como anteriormente citado, foi colocada uma bolinha de algodão apirogênica embebida em caldo BHI. Os espécimes foram mantidos em estufa a $37^o \pm 1^o$ C, em umidade relativa, por 21 dias, sendo que a cada 2 dias, foi adicionado meio de cultura (caldo BHI) no interior dos canais radiculares até o preenchimento completo dos mesmos (em média 15 a 20 µl) com o auxílio de seringas tipo insulina de 1 ml (Injex Indústrias Cirúrgicas Ltda., Ourinhos, SP, Brasil).

Após 28 dias de incubação, foi realizada coleta de todos os espécimes para confirmação da contaminação dos canais radiculares (descrita no item 4.5).

4.3 Preparo biomecânico

Em todos os grupos, os canais foram instrumentados mecanicamente, no comprimento de trabalho, com limas R40 do sistema Reciproc® (VDW, Munich, Germany), acopladas em motor elétrico VDW Silver (VDW, Munich, Germany), no modo Reciproc, seguindo as orientações do fabricante. Inicialmente os canais foram preenchidos com 0,5 ml de hipoclorito de sódio gel 3%, ChorCid V (Ultradent, South Jordan, UT, USA) (Figura 2). Então, o instrumento Reciproc R40 foi movido em direção apical em um movimento reciprocante realizado com amplitude de 3 mm. A progressão foi realizada com pressão apical até que o instrumento atingiu o terço cervical do canal. Depois de três movimentos, o instrumento foi retirado e limpo, e o canal foi irrigado com 5 ml de solução salina fisiológica estéril e apirogênica. Em seguida, da mesma maneira, foi realizado o preparo dos terços médio e apical, sendo que os canais antes do preparo de cada terço foram inicialmente preenchidos com 0,5 ml de NaOCl 3% gel e após copiosamente irrigados com 5 ml de solução salina fisiológica estéril e apirogênica. Após os canais foram novamente preenchidos com 0,5 ml de NaOCl 3% gel, mantidos por 1 minuto, e novamente irrigados com 5 ml de solução salina fisiológica estéril e apirogênica.

Figura 2 - Hipoclorito de sódio 3% gel utilizado no experimento

Fonte: Elaborado pelo autor.

A irrigação foi realizada com auxílio de agulhas hipodémicas (25X7) e seringas de 10 ml (Injex Indústrias Cirúrgicas Ltda., Ourinhos, SP, Brasil) e a aspiração realizada com bomba à vácuo (NSR, Indústria, Comércio e Representações Ltda.), intermediários e agulhas (40X12) (Nipro Medica Ltda.orocaba, SP, Brasil).

Após para remoção da *smear layer* os canais foram preenchidos com 3 ml de EDTA 17 % durante 3 minutos sob agitação e posterior lavagem com 5 ml de solução salina fisiológica estéril e apirogênico.

Totalizando 2 ml de NaOCl 3% gel e 25 ml de solução salina fisiológica estéril e apirogênica.

Todos os procedimentos foram realizados dentro do fluxo laminar (Figura 3).

Figura 3 - Organização do fluxo laminar para realização dos experimentos

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Divisão dos grupos experimentais

Os espécimes foram divididos em 8 grupos de acordo com o Quadro 1. Sendo inicialmente divididos em 2 grupos de 40 espécimes cada, de acordo com agitação

ou não com ultrassom após a etapa de instrumentação.

Em um segundo momento, os espécimes foram subdivididos em grupos com 10 espécimes cada, de acordo com a agitação ultrassônica ou não da medicação intracanal (MIC) de hidróxido de cálcio, e o tempo de ação desta MIC, 7 ou 14 dias.

Quando houve a agitação ultrassônica do NaOCl 3% gel (grupos 1, 2, 3 e 4), esta foi executada no momento final do PBM por 1 minuto, com o canal radicular inundado com NaOCl 3% gel. Em seguida os canais foram irrigados com 5 ml de solução fisiológica estéril e apirogência. Para padronização dos espécimes, os grupos sem agitação ultrassônica da substância química auxiliar (grupos 5, 6, 7 e 8), também foram preenchidos com NaOCl 3% gel, mantidos por 1 minuto, e irrigados com 5 ml de solução fisiológica estéril e apirogência.

Nos grupos com agitação ultrassônica da MIC, esta foi executada por um 1 minuto, com o canal preenchido pela MIC. Todos os canais radiculares foram preenchidos com auxílio de agulhas Capilary Tips (Ultradent, South Jordan, UT, USA) com pasta de hidróxido de cálcio UltraCal® (Ultradent, South Jordan, UT, USA) até o comprimento de trabalho.

A agitação ultrassônica tanto da substância química auxiliar quanto da MIC, foi realizada de forma passiva utilizando-se um inserto de aço inoxidável E1-Irrisonic, (Helse, Santa Rosa do Viterbo, SP, Brasil) de 0.10 mm de diâmetro, 2mm aquém do comprimento de trabalho, com 10% da potência, como recomendado pelo fabricante, acoplado em aparelho de ultrassom ALT SONIC (Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Quadro 1 - Divisão dos grupos experimentais

Grupo	Ativação do NaOCl 3% gel	Ativação $Ca(OH)_2$	Tempo de curativo
1	Com ativação	Sem ativação	7 dias
2			14 dias
3		Com ativação	7 dias
4			14 dias
5	Sem ativação	Com ativação	7 dias
6			14 dias
7		Sem ativação	7 dias
8			14 dias

Legenda: Quadro com a divisão dos grupos experimentais. De acordo com a ativação do NaOCl (hipoclorito de sódio) 3% gel, ativação do $Ca(OH)_2$ (hidróxido de cálcio) e o tempo de curativo.
Fonte: Elaborado pelo autor.

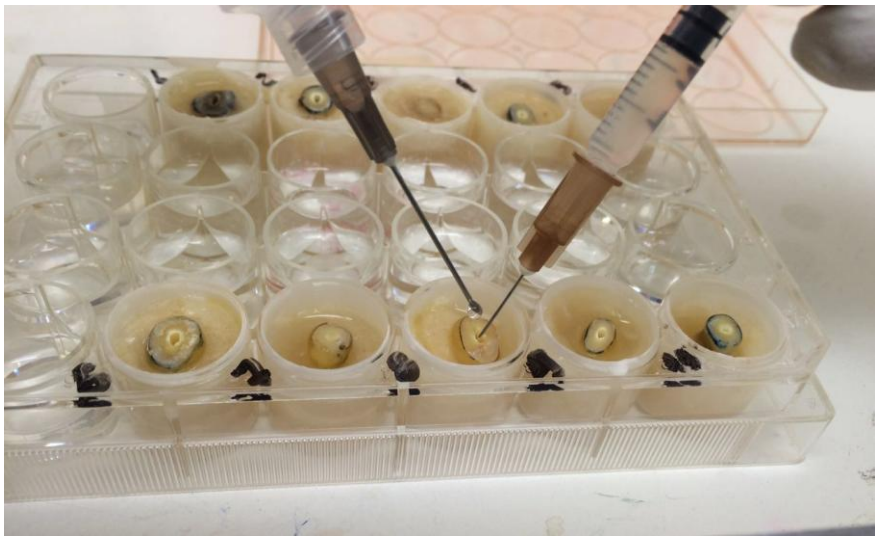
4.5 Coletas do conteúdo dos canais radiculares

Para coleta das amostras do canal radicular, os canais foram preenchidos com solução salina fisiológica e apirogênica. Com auxílio de uma seringa de 1 ml com agulha a solução foi agitada dentro dos canais e então coletou-se todo o conteúdo ali existente com outra seringa de 1 ml (Figura 4). Este procedimento foi realizado até completar a quantidade de 100 µl coletados retirados do canal radicular, os quais foram transferidos para microtubos de centrifugação de 1,5 ml (tipo eppendorf) (Axygen, Union City, USA) contendo 900 µl de soro fisiológico apirogênico (Oliveira et al., 2012; Carvalho et al., 2016).

Foram realizadas 4 coletas do conteúdo dos canais radiculares: Coleta de confirmação (1ª Coleta), coleta logo após o PBM (2ª Coleta), coleta após o preenchimento com EDTA (3ª Coleta) e coleta após 7 ou 14 dias da medicação intracanal (4ª Coleta).

Para todas as amostras coletadas, foram realizadas a avaliação da atividade antimicrobiana e a quantificação de ácido lipoteicóico.

Figura 4 - Coleta do canal radicular



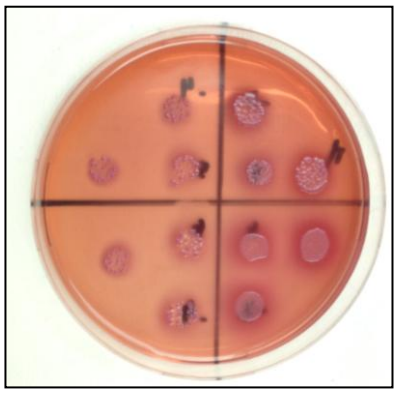
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana

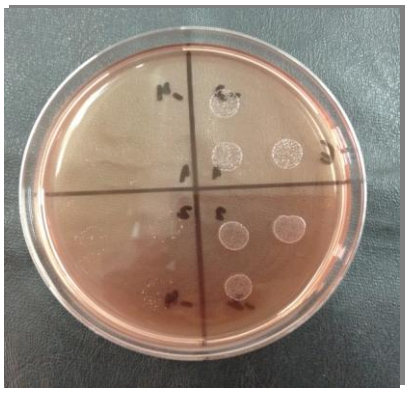
Para determinar a atividade antimicrobiana, foram realizadas diluições seriadas das amostras coletadas do canal radicular e semeadura, em duplicata, em dois diferentes meios de cultura, seletivo para cada micro-organismo: ágar Enterococcosel (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD 21152, USA) para *E. faecalis* e, ágar MacConkey (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) para *E. coli* (Figura 5).

As placas foram mantidas em estufa bacteriológica a 37ºC ± 1ºC por 24 horas, para determinação de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml).

Figura 5 - Placas com colônias de micro-organismos



a



b

Legenda: a) Ágar MacConkey com colônias de *E. coli*; b) Ágar Enterococcosel com colônias de *E. faecalis*.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7 Detecção e quantificação de ácido lipoteicóico

Para detecção e quantificação de ácido lipoteicóico (LTA), placas de microtitulação de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-LTA (anti-LTA monoclonal antibody).

As placas foram mantidas *overnight* a 37ºC. No dia seguinte, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS com 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com

tampão de bloqueio (PBS com 2% de soro albumina bovina, BSA) por 1 hora a temperatura ambiente. Após, foram lavadas com tampão de lavagem e receberam 100 μL das amostras coletadas dos canais radiculares e 100 μL dos padrões de LTA com concentrações conhecidas (curva-padrão). As placas foram mantidas 2 horas a temperatura ambiente. Após, as placas foram novamente lavadas e foram acrescentados 100 μL de anticorpo anti-LTA. As placas foram mantidas por 1 hora em temperatura ambiente. Após lavagem, foram acrescentados 100 μL de anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase (horseradish peroxidase HRP conjugated ati-rabbit IgG antibody). Após 1 hora em temperatura ambiente, as placas foram lavadas e a reação foi revelada utilizando tetrametilbenzidina (TMB). Após, foram adicionados em cada poço da placa solução *stop* (ácido sulfúrico 2 N) (Figura 6) e as densidades ópticas (DO) foram lidas no leitor de microplacas (Biotek) com comprimento de onda de 450 nm e 570 nm.

Figura 6 - Reação revelada utilizando tetrametilbenzidina (TMB). Adição da solução stop (ácido sulfúrico 2 N)

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.8 Análise estatística

A análise dos resultados foi submetida ao teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn com nível de significância de 5 %.

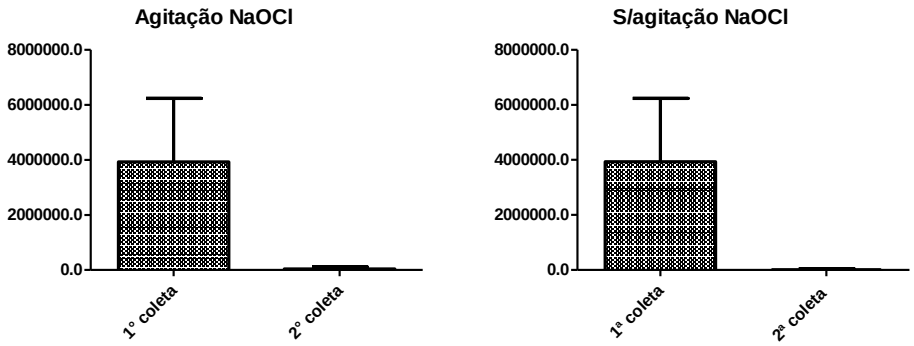
5 RESULTADO

5.1 Análise microbiológica - Eficácia do hipoclorito de sódio 3% gel agitado ou não por ultrassom, sobre micro-organismos

5.1.1 Sobre *E. faecalis*

A atividade antimicrobiana do gel de NaOCl 3% foi observada para todos os grupos. Demonstrando diferença estatística entre a 1ª coleta (coleta de confirmação) e as demais coletas. No entanto não houve diferença estatística entre os grupos com ou sem agitação ultrassônica da substância química auxiliar (Figura 7).

Figura 7 - Gráficos em barras do percentual de redução de *E. faecalis* das 1ª e 2ª coleta, dos grupos com e sem agitação ultrassônica da substância química auxiliar



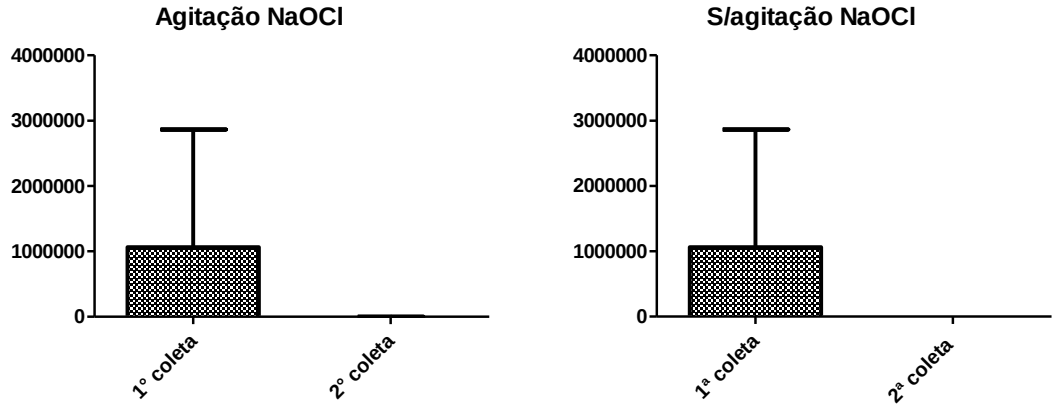
Legenda: Grupo com e sem agitação do NaOCL (hipoclorito de sódio 3% gel) respectivamente.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.2 Sobre *E. Coli*

A atividade antimicrobiana do gel de NaOCl 3% foi observada para todos os grupos. Demonstrando diferença estatística entre a 1ª coleta (coleta de confirmação)

e as demais coletas. No entanto não houve diferença estatística entre os grupos com e sem agitação com ultrassom da substância química auxiliar (Figura 8).

Figura 8 - Gráficos em barras do percentual de redução de *E. coli* das 1ª e 2ª coleta, dos grupos com e sem agitação com ultrassom da substância química auxiliar



Legenda: Grupo com e sem agitação do NaOCL (hipoclorito de sódio 3% gel) respectivamente.
Fonte: Elaborado pelo autor.

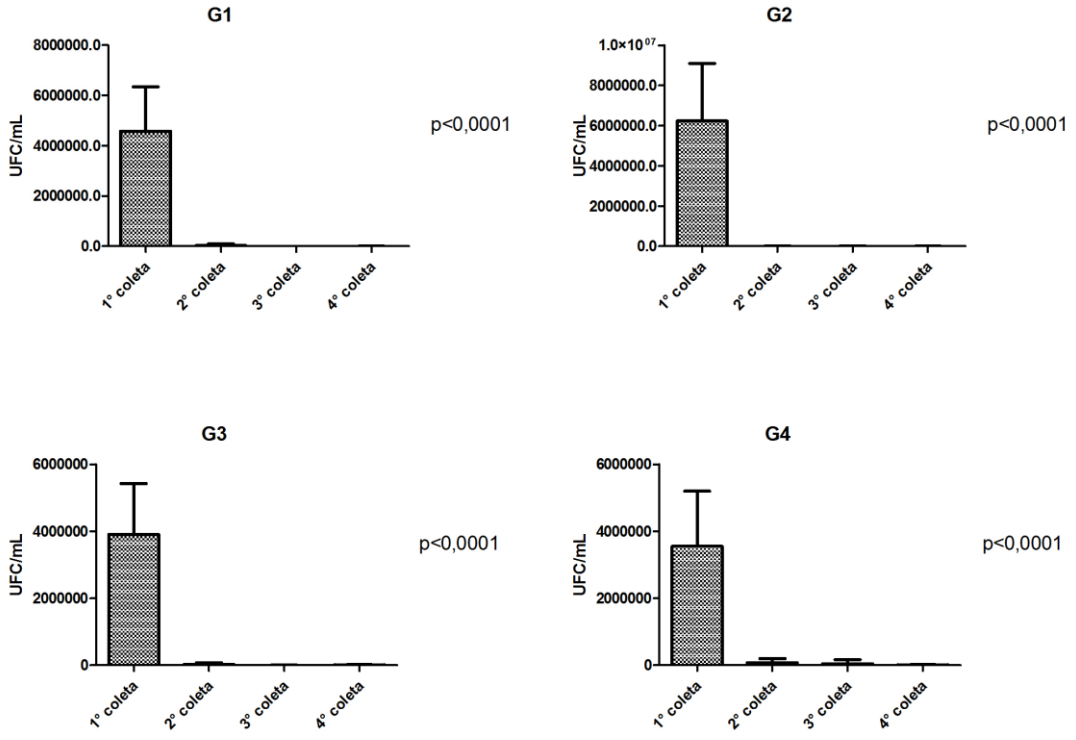
5.2 Análise microbiológica - Eficácia da agitação ultrassônica da MIC sobre micro-organismos

5.2.1 Sobre *E. Faecalis*

A figura 9 demonstra o gráfico dos resultados obtidos para os grupos 1, 2, 3 e 4, os quais durante o PBM foi realizada a agitação do NaOCl 3% gel. Quanto a agitação da MIC, não foi possível observar diferença estatística entre os grupos, visto que *E. Faecalis* foi eliminado quase completamente durante o PBM.

Figura 9 - Gráficos em barras dos resultados obtidos pela contagem de UFC/ml, das quatro coletas dos grupos 1, 2, 3 e 4

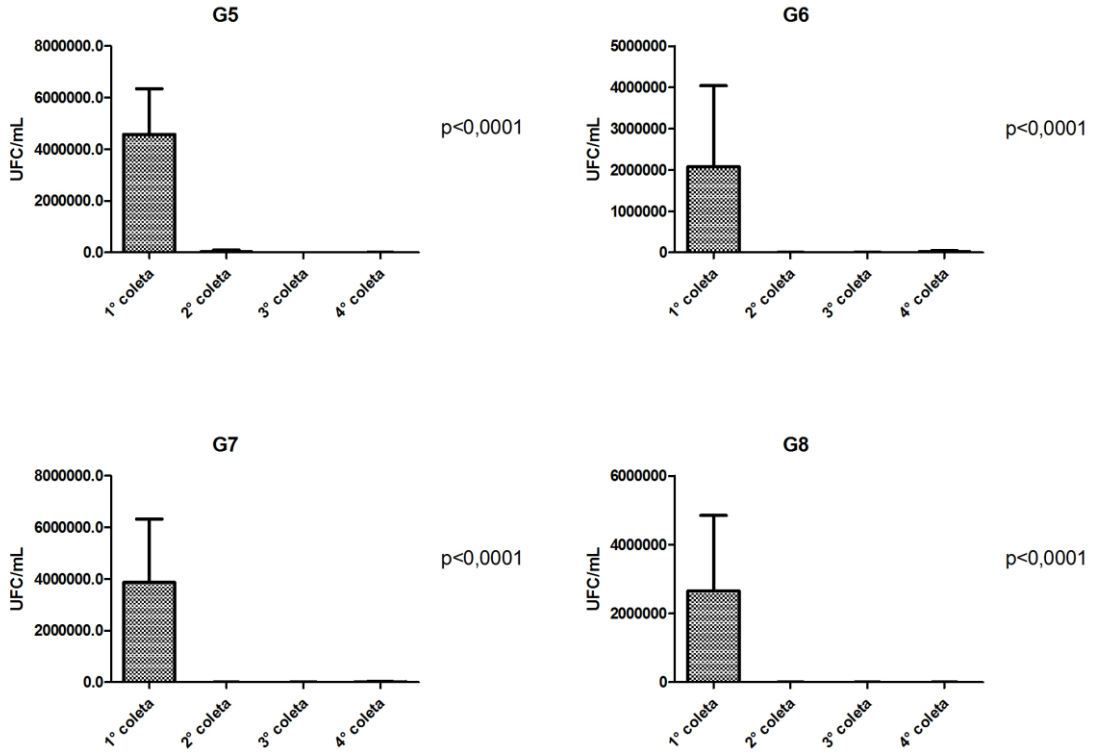
.



Legenda: Grupo 1: PBM com ativação ultrassônica final/ MIC 7 dias sem ativação ultrassônica; Grupo 2: PBM com ativação ultrassônica final/ MIC 14 dias sem ativação ultrassônica; Grupo 3: PBM com ativação ultrassônica final/ MIC 7 dias sem ativação ultrassônica; Grupo 4: PBM com ativação ultrassônica final/ MIC 14 dias sem ativação ultrassônica.
Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 10 demonstra o gráfico dos resultados obtidos para os grupos 5,6,7 e 8 os quais durante o PBM não foi realizada a agitação do NaOCl 3% gel. Quanto a agitação da MIC, não foi possível observar diferença estatística entre os grupos, visto que *E. Faecallis* foi eliminado quase completamente durante o PBM.

Figura 10 - Gráficos em barras dos resultados obtidos pela contagem de UFC/ml, das quatro coletas dos grupos 5,6,7 e 8

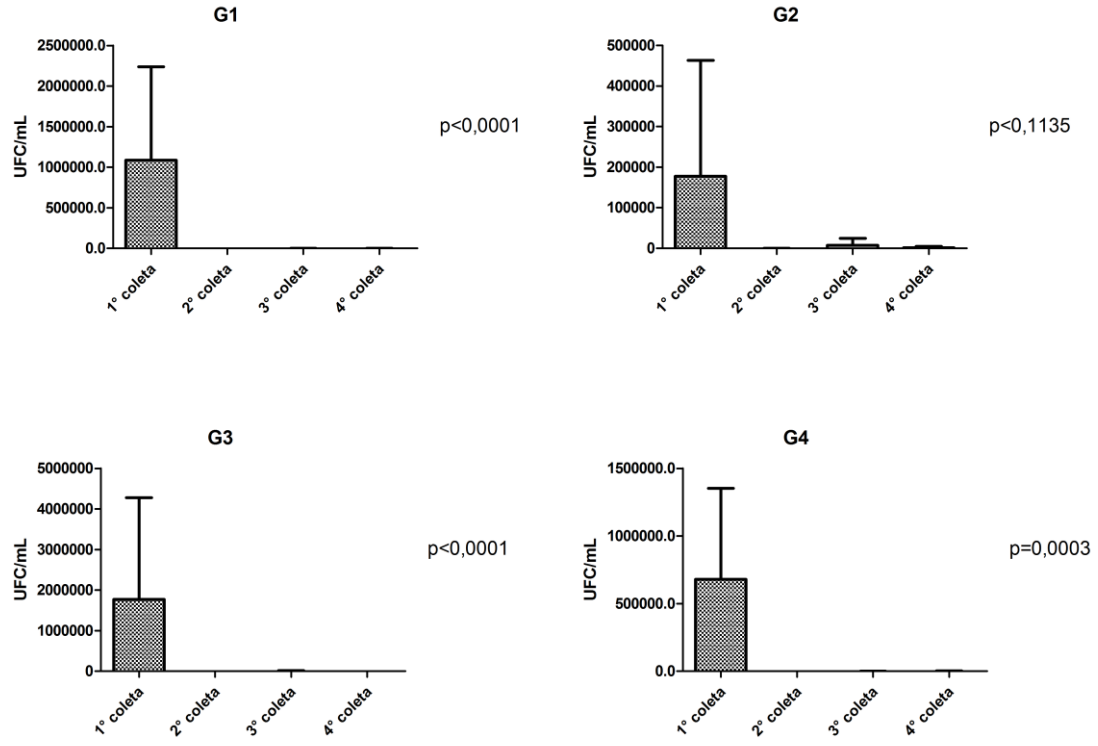


Legenda: Grupo 5: PBM sem ativação ultrassônica final/ MIC 7 dias com ativação ultrassônica; Grupo 6: PBM sem ativação ultrassônica final/ MIC 14 dias com ativação ultrassônica; Grupo 7: PBM sem ativação ultrassônica final/ MIC 7 dias com ativação ultrassônica; Grupo 8: PBM sem ativação ultrassônica final/ MIC 14 dias com ativação ultrassônica.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.2 Sobre *E. Coli*

A figura 11 demonstra o gráfico dos resultados obtidos para os grupos 1, 2, 3 e 4, os quais durante o PBM foi realizada a agitação do NaOCl 3% gel. Quanto a agitação da MIC, não foi observada diferença estatística entre os grupos, visto que *E. Coli* foi eliminado quase completamente durante o PBM.

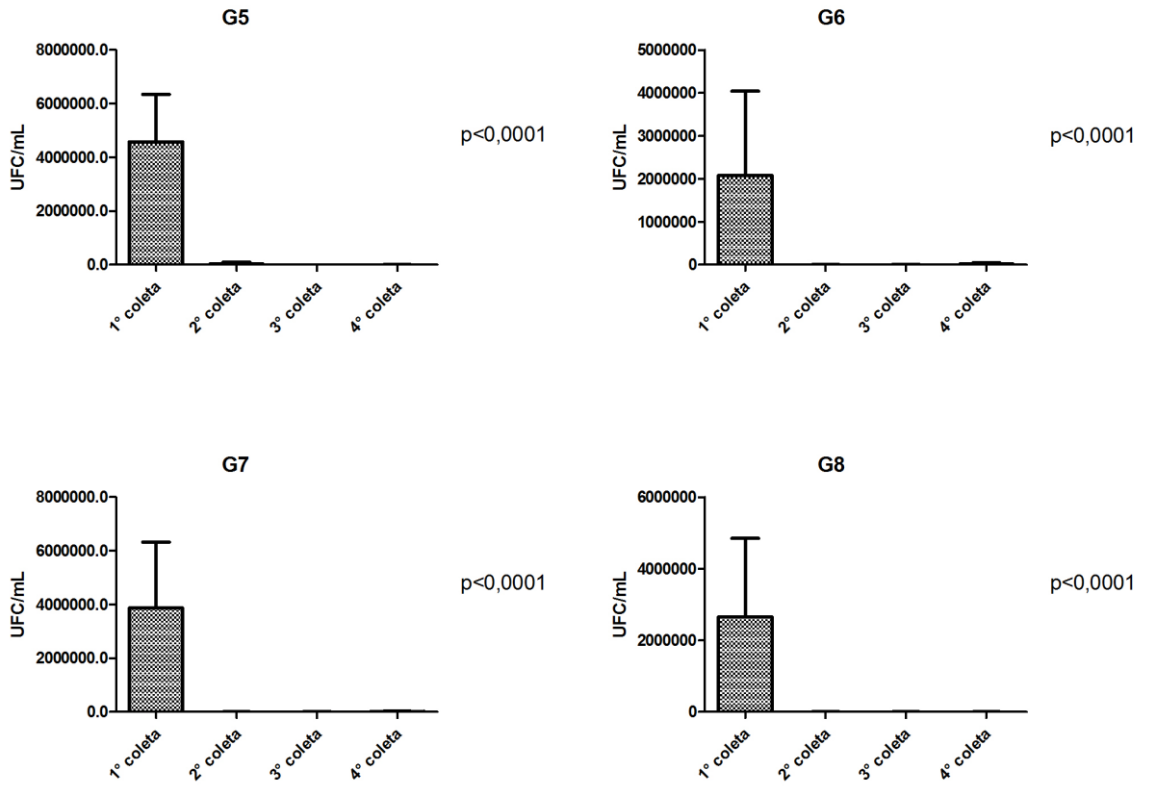
Figura 11 - Gráficos em barras dos resultados obtidos pela contagem de UFC/ml, das quatro coletas dos grupos 1, 2, 3 e 4



Legenda: Grupo 1: PBM com ativação ultrassônica final/ MIC 7 dias sem ativação ultrassônica; Grupo 2: PBM com ativação ultrassônica final/ MIC 14 dias sem ativação ultrassônica; Grupo 3: PBM com ativação ultrassônica final/ MIC 7 dias sem ativação ultrassônica; Grupo 4: PBM com ativação ultrassônica final/ MIC 14 dias sem ativação ultrassônica.
Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 12 demonstra o gráfico dos resultados obtidos para os grupos 5, 6, 7 e 8 os quais durante o PBM não foi realizada a agitação do NaOCl 3% gel. Quanto a agitação da MIC, não foi observada diferença estatística entre os grupos, visto que *E. Coli* foi eliminado quase completamente durante o PBM.

Figura 12 - Gráficos em barras dos resultados obtidos pela contagem de UFC/ml, das quatro coletas dos grupos 5,6,7 e 8



Legenda: Grupo 5: PBM sem ativação ultrassônica final/ MIC 7 dias com ativação ultrassônica; Grupo 6: PBM sem ativação ultrassônica final/ MIC 14 dias com ativação ultrassônica; Grupo 7: PBM sem ativação ultrassônica final/ MIC 7 dias com ativação ultrassônica; Grupo 8: PBM sem ativação ultrassônica final/ MIC 14 dias com ativação ultrassônica.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Detecção e Quantificação de LTA

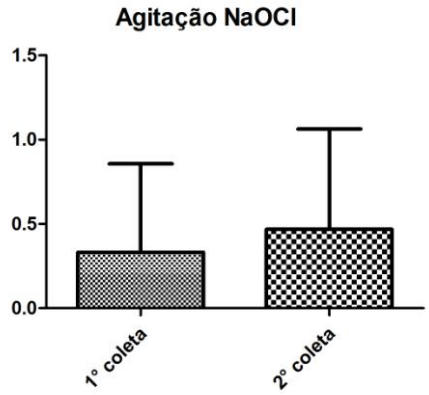
5.3.1 Eficácia da agitação ultrassônica do hipoclorito de sódio 3% gel sobre LTA

A análise estatística realizada foi baseada nos percentuais de alteração referente á redução da quantidade de ácido lipoteicóico (EU/ml) da 1ª coleta (coleta de confirmação) com a 2ª coleta (logo após o PBM) dos grupos onde foi realizada a

agitação do NaOCl 3% gel (Figura 13) como para os grupos onde não houve a agitação do NaOCl 3% gel (Figura 14).

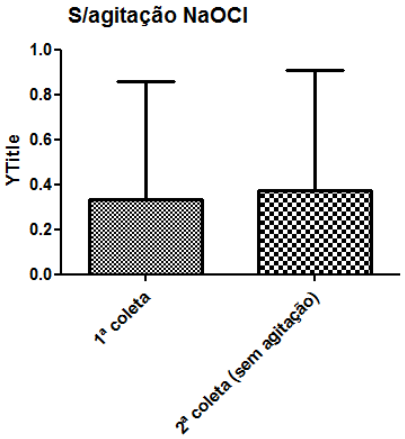
Pôde-se observar que não houve diferença estatística entre a 1ª coleta e a segunda coleta tanto para os grupos com ativação como os sem ativação do NaOCl 3% gel com ultrassom. Em todos os grupos pôde-se observar um discreto aumento do LTA entre a 1ª e 2ª coletas, mas não houve diferença estatística.

Figura 13 - Gráfico em barras da média da primeira e segunda coletas dos grupos 1, 2,3 e 4, nos quais foi realizada a agitação do NaOCl 3% gel



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 - Gráfico em barras da média da primeira e segunda coletas dos grupos 5, 6, 7 e 8, nos quais não foi realizada a agitação do NaOCl 3% gel



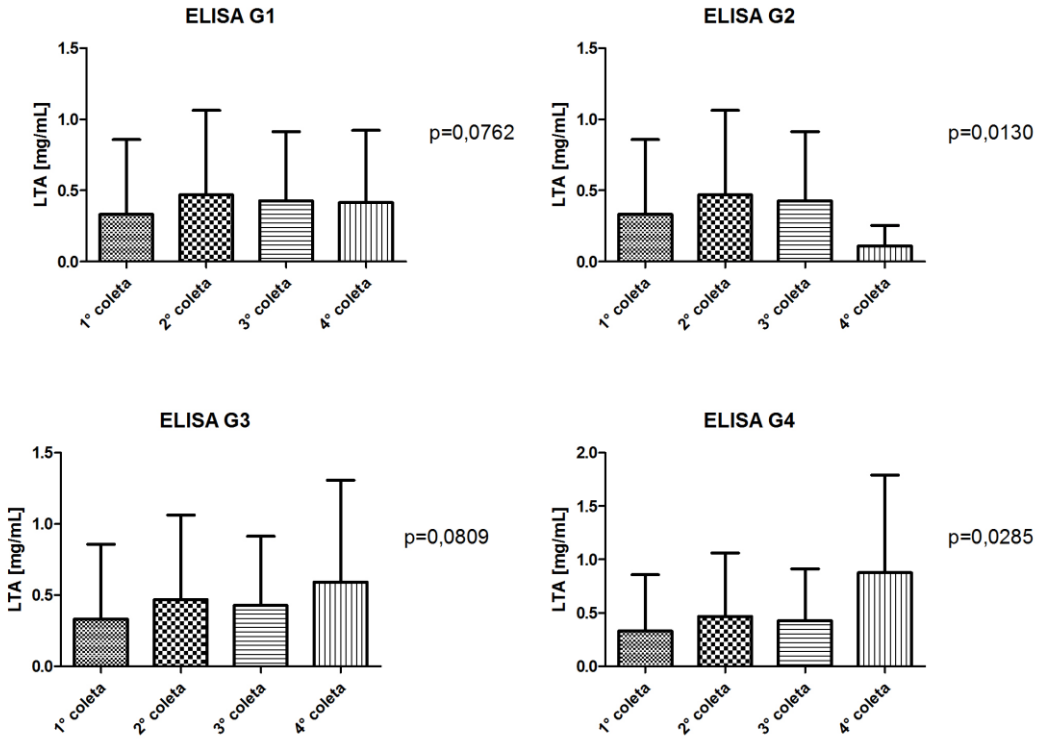
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.2 Eficácia da agitação ultrassônica da MIC sobre LTA

A eficácia da agitação da MIC sobre LTA para todos os grupos pôde ser observada pelos percentuais de alteração referente á diminuição ou aumento da quantidade de ácido lipoteicóico (EU/ml) quando comparadas as média estatísticas das coletas 1, 2 e 3 com a 4ª coleta (após a MIC).

A figura 15 demonstra o gráfico dos resultados obtidos para os grupos 1, 2, 3 e 4. Ao comparar os grupos 1, 2, 3 e 4 , onde realizou-se a ativação do NaOCl 3% gel, verificou-se que no grupo 2 (grupo sem ativação da MIC, mantida durante 7 dias) houve diferença estatística entre a terceira e quarta coletas. (p=0,0130)

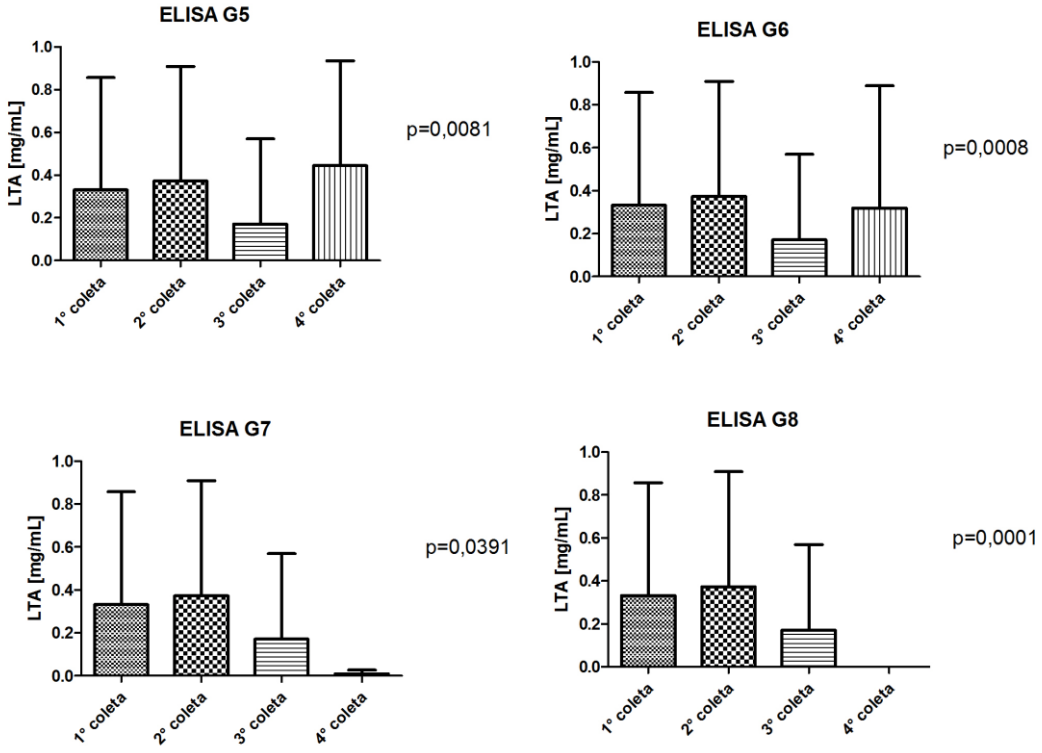
Figura 15 - Gráficos em barras dos resultados obtidos pelo teste de Elisa, das quatro coletas dos grupos 1, 2, 3 e 4



Legenda: Grupo 1: PBM com ativação ultrassônica final/ MIC 7 dias sem ativação ultrassônica; Grupo 2: PBM com ativação ultrassônica final/ MIC 14 dias sem ativação ultrassônica; Grupo 3: PBM com ativação ultrassônica final/ MIC 7 dias sem ativação ultrassônica; Grupo 4: PBM com ativação ultrassônica final/ MIC 14 dias sem ativação ultrassônica.
Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 16 demonstra o gráfico dos resultados obtidos para os grupos 5,6,7 e 8 nos quais durante o PBM não foi realizada a agitação do NaOCl 3% gel. Foi possível observar diferença estatística relevante, entre a segunda e quarta coletas nos grupos 7 e 8 (grupo 7: sem ativação da MIC, 7 dias; grupo 8: sem ativação da MIC, 14 dias).

Figura 16 - Gráficos em barras dos resultados obtidos pelo teste de Elisa, das quatro coletas dos grupos 5,6,7 e 8



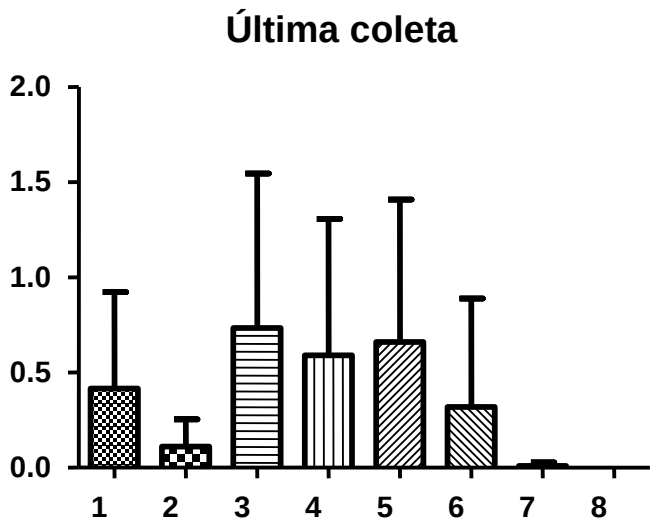
Legenda: Grupo 5: PBM sem ativação ultrassônica final/ MIC 7 dias com ativação ultrassônica; Grupo 6: PBM sem ativação ultrassônica final/ MIC 14 dias com ativação ultrassônica; Grupo 7: PBM sem ativação ultrassônica final/ MIC 7 dias com ativação ultrassônica; Grupo 8: PBM sem ativação ultrassônica final/ MIC 14 dias com ativação ultrassônica.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.3 Eficácia dos tratamentos propostos para redução de LTA

A eficácia dos tratamentos propostos para redução de LTA para todos os grupos pôde ser comparada pelas médias estatísticas dos grupos na última coleta.

Apresentando como grupos homogêneos, que tiveram os melhores resultados, os grupos 1, 2, 7 e 8. (Figura 17) (grupo 1: com agitação do NaOCl, sem agitação da MIC, 7 dias; grupo 2: com agitação do NaOCl, sem agitação da MIC, 14 dias; grupo 7: sem agitação do NaOCl, sem agitação da MIC, 7 dias; grupo 8: sem agitação do NaOCl, sem agitação da MIC, 14 dias).

Figura 17 - Gráfico em barras das médias de LTA na 4ª coleta de todos os grupos



Legenda:Gráfico com a média de LTA da última coleta dos grupos 1 a 8.
Fonte: Elaborada pelo autor.

6 DISCUSSÃO

6.1 Sobre o tema da pesquisa

Micro-organismos desempenham papel fundamental na etiologia de patologias pulpares e periapicais. (Kakehashi et al., 1965). Mesmo em dentes tratados adequadamente podem haver falhas que podem ocasionar insucessodo tratamento, nestes casos a principal causa de falha pode ser a persistência bacteriana em áreas anatômicas desafiadoras, como canais laterais, istmo, ramificações apicais e túbulos dentinários (Ricucci et al., 2009), e até mesmo falhas na descontaminação. O preparo biomecânico é capaz de reduzir a microbiota presente em canais infectados, mas muitas vezes não completamente a ponto de ocasionar uma desinfecção adequada. A partir disso, justifica-se a pesquisa por substâncias químicas auxiliares e métodos que possibilitem uma desinfecção mais efetiva dos canais radiculares.

A substância química auxiliar mais utilizada em endodontia é o hipoclorito de sódio, que apesar das suas propriedades antimicrobiana e solvente de matéria orgânica, possui um efeito adverso que é ser tóxico aos tecidos perirradiculares (Hulsmann, Hahn, 2000). A utilização de uma formulação em gel do hipoclorito de sódio tem sido sugerida. Esta se mostrou eficaz em remover *smear layer* em canais radiculares (Zand et al., 2010). A formulação em gel apresenta maior viscosidade, sua utilização é feita de forma passiva, o que pode evitar acidentes e, portanto os efeitos negativos do uso de uma solução de hipoclorito de sódio.

A utilização do ultrassom para agitação da substância química auxiliar como método complementar a irrigação convencional tem sido relevante uma vez que estudos demonstraram contribuição para remoção de *smear layer* (van der Sluis et al., 2005), maior limpeza dos canais inclusive em áreas de istmo (Burleson et al., 2007), maior dissolução tecidual, devido a aumento da temperatura da substância química auxiliar (Al-Jadaa et al., 2009). Resultando em maior redução de micro-organismos e biofilme (Cachovan et al., 2013; Joy et al., 2015).

Neste estudo foi utilizada uma medicação intracanal de hidróxido de cálcio, associada a veículo aquoso, mantida durante 7 ou 14 dias no interior dos canais. Alguns autores preconizam o período de 14 dias para que a medicação intracanal de hidróxido de cálcio possa difundir-se nas áreas de propagação microbiana e desta forma ter ação mais efetiva (Nerwich et al., 1993). Leonardo et al. (2002b) verificaram que os melhores resultados histopatológicos após utilização do hidróxido de cálcio como medicação intracanal, ocorreram de 15 a 30 dias. Mesmo em pH elevado, 7 dias podem não ser tempo suficiente para pastas de hidróxido de cálcio matar células bacterianas organizadas em biofilme (Zancan et al., 2016). Contudo, no presente estudo optou-se por avaliar a ação desta MIC também em 7 dias, a fim de verificar se a agitação ultrassônica desta possibilitaria a redução do tempo de curativo. Segundo Duarte et al. (2012) o uso do ultrassom sobre a MIC tem o intuito de promover maior penetração nos túbulos dentinários do medicamento utilizado, e assim maior desinfecção. Esse mesmo autor observou que a ativação ultrassônica de pastas de hidróxido de cálcio ocasionou um aumento do pH e maior liberação de cálcio em raízes extraídas.

Segundo Arias (2013) a agitação promovida pelo ultrassom pode proporcionar maior impulsionamento da pasta de hidróxido de cálcio resultando em uma maior penetração intratubular observada por Microscopia Confocal de Varredura a Laser, resultando em menor viabilidade bacteriana quando a agitação foi realizada. No entanto Almeida (2016) observou que a agitação ultrassônica de duas diferentes medicações intracanais não se mostrou mais efetiva no processo de reparo de reimplante tardio de dentes de rato.

6.2 Da Metodologia

Para este estudo foram utilizados dentes unirradiculares humanos extraídos. A utilização de dentes humanos envolve desafios relacionados a dificuldade de obtenção de dentes humanos hígidos em quantidade suficiente. Além disso, dificuldade com a necessidade de padronização dos espécimes. A decisão por utilizar dentes humanos, ao invés de bovinos, que têm sido bastante utilizados em

pesquisas *in vitro* em odontologia foi por estudos demonstrarem que existem diferenças micromorfológicas entre os dentes humanos e bovinos. (Dutra-Correa et al., 2007). Dentes humanos apresentam uma maior densidade tubular e túbulos dentinários de menor diâmetro em relação aos dentes bovinos. (Lamosa, 2001). Para este estudo foram selecionados dentes que apresentavam raízes retas, bem como raízes com morfologia e diâmetros semelhantes. Para padronização do diâmetro inicial dos canais utilizou-se limas R25 do Sistema Reciproc (VDW, Munich, Germany), acopladas em motor elétrico VDW Silver (VDW, Munich, Germany), no modo Reciproc, seguindo orientações do fabricante. E o comprimento dos espécimes foi padronizado em 16 mm ± 0,5 mm (Menezes et al., 2004).

A região apical das raízes foi vedada com resina fotopolimerizável, e o longo eixo foi impermeabilizado externamente com resina epóxi. Esses cuidados são tomados a fim de vedar possíveis ramificações do canal radicular e forame apical (Oliveira et al., 2005).

As raízes foram fixadas em placas de cultura de células de 24 poços com resina acrílica, a fim de evitar o manuseio e contaminação destas. (Oliveira et al., 2007). Pois as placas, assim como todos os materiais e instrumentais utilizados nesta pesquisa foram submetidos a esterilização por radiação gama com cobalto 60 (20 KGy por 6 h) para neutralizar toxinas pré-existentes (Csako et al., 1983).

Tendo conhecimento do caráter polimicrobiano das infecções endodônticas (Narayanan, Vaishnavi, 2010), os micro-organismos utilizados para contaminação das raízes foram *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*, com o intuito de cultivar tanto uma espécie Gram - quanto Gram +, propiciando a formação de um biofilme. A contaminação ocorreu num período de 28 dias, que segundo Maekawa et al. (2010) apenas após 28 dias é possível verificar a penetração destes micro-organismos nos túbulos dentinários através de microscopia eletrônica de varredura.

Para preparo dos canais radiculares foi feita a escolha pelo sistema Reciproc, um sistema rotatório, reciprocante, de lima única. Sistemas de lima única tem se destacado pela facilidade de utilização. Estudos demonstram que em relação à redução de endotoxinas e bactérias cultiváveis em canais radiculares, sistemas de lima única reciprocantes se mostraram tão efetivos quanto sistemas rotatórios multi-limas. (Martinho et al., 2014) É importante ressaltar, que estudos que demonstrem a redução do LTA através do PBM são escassos na literatura.

Os canais foram preenchidos com medicação intracanal de hidróxido de cálcio. Foi utilizada a pasta UltraCal, medicação à base de hidróxido de cálcio disponível comercialmente. Esta consiste numa pasta que contém em sua composição a associação de hidróxido de cálcio, sulfato de bário $(BaSO)_4$, água e outros componentes (Komabayashi et al., 2014).

A agitação ultrassônica foi realizada no momento final do preparo biomecânico, durante 1 minuto. Estudos mostram que 30 segundos a 1 minuto são suficientes para que aconteça a ação do ultrassom sobre a substância química auxiliar (Sabins et al., 2003). Este mesmo tempo foi utilizado para a agitação da medicação intracanal (Arias, 2013).

A detecção e quantificação de LTA pelo teste de Elisa, trata-se de uma metodologia inovadora, recém estabelecida pelos pesquisadores que estudam esta molécula, em nossa instituição, pois ainda não são disponíveis no mercado kits para quantificação de LTA, como existem para LPS, como o teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (Oliveira et al., 2012; Xavier et al., 2013).

6.3 Dos resultados

As soluções de hipoclorito de sódio apresentam grande capacidade antimicrobiana. (Xavier et al., 2013). Neste estudo tanto para *E. faecallis*, quanto para *E. coli* o hipoclorito de sódio 3% gel exerceu atividade antimicrobiana, apresentando redução estatística da 1ª coleta para as demais coletas. Apesar de ser um gel, e ter maior viscosidade, o material e a técnica de irrigação utilizada foram capazes de eliminar quase que completamente o conteúdo microbiano dos canais. Além da substância química auxiliar, pode-se atribuir essa redução da carga microbiana a instrumentação mecanizada realizada. Neste estudo o PBM foi realizado utilizando limas Niti reciprocantes. Sabe-se que o PBM é capaz reduzir a carga microbiana independente do sistema de instrumentação utilizado. (Martinho et al., 2014; Marinho et al., 2015; Neves et al., 2016).

A agitação do hipoclorito de sódio solução demonstra potencial aumento da atividade antimicrobiana da substância química auxiliar. (Cachovan et

al., 2013). Neste estudo foi observado o mesmo percentual de redução para os grupos com e sem agitação da substância química auxiliar, não havendo diferença estatística entre eles. Esse resultado demonstra que a agitação ultrassônica do hipoclorito de sódio na forma gel não interfere no seu potencial antimicrobiano. Outros estudos que avaliem a potencialização da atividade antimicrobiana através da agitação ultrassônica para hipoclorito de sódio na forma gel são escassos na literatura.

A análise microbiológica dos efeitos da agitação ultrassônica da MIC não demonstrou diferença estatística em nenhum dos grupos. A MIC de hidróxido de cálcio foi eficiente para manutenção da redução de *E. faecalis* e *E.Coli.*

A análise estatística da quantificação de LTA nas quatro coletas permitiu observar que o hipoclorito de sódio 3% gel, bem como o PBM não foram capazes de neutralizá-lo. Embora LPS e LTA apresentem semelhanças estruturais e também nas propriedades patogênicas, neste estudo pode-se concluir que devem ser atribuídos comportamentos diferentes para estas duas toxinas, uma vez que Martinho et al. (2014) demonstraram redução significativa na quantificação de LPS em canais radiculares com o PBM , intrumentação rotatória com instrumentos NiTi, o que não foi observado para quantificação de LTA neste estudo.

A agitação ultrassônica também não exerceu diferença estatística para redução de LTA nos grupos testados. Quanto à agitação da MIC foi possível observar diferença estatística entre os grupos, sendo os melhores resultados atribuídos aos grupos onde não houve agitação da MIC. Resultado semelhante foi observado por Almeida (2016), onde a realização da agitação ultrassônica da MIC não se mostrou mais efetivo que o uso da MIC sem agitação no processo de reparo do reimplante tardio de dentes de rato.

A MIC de hidróxido de cálcio se mostrou eficiente para redução de LTA. A literatura demonstra que o pré-tratamento do LTA com hidróxido de cálcio inibiu sua atividade imunoestimuladora, como a de induzir liberação de TNF-α em macrófagos (Baik et al., 2008a; Hong et al., 2014). Baik et al. (2011) verificaram que o tratamento de LTA com hidróxido de cálcio inibiu significativamente a produção de óxido nítrico, MIP-1α e IP-10 em cultura de macrófagos (RAW 264.7). Além disso, pode-se observar a maior redução no grupo sem agitação da MIC, mantido por 14 dias.

A análise estatística da média das últimas coletas de todos os grupos pôde

indicar para redução de LTA entre todos os tratamentos realizados que o melhor protocolo foi o que não houve agitação da substância química auxiliar, nem da MIC e utilizou a MIC de hidróxido de cálcio por 14 dias.

7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que:

a) O hipoclorito de sódio 3% gel usado durante o PBM foi efetivo na eliminação de *E. faecalis e E. coli* independente da ativação ultrassônica ou não;
b) O PBM com limas NiTi e hipoclorito de sódio 3% gel não conseguiu detoxificar o LTA presente no sistema de canais radiculares;
c) A MIC com hidróxido de cálcio ativada por ultrassom não foi eficiente na redução de LTA;
d) Os melhores resultados com relação a MIC com hidróxido de cálcio foram verificadas quando utilizada por 14 dias sem ativação ultrassônica.

REFERÊNCIAS*

Ahmad M, Pitt Ford TR, Crum LA. Ultrasonic debridement of root canals: an insight into the mechanisms involved. J Endod. 1987;13(3):93-101. doi: 10.1016/S0099-2399(87)80173-5. PubMed PMID: 3471836.

Al-Jadaa A, Paqué F, Attin T, Zehnder M. Necrotic pulp tissue dissolution by passive ultrasonic irrigation in simulated accessory canals: impact of canal location and angulation. Int Endod J. 2009;42(1):59-65. doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01497.x. PubMed PMID: 19125981.

Almeida, MM. Avaliação do hidróxido de cálcio associado à própole com agitação ultrassônica como curativo intracanal em reimplante dentário tardio [dissertação]. Araçatuba (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araçatuba; 2016.

Arias MPC. Influência da agitação ultrassônica na ação antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio e própolis [dissertação]. Bauru (SP): Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Odontologia de Bauru; 2013.

Baik JE, Jang KS, Kang SS, Yun CH, Lee K, Kim BG, et al. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from enterococcus faecalis through deacylation of the lipid moiety. J Endod. 2011;37(2):191-6. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.007. PubMed PMID: 21238801.

Baik JE, Kum KY, Yun CH, Lee JK, Lee K, Kim KK, et al. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from Enterococcus faecalis. J Endod. 2008a;34(11):1355-9. doi: 10.1016/j.joen.2008.08.014 PubMed PMID: 18928846.

Baik JE, Ryu YH, Han JY, Im J, Kum KY, Yun CH, et al. Lipoteichoic acid partially contributes to the inflammatory responses to enterococcus faecalis. J Endod. 2008b;34(8):975-82. doi: 10.1016/j.joen.2008.05.005. PubMed PMID: 18634930.

Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of enterococcus faecalis isolates from teeth with failure of the endodontic treatment. J Endod. 2016a;S0099-2399(16):30104-2 doi: 10.1016/j.joen.2016.03.015. PubMed PMID: 27221594.

Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of lipoteichoic acid contents and cultivable bacteria at the different phases of the endodontic retreatment. J Endod. 2016b;42(4):552-6. doi: 10.1016/j.joen.2016.01.002. PubMed PMID: 27000273.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Burleson A, Nusstein J, Reader A, Beck M. The in vivo evaluation of hand rotary ultrasound instrumentation in necrotic, human mandibular molars. J Endod. 2007;33(7):782-7. doi: 10.1016/j.joen.2007.04.015. PubMed PMID: 17804312.

Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. Scand J Dent Res. 1981;89(4):321-8. PubMed PMID: 6947391.

Cachovan G, Schiffner U, Altenhof S, Guentsch A, Pfister W, Eick S. Comparative antibacterial efficacies of hydrodynamic and ultrasonic irrigation systems in vitro. J Endod. 2013;39(9):1171-5. PubMed PMID: 23953293.

Cheung GS, Stock CJ. In vitro cleaning ability of root canal irrigants with and without endosonics. Int Endod J. 1993;26(6):334-43. PubMed PMID:8144242.

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

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

Cunninghan WT, Balekjian AY. Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1980a;49(2):175-7. PubMed PMID: 6928291.

Cunninghan WT, Joseph SW. Effect of temperature on the bactericidal action of sodium hypochlorite endodontic irrigant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1980b; 50(6):569-71. PubMed PMID: 6779248.

Dakin HD. The antiseptic action of hypochlorites: the ancient history of the "new antiseptic.". Br Med J. 1915;2(2866):809-10. PubMed PMID: 20767916.

De Almeida AP, Souza MA, Miyagaki DC, Dal Bello Y, Cecchin D, Farina AP. Comparative evaluation of calcium hypochlorite and sodium hypochlorite associated with passive ultrasonic irrigation on antimicrobial activity of a root canal system infected with enterococcus faecalis: an in vitro study. J Endod. 2014;40(12):1953-7. doi: 10.1016/j.joen.2014.08.025. PubMed PMID: 25282371

do Nascimento AL, Busanello FH, Só MV, Kuga MC, Pereira JR, Grecca FS.Residues of different gel formulations on dentinal walls: A SEM/EDS analysis. Microsc Res Tech. 2015 Jun;78(6):495-9. doi: 10.1002/jemt.22500. Epub 2015 Mar 24.doi: 10.1002/jemt.22500. PMID:25808107

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

Dutra-Correa M, Anauate-Netto C, Arana-Chavez VE. Density and diameter of dentinal tubules in etched and non-etched bovine dentine examined by scanning electron microscopy. Arch Oral Biol.2007 Sep;52(9):850-5. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2007.03.003. PubMed PMID:17433249

Gatot A, Arbelle J, Leiberman A, Yanai-Inbar I. Effects of sodium hypochlorite on soft tissues after its inadvertent injection beyond the root apex. J Endod. 1991;17(11):573-4. PubMed PMID: 1812208.

Gomes BP, Ferraz CC,Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ.In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of Enterococcus faecalis. Int Endod J.2001 Sep;34(6):424-8. PubMed PMID:11556507

Grossman LL, Meiman BW. Solution of pulp tissue by chemical agents. JADA. 1941;28(2):223-5.

Hong SW, Baik JE, Kang SS, Yun CH, Seo DG, Han SH. Lipoteichoic acid of streptococcus mutans interacts with Toll-like receptor 2 through the lipid moiety for induction of inflammatory mediators in murine macrophages. Mol Immunol. 2014 Feb;57(2):284-91. doi: 10.1016/j.molimm.2013.10.004. Epub 2013 Nov 12. PubMed PMID: 24216318

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;71(4):492-5. PubMed PMID: 2052336.

Hülsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation-literature review and case reports. Int Endod J. 2000 May;33(3):186-93. PubMed PMID: 11307434

Joy J, Mathias J, Sagir VM, Babu BP, Chirayath KJ, Hameed H. Bacterial biofilm removal using static and passive ultrasonic irrigation. J Int Oral Health. 2015;7(7):42-7. PMID: 26229369

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;20:340-9. PubMed PMID: 14342926.

Karunakaran JV[1], Kumar SS, Kumar M, Chandrasekhar S, Namitha D.The effects of various irrigating solutions on intra-radicular dentinal surface: An SEM analysis. J Pharm Bioallied Sci. 2012 Aug;4(Suppl 2):S125-30. doi: 10.4103/0975-7406.100209. PMID:23066232

Komabayashi T, Ahn C, Spears R, Zhu Q. Comparison of particle morphology between commercial- and research-grade calcium hydroxide in endodontics. J Oral Sci. 2014;56(3):195-9.PubMed PMID:25231145.

Lamosa AC. Comparação da dentina de dentes humanos e de dentes bovinos através de microscopia eletrônica de varredura [dissertação]. Rio de janeiro (RJ): Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia; 2001.

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

Lee SJ, Wu MK, Wesselink PR. The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonics to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls. Int Endod J. 2004;37(10):672-8. doi: 10.1111/j.1365-2591.2004.00848.x PubMed PMID: 15347291

Leonardo MR. Endodontia tratamento de canais radiculares. 4. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2002a.

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

Lopes HP, Siqueira Jr JF. Endodontia: biologia e técnica. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

Love RM. Enterococcus faecalis: a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J. 2001;34(5):399-405. PubMed PMID:11482724.

Maekawa LE. Avaliação dos extratos de própolis e de gengibre como medicação intracanal sobre microrganismos e endotoxinas em canais radiculares [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de São José dos Campos; 2010.

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;36(11):1766-9. doi: 10.1016/j.joen.2010.08.019. PubMed PMID: 20951284.

Martinho FC, Gomes AP, Fernandes AM, Ferreira NS, Endo MS, Freitas LF, et al. Clinical comparison of the effectiveness of single-file reciprocating systems and rotary systems for removal of endotoxins and cultivable bacteria from primarily infected root canals. J Endod. 2014;40(5):625-9. doi: 10.1016/j.joen.2013.12.006. PubMed PMID:24767554.

Menezes MM, Valera MC, Jorge AO, Koga-Ito CY, Camargo CH, Mancini MN. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. Int Endod J. 2004 May;37(5):311-9. doi:10.1111/j.0143-2885.2004.00799.x PubMed PMID:15086752.

Miller RS. A note on tubercle bacilli in house dust. Br Med J. 1894;1(1724):62. PubMed PMID: 20754607.

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

Moller AJR, Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bactéria and necrotic pulptissue in monkeys. Scan J Dent Res.1981;89(6):475-84 PubMed PMID: 6951246.

Murad CF, Sassone LM, Faveri M, Hirata R, Figueiredo L, Feres M. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard dna-dna hybridization. J Endod. 2014;40(7):899-906. doi: 10.1016/j.joen.2014.02.010 PubMed PMID: 24935532.

Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. J Endod. 2004 Nov;30(11):785-7.PMID:15505511

Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after one-visit endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005;99(2):231-52. doi:10.1016/j.tripleo.2004.10.005 . PubMed PMID: 15660098.

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

Nerwich A, Fidgor D, Messer HH. Ph changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. J Endod. 1993 Jun;19(6):302–6. PubMed PMID: 8228751

Neves MA, Provenzano JC, Rôças IN, Siqueira JF. 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. Epub 2015 Nov 6. PubMed PMID: 26549221.

Oliveira LD, Carvalho CA, Carvalho AS, Alves JS, 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(8):1053-7. doi: 10.1016/j.joen.2012.04.015. PubMed PMID: 22794204.

Oliveira LD, Leão MV, Carvalho CA, Camargo CH, Valera MC, Jorge AO, et al. In vitro effects of calcium hydroxide and polymyxin b on endotoxins in root canals. J Dent. 2005 Feb;33(2):107-14. doi:10.1016/j.jdent.2004.08.008 PubMed PMID:15683891.

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. Epub 2007 Mar 26. PubMed PMID: 17376712

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

Richman, MJ. The use of ultrasonics in root canal therapy and root resection. Med Dent J.1957;12:12-8.

Ricucci D, Siqueira JF, Bate AL, Pitt Ford TR. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. J Endod. 2009 Apr;35(4):493-502. doi: 10.1016/j.joen.2008.12.014 PubMed PMID: 19345793

Rôças IN, Siqueira JF. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. J Clin Microbiol. 2012;50(5):1721-4. doi: 10.1128/JCM.00531-12. PubMed PMID: 22403423

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

Sabins RA,Johnson JD,Hellstein JW.A comparison of the cleaning efficacy of short term sonic and ultrasonic passive irrigation afterhand instrumentation in molar root canals. J Endod. 2003 Oct;29(10):674-8. dói: 10.1097/00004770-200310000-00016 PubMed PMID:14606795

Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. J Endod. 1993;19(2):76-8. PubMed PMID: 8509740

Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. J Endod. 1975;1(1):19-21. PubMed PMID: 16554197

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

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

Tartari T, Bachmann L, Maliza AG, Andrade FB, Duarte MA, Bramante CM.Tissue dissolution and modifications in dentin composition by different sodium hypochlorite concentrations. J Appl Oral Sci. 2016 May-Jun;24(3):291-8. doi: 10.1590/1678-775720150524. PubMed PMID:27383711

Tennert C, Feldmann K, Haamann E, Al-Ahmad A, Follo M, Wrbas KT, et al. Effect of photodynamic therapy (PDT) on Enterococcus faecalis biofilm in experimental primary and secondary endodontic infections. BMC Oral Health. 2014;14:132. doi: 10.1186/1472-6831-14-132. PubMed PMID:25366394

Valera MC, Cardoso FG, Chung A, Xavier AC,Figueiredo MD, Martinho FC, Palo RM.Comparison of Different Irrigants in the Removal of Endotoxins and Cultivable Microorganisms from Infected Root Canals. ScientificWorldJournal. 2015;2015:125636. doi: 10.1155/2015/125636. Epub 2015 Aug 9. PMID:26346574

van der Sluis LW, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. Int Endod J. 2007;40(6):415-26. doi:10.1111/j.1365-2591.2007.01243.x. PubMed PMID:17442017.

van der Sluis LW, Vogels MP, Verhaagen B, Macedo R, Wesselink PR. Study on the influence of refreshment/activation cycles and irrigants on mechanical cleaning efficiency during ultrasonic activation of the irrigant. J Endod. 2010;36(4):737-40. doi: 10.1016/j.joen.2009.12.004 PubMed PMID:20307755

van der Sluis LW, Wu MK, Wesselink PR. The efficacy of ultrasonic irrigation to remove artificially placed dentine debris from human root canals prepared using instruments of varying taper. Int Endod J. 2005;38(10):764-8. doi:10.1111/j.1365-2591.2005.01018.x. PubMed PMID:16164691.

Vianna ME, Horz 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(6):411-8. PubMed PMID:17949345

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

Wang L,Jin H,Ye D,Wang J, Ao X, Dong M,Niu W. Enterococcus faecalis Lipoteichoic Acid Induced NLRP3 Inflammasome via the Activation of the Nuclear Factor Kappa B Pathway. J Endod. 2016 Jul;42(7):1093-100. doi: 10.1016/j.joen.2016.04.018. PubMed PMID: 27325457

Weller RN, Brady JM, Bernier WE. Efficacy of ultrasonic cleaning. Journal of Endodontics. 1980

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(8):959-64. doi: 10.1016/j.joen.2013.04.027. PubMed PMID: 23880258.

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

Zancan RF, Vivan RR, Milanda Lopes MR, Weckwerth PH, de Andrade FB, Ponce JB et al. Antimicrobial Activity and Physicochemical Properties of Calcium Hydroxide Pastes Used as Intracanal Medication. J Endod. 2016 Dec;42(12):1822-1828. doi: 10.1016/j.joen.2016.08.017. PubMed PMID:27776884

Zand V, Lotfi M, Rahimi S, Mokhtari H, Kazemi A, Sakhamanesh V. A comparative scanning electron microscopic investigation of the smear layer after the use of sodium hypochlorite gel and solution forms as root canal irrigants. J Endod. 2010;36(7):1234-7. doi: 10.1016/j.joen.2010.02.033. PubMed PMID:20630306

Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod. 2006;32(5):389-98. PubMed PMID:16631834

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética

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

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO IN VITRO DA AÇÃO DO ULTRASSOM COM O GEL DE HIPOCLORITO DE SÓDIO 3%, E NA MEDICAÇÃO INTRACANAL, SOBRE MICROORGANISMOS E SUAS TOXINAS

Pesquisador: Fernanda Carvalho Silva

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 52876815.4.0000.0077

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.504.962

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto que busca avaliar in vitro a Ação do ultrassom com o gel de hipoclorito de sódio a 3% e na medicação intracanal sobre os microorganismos e suas toxinas

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário: Avaliar a eficiência do hipoclorito de sódio gel na concentração de 3% como substância química auxiliar; avaliar a atividade antimicrobiana do uso da agitação ultrassônica passiva durante o momento final da instrumentação e também da medicação intracanal.

Objetivo secundário: quantificar a redução de LPS e LTA com os tratamentos propostos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em relação aos benefícios indicamos pela pesquisadora não há correção a ser realizada. No entanto, no que se refere aos riscos, há alterações sugeridas nas pendências.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa se propõe a tornar mais eficiente o uso do hipoclorito de sódio gel na concentração de 3%, o que nos parece ser benéfico ã sociedade, uma vez que se tornaria, em tese, mais eficiente a utilização da substância sobre ação de microorganismos e suas toxinas.

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

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados adequadamente.

Recomendações:

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora cumpriu a lista de pendências expostas nos dois pareceres anteriores, em especial realizou a juntada dos Termos de Doação pelas Clínicas da quais obterá os elementos dentários objeto de pesquisa.

A pesquisadora explicitou o método utilizado para a definição da amostra de 80 elementos em sua pesquisa.

"O tamanho amostral foi estimado pelo programa Minitab para o modelo ANOVA 3 fatores (2x2x2). Foram levantadas curvas de poder de teste.

Verificou-se que para n=10 em cada um dos 8 grupos é possível detectar diferença (unitária) estatisticamente significante com probabilidade acima

de 80%. Os valores de UFC serão transformados para escala log. Nesta estimativa a variabilidade estimada (valor = 1,5) foi obtida por meio de

revisão de literatura."

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer da relatora.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_620441.pdf	29/03/2016 09:10:19		Aceito
Outros	Termo_doacao2.pdf	28/03/2016 15:05:47	Fernanda Carvalho Silva	Aceito
Outros	termo_doacao3.pdf	28/03/2016 15:05:18	Fernanda Carvalho Silva	Aceito
Outros	Termo_doacao1.pdf	28/03/2016 15:04:46	Fernanda Carvalho Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	Carta_de_cessao.docx	29/02/2016 10:36:56	Fernanda Carvalho Silva	Aceito

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