

**LUCIANE DIAS DE OLIVEIRA**



**ESTUDO *IN VITRO* DA EFETIVIDADE DO HIDRÓXIDO DE  
CÁLCIO E DA POLIMIXINA B NA ELIMINAÇÃO DAS  
ENDOTOXINAS PRESENTES NOS CANAIS RADICULARES**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Concentração em Biopatologia Bucal.**

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup> Adj. CARMELINDA SCHMIDT UNTERKIRCHER**

**São José dos Campos**

**2002**

## DEDICATÓRIA

A DEUS, nosso Senhor todo poderoso, que abençoa todos os dias da minha vida, que ilumina o meu caminho, que me protege e me fortalece, que me ensina e me orienta. Senhor, eu te louvo e te agradeço por tudo em nome do seu filho Jesus Cristo.

*“Eu sempre louvarei ao Deus Eterno;  
Em todos os momentos o seu louvor estará em meus lábios...  
Procure saber, por você mesmo, como o Eterno é bom!  
Feliz aquele que encontra a segurança em Deus!  
Que todo o povo de Deus o tema,  
Pois aqueles que o temem não têm falta de nada.  
Até os leões não têm comida e passam fome,  
Porém não falta nada aos que procuram a ajuda do Deus Eterno.”*

*Salmo 34*

Aos meus pais, Alberto e Dirce, por todo amor e carinho que nos une, pelo apoio e incentivo que me deram durante toda a minha vida, pelos esforços incansáveis que fizeram para que eu pudesse buscar os meus ideais e torná-los realidade, pelos exemplos de força e dedicação, pelos conselhos nas horas difíceis, pelos muitos momentos felizes que temos compartilhados e pelos pais maravilhosos que vocês são para mim. Amo vocês!

*“Meu Filho, escute o que seu pai ensina e preste atenção no que a sua mãe diz. Os ensinamentos deles vão aperfeiçoar o seu caráter.”*

*Provérbios 1:8*

Ao Cláudio, meu marido, companheiro de todas as horas, pelo laço de amor que nos une, pela força que sempre tem me dado, por me apoiar e me incentivar, por me compreender e me amar. Você foi um presente de Deus em minha vida. Obrigado por ser essa pessoa abençoada, que compartilha comigo todos os momentos, fazendo-me muito feliz e realizada. Te amo!

*“O amor é paciente e bondoso. O amor não é ciumento, nem orgulhoso, nem vaidoso. Não é grosseiro, nem egoísta. Não se irrita, nem fica magoado. O amor nunca desanima, porém suporta tudo com fé, esperança e paciência. O amor é eterno.”*

*Coríntios 13:4-8*

Aos meus irmãos Ricardo e Andrea pelos muitos momentos felizes que vivemos juntos, pelas boas recordações de nossa infância, pelo incentivo que sempre me deram e pelo amor, respeito e amizade que nasceu e cresceu entre nós. Vocês são pessoas muito importantes para mim. À minha cunhada Fabiane pela amizade e carinho e ao meu sobrinho Ricardinho pelo amor que já sinto por ele.

Aos meus avós Maria, Manuel (*in memorium*), Alice (*in memorium*) e Juan (*in memorium*) por todo amor, carinho, dedicação e ensinamentos valiosos durante os inesquecíveis momentos que passamos juntos.

Aos meus sogros Antonio e Graça, por me acolherem como uma filha, por me incentivarem e me apoiarem em tudo, pelo carinho especial, pela amizade e amor que nos une. Vocês são pessoas maravilhosas, por quem eu tenho um imenso respeito e admiração.

À toda a minha família, que sempre me apoiou e me incentivou. Em especial à tia Dulce e tio Belmiro, por quem tenho um carinho muito grande, pela força e apoio que sempre me deram.

Minha eterna gratidão

À Prof<sup>a</sup>. Adj. Carmelinda Schmidt Unterkircher, por ter me acolhido, por ter me transmitido ensinamentos imprescindíveis durante todo este curso, pela amizade que cresceu entre nós, pelo convívio maravilhoso que tivemos, pelos conselhos e por toda ajuda que tem me dado. A senhora é uma pessoa muito importante para mim. Muito obrigada por tudo.

À Prof<sup>a</sup> Adj. Márcia Carneiro Valera, por todo apoio e incentivo que tem me dado, pelos ensinamentos a mim transmitidos, pelo laço de carinho e amizade que nos une, pelo convívio maravilhoso que temos, pelos conselhos nas horas mais difíceis, por ter me ajudado a conhecer mais Jesus e por tudo que tem feito por mim. Muito obrigada, a senhora é uma pessoa abençoada, que eu admiro e estimo muito.

Muito Obrigada

A Profª. Ana Paula Martins Gomes, pela sua amizade, por me incentivar e me apoiar desde o período da graduação, por ter me despertado para a pesquisa, por ter me ensinado a realizar meu primeiro trabalho científico, por acreditar no meu trabalho e por me ajudar. Eu tenho muito a te agradecer, e se hoje eu estou seguindo carreira acadêmica foi porque você plantou esta semente em mim. Eu te admiro muito. Obrigado por tudo que fez e tem feito por mim.

Ao Prof. Antonio Olavo Cardoso Jorge, pelos conhecimentos transmitidos, pelo convívio saudável que tivemos, pelo apoio e auxílio durante todo este curso.

Muito obrigada

## AGRADECIMENTOS

A UNESP - FOSJC, por ter me acolhido, por ter me formado cirurgiã-dentista, por me transmitir valiosos conhecimentos e por me proporcionar uma carreira acadêmica.

A FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio à pesquisa e pela concessão de minha bolsa de estudo durante o curso de Pós-Graduação.

À Profª Titular Maria Amélia Máximo de Araújo, diretora da FOSJC – UNESP, por incentivar os cursos de Pós-Graduação, pela sua força e dedicação à pesquisa e por investir na qualidade do ensino.

À Profª Adj. Yasmin Rodarte Carvalho, coordenadora do Programa de Pós-Graduação, pelo incentivo à pesquisa, pelos conhecimentos transmitidos durante este curso e pelo apoio e amizade.

À Profª Drª Rosilene Fernandes da Rocha, pelos ensinamentos, pela amizade, ajuda e incentivo que tem me dado ao longo deste curso e pelo saudável convívio que tivemos.

A todos os docentes do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal: Luiz Eduardo Blumer Rosa, Adriana Aigotti Haberbeck Brandão, Mônica Fernandes Gomes, Maria Nadir Gasparoto Mancini, Horácio Faig Leite, Simone Helena Gonçalves de Oliveira, Ana Sueli Rodrigues Cavalcante, Janete Dias Almeida, Luiz Antonio Guimarães Cabral, Walter Domingos Nicolli Filho, José Benedito Oliveira Amorim, Lúcio Murilo dos Santos, Miguel Angel Castilho Salgado e Valéria Abrantes Pinheiro Carvalho, por todos os conhecimentos que me foram transmitidos, pela boa receptividade e convívio saudável que tivemos.

Ao Departamento de Odontologia Restauradora FOSJC, por me acolher como estagiária e por permitir que eu desenvolvesse parte deste trabalho em seu laboratório.

A Mariella Vieira Pereira Leão, pela ajuda imprescindível que me deu durante todo o curso, pelo apoio e incentivo que tem me dado e pela forte amizade que temos.

A Clélia Aparecida de Paiva Martins pela eficiência, suporte técnico, dedicação, presteza e pela amizade e convívio maravilhoso que temos.

A Ana, técnica da disciplina de Patologia, pelo auxílio e amizade.

Às secretárias do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da FOSJC: Sílvia e Terezinha, pela instrução, colaboração e amizade.

Às secretárias da Pós-Graduação FOSJC: Rosemary, Erena e Cida pelo cuidado, orientação e esclarecimentos prestados durante este curso.

Às bibliotecárias da FOSJC: Dora, Neide, Silvana, Renata e, em especial, à Ângela de Brito Bellini pela contribuição e ajuda na elaboração deste trabalho.

Ao professor Marco Antonio Leonel Caetano, pela realização da análise estatística dos resultados desta pesquisa.

Ao Ricardo, do Áudio-visual, pela colaboração.

A todos os funcionários da FOSJC que direta ou indiretamente muito me ajudaram durante o período deste curso.

Aos colegas deste curso de Pós-Graduação: Luis Fernando, Alexandre, Ivan, Liana, Luana, Dalton e Cristina pelo convívio, pelas experiências compartilhadas e pela amizade que nasceu e cresceu entre nós.

Aos amigos Emmanuel, Marcia Valera, Marcia Maciel, Samira, Ique, Graça, Simone, Marcio, Beatriz, Basile, pela imensa ajuda que têm me dado, pela grande amizade que nasceu entre nós, pelo convívio maravilhoso, pelos ótimos momentos que temos compartilhados, com a bênção do Senhor.

Às tias: Leila, Sarita, Marita e Lúcia e aos tios Ale, Luis e Francisco pelo amor que nos une, pela amizade, carinho e incentivo que sempre me deram.

Aos amigos Mauhamad, Ahmed e Wandecya pela amizade e pelos momentos alegres que passamos juntos.

Aos amigos Arlindo e Silvinha, pelo auxílio e presteza nas horas em que mais precisei, pelo apoio e força que sempre me deram, pelos momentos de alegria e descontração que passamos juntos, pelo carinho e pela forte amizade que temos.

Aos amigos Fabio e Dani, pela ajuda, dedicação e incentivo, pelo ótimo convívio que temos, pelos bons momentos compartilhados, pelo carinho e pela sincera amizade que nos unem.

Aos amigos Rodrigo e Thayse, pela forte amizade e pelos momentos alegres que compartilhamos juntos.

Aos amigos Alessandra e Alexandre pela amizade, incentivo e apoio.

Aos amigos Domício, Alessandro, Leonardo, pelo saudável convívio que tivemos e pela amizade que cresceu entre nós.

Aos amigos Silvia e Sérgio, pelo apoio, incentivo e auxílio que me deram e pela forte amizade que temos.

Às amigas Geovana, Adriana, Maria Angélica, Fabiana e Sandra pelo apoio e amizade.

Às amigas Valdirene, Daniela, Carol, Juliana e Janiene pela grande amizade que nos une até hoje e pela força que sempre me deram.

Ao Johnny, meu cachorro, pelos maravilhosos momentos de alegria e descontração que tem me proporcionado, pelo carinho nas horas mais difíceis, pelo companheirismo e por ser meu verdadeiro amigo.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	15
RESUMO.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 Endotoxina e sua atuação sobre a polpa e os tecidos periodontais.....	22
2.2 Hidróxido de cálcio e sua ação sobre os canais radiculares infectados sobre a endotoxina.....	39
2.3 Polimixina B e sua atividade sobre a endotoxina presente na circulação de pacientes com sepsis por microrganismos Gram-negativos.....	50
2.4 Polimixina B pura ou associada à hidrocortisona e ao sulfato de neomicina.....	55
2.5 O lisado de Limulus, a radiação com cobalto 60 e o efeito do laser de Er:YAG.....	57
2.6 Atividade das endotoxinas <i>in vivo</i> .....	58
3 PROPOSIÇÃO.....	62
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
4.1 Preparo das amostras.....	63

4.2	Testes para verificar a neutralização da endotoxina presente no canal radicular.....	68
4.2.1	Lisado de amebócito de Limulus.....	68
4.2.2	Produção de anticorpos em cultura de linfócitos B.....	72
4.2.2.1	Teste ELISA.....	75
5	RESULTADOS.....	76
6	DISCUSSÃO.....	82
6.1	Da escolha do tema.....	82
6.2	Da metodologia.....	86
6.3	Dos resultados.....	90
7	CONCLUSÕES.....	95
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
	ANEXOS.....	108
	ABSTRACT.....	109

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Estrutura química da endotoxina de <i>E. coli</i> .....	21
FIGURA 2 -	Padronização dos espécimes.....	63
FIGURA 3 -	Raiz com vedamento apical de resina fotopolimerizável.....	64
FIGURA 4 -	Distribuição dos espécimes nas placas.....	65
FIGURA 5 -	Hidróxido de cálcio (pasta Calen), seringa Calen e agulha longa.....	67
FIGURA 6 -	A: Polimixina B pura, na forma de colírio; B: Polimixina B associada à hidrocortisona e sulfato de neomicina.....	67
FIGURA 7 -	Kit lisado de amebócito de <i>Limulus</i> E-Toxate (Sigma).....	69
FIGURA 8 -	A: O lisado de amebócito de <i>Limulus</i> e a endotoxina padrão de <i>E. coli</i> ; B: A água apirogênica (30mL).....	69

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

QUADRO 1 - Distribuição dos espécimes nos grupos experimentais.....	66
QUADRO 2 - Diluições da endotoxina e concentrações finais apresentadas.....	70
QUADRO 3 - Representação dos p-níveis para cada par de grupos analisados.....	80
TABELA 1 - Resultados do teste do lisado de amebócito de Limulus.....	76
TABELA 2 - Valores médios da densidade ótica (DO) para cada espécime dos grupos experimentais.....	78
TABELA 3 - Valores médios da DO apresentados por cada grupo	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% = porcentagem

$\mu$  = mícron (unidade de medida equivalente a  $10^{-6}$ m)

$\mu$ g = micrograma

$\mu$ L = microlitro

$\mu$ m = micrômetro

BHI = *Brain Heart infusion* (Infusão de cérebro e coração)

BSA = soro albumina bovino

$\text{Ca}^{2+}$  = íons cálcio

$\text{Ca}(\text{OH})_2$  = hidróxido de cálcio

CIP = ciprofloxacina

$\text{CO}_2$  = gás carbônico

C3 = componente C3 do Sistema Complemento

DNA = ácido desoxiribonucléico

DO = densidade ótica

EDTA = ácido etilenodiamino-tetra-acético

*E. coli* = *Escherichia coli*

ELISA = ensaio imunoabsorvente ligado à enzima

EMBRARAD = Empresa Brasileira de Radiação

$^{\circ}\text{C}$  = grau Celsius

h. = hora

$\text{H}_2$  = gás hidrogênio

IgG = Imunoglobulina G

IgM = Imunoglobulina M

IL = Interleucina

J = Joule

KDO = ácido 2-Keto-3-deoxioctônico  
Kg = Kilograma  
LAL = Lisado do Amebócito de Limulus  
LOS = lipooligossacarídeo  
LPS = Lipopolissacarídeo  
LTA = ácido lipoteicóico  
M = Molar  
MDP = muramil dipeptídeo  
Mg<sup>2+</sup> = íons magnésio  
min. = minuto  
mm = milímetro (unidade de medida equivalente a 10<sup>-3</sup>m)  
mL = mililitro  
ng = nanograma  
nm = nanômetro (equivalente a 10<sup>-9</sup>m)  
Na = sódio  
NaCl = cloreto de sódio  
NaHCO<sub>3</sub> = bicarbonato de sódio  
OPD = ortofenildiamino  
PBS = solução salina fisiológica tamponada com fosfato  
PBS-T = solução salina fisiológica tamponada com fosfato + Tween  
pg = picograma  
PGE<sub>2</sub> = Prostaglandina E<sub>2</sub>  
pH = potencial de hidrogênio iônico  
PMCC = Paramonoclorofenol canforado  
PMN = polimorfonuclear  
PNH = polimixina B + neomicina + hidrocortisona  
s = segundo  
SDS = dodecil sulfato de sódio  
TNF = Fator de Necrose Tumoral  
UI = Unidade Internacional  
Xg = gravidade

OLIVEIRA, L.D. **Estudo *in vitro* da efetividade do hidróxido de cálcio e da polimixina B na eliminação das endotoxinas presentes nos canais radiculares.** 2002. 109f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração: Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.

## RESUMO

A parede celular das bactérias Gram-negativas é constituída principalmente por endotoxinas, que são complexos de lipopolissacarídeos com potente ação citotóxica, liberadas durante a duplicação ou morte celular destas bactérias. Assim, mesmo após o preparo biomecânico do canal, a endotoxina pode permanecer e contribuir para a manutenção da lesão periapical, impedindo o sucesso do tratamento endodôntico. Com isso, a proposta desta pesquisa foi avaliar a efetividade de curativos intracanal na eliminação das endotoxinas presentes nos canais radiculares. Para tanto, foram utilizados 75 dentes humanos unirradiculados, que tiveram suas coroas seccionadas e o ápice cortado em 3mm, padronizando o tamanho dos espécimes em 14mm. Os dentes foram preparados biomecanicamente, seus ápices radiculares vedados com resina fotopolimerizável e as raízes impermeabilizadas externamente com um adesivo epóxi (Araldite). A seguir, os espécimes foram esterilizados e foi inoculada, no interior de sessenta canais radiculares, uma solução contendo endotoxina de *Escherichia coli*. Os dentes foram então divididos em 5 grupos experimentais, com 15 dentes cada. O grupo 1 recebeu como medicamento intracanal a pasta de hidróxido de cálcio, o grupo 2 recebeu uma solução contendo Polimixina B pura, o grupo 3 recebeu uma solução contendo Polimixina B associada ao sulfato de neomicina e hidrocortisona, o grupo 4 (controle positivo) não recebeu nenhum medicamento e no grupo 5 (controle negativo) não foi inoculada endotoxina. Os dentes foram mantidos em estufa a uma temperatura de  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa 100% durante 7dias. Após este período, a neutralização da endotoxina foi verificada utilizando-se o método do lisado de amebócito de *Limulus* (Sigma) e a produção de anticorpos em cultura de linfócitos B. Os resultados obtidos com o lisado de *Limulus* foram submetidos à análise estatística usando o teste de Mann-Whitney e verificou-se que os tratamentos com o hidróxido de cálcio e com a solução de polimixina B pura foram efetivos na neutralização das endotoxinas presentes nos canais radiculares. Os resultados obtidos na cultura de linfócitos B foram submetidos à análise estatística ANOVA, com nível de significância de 5%, e ao teste de Tukey onde foi verificado que o hidróxido de cálcio apresentou os melhores resultados, com diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos ( $p<0,05$ ). Assim, os resultados deste trabalho sugerem o hidróxido de cálcio como o melhor neutralizante de endotoxinas no tratamento endodôntico, sendo seguido pela polimixina B pura. Já a polimixina B associada ao sulfato de neomicina e hidrocortisona não exibiu capacidade neutralizante de LPS e, portanto, não deveria ser recomendada com este objetivo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Endotoxina, hidróxido de cálcio, polimixina B.

## I INTRODUÇÃO

A maior parte das alterações patológicas que envolvem a polpa e os tecidos periapicais é de etiologia microbiana, de modo que as bactérias e seus produtos exercem um papel significativo na indução e principalmente na manutenção destas lesões (Sundqvist<sup>93</sup>, 1994). Assim sendo, o sucesso do tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar depende da máxima eliminação de bactérias e seus produtos através do preparo biomecânico, da ação de irrigantes endodônticos e de medicamentos intracanal.

As infecções dos canais radiculares são polimicrobianas. Microrganismos da saliva, do sulco gengival, da bolsa periodontal e das lesões de cárie podem estar presentes (Walton & Torabinejad<sup>105</sup>, 1996). Muitos fatores influenciam o crescimento e a colonização microbiana nos canais radiculares, tais como: a disponibilidade de nutrientes, a baixa tensão de oxigênio nos condutos com polpas necrosadas e interações bacterianas (Sundqvist<sup>92</sup>, 1992). Dessa forma, em dentes com necrose pulpar e periodontite apical, a inflamação purulenta é induzida por combinações específicas de bactérias anaeróbias facultativas e estritas (Sundqvist et al.<sup>94</sup>, 1989), com predominância de bactérias anaeróbias Gram-negativas (Wittgow & Sabiston<sup>107</sup>, 1975).

A parede celular das bactérias Gram-negativas é constituída principalmente por endotoxinas, que são complexos de lipopolissacarídeos (LPS) com potente ação citotóxica, liberadas durante a duplicação ou morte celular dessas bactérias. As endotoxinas constituem cerca de três quartos da superfície bacteriana e são responsáveis por sua organização, estabilidade (Vaara & Nikaido<sup>104</sup>, 1984, citado por Petsch & Anspach<sup>64</sup>, 2000) e representam o principal

fator de virulência das bactérias Gram-negativas. Esta molécula é responsável por muitos efeitos patológicos observados numa infecção como febre, letalidade, ativação de macrófagos, ativação de linfócitos B e falência de órgãos, entre outros.

As endotoxinas são constituídas de três partes quimicamente diferentes. Possuem um componente lipídico, chamado lipídio A, um corpo oligossacarídico e outro heteropolissacarídico, representado pelo antígeno O de superfície (Figura 1). O antígeno O é formado por uma cadeia de unidades polissacarídicas repetidas (de 3 a 8 monossacarídeos cada). O corpo oligossacarídico tem uma estrutura conservada com uma região de KDO (ácido 2-keto-3-deoxioctônico)-heptose interna e outra externa. O lipídio A é constituído por um dissacarídeo de glucosamina com ligações  $\beta$  (1-6) e grupos fosforila. A parte hidrofóbica da endotoxina apresenta um arranjo hexagonal ordenado, resultando numa estrutura mais rígida quando comparada com o restante da molécula (Figura 1). O componente lipídico representa o centro ativo responsável pelas propriedades tóxicas dos LPS (Petsch & Anspach<sup>64</sup>, 2000).

As endotoxinas não agem diretamente sobre os órgãos, mas através da ativação do sistema imune. As endotoxinas são ativadores policlonais, responsáveis por fenômenos que iniciam a resposta inflamatória, tais como: quimiotaxia de polimorfonucleares (PMNs), estímulo da liberação de enzimas lisossomais de PMNs, promoção da liberação de colagenase dos macrófagos, ativação do sistema complemento, aumento da temperatura corporal, atração de osteoclastos (Morse<sup>55</sup>, 1981; Farber & Seltzer<sup>21</sup>, 1988), alteração da estrutura e função de vários órgãos e células, alteração das funções metabólicas, modificações hemodinâmicas e, em alguns casos, choque séptico endotóxico (Martich et al.<sup>46</sup>, 1993). Devido a sua potente atividade pró-inflamatória, a exposição à endotoxina transportada pelo ar pode aumentar o risco de desenvolvimento de doenças sistêmicas e pulmonares. Em indivíduos asmáticos, a inalação aguda de endotoxina

pura pode desenvolver broncoconstrição e um aumento dos níveis de bronquite não-específica (Michel<sup>50</sup>, 1998).

No sangue e nos tecidos, as endotoxinas ligam-se ao receptor CD14 na superfície de monócitos e macrófagos. Os macrófagos ativados pela endotoxina liberam três grupos de mediadores químicos: proteínas, radicais livres de oxigênio e lipídios. Os LPSs também induzem os macrófagos a secretar várias interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), o Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), o superóxido ( $O_2^-$ ), o óxido nítrico, os interferons  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , e moléculas lipídicas como o fator ativador de plaquetas e as prostaglandinas (Janeway et al.<sup>39</sup>, 2000). Estes são fatores importantes no desenvolvimento de reabsorção óssea periapical (Wang & Stashenko<sup>106</sup>, 1993).

Uma importante correlação tem sido demonstrada entre os níveis de endotoxina intracanal e a sintomatologia clínica da polpa e dos tecidos periapicais (Schein & Schilder<sup>76</sup>, 1975; Horiba et al.<sup>31</sup>, 1991). Dessa forma, estudos vêm sugerindo que as endotoxinas são os principais fatores etiológicos envolvidos na patogênese da inflamação periapical, incluindo a reabsorção óssea (Dwyer & Torabinejad<sup>14</sup>, 1981; Pitts et al.<sup>66</sup> 1982; Mattison et al.<sup>48</sup> 1987; Yamasaki et al.<sup>109</sup>, 1992). Assim, mesmo após o preparo biomecânico do canal, a endotoxina permanece e pode contribuir para a manutenção da lesão periapical, impedindo o sucesso do tratamento endodôntico.

Na prática endodôntica moderna, grande ênfase tem sido dada aos medicamentos intracanal como as pastas de hidróxido de cálcio e as associações de corticosteróide-antibiótico. O hidróxido de cálcio tem sido muito utilizado devido às suas propriedades como alta alcalinidade, atividade antimicrobiana e a capacidade de criar um meio ambiente favorável à deposição de tecido duro e à reparação apical. A associação de corticosteróide-antibiótico tem sido empregada devido à sua ação antimicrobiana e, principalmente, à sua ação antiinflamatória satisfatória.

A persistência, relatada na literatura, de endotoxinas nos canais radiculares e na região periapical, sugere a necessidade de novos estudos sobre a eficácia de medicamentos intracanal, com objetivo de eliminar estas substâncias com alto potencial flogístico.

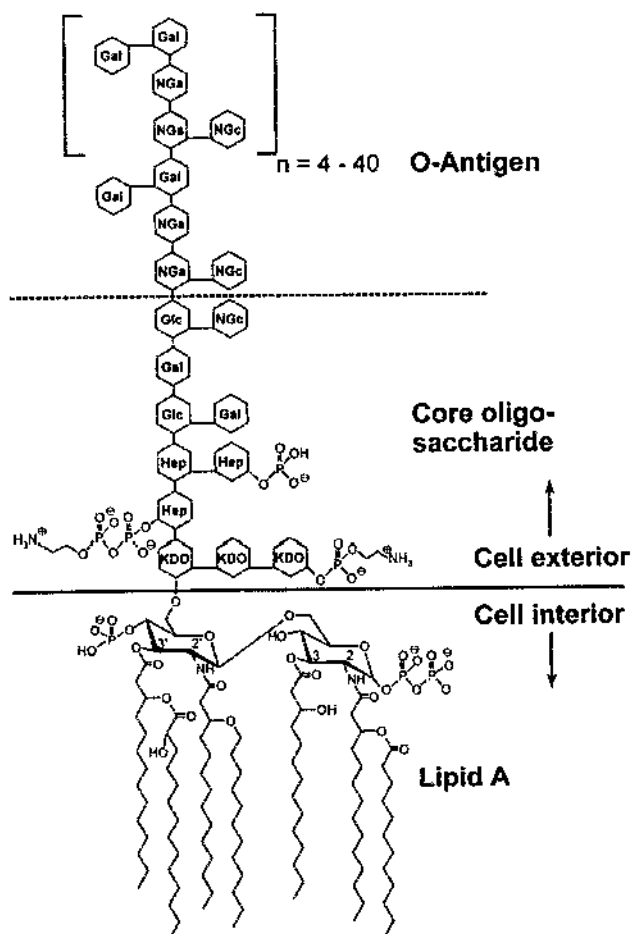


FIGURA 1 - Estrutura química da endotoxina de *Escherichia coli*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Endotoxina e sua atuação sobre a polpa e os tecidos periodontais

Rizzo & Mergenhagen<sup>71</sup> (1964) avaliaram os efeitos histopatológicos da endotoxina injetada na mucosa bucal de coelhos. Para o estudo da toxicidade primária, foi realizada uma única injeção de 50µg de endotoxina purificada de *Veillonella* na região palatogengival. Os animais foram sacrificados em diferentes intervalos de tempo: 2, 4, 10 e 18 horas; dois, quatro, seis, dez e 14 dias. Os resultados demonstraram que 50µg de endotoxina produziram uma lesão inflamatória aguda, caracterizada por grandes abscessos evidentes por um período de dez dias e, microscopicamente, por até 14 dias. As áreas abscedadas continham neutrófilos, monócitos e células remanescentes, mas não se evidenciou a presença de bactérias. Para determinar a dose preparatória mínima para a reação de Shwartzman, injeções preparadas com 200, 100, 50, 25, 10 e 1µg de endotoxina foram administradas a grupos de três coelhos por dose. Concluindo-se que a dose mínima de endotoxina necessária para iniciar a reação de Shwartzman local na mucosa foi determinada em aproximadamente 1µg. A inoculação intramucosa de quantidades menores que 1µg produziram apenas elevação da temperatura corporal.

A endotoxina oriunda de bactérias orais Gram-negativas pode ter um papel na etiologia da lesão periodontal inflamatória, assim, Shapiro et al.<sup>80</sup> (1972) quantificaram os níveis de endotoxina detectável na inflamação gengival. As amostras foram coletadas do exsudato sulcular,

da placa dentária e do tecido biopsiado. Alíquotas de cada uma das amostras processadas foram submetidas ao teste do lisado de *Limulus* para determinação da endotoxina, onde a formação de gel duro indicava uma reação positiva. Os resultados demonstraram que de acordo com o aumento do grau de inflamação clínica, a quantidade de endotoxina também aumentava.

Schein & Schilder<sup>76</sup> (1975) quantificaram o conteúdo de endotoxina em quarenta dentes indicados para tratamento endodôntico. Os dentes foram isolados com dique de borracha e toda dentina cariada foi removida com brocas e curetas. Foi realizada a abertura de acesso à câmara pulpar, na qual foi depositado 0,1mL de solução fisiológica apirogênica. Os canais foram explorados com limas tipo Kerr até o terço apical e 0,1mL do fluido foi aspirado dos canais radiculares. A determinação de endotoxina foi feita pelo teste do lisado de *Limulus*. Os dentes com polpas necrosadas tinham uma concentração mais alta de endotoxina que os dentes com polpas vitais. Os dentes sintomáticos também apresentavam mais endotoxinas que os assintomáticos.

Dhalén & Bergenholtz<sup>11</sup> (1980) analisaram a atividade endotóxica em dentes com polpas necrosadas. Foram utilizados os canais radiculares de treze dentes de pacientes com idade entre 14 e 39 anos. Foi realizado o isolamento absoluto dos dentes, a abertura da câmara pulpar, a irrigação do canal radicular com 15-25 $\mu$ l de NaCl 0,43% e a exploração do canal até o ápice com auxílio de uma lima Hedströen. A suspensão foi aspirada com uma seringa, o volume foi registrado e transferido para 1ml de NaCl 0,43% apirogênico. O conteúdo de endotoxina das amostras foi medido pela técnica do lisado de *Limulus*. Os parâmetros avaliados foram: a contagem de bactérias viáveis nas amostras, o LPS extraído com fenol/água das diferentes bactérias Gram-negativas e as diferentes frações do exsudato inflamatório. Observou-se que a atividade endotóxica das amostras do canal radicular estava correlacionada com a presença e o número de bactérias Gram-negativas.

Dahlén et al.<sup>12</sup> (1981) realizaram um estudo histológico e histoquímico da influência do lipopolissacarídeo (LPS), extraído e purificado do *Fusobacterium nucleatum*, nos tecidos periapicais de macaco *Macaca fascicularis*. Utilizaram 27 canais radiculares de quatro macacos. Os dentes foram isolados com dique de borracha, a câmara pulpar foi aberta e os canais instrumentados, de forma que a lima ultrapassasse o forame apical. Um volume de 5 a 10µl da solução de LPS foi introduzido no canal radicular com uma seringa e conduzido com uma lima até a região apical. Uma bolinha de algodão embebida na solução do LPS foi colocada na câmara pulpar e o acesso foi selado com cimento de óxido de zinco e eugenol. Os dentes foram observados por três meses (Grupo I, 18 dentes) e sete meses (Grupo II, nove dentes). Dezesete dentes foram utilizados como controle. Radiografias foram realizadas no final de cada período para verificar alterações na região periapical. Os animais foram sacrificados e as reações histoquímicas foram observadas pelas atividades de fosfatase ácida e aminopeptidase. Observou-se reação inflamatória nos tecidos periapicais de todos os dentes experimentais, com reabsorção óssea e dentária. Mesmo quando a inflamação era moderada, as células do osso apical apresentavam aumento da atividade enzimática, sugestivo de reabsorção óssea ativa. As células do grupo controle apresentaram pouca ou nenhuma reação enzimática.

Dwyer & Torabinejad<sup>14</sup> (1981) avaliaram radiográfica e histologicamente o efeito da endotoxina de *Escherichia coli* nos tecidos periapicais de gatos. Estudou-se a reação induzida, por três concentrações de endotoxina: 100µg/ml, 10µg/ml e 1µg/ml, no tecido periapical de dez gatos. Também foi avaliada a resposta para endotoxina neutralizada e para uma solução fisiológica apirogênica. Os caninos da maxila e mandíbula foram isolados com dique de borracha e as polpas foram removidas. Nos quatro canais radiculares de seis gatos foram depositadas 0,1mL de endotoxina nas concentrações: 100µg/ml, 10µg/ml

e 1µg/ml e solução fisiológica, respectivamente. Nos canais radiculares de três gatos foi utilizada endotoxina neutralizada, nas mesmas concentrações, e um gato foi usado como controle adicional, no qual injetou-se apenas solução fisiológica em seus canais. As aberturas de acesso foram seladas com IRM. Os tecidos periapicais foram examinados radiográfica e histologicamente duas, quatro e seis semanas após. Os resultados sugeriram indiretamente que as endotoxinas têm uma participação na iniciação e perpetuação das lesões inflamatórias periapicais em humanos.

Raisz et al.<sup>67</sup> (1981) estudaram as interações entre endotoxina bacteriana e outros estimuladores de reabsorção óssea. Foram estudados quatro agentes, freqüentemente implicados na patogênese da perda óssea alveolar na doença periodontal, a endotoxina, a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), o hormônio da paratireóide e o fator ativador de osteoclastos, medindo-se a liberação de cálcio previamente incorporado ao osso longo de ratos fetais com 19 dias. Endotoxina nas concentrações de 4 a 25ng/mL causou pouco aumento da liberação de cálcio, mas foi capaz de aumentar a resposta para as concentrações de PGE<sub>2</sub>, hormônio da paratireóide e fator ativador de osteoclasto. A resposta sinérgica apresentada foi maior que as respostas individuais, de tal forma que aumentou a liberação de cálcio em 45 a 65%. O hormônio da paratireóide e PGE<sub>2</sub> não demonstraram sinérgismo aparente quando usados juntos. E ainda, os efeitos da endotoxina não foram inibidos pela indometacina e o ácido flufenâmico, potentes inibidores da síntese de PGE<sub>2</sub>, e a resposta sinérgica foi similar quando PGE<sub>2</sub> e endotoxina foram adicionadas na presença de indometacina. Os resultados mostraram que as interações entre endotoxina e os outros estimuladores da reabsorção óssea podem produzir grandes respostas e sugerem, ainda, que estas interações podem ser importantes na patogênese da perda óssea na doença periodontal e em outras formas de osteólise patogênica.

Pitts et al.<sup>66</sup> (1982) investigaram o papel da endotoxina na inflamação periapical. Foram removidas polpas dentais de dois cães. Nos canais radiculares do grupo experimental injetou-se 0,1mL de endotoxina de *Salmonella minnesota* R-595 e nos canais do grupo controle solução fisiológica esterilizada. Exames radiográficos foram feitos semanalmente e avaliações histológicas foram feitas após quatro ou cinco semanas. As alterações radiográficas periapicais ocorridas foram mais severas nas raízes contendo endotoxinas do que nas raízes contendo solução fisiológica. A avaliação histológica também demonstrou maior destruição óssea periapical e maior resposta inflamatória nos espécimes contendo endotoxinas. Os resultados do estudo indicaram que as endotoxinas podem ter um papel na inflamação periapical e na destruição óssea.

Schonfeld et al.<sup>77</sup> (1982) analisaram a atividade endotóxica em lesões periapicais. Trinta amostras de tecidos foram examinadas histologicamente e classificadas como sendo inflamadas (granulomas apicais) ou não inflamadas (cicatrices ou cistos não inflamatórios). As amostras foram homogeneizadas em água apirogênica e tratadas para remover substâncias interferentes. A presença da endotoxina foi determinada pelo método do lisado de *Limulus*. Setenta e cinco por cento dos tecidos inflamados foram positivos para endotoxina, enquanto apenas 20% dos não inflamados continham endotoxinas. A presença da endotoxina foi altamente correlacionada ( $p=0.015$ ) com a presença de inflamação nestes tecidos.

Pinero et al.<sup>65</sup> (1983) estudaram, *in vitro*, os efeitos da endotoxina na síntese dos componentes da matriz do tecido conjuntivo. Fibroblastos pulpares humanos ou bovinos foram tratados com baixos níveis de endotoxina e analisados através da utilização de vários isótopos para medir a síntese de DNA, colágeno e glicosaminoglicanos sulfatados e não-sulfatados. Quantidades de 5 a 125  $\mu\text{g/ml}$  de endotoxina estimularam a captação de timidina tritiada em ambas as linhagens. A utilização de outros isótopos também aumentou, porém, variou com as

linhagens celulares e concentrações de endotoxina. Os resultados sugeriram que os fibroblastos pulpares são capazes de responder a baixos níveis de endotoxina através do aumento da divisão celular e síntese da matriz do tecido conjuntivo.

Millar et al.<sup>51</sup> (1986) estudaram a influência de duas frações, quimicamente distintas, de LPS de *Bacteroides gingivalis* 381 sobre o metabolismo ósseo. A eletroforese em poliacrilamida com SDS (dodecil sulfato de sódio) não demonstrou apenas a heterogeneidade de cada espécie, mas também que elas possuíam pesos moleculares diferentes. Entretanto, ambas continham os mesmos componentes, carboidratos e ácidos graxos, e as proporções destes diferiram entre as espécies de LPS. Os efeitos diretos dessas duas espécies na modulação da reabsorção óssea, colágeno ósseo e síntese protéica não-colagenosa foram examinados. Na reabsorção óssea, as duas espécies estimularam a liberação de cálcio de ossos fetais de ratos pré-marcados nas concentrações de 0,5 a 3µg/mL. As duas espécies de LPS também promoveram uma redução de 30 a 40% na formação protéica de colágeno na concentração de 10µg/mL. As espécies de alto peso molecular inibiram significativamente a formação de proteína não-colagenosa. Os resultados mostraram que o LPS da *B. gingivalis* inibe a formação de colágeno ósseo e promove uma potente reabsorção óssea.

Mattison et al.<sup>46</sup> (1987) examinaram a reação do osso periapical à endotoxina de *Eikenella corrodens* em sete cães adultos. Foram utilizados 28 terceiros e quartos premolares, sendo que cada premolar tinha dois canais, totalizando 56 amostras experimentais. Os dentes foram isolados com dique de borracha e foi realizada a abertura coronária. O comprimento de trabalho foi definido em 0,5mm aquém do ápice radiográfico. Todos os canais foram preparados biomecanicamente até a lima Hedströen nº 50 utilizando água apirogênica como agente irrigante. Todos os 56 canais radiculares foram intencionalmente perfurados a 1mm além do ápice com uma lima nº 20. Os canais foram

secos com pontas de papel absorvente. Com o uso de uma seringa de 1mL foi depositado 0,1mL de endotoxina *E. corrodens* em 42 raízes, 0,1mL de endotoxina *E. coli* em oito raízes (controle positivo) e 0,1mL de água apirogênica em seis raízes (controle negativo). Todas as agulhas foram colocadas passivamente no interior dos canais para permitir a injeção direta nos tecidos periapicais. Os dentes foram selados com algodão e cimento de óxido de zinco e eugenol. O procedimento foi repetido por quatro semanas. Radiografias e amostras sangüíneas foram obtidas semanalmente durante doze semanas e um animal foi sacrificado para análise histológica no final de cada período testado. Radiograficamente, 90,4% das raízes tratadas com endotoxina de *E. corrodens* e 75% das raízes tratadas com endotoxina de *E. coli* exibiram lesões periapicais. O exame histológico demonstrou significativa perda óssea e intenso infiltrado inflamatório. Os resultados mostraram que a endotoxina tem um papel na iniciação e perpetuação da inflamação e na perda óssea associadas a problemas endodônticos.

McCoy et al.<sup>49</sup> (1987) estudaram, *in vivo*, a concentração de LPS nas superfícies radiculares por períodos de tempo variados após o aplainamento radicular. Para tanto, cinco pacientes com dentes condenados devido à doença periodontal avançada participaram deste estudo. Cada indivíduo tinha o mínimo de seis dentes unirradiculados requerendo extração, perfazendo um total de trinta dentes utilizados. Um dente de cada paciente foi aplainado no dia da extração (Dia 0) e os outros dentes foram aplainados duas, quatro, oito e 12 semanas antes da extração. Após a remoção, cada dente foi colocado em um tubo contendo água apirogênica. Foram removidos cortes finos da superfície radicular, os quais foram colocados em um dessecador por dois dias. As amostras secas foram extraídas individualmente com 2mL de ácido cítrico por 15min., à temperatura ambiente, e foi possível quantificar a endotoxina usando o método cromogênico do lisado de amebócio de *Limulus*. Concluíram que a concentração de endotoxina presente nas superfícies

radiculares dos dentes com doença periodontal foi notavelmente reduzida, mas não eliminada, pelo aplainamento radicular e, ainda, que houve significativa retoxificação das superfícies radiculares em um espaço de tempo relativamente curto após o aplainamento radicular. A concentração de endotoxina encontrada foi maior nos dentes removidos duas, quatro, oito e 12 semanas após o aplainamento que no dente extraído no mesmo dia.

Lindeman et al.<sup>43</sup> (1988) estudaram a produção de interleucina 1 (IL-1) e do Fator de Necrose Tumoral (TNF) pelos monócitos do sangue periférico humano, ativados por bactérias periodontais e LPS. As bactérias testadas foram: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A. a) Y4, *Eikenella corrodens*, *Haemophilus aphrophilus*, *Bacteroides gingivalis*. Para comparar os efeitos, bactérias orais Gram-positivas também foram testadas, como o *Staphylococcus epidermidis* e o ácido lipoteicóico (LTA) extraído de *Staphylococcus aureus*. O A.a e o *B. gingivalis* induziram níveis mais altos de TNF e produção de IL-1, enquanto *E. corrodens* e *H. aphrophilus* induziram quantidades menores de TNF e IL-1. O LPS purificado do A.a Y4, na concentração de 1µg/mL, foi capaz de induzir a liberação de IL-1 e TNF. As bactérias Gram-positivas não apresentaram efeitos estimulatórios nos monócitos; o LTA induziu a produção de IL-1 e TNF em concentração equivalente ao LPS. Os resultados indicaram que os monócitos são ativados por LPSs livres ou ligados às bactérias periodontais Gram-negativas e que suas monocinas induzem a reabsorção óssea pelos osteoclastos, podendo contribuir para a destruição óssea periodontal.

Horiba et al.<sup>29</sup> (1989) investigaram a citotoxicidade do LPS purificado de *Bacteroides gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Veillonella parvula*, isolados de canais radiculares infectados, contra duas linhagem de células mesenquimais, fibroblastos L-929 e WI-38, e duas linhagens de células epiteliais, KB e HeLa S-3. A inibição do crescimento celular por esses LPSs foi considerável para linhagens de células

mesenquimais, mas para linhagens de células epiteliais essa inibição foi branda. Cada LPS purificado de *B. gingivalis*, *F. nucleatum* e *V. parvula*, nas concentrações de 100µg/mL ou 250µg/mL, inibiu mais fortemente o crescimento dos fibroblastos L-929 e, em seguida, também inibiu o crescimento dos fibroblastos WI-38. A inibição das células da linhagem epitelial, KB e HeLa S-3, não ocorreu quando foi usado LPS na concentração de 100µg/mL e quando foi adicionado LPS na concentração de 250µg/mL ocorreu leve inibição do crescimento celular.

Horiba et al.<sup>30</sup> (1990) estudaram a distribuição da endotoxina na parede dentinária de canais radiculares infectados. Amostras das paredes dentinárias da superfície pulpar do canal até o lado cementário foram preparadas por um método abrasivo. Para tanto, utilizaram trinta dentes com canais radiculares infectados, recém-extraídos de pacientes em que foi diagnosticado periodontite apical avançada. As coroas foram desprezadas e as raízes foram seccionadas ao meio, verticalmente, através do eixo longitudinal, em seguida, foram novamente seccionadas verticalmente de forma a obter uma espessura de 1mm e, ainda, foi realizada outra secção, agora no sentido transversal, também com 1mm de espessura, obtendo, portanto, um bloco de raiz com uma área aproximada de 1mm<sup>2</sup>. Um método abrasivo foi usado para obter uma série de pó de dentina, de cada espécime, progressivamente da superfície pulpar da dentina até o cimento. Foi medida a quantidade de pó em todos os espécimes. Foi acrescentado 1mL de água destilada apirogênica ao pó de dentina e o conteúdo de endotoxina, extraído com ácido cítrico, foi medido usando um método colorimétrico. O conteúdo de endotoxina foi significativamente maior nas amostras da superfície pulpar (300µm de profundidade) do que nas amostras da parede cementária. Foi detectada endotoxina em todas as amostras obtidas dos canais radiculares infectados.

Segal et al.<sup>79</sup> (1990) estudaram *in vitro* a permeabilidade da dentina humana à endotoxina bacteriana. Para tanto, foi usado um

sistema-modelo em que uma câmara foi dividida ao meio para estudar a passagem do LPS endotóxico através de discos de dentina. O LPS foi extraído com fenol/água de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 29523 e introduzido num dos lados do disco de dentina (aproximadamente 0,2mm de espessura) no interior da câmara. O efluente do outro lado do disco foi monitorado pela presença de LPS medido pelo lisado de *Limulus*. O LPS foi detectado quase imediatamente após sua introdução no sistema e atingiu o nível máximo em 24h. Durante as duas primeiras horas, a condutibilidade hidráulica da dentina reduziu para um valor de 75,4% em relação ao controle (solução apirogênica). Após 24h., a condutibilidade hidráulica retornou próximo aos níveis do controle. Os resultados revelaram que o LPS é capaz de passar através da dentina e diminuir sua condutibilidade hidráulica.

Horiba et al.<sup>31</sup> (1991) avaliaram as correlações entre endotoxina e sintomas clínicos ou áreas radiolúcidas em canais radiculares infectados. Amostras foram coletadas de canais radiculares de trinta dentes de pacientes com periodontite apical e o conteúdo de endotoxina analisado. Os dentes foram isolados com dique de borracha, foi realizada a abertura de acesso coronário e os canais radiculares foram instrumentados até a lima nº 25. Uma ponta de papel absorvente saturada com solução fisiológica foi inserida até a porção apical do canal por 1min. para absorver o exsudato e permitir a detecção de microrganismos e endotoxina. Foram feitas tomadas radiográficas na região dos dentes envolvidos. Foi detectada maior quantidade de endotoxina em todos os 16 dentes com sintomas clínicos, em quatro dos 14 dentes assintomáticos, em 19 dos 22 dentes com área radiolúcida na região periapical e também em 19 dos vinte dentes com exsudato. Portanto, os resultados demonstraram que os níveis de endotoxina foram maiores em dentes com sintomatologia, com áreas radiolúcidas e com exsudação do que em dentes sem essas características.

Sundqvist<sup>92</sup> (1992) investigou a relação comensal e antagônica entre microrganismos no canal radicular de dentes humanos com periodontite apical. Amostras foram obtidas de 65 canais radiculares infectados e analisadas de acordo com as espécies, frequência de acontecimento e proporção da microbiota total isolada. As espécies mais frequentes foram *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium alactolyticum*, *Eubacterium lentum* e *Wolinella recta*. Foram avaliadas as associações positivas e negativas entre as bactérias isoladas. Fortes associações positivas foram encontradas entre *F. nucleatum* e *P. micros*, *Porphyromonas endodontalis*, *Selenomonas sputigena* e *W. recta*. Houve também uma associação positiva entre *P. intermedia* e *P. micros*, *P. anaerobius* e a eubactéria. Em geral, espécies de estreptococos, *Propionibacterium propionica*, *Capnocytophaga ochracea* e *Veillonella parvula* não demonstraram associações positivas e apresentaram associações negativas com as outras bactérias. Os resultados são coerentes com o conceito de que existe no canal radicular um meio ambiente especial e seletivo e isto é devido, em parte, à natureza cooperativa e antagônica entre as bactérias presentes no canal radicular infectado.

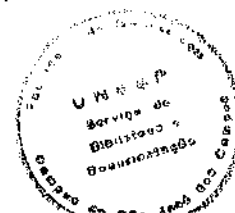
Yamasaki et al.<sup>109</sup> (1992) quantificaram endotoxina e identificaram as bactérias Gram-negativas em lesões periapicais de ratos. As polpas dos molares foram expostas, infectadas e a quantidade de endotoxina no tecido periapical do primeiro molar inferior direito foi medida pelo Endospecy (Seikagaku-Kogyo Co. Tokyo, Japan), enquanto o número de colônias de bactérias Gram-negativas foi determinado na mesma região do primeiro molar inferior esquerdo. Nos animais experimentais, a quantidade de endotoxina no tecido periapical aumentou gradualmente de 1 a 70 dias. Bactérias Gram-negativas foram isoladas dos tecidos periapicais e seu número aumentou gradualmente de 1 a 14 dias (26 a 82%), porém diminuiu após 21 dias. Os resultados do estudo

demonstraram que a quantidade de endotoxina nos tecidos periapicais aumentou progressivamente com o tempo e que o número de bactérias Gram-negativas isoladas da mesma região não aumentou na mesma proporção.

Wang & Stashenko<sup>106</sup> (1993) estudaram o papel da interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) na patogênese da destruição óssea periapical num modelo experimental em rato. Extratos de tecidos de lesões inflamatórias ativas contendo altos níveis de atividade de reabsorção óssea indicaram a presença de mediadores protéicos. Cromatografia de gel filtração dos extratos de lesões ativas demonstrou que a maior parte da atividade está associada com as citocinas IL-1 $\alpha$  e Fator de Necrose Tumoral (TNF). Inibição com antisoro citocina-específico demonstrou que a atividade de reabsorção em lesões ativas era significativamente neutralizada pelo anti-IL-1 $\alpha$ , enquanto que anti-IL-1 $\beta$ , anti-TNF- $\alpha$  e anti-TNF- $\beta$  tiveram apenas efeitos moderados. Uma baixa atividade de reabsorção estava presente em extratos de lesões crônicas, que também foi neutralizada com anti-IL-1 $\alpha$ . Os tecidos inflamatórios produziram mais IL-1 $\alpha$  que IL-1 $\beta$  *in vitro*, confirmando os achados com os extratos, e níveis altos de IL-1 $\alpha$  estavam presentes nas lesões ativas por radioimunoensaio. Os dados indicaram que a reabsorção óssea estimulada por infecção bacteriana é primariamente mediada por IL-1 $\alpha$ . As similaridades de citocinas em lesões ativas e crônicas sugerem que diferenças nesses mediadores, tanto quantitativas como qualitativas, podem ser responsabilizadas pela progressão da lesão.

Nakane et al.<sup>57</sup> (1995) estudaram os efeitos do lipopolissacarídeo (LPS) nas células da polpa dental. Dentes humanos recém-extraídos foram seccionados no seu longo eixo para obtenção da polpa. Amostras de LPS foram purificadas de *Porphyromonas gingivalis* AE 12, *Porphyromonas endodontalis* AE 51 e *Fusobacterium nucleatum* AE 91 isolados de canais radiculares infectados. O LPS da *Escherichia coli* 0111:B4 foi usado como controle positivo. As células da polpa foram

X 1506



tratadas com 1, 10 e 100µg/mL de LPS. Os efeitos do tratamento foram medidos pelo conteúdo de DNA, conteúdo protéico e atividade de fosfatase alcalina das células. Na concentração de 1µg/mL nenhum dos LPSs causaram qualquer alteração na produção de DNA ou proteína, enquanto que a quantidade de DNA foi aumentada na concentração 10µg/mL do LPS e inibida na concentração 100µg/mL. A síntese protéica foi diminuída pelos LPSs tanto a 10 como a 100µg/mL. A atividade da fosfatase alcalina não foi alterada em nenhuma concentração de LPS testada.

Nissan et al.<sup>62</sup> (1995) estudaram a habilidade da endotoxina bacteriana de difundir através da dentina humana. Um sistema *in vitro* foi desenvolvido para determinar se a endotoxina é capaz de difundir através dos túbulos dentinários sem o uso de uma pressão de filtração. Foram preparadas cavidades Classe I na superfície oclusal de cinco terceiros molares, de forma que uma espessura de 0,5mm de dentina separava a câmara oclusal da pulpar. Foi introduzida 0,1mL de endotoxina na concentração de 100µg/mL no interior da câmara oclusal e 0,1mL de água apirogênica foi adicionada na câmara pulpar. Foi removido 0,1mL das amostras da câmara pulpar após 15 e 30min. e em intervalos de 30min. por 5h. e a 24h. A presença de endotoxina foi determinada pelo método do lisado de *Limulus*. Em quatro espécimes, o aparecimento inicial de endotoxina na câmara pulpar variou de 15min. a 4h30min. Em um espécime nenhuma endotoxina foi detectada na câmara pulpar durante o período testado (24h). Os resultados indicaram que a endotoxina é capaz de passar através de 0,5mm de dentina.

Trope et al.<sup>100</sup> (1995) avaliaram *in vitro* a penetração de endotoxina bacteriana (LPS) através da obturação de canais radiculares em dentes sem selamento coronário. Vinte e quatro dentes unirradiculados foram instrumentados e divididos em três grupos experimentais: a) grupo 1 (controle positivo): quatro dentes obturados sem cimento e impermeabilizados externamente deixando 2mm apical e o

acesso coronário livres; b) grupo 2 (controle negativo): quatro dentes obturados sem cimento e totalmente impermeabilizados; c) grupo 3 (experimental): 16 dentes foram obturados com cimento endodôntico e impermeabilizados de forma igual ao grupo 1. Todos os dentes foram colocados em uma câmara contendo dois compartimentos, de modo que a porção coronária do dente ficasse restrita ao compartimento superior e a raiz ao compartimento inferior. Na parte superior da câmara foi colocada 1mL de água contendo 100µg/mL de endotoxina e na inferior foi colocada água apirogênica. Nos dois compartimentos a quantidade de endotoxina foi testada em diferentes períodos até 21 dias. Os quatro dentes do controle positivo demonstraram endotoxina no compartimento inferior em 24 horas, enquanto que nenhum dos quatro dentes do controle negativo apresentou endotoxina durante todo o período do estudo. Cinco dos 16 (31,5%) dentes experimentais demonstraram LPS no compartimento inferior no final dos 21 dias do período de teste. De acordo com os resultados deste estudo, a endotoxina pode deslocar-se através da obturação do canal radicular.

Alves et al.<sup>1</sup> (1998), considerando que a infiltração coronária é uma das principais causas de falhas no tratamento endodôntico e que a bactéria pode penetrar pela obturação do canal radicular e atingir os tecidos periapicais, examinaram em seu estudo a possibilidade de penetração de endotoxina e células bacterianas, derivadas de uma comunidade bacteriana mista, em canais radiculares preparados para núcleo. Os resultados demonstraram que tanto a bactéria como a endotoxina são capazes de penetrar pelo material obturador em canais radiculares preparados para núcleo, entretanto, a penetração da endotoxina foi mais rápida que a da bactéria. A média de tempo da infiltração de endotoxina foi de 23 dias e da bactéria foi de 62 dias. Se considerar uma seqüência de eventos ocorridos clinicamente, com uma rápida penetração de endotoxina, esta poderá induzir uma reação

periapical inicial, com subsequente falha no tratamento endodôntico e necessidade de retratamento ou cirurgia periapical.

Haight-Ponce et al.<sup>27</sup> (1999) investigaram a atividade de endotoxina (*Escherichia coli* 0111) no pó de dentina pré-tratada com hipoclorito de sódio 10% e peróxido de hidrogênio 3% por períodos de tempo variados. Vinte dentes humanos unirradiculados anteriores foram utilizados e as amostras de pó de dentina foram coletadas utilizando limas tipo Kerr n<sup>os</sup> 15, 20 e 25. As amostras foram colocadas num frasco e tratadas com 100µl de água destilada livre de endotoxina e estocadas sob refrigeração de 4°C. O pó de dentina foi pesado e suspenso na concentração protéica de 34µg/mL. A endotoxina foi diluída em três concentrações (10pg/mL; 1ng/mL e 100ng/mL). Uma microplaca foi dividida em três grupos (A, B e C) e cada grupo foi dividido em dois subgrupos, sendo que no primeiro subgrupo foi colocado, nos orifícios da placa, 100µl de água apirogênica e no segundo subgrupo 100µl da solução contendo o pó de dentina. Foi adicionado ao grupo A 100µl de peróxido de hidrogênio 3%, ao grupo B hipoclorito de sódio 10% e ao grupo C água destilada (controle positivo), por 1, 10 e 30min. Em seguida, a endotoxina foi acrescentada aos orifícios da placa. O teste do lisado de *Limulus* foi usado para determinar a quantidade de endotoxina, medido em leitor ELISA. O nível de endotoxina foi significativamente menor no pó de dentina tratada com hipoclorito de sódio 10% do que na tratada com peróxido de hidrogênio 3% a 1 e a 10min. A atividade de endotoxina foi mais baixa para o período de 30min.

Matsushita et al.<sup>47</sup> (1999) examinaram a indução de interleucina-1β (IL-1β), IL-6 e IL-8 pelos LPSs de diversas espécies de bactérias melaninogênicas. Os estudos foram realizados em culturas de sangue humano de pacientes que apresentavam quantidades diferentes de lesões periapicais, sendo que quatro pacientes tinham dez ou mais lesões periapicais visíveis radiograficamente, seis pacientes apresentavam lesões periapicais em um ou dois dentes e seis pacientes

não apresentavam lesões. O LPS da *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Porphyromonas gingivalis* 381 e *Porphyromonas endodontalis* ATCC 27067 induziram elevada resposta de IL-8 nos indivíduos do grupo com mais lesões comparando com os indivíduos dos outros grupos. Para determinar o grau de sensibilização pela bactéria testada, foram examinadas as reatividades de anticorpos no soro e saliva dos pacientes para as diferentes espécies bacterianas. O LPS da *P. gingivalis* reagiu fortemente com soros do grupo com mais lesões. Assim, o LPS de bactérias melaninogênicas pode estar envolvido com multilesões periapicais pela indução de citocinas e/ou resposta imune humoral.

Khabbaz et al.<sup>36</sup> (2000) propuseram em seus estudos determinar a presença ou ausência de endotoxinas nas camadas superficiais e profundas de lesões cariosas de dentes, com polpas vivas, sintomáticos ou assintomáticos; quantificar a endotoxina presente e associar a presença de endotoxina com dor pulpar aguda devido a pulpites irreversíveis. Para tanto, dois espécimes de dentina cariada foram obtidos de nove dentes sintomáticos com pulpites irreversíveis e de 11 dentes assintomáticos com pulpites reversíveis. O primeiro espécime (6mg) foi obtido da camada superficial da cárie e o segundo (6mg) da camada mais profunda. As endotoxinas foram extraídas pelo método fenol/água. A determinação da quantidade de endotoxina foi feita pelo método quantitativo cromogênico usando o lisado de *Limulus*. Os resultados indicaram que as endotoxinas estavam presentes nas camadas superficiais e profundas das cáries de todos os dentes sintomáticos com pulpites irreversíveis e em todos os dentes assintomáticos com pulpites reversíveis. Quantidade significativamente maior de endotoxina foi encontrada na camada superficial em comparação com a profunda e também nos dentes sintomáticos em comparação com os assintomáticos.

As bactérias Gram-negativas em polpas necrosadas de dentes com lesões periapicais induzem a reabsorção óssea através dos efeitos

dos seus LPS. Entretanto, as bactérias Gram-positivas não contêm LPS e seu papel no desenvolvimento de lesões periapicais não está claramente compreendido. Com isso, Safavi & Nichols<sup>75</sup> (2000) decidiram em seus estudos avaliar os efeitos do muramil dipeptídeo (MDP), um componente da parede celular tanto de bactérias Gram-negativas como de Gram-positivas, na liberação de citocinas pelos monócitos. Culturas de monócitos humanos foram tratadas com MDP ou LPS e níveis de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) foram estimados nos sobrenadantes. MDP e LPS estimularam a liberação de citocinas, mas o efeito do MDP foi significativamente menor que o do LPS.

Souza<sup>88</sup> (2000) avaliou a eficácia da impermeabilização das paredes dentinárias do canal radicular com verniz tipo copal, em dentes obturados com os cimentos N-Rickert e Sealer 26 e preparados para retentor intra-radicular. Usando o método cromogênico do lisado do amebócito de *Limulus* (LAL "Endochrome"), que possui especificidade para detecção de níveis mínimos de contaminação, o autor avaliou a penetração de endotoxina no sentido do interior do canal para o exterior, para verificação da permeabilidade da dentina exposta no preparo para retentor intra-radicular e no sentido da coroa para o ápice (cérvico-apical), para verificação da permeabilidade marginal apical do remanescente da obturação. Constatou-se que a endotoxina penetrou no sentido apical e lateralmente em todos os grupos experimentais, porém, quase sempre os valores foram inferiores ao padrão de 0,15 UI/mL. O cimento Sealer 26 apresentou menor infiltração apical que o cimento N-Rickert quando o verniz copal não foi utilizado. As médias da infiltração da endotoxina foram menores com a utilização do verniz tipo copal.

Khabbaz et al.<sup>37</sup> (2001) determinaram a presença ou ausência de endotoxinas em polpas de dentes humanos cariados sintomáticos e assintomáticos. Tecidos pulpares (aproximadamente 8mg) foram coletados de 28 dentes unirradiculados cariados, sendo 15 sintomáticos e 13 assintomáticos. As endotoxinas foram extraídas pelo método

fenol/água. A determinação da quantidade de endotoxina foi feita pelo método quantitativo cromogênico usando o lisado de *Limulus*. As endotoxinas foram detectadas nos tecidos pulpares de todos os dentes cariados sintomáticos ou assintomáticos, sendo que a presença de endotoxina foi significativamente maior nos dentes sintomáticos. A presença de endotoxinas em todos os tecidos pulpares indica que elas devem ter um papel importante na patogênese da doença pulpar e é possível, ainda, uma associação dos níveis de endotoxina com severidade de dor pulpar.

## **2.2 Hidróxido de cálcio e sua ação sobre os canais radiculares infectados e sobre a endotoxina**

Byström et al.<sup>7</sup> (1985) avaliaram clinicamente o efeito antimicrobiano do paramonoclorofenol canforado (PMCC), fenol canforado e hidróxido de cálcio no tratamento de canais radiculares infectados. Foram estudados 65 dentes unirradiculados com necrose pulpar e com as paredes da câmara pulpar intactas. Após o isolamento com dique de borracha, procedeu-se abertura de acesso e a irrigação com hipoclorito de sódio a 0,5% (vinte dentes) e 5% (15 dentes). Os canais radiculares foram secos com cones de papel absorvente e preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio. O acesso coronário foi selado com cimento de óxido de zinco e eugenol. Os outros trinta dentes foram irrigados com hipoclorito de sódio 0,5% e preenchidos com fenol canforado (15 dentes) e PMCC (15 dentes). Antes da medicação intracanal, o fluido do canal radicular foi absorvido por cones de papel esterilizados e transferidos para um tubo contendo caldo de cultura. Num segundo momento, um mês após o preenchimento dos canais com hidróxido de cálcio e duas semanas após o preenchimento com fenol canforado e PMCC, os curativos foram removidos através da irrigação com solução fisiológica e amostras foram coletadas dos canais radiculares para realização dos exames

bacteriológicos. Foram encontradas bactérias em um dos 35 dentes tratados com hidróxido de cálcio e em dez dos trinta dentes tratados com fenol canforado e PMCc. As bactérias isoladas foram predominantemente Gram-positivas e anaeróbias. Os resultados revelaram que o tratamento endodôntico de canais radiculares infectados deve ser completado em dois momentos com a utilização da pasta de hidróxido de cálcio como medicação intracanal.

Sjögren et al.<sup>85</sup> (1991) avaliaram o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio como medicamento intracanal a curto prazo. Foi avaliada clinicamente a aplicação do medicamento por dez minutos ou por sete dias nos canais radiculares de trinta dentes com lesões periapicais. Esses dentes foram isolados com dique de borracha, foi realizado o acesso à câmara pulpar e o comprimento de trabalho definido. Os canais foram instrumentados com limas Hedströen até a de nº 40. Hipoclorito de sódio a 0,5% foi usado como agente irrigante. Os canais radiculares foram preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio utilizando-se um lentulo. Em doze dentes, o hidróxido de cálcio permaneceu por 10min. e em 18 dentes permaneceu por sete dias. A cavidade de acesso foi selada com bolinha de algodão esterilizada e cimento de óxido de zinco e eugenol. Os resultados demonstraram que sete dias foram eficientes na eliminação das bactérias que sobreviveram à instrumentação biomecânica do canal, enquanto a aplicação por 10min. foi insuficiente.

Georgopolou et al.<sup>24</sup> (1993) avaliaram *in vitro* a efetividade do hidróxido de cálcio e PMCc sobre bactérias anaeróbias do canal radicular. Um total de trinta microrganismos de canais radiculares infectados foram isolados e identificados. Os dentes foram isolados com dique de borracha, foi realizada a abertura coronária e o acesso à câmara pulpar. Um cone de papel esterilizado foi inserido no canal radicular por 30s e, em seguida, colocado num tubo contendo 0,9mL de meio de transporte, acondicionado numa câmara anaeróbica com 85% de Na, 10% de CO<sub>2</sub> e 5% de H<sub>2</sub>. Uma suspensão de cada cepa foi preparada em 5mL de caldo tioglicolato e

uma concentração padrão de bactérias contendo  $3 \times 10^8$ /mL foi obtida comparando-se com o tubo nº 1º da escala de MacFarland. Em seguida, 0,2mL do inóculo foi transferido para placas contendo 10mL de solução aquosa de PMCc 2% ou 10mL de solução aquosa de hidróxido de cálcio 2%, respectivamente. Após os intervalos de tempo de 5, 15, 30 ou 60 min., 0,01mL de cada diluição foi colocada em tubos contendo 0,9mL de caldo tioglicolato e 0,1mL de Tween 80. Para cada tubo, a ação antimicrobiana dos medicamentos foi testada através da cultura em placas de ágar sangue, incubadas a 37°C por dois ou mais dias. Os resultados demonstraram que as bactérias Gram-positivas apresentaram resistência ao PMCc por 5min. (92,8%), por 15min. (57,1%) e por 30min. (21,4%), enquanto que a 60min. nenhuma bactéria sobreviveu. A resistência dessas bactérias ao hidróxido de cálcio foi a 5min. (64,3%), a 15min. (7,1%) e após 30min. nenhuma bactéria sobreviveu. Para as bactérias Gram-negativas, a resistência ao PMCc foi de 93,7% a 5min.; 43,75% a 15min. e após 30min. nenhuma bactéria sobreviveu. A resistência dessas bactérias ao hidróxido de cálcio foi de 62,59% a 5min. e após 15min. nenhuma bactéria sobreviveu. Portanto, não houve diferença estatística significativa entre a efetividade do hidróxido de cálcio e do PMCc contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em nenhum intervalo de tempo testado.

Safavi & Nichols<sup>73</sup> (1993) estudaram os efeitos do hidróxido de cálcio sobre o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano. Ácidos graxos livres foram quantificados em amostras de LPS tratadas com hidróxido de cálcio. O tratamento do LPS liberou quantidades elevadas de ácidos graxos. Concluiu-se que a porção lipídica do LPS bacteriano foi hidrolizada pelo hidróxido de cálcio, resultando ácidos graxos livres. Os resultados sugeriram que a degradação do LPS mediada pelo hidróxido de cálcio pode ter uma importância nos efeitos benéficos obtidos com o uso clínico do hidróxido de cálcio na endodontia.

Safavi e Nichols<sup>74</sup> (1994) estudaram a alteração das propriedades biológicas do lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano pelo tratamento com hidróxido de cálcio. Para isso, culturas de monócitos foram estimuladas com LPS ou LPS tratado com hidróxido de cálcio e os sobrenadantes das culturas analisados quanto ao conteúdo de prostaglandina E<sub>2</sub> usando cromatografia gasosa. Prostaglandina E<sub>2</sub> foi identificada em sobrenadantes de monócitos estimulados pelo LPS mas não naqueles estimulados com LPS tratado com hidróxido de cálcio. Concluiu-se que o tratamento com hidróxido de cálcio pode alterar as propriedades biológicas do LPS bacteriano.

Trope et al.<sup>101</sup> (1995) examinaram histologicamente a cura da reabsorção radicular inflamatória produzida intencionalmente em dentes reimplantados de cães da raça beagle, tratados por curto ou longo período com hidróxido de cálcio. Trinta incisivos foram aleatoriamente divididos em quatro grupos. No G1 (controle negativo): os dentes não infectados foram extraídos, as raízes receberam sulcos longitudinais e os dentes foram reimplantados em dois minutos. No G2: os canais radiculares foram artificialmente infectados após sua extração, sulcados longitudinalmente e reimplantados como no grupo 1. Radiografias foram feitas e aos primeiros sinais de reabsorção radicular inflamatória da raiz, os canais radiculares foram instrumentados e medicados com hidróxido de cálcio. No G2, os canais foram obturados após uma semana de medicação. Os dentes no G3 foram tratados conforme descrito no G2, porém, os dentes não foram obturados e o hidróxido de cálcio permaneceu até o final do experimento. No G4 (controle positivo): os dentes foram tratados conforme descrito nos G2 e G3, mas nenhum tratamento endodôntico foi realizado. Vinte semanas após o início do tratamento endodôntico, os animais foram sacrificados e os corte histológicos preparados. No G1, completo reparo do cimento foi visto em todos os dentes. No G2, cinco dos dez dentes demonstraram completo reparo do cimento enquanto no G3, nove dos dez dentes apresentaram

total reparação. Nenhum dos dentes do G4 demonstrou reparo do cimento. De acordo com os resultados, os autores concluíram que a medicação com hidróxido de cálcio a longo prazo pode ser mais efetiva que a curto prazo nos casos de reabsorção radicular inflamatória.

Caliskan & Sen<sup>8</sup> (1996) avaliaram a efetividade do hidróxido de cálcio no tratamento de periodontites apicais e o prognóstico a longo prazo desta terapia. Para isso, um total de 172 dentes com lesões periapicais, com ou sem sintomatologia, foram tratados endodonticamente usando uma pasta de hidróxido de cálcio como medicação intracanal e um cimento obturador contendo hidróxido de cálcio. Em 58 dentes, a medicação foi acidentalmente ou intencionalmente extravasada para o interior das lesões. Todos os casos foram acompanhados por um período de dois a cinco anos. Os dentes em que o medicamento foi extravasado não apresentaram diferenças no processo de cura em relação aos dentes tratados convencionalmente. Os resultados demonstraram que em 80,8% dos casos houve cura completa, em 7,6% houve cura incompleta e em 11,6% houve falhas no tratamento endodôntico.

Siqueira Junior & Uzeda<sup>83</sup> (1996) estudaram a desinfecção por pastas de hidróxido de cálcio dos túbulos dentinários infectados com duas bactérias anaeróbias estritas e uma facultativa. Cilindros de dentina de dentes bovinos foram experimentalmente infectados com *Actinomyces israeli*, *Fusobacterium nucleatum* ou *Enterococcus faecalis*, bactérias comumente encontradas em infecções endodônticas. Os espécimes infectados foram expostos a pastas de hidróxido de cálcio com solução fisiológica ou com paramonoclorofenol canforado (PMCc) por períodos de uma hora, um dia e uma semana. A viabilidade das bactérias após esses períodos de exposição foi avaliada através da incubação dos espécimes em meio de cultura, para comparar a efetividade das pastas na desinfecção dos túbulos dentinários. A pasta de hidróxido de cálcio com PMCc eliminou efetivamente as bactérias após o período de uma hora de exposição, exceto *E. faecalis* que necessitou de um dia de exposição. Em

contraste, a pasta de hidróxido de cálcio mais solução fisiológica foi ineficiente contra *E. faecalis* e *F. nucleatum* mesmo após uma semana de exposição. Os resultados demonstraram que o PMCc aumentou os efeitos antimicrobianos do hidróxido de cálcio.

Barbosa et al.<sup>2</sup> (1997) avaliaram clínica e laboratorialmente a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio, clorexidina, paramonoclorofenol canforado (PMCc) como medicamentos intracanal. No estudo clínico, 311 dentes unirradiculados foram preparados biomecanicamente e, em seguida, receberam na câmara pulpar uma bolinha de algodão com PMCc por sete dias. O acesso coronário foi selado com Cavit. Na semana seguinte, os canais foram irrigados com solução fisiológica esterilizada e cones de papel foram usados para absorver todo o fluido do canal. Esses cones foram transferidos para tubo de vidro contendo caldo tioglicolato e incubados em estufa a 37°C por sete dias, verificando-se diariamente o crescimento de microrganismos. Em seguida, os dentes foram divididos em três grupos experimentais: a) grupo 1: os canais radiculares foram tratados com PMCc somente na câmara pulpar (bolinha de algodão); b) grupo 2: os canais foram preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio; c) grupo 3: os canais foram preenchidos com clorexidina 0,12%. A abertura de acesso foi selada com Cavit. Após sete dias, os espécimes que não demonstraram crescimento bacteriano no caldo tioglicolato foram obturados, restando 120 dentes. Desses dentes, após o curativo de demora, foi realizado o teste bacteriológico para comparar os efeitos antimicrobianos dos medicamentos. Os resultados demonstraram que todos os medicamentos foram efetivos na redução ou eliminação da microbiota dos canais radiculares, demonstrado pela presença de culturas negativas, não existindo diferença estatística significativa entre eles. No estudo laboratorial, foi avaliada a capacidade inibitória dos medicamentos contra bactérias comumente encontradas nas infecções endodônticas, como *Porphyromonas endodontalis*, *Actinomyces israeli*, *Enterococcus faecalis*,

entre outras. Na avaliação laboratorial, o PMCc apresentou maiores zonas de inibição bacteriana contra todos os grupos testados.

Barthel et al.<sup>3</sup> (1997) investigaram se o potencial tóxico do LPS de *Escherichia coli* poderia ser reduzido ou eliminado pelo hidróxido de cálcio, verificando a liberação do Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) pelos monócitos. Quatro concentrações de LPS foram preparadas: 1ng/mL; 10ng/mL; 100ng/mL e 1000ng/mL. Essas amostras foram feitas em duplicatas, sendo que, em metade dessas amostras, foram adicionados 25mg de hidróxido de cálcio, resultando numa solução saturada. Dois tubos livres de endotoxinas, um com água e outro com água e hidróxido de cálcio serviram como controles. Monócitos foram coletados do sangue periférico de um doador saudável por centrifugação e plaqueados a uma densidade de  $4 \times 10^6$  células/mL<sup>1</sup>. Os monócitos aderentes foram incubados por 4 dias a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> em meio M199 com 10% de soro autólogo. As diferentes soluções de LPS foram adicionadas aos orifícios da placa no 5º dia. Após 4 horas, os sobrenadantes foram coletados e o TNF- $\alpha$  quantitativamente medido por ELISA. Os resultados indicaram que o hidróxido de cálcio pode eliminar a capacidade indutora do LPS *E. coli* de estimular a produção de TNF- $\alpha$  pelos monócitos do sangue periférico ( $P < 0.0001$ ).

Siqueira Junior & Uzeda<sup>84</sup> (1997) avaliaram os efeitos antimicrobianos da clorexidina, metronidazol e hidróxido de cálcio associado a três veículos, contra espécies bacterianas comumente isoladas de canais radiculares infectados. Os medicamentos incluíram: a) pó de hidróxido de cálcio com água destilada; b) hidróxido de cálcio com PMCc (3.5; 6.5); c) hidróxido de cálcio mais glicerina; d) gel de clorexidina digluconato 0,12% e e) gel metronidazol 10%. As atividades antimicrobianas dos medicamentos foram avaliadas contra bactérias anaeróbias facultativas e estritas. As anaeróbias estritas usadas foram: *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces israeli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Propionibacterium acnes* e

*Campylobacter rectus*. As anaeróbias facultativas foram: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis* e *Actinomyces viscosus*. O estudo avaliou as atividades antimicrobianas dos medicamentos que agiram por meio de contato e não pela liberação de vapor. O teste de difusão no ágar foi usado e os halos de inibição bacteriana ao redor de cada medicamento foram medidos e comparados. Os resultados revelaram que o hidróxido de cálcio com o PMCC foi efetivo contra todas as espécies bacterianas testadas. A clorexidina também teve efeito inibitório contra todas as espécies. O metronidazol causou inibição de crescimento de todos os anaeróbios estritos testados. O hidróxido de cálcio misturado com água destilada ou glicerina falhou na inibição bacteriana, provavelmente devido às limitações da difusibilidade do medicamento no meio de cultura utilizado.

Estrela et al.<sup>17</sup> (1998) estudaram *in vitro* o tempo necessário para o hidróxido de cálcio, em contato com os microrganismos, expressar seu efeito antimicrobiano. Os microrganismos usados foram: *Micrococcus luteus* (ATCC-9341), *Staphylococcus aureus* (ATCC-6538), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC-25586), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853), *E. coli* e *Streptococcus sp.* Foram preparadas suspensões puras e mistas dos microrganismos e cones de papel esterilizados foram imersos no inóculo por 3 min. Em seguida, esses cones foram colocados em placas de Petri e cobertos com pasta de hidróxido de cálcio, usando solução fisiológica como veículo. Nos intervalos de 0, 1, 2, 6, 12, 24, 48, 72 h. e sete dias, dois cones foram removidos do contato com a pasta de hidróxido de cálcio. Um cone foi imerso em 10mL de caldo BHI e o outro foi espalhado, com movimentos rotatórios, na superfície de ágar BHI 2% e incubado a 37°C por 24 a 48h. O experimento foi repetido três vezes nos diferentes períodos de tempo. Um estereomicroscópio foi usado para observar o crescimento das colônias. O efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio ocorreu após 12h.

para o *M. luteus* e *F. nucleatum*; 24h. para os *Streptococcus sp*; 48h. para *E. coli*; e 72h. para os *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A mistura II (*M. luteus*, *Streptococcus sp* e *S. aureus*) foi sensível ao potencial antimicrobiano do hidróxido de cálcio após 48 horas, enquanto a mistura I (*M. luteus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*), a mistura III (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e a mistura IV (*S. aureus* e *P. aeruginosa*) foram inativadas após 72 h. de exposição.

Fava<sup>22</sup> (1998) estudou a incidência de dor pós-operatória em periodontites apicais agudas usando dois diferentes medicamentos no canal radicular. Sessenta dentes, incisivos centrais superiores, de 48 pacientes foram preparados biomecanicamente e divididos em dois grupos experimentais. O grupo 1 recebeu como medicamento uma pasta de hidróxido de cálcio (Calen-S.S.White) e o grupo 2 recebeu uma solução de corticosteróide-antibiótico (Otosporin). Todos os dentes foram selados com Cavit. Após sete dias, foram reavaliados clinicamente. Não foi observada diferença na incidência de dor pós-operatória nos dois grupos avaliados.

Estrela et al.<sup>18</sup> (1999) avaliaram a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio nos túbulos dentinários infectados. Para tanto, quatro espécies bacterianas foram selecionadas: *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*. Estes microrganismos foram inoculados em caldo Infuso de Cérebro e Coração (BHI) e incubados a 37°C por 24 horas. As suspensões de microrganismos foram ajustadas para o tubo 2 da escala de MacFarland ( $6 \times 10^8$  células/mL). Os autores utilizaram 63 incisivos centrais superiores humanos, que foram preparados biomecanicamente e esterilizados em autoclave. Cinco grupos de doze dentes cada foram contaminados com um tipo de microrganismo ou com a mistura deles. Este procedimento foi repetido a cada 72h. durante 28 dias. Os dentes foram mantidos em estufa a 37°C, em ambiente úmido. Os canais radiculares foram então irrigados com 5mL de solução fisiológica, secos e completamente preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio. Em intervalos de 0, 48,

72h. e sete dias, os curativos foram removidos, os dentes imersos em 5mL de BHI e incubados a 37°C por 48h. para permitir o crescimento dos microrganismos. Este crescimento foi verificado pela turvação do meio de cultura e confirmado após semeadura em ágar infuso de cérebro e coração (BHI) a 37°C por 24 horas. Os resultados deste estudo demonstraram que, durante o período de sete dias, o hidróxido de cálcio não demonstrou efeito antimicrobiano positivo nos túbulos dentinários para os microrganismos testados.

Nelson Filho et al.<sup>60</sup> (2000) avaliaram, *in vivo*, o efeito da endotoxina bacteriana (LPS), associada ou não ao hidróxido de cálcio, sobre os tecidos apicais e periapicais de dentes de cães, por meio de avaliação histopatológica. Foram utilizados 59 premolares de cães que, após abertura coronária e biopulpectomia, foram preenchidos com um dos seguintes materiais: Grupo I: LPS; Grupo II: LPS associado ao hidróxido de cálcio; Grupo III: soro fisiológico. No Grupo IV, foram induzidas lesões periapicais experimentalmente. Decorridos trinta dias, os animais foram sacrificados e as peças submetidas ao processamento histológico. Os resultados obtidos demonstraram que a intensidade do infiltrado inflamatório, a espessura do ligamento periodontal e a presença de reabsorções no Grupo I foram semelhantes ao Grupo IV, enquanto que no Grupo II foram semelhantes ao Grupo III. Os autores concluíram que a endotoxina bacteriana ocasionou o desenvolvimento de reação periapical e que o hidróxido de cálcio foi capaz de inativar os efeitos tóxicos da endotoxina.

Buck et al.<sup>5</sup> (2001) analisaram os efeitos de irrigantes endodônticos e hidróxido de cálcio no LPS usando uma técnica altamente seletiva de espectrometria de massa e cromatografia gasosa com monitoramento iônico seletivo. Em tubos de vidro apirogênicos foi misturado 25µl de LPS, 0,5mL de água apirogênica e 0,5mL de cada um dos irrigantes testados, por 30min: água, clorexidina 0,12%, EDTA 15%, hipoclorito de sódio 2,6%, etanol 95% e associações de irrigantes como

clorexidina 0,12% com hipoclorito de sódio 2,6%, clorexidina 0,12% mais hipoclorito de sódio 2,6% mais etanol 95% (CNE). Como o hidróxido de cálcio é comumente utilizado como medicação de demora, ele foi aplicado ao LPS por 1, 2 e 5 dias. A inativação do LPS foi medida pela quantificação dos ácidos graxos livres liberados. Pelos resultados apresentados, a água, o EDTA, o etanol, a clorexidina 0,12%, a clorexidina mais hipoclorito de sódio, e o hipoclorito de sódio sozinho demonstraram pequena ou nenhuma degradação do LPS. O hidróxido de cálcio (1 dia) e a associação de clorexidina, etanol e hipoclorito de sódio detoxificaram moléculas de LPS pela hidrólise de ligações éster das cadeias de ácidos graxos do lipídio A.

Estrela et al.<sup>19</sup> (2001) analisaram a influência de veículos na eficiência antimicrobiana do hidróxido de cálcio. Um total de 588 cones de papel absorvente nº 50 foi imerso em várias suspensões microbianas por 3min. As cepas utilizadas foram: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Os cones de papel foram colocados em placas de Petri e cobertos com medicação intracanal contendo hidróxido de cálcio:  $\text{Ca(OH)}_2$  + salina;  $\text{Ca(OH)}_2$  + paramonoclofenol canforado (PMCC);  $\text{Ca(OH)}_2$  + solução de clorexidina 1%;  $\text{Ca(OH)}_2$  + sulfato de sódio 3%;  $\text{Ca(OH)}_2$  + Otosporin. Após 1min, 48h, 72h e sete dias, 147 cones de papel foram removidos do contato com o medicamento, imersos em 5mL de caldo Lethéen e incubados a 37°C por 48h. O crescimento microbiano foi avaliado pela turvação do meio de cultura. Subsequentemente, um inóculo de 0,1mL foi transferido para 5mL de BHI e incubado a 37°C por 48h. Os tubos BHI positivos foram selecionados, semeados em ágar BHI e incubados a 37° por 48h. O efeito antimicrobiano ocorreu após 48h nas culturas de *S. mutans*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* e na cultura mista, para todos os medicamentos. Assim, os autores concluíram que, nas condições deste estudo, os vários veículos

associados ao hidróxido de cálcio não influenciaram o tempo necessário para a inativação microbiana.

Hosoya et al.<sup>33</sup> (2001) analisaram tanto a concentração de cálcio como o pH na região periapical, em modelos de canais radiculares, após a aplicação de quatro diferentes preparações de hidróxido de cálcio. Cinquenta modelos de canais radiculares foram preparados e divididos em cinco grupos: G1: o hidróxido de cálcio foi misturado com água destilada, na proporção de 38%, pó e água; G2: o hidróxido de cálcio foi misturado com água destilada a 44%; G3: a mistura foi a 50%; G4: apenas o pó do hidróxido de cálcio foi usado e G5 (controle): nada foi aplicado nos canais. Todas as amostras foram imersas em água destilada e mantidas a 37°C. A concentração de cálcio e o pH da água destilada foram medidos após três e sete dias, e semanalmente até 15 semanas. A concentração de cálcio e a mudança no pH da água destilada foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) nos grupos 1, 2 e 3 que no grupo 4. A maior concentração de  $Ca^{2+}$  liberada foi observada após três dias nos G1, G2 e G3 e após sete dias no G4. O pico de mudança no pH foi observado após 14 dias para os G1, G2 e G3, enquanto que para o G4 foi observado após 49 dias. Após o pico, todos os grupos demonstraram um declínio no pH. Os resultados sugeriram que o tempo necessário para uma ótima atividade intracanal do hidróxido de cálcio é de no mínimo duas semanas.

### **2.3 Polimixina B e sua atividade sobre a endotoxina presente na circulação de pacientes com sepsis por microrganismos Gram-negativos**

Rifkind<sup>69</sup> (1967) propôs em seus estudos determinar se a polimixina B poderia prevenir letalidade endotóxica em ratos. Para tanto, endotoxina da *Escherichia coli* sozinha ou associada ao sulfato de

polimixina B foi injetada intravenosamente em ratos de oito a dez semanas de idade. A letalidade foi observada após 48 h. Quando 50µg de polimixina B foi usada, esta preveniu a letalidade endotóxica em todos os casos, porém, quando foi usada 100µg de polimixina B houve 33% (23 de 70) de mortalidade. Os dados demonstraram que a polimixina B previne letalidade endotóxica, entretanto, depende da proporção antibiótico/endotoxina.

Moore et al.<sup>53</sup> (1986) estudaram a interação de antibióticos policatiônicos com LPS e lipídio A de *Pseudomonas aeruginosa* usando dansil-polimixina, um derivado fluorescente da Polimixina B. A dansil-polimixina pode ser ligada a regiões do LPS e do lipídio A, incluindo regiões ligantes de íons  $Mg^{2+}$ , resultando num aumento da fluorescência, que pode ser medido por espectrofotometria. Uma variedade de compostos policatiônicos, incluindo gentamicina, estreptomicina, polimixina B, bem como  $Mg^{2+}$ , foram capazes de substituir a dansil-polimixina ligada ao LPS ou ao lipídio A. Diferenças marcantes em termos do aumento da substituição e da quantidade requerida do cátion para substituir uma certa quantidade de dansil-polimixina foram observadas. Adição de excessos de polimixina B resultou na substituição total da dansil-polimixina. Outros dados demonstraram que a polimixina B ligou-se a múltiplas regiões do LPS, incluindo regiões ligantes de antibióticos aminoglicosídicos e outros compostos policatiônicos.

Stokes et al.<sup>91</sup> (1989) examinaram o efeito inibidor da Polimixina B, *in vivo* e *in vitro*, sobre a liberação de TNF dos macrófagos alveolares de ratos em resposta ao LPS. A endotoxina utilizada foi purificada da *E. coli* 0111:b4 e os níveis de endotoxina foram quantificados pelo método de geleificação do lisado de *Limulus*. Foram preparadas culturas de macrófagos e a produção de TNF- $\alpha$  (*in vitro*) foi bloqueada pela Polimixina B nas concentrações de 100, 10 e 1µg/mL. Um segundo antibiótico incluído na pesquisa, a gentamicina, inibiu a produção de TNF- $\alpha$  (*in vitro*) apenas na concentração de 100µg/mL e não

demonstrou nenhum efeito em concentrações menores. Efeitos inibitórios similares também foram induzidos pela Polimixina B num modelo *in vivo*, no qual a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos foi estimulada pela injeção intratraqueal de LPS. Como muitos dos efeitos do LPS são mediados pelo TNF- $\alpha$ , sua inibição pode explicar a proteção oferecida pela Polimixina B contra a toxicidade induzida pelo LPS.

Bucklin et al.<sup>6</sup> (1995) estudaram a eficácia da Polimixina B conjugada com dextrano 70 em modelo experimental de endotoxemia. Foram administradas em ratos, intraperitonealmente, doses letais de bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) juntamente com D-galactosamina e um antibiótico imipenen (Merck, Co). Os autores tinham determinado previamente que a quimioterapia antibiótica daria significativa proteção contra a letalidade mediada por *E. coli* com pequenas doses de bactéria, entretanto, o antibiótico não proporcionou proteção contra largas doses de bactéria. A administração de Polimixina B conjugada com dextrano 70 promoveu significativa proteção quando usada juntamente com um antibiótico, mas sozinha não foi efetiva. Os resultados deste estudo indicaram que a combinação é efetiva na prevenção de choque séptico letal por Gram-negativo em ratos e pode ser usada como um potente agente terapêutico em humanos.

Darrow & Keithley<sup>13</sup> (1996) estudaram o efeito da Polimixina B na redução da inflamação induzida por endotoxina no ouvido médio. Para tanto, utilizaram porcos, que foram previamente examinados e considerados livres de qualquer infecção primária. Uma solução de endotoxina de *Salmonella typhimurium* foi preparada na concentração de 10 $\mu$ g/mL; uma solução de endotoxina mais Polimixina B foi preparada nas concentrações de 10 $\mu$ g/mL e 100 $\mu$ g/mL, e uma terceira solução com apenas Polimixina B foi preparada na concentração de 100 $\mu$ g/mL. Foi realizado um acesso à membrana timpânica e preparado um orifício no osso com 3mm de diâmetro. Um inóculo de 100 $\mu$ l foi inserido e o orifício fechado com pasta de óxido de zinco e eugenol. No primeiro experimento,

15 porcos foram divididos em três grupos. Em cada grupo, três animais receberam endotoxina em um ouvido e endotoxina mais Polimixina B no ouvido oposto, e 2 animais receberam Polimixina B em um ouvido e PBS no outro. No primeiro grupo, os animais foram sacrificados no segundo dia; o outro grupo no quinto dia e o último grupo no oitavo dia. No segundo experimento, a quantidade de infusões no ouvido médio foi quantificada e associada com células inflamatórias em resposta à endotoxina e à endotoxina mais Polimixina B. Trinta e seis porcos foram divididos em três grupos. Em cada grupo, quatro animais receberam endotoxina em um ouvido e PBS no outro; quatro animais receberam endotoxina mais Polimixina B em um ouvido e no oposto PBS; 4 animais receberam Polimixina B em um e PBS no outro ouvido. Os tempos de sacrifício foram os mesmos. Os resultados demonstraram que as secções do osso temporal exibiram significativa diferença histológica nos ouvidos expostos à endotoxina e à endotoxina mais Polimixina B. Os ouvidos tratados com endotoxina apresentaram edema de mucosa, infusão e infiltrado celular, enquanto os ouvidos tratados com endotoxina mais Polimixina B, nos mesmos animais, exibiram uma marcante redução na resposta inflamatória. Assim, este estudo demonstrou a eficácia da Polimixina B na inibição da inflamação induzida por endotoxina no ouvido médio.

A endotoxina pode se desprender das bactérias Gram-negativas durante a terapia antimicrobiana e promover a síndrome do choque endotóxico, uma das principais causas de morte no mundo desenvolvido. Com isso, existe um grande interesse no desenvolvimento de antimicrobianos que possam reverter o quadro antes que ocorra o choque. Para tanto, Gough et al.<sup>25</sup> (1996) estudaram a atividade antiendotóxica e antimicrobiana, *in vitro* e *in vivo*, de dois peptídios catiônicos MBI-27 e MBI-28. Em estudos prévios, os autores demonstraram que esses peptídios ligam-se ao LPS com afinidade equivalente à polimixina B. Neste estudo, os peptídios bloquearam a

habilidade do LPS de induzir choque endotóxico e a liberação de TNF- $\alpha$  em cultura de macrófagos RAW 264-7. O MBI-27 e MBI-28 ofereceram significativa proteção contra o choque endotóxico letal em camundongos sensibilizados pela galactosamina. Tanto o MBI-27 como o MBI-28 demonstraram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas *in vitro* e contra infecções por *Pseudomonas aeruginosa* em ratos neutropênicos (*in vivo*).

Parviainen et al.<sup>63</sup> (2001) avaliaram os efeitos do sulfato de Polimixina B na resposta de cavalos à endotoxina. Foram utilizados oito cavalos doentes, três doses de Polimixina B (1.000, 5.000 e 10.000 U/Kg do peso corporal) e solução fisiológica como controle. Amostras sanguíneas foram coletadas antes e após 24h. da administração da Polimixina B. Para a medida do Fator de Necrose Tumoral (TNF) induzida por endotoxina, as amostras sanguíneas foram incubadas a 37°C por 4h. com 1ng de endotoxina de *Escherichia coli* ou *Salmonella typhimurim* por mL de sangue. Para a medida da atividade da endotoxina residual, o plasma foi coletado e esterilizado em tubos apirogênicos, diluído a 1:10 com água apirogênica e incubado por 10 min. a 70°C. Endotoxina de *E. coli* (0,1 ou 1ng/mL de plasma) foi adicionado ao tubos congelados antes da realização do teste do lisado de *Limulus*. Comparando-se com os valores do controle, a Polimixina B causou uma diminuição significativa da atividade de TNF induzida pela endotoxina e a atividade da endotoxina residual foi significativamente reduzida após administração de 10.000 U de Polimixina B/Kg. Nas concentrações de 1.000 e 5.000 U de Polimixina/Kg houve uma inibição de 75% na atividade de TNF por 3 e 12h., respectivamente. Os resultados dos estudos demonstraram que a Polimixina B é um efetivo inibidor da inflamação induzida por endotoxina em cavalos doentes.

Tani et al.<sup>96</sup> (2001) avaliaram a correlação entre os parâmetros clínicos e plasmáticos e a mudança da atividade endotóxica no plasma de pacientes sépticos com 2 horas de terapia usando polimixina B. Um total

de 88 pacientes foi admitido para o tratamento de sepsis severa ou falência séptica de órgãos com polimixina B. A endotoxina, o TNF- $\alpha$ , a IL-6, a IL-10, o inibidor do fator ativador do plasminogênio (PAI-1) e os parâmetros clínicos foram medidos antes, imediatamente após e no dia seguinte ao tratamento com a polimixina B. Após duas semanas, o índice de sobreviventes foi de 51,1%. Nesses indivíduos, o TNF- $\alpha$ , a IL-6, a IL-10 e o PAI-1 foram significativamente reduzidos durante as duas horas de tratamento com a polimixina B e no dia seguinte. O nível de endotoxina no plasma reduziu mais que 30%. Conseqüentemente, o tratamento com a polimixina B contribuiu para reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias no plasma e melhorar os parâmetros clínicos principalmente durante as 2h de tratamento. As alterações desses parâmetros estão correlacionadas com mudanças na atividade endotóxica no plasma dos sobreviventes que tiveram os níveis de endotoxina adequadamente reduzidos.

#### **2.4 Polimixina B pura ou associada a hidrocortisona e ao sulfato de neomicina**

Shenep et al.<sup>81</sup> (1985) avaliaram o papel do antibiótico na liberação de endotoxina durante terapia da sepsis experimental causada por bactérias Gram-negativas. Foram obtidas amostras de sangue de coelhos com septicemia causada por *E. coli* e tratados com cloranfenicol, gentamicina e moxalactam. Foram medidas, em cada amostra de sangue, as concentrações de bactérias viáveis, endotoxinas livres e o total de endotoxina. Nos coelhos tratados com cloranfenicol, a média geométrica dos níveis de endotoxinas livres permaneceu proporcional à média geométrica dos níveis de bacteremia, resultado que indica ausência de liberação de endotoxina induzida pelo antibiótico. Em contraste, os níveis de endotoxinas livres aumentaram rapidamente enquanto os níveis de bacteremia declinaram após o tratamento com gentamicina ou

moxalactam, sugerindo a liberação de endotoxina induzida pelos antibióticos. Apesar de graus similares de morte bacteriana, os níveis médios de endotoxinas livres foram bem maiores em coelhos tratados com moxalactam que em coelhos que receberam gentamicina ( $p < 0,05$ ). Esses resultados indicaram que a liberação de endotoxina durante a terapia da septicemia causada por bactérias Gram-negativas é dependente da classe de antibiótico administrada e não necessariamente correlacionada com o grau de morte bacteriana.

Smith & Moodie<sup>86</sup> (1990) compararam a eficácia, tolerabilidade e aceitabilidade da preparação neomicina/dexametasona administrada em aerossol (Otomize) e neomicina/polimixina B/hidrocortisona administrada em gotas (Otosporin) no tratamento de 187 pacientes com otite externa. Os pacientes foram orientados para aplicar um dos medicamentos três vezes ao dia durante dez dias independente da resposta. As avaliações foram feitas no início, após dez dias e após 24 dias do início da terapia quanto à severidade do eritema, edema e resíduos. Os resultados demonstraram que não existe diferença significativa entre os dois grupos no início do tratamento. Ocorreu uma melhora significativa em ambos os grupos do início do tratamento ao dia dez e do dia dez ao dia 24 para todos os sintomas, e não houve diferença estatística significativa entre os dois medicamentos utilizados.

Miró<sup>52</sup> (2000) estudou otites médias supurativas crônicas tratadas com aplicações tópicas de soluções de ciprofloxacina 0,2% (CIP) ou combinação de polimixina B, neomicina e hidrocortisona (PNH-suspensão). Os medicamentos foram administrados por 6 a 12 dias em 322 pacientes com otite média supurativa crônica. Os agentes causais mais frequentemente identificados foram os *Staphylococcus aureus* (28% dos pacientes), *Pseudomonas aeruginosa* (19%) e *Staphylococcus sp* (9%). Foi observado sucesso clínico em 91% e 87% dos pacientes tratados com CIP e PNH, respectivamente. A erradicação bacteriológica foi vista em 89% e 85% dos pacientes tratados com CIP e PNH,

respectivamente. Após um mês, houve reinfecção em três pacientes tratados com PNH e em um paciente tratado com CIP. Com base nos resultados clínicos e bacteriológicos, concluiu-se que a solução de ciprofloxacina 0,2% é efetiva e bem tolerada em pacientes com otites médias supurativas crônicas.

## **2.5 O lisado de Limulus, a radiação com cobalto 60 e o efeito do laser de Er:YAG**

Tsuji & Harrison<sup>103</sup> (1979) utilizaram o lisado de Limulus para monitorar a inativação de LPS com óxido de etileno, irradiação por cobalto 60 e tratamentos com calor seco. Concluíram, que o lisado de Limulus pode ser usado para determinar a degradação ou depirogenação cinética do LPS.

Csako et al.<sup>10</sup> (1983) estudaram as propriedades físico-químicas da endotoxina após exposição à radiação ionizante por cobalto 60. A eletroforese em poliacrilamida com SDS demonstrou perda gradual dos componentes polissacarídicos das moléculas de endotoxinas. A destruição da toxicidade primária do lipídio A foi sugerida pelos resultados dos testes de atividade: tanto a pirogenicidade como a reatividade ao Limulus da endotoxina foram destruídas pelo aumento das doses de radiação. Os resultados indicaram que a detoxificação é devido, provavelmente, a múltiplos efeitos da radiação ionizante nos LPS bacterianos, e sua ação envolve a destruição dos componentes polissacarídicos e a alteração do lipídio A da molécula de endotoxina.

Yamaguchi et al.<sup>108</sup> (1997) avaliaram em seus estudos os efeitos do laser de Er:YAG, na remoção do LPS usando microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi usado um espectrofotômetro infravermelho para investigar os efeitos do laser, aplicado na dentina radicular, sobre o LPS. Foram utilizados 15 premolares inferiores que tiveram suas coroas seccionadas e o conteúdo da câmara pulpar

removido. As raízes foram seccionadas longitudinalmente (5x5x1mm) e divididas em três grupos: a) G1: nenhum tratamento; b) G2: leve aplainamento do cimento; c) G3: aplainamento do cimento até a superfície dentinária ficar descoberta. O centro de cada espécime foi usado como área experimental irradiada e a periferia serviu como controle. A quantidade de vapor liberada foi grande e as áreas irradiadas apresentaram poucas alterações morfogênicas. Cinco microlitros da solução de LPS 0111 B4 de *E. coli* foi gotejada na dentina radicular dos espécimes, que foram irradiados pelo laser de Er:YAG e irrigados com água apirogênica. A quantidade de LPS foi determinada pelo espectrofotômetro a 405nm. O laser de Er:YAG conseguiu remover 83,1% do LPS. Este estudo sugeriu que a irradiação pelo laser de Er:YAG pode ser proveitosa para o condicionamento radicular na terapia periodontal. Entretanto, testes clínicos são necessários para estabelecer melhores parâmetros para utilização do laser na periodontia.

## **2.6 Atividade das endotoxinas *in vivo***

Galanos et al.<sup>23</sup> (1985) compararam as atividades endotóxicas do lipídio A sintético e natural da *E. coli*. O lipídio A quimicamente sintetizado e o natural foram testados quanto à toxicidade letal, pirogenicidade, reação de Shwartzman local, capacidade de geleificação do lisado de *Limulus*, atividade do Fator de Necrose Tumoral (TNF), mitogenicidade para células B, indução da síntese de prostaglandinas em macrófagos e especificidade antigênica. A atividade do TNF foi investigada em camundongos BALB/c, injetando-se no peritônio diferentes quantidades (10µg a 50µg) de lipídio A. Para o teste de geleificação do lisado de *Limulus*, 100µl do lisado foi adicionado aos tubos contendo diluições (0,01 a 0,1 pg) de lipídio A sintético e natural com 100µl de água apirogênica. Após, as amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora. A geleificação foi verificada através da inclinação dos tubos e

formação de gel. A toxicidade letal para camundongos foi de 100% com 1 $\mu$ g e 50% com 0,01 $\mu$ g de lipídio A sintético ou natural. A atividade pirogênica dos lipídios foi analisada em coelhos e as duas concentrações (0,1 e 0,01 $\mu$ g/Kg) induziram febre e alteração bifásica na temperatura retal de 1°C e 2°C em 1 e 3 horas. Ambas as preparações (lipídio A natural e sintético) induziram completa geleificação do lisado de *Limulus* na quantidade mínima de 10pg. A atividade do TNF também foi semelhante, sendo que, com 50 $\mu$ g ambas as preparações causaram necrose tumoral em 80% dos animais. A indução da síntese de prostaglandinas em macrófagos foi similar. Concluiu-se, assim, que tanto o lipídio A natural como o sintético apresentam atividades idênticas e são indistinguíveis em todos os testes.

Brandtzaeg et al.<sup>4</sup> (1989) estudaram a relação quantitativa de endotoxina circulante (lipooligosacarídeos – LOSs) e o desenvolvimento de falência de múltiplos órgãos e morte em 45 pacientes admitidos com doença meningocócica sistêmica bacteriologicamente comprovada. Nível de LOS no plasma superior a 700 ng/L foi correlacionado com o desenvolvimento de choque séptico severo ( $p < 0,0001$ ), síndrome respiratória ( $p = 0,0035$ ), nível patologicamente elevado de creatinina sérica ( $p < 0,0001$ ) ou morte em consequência de falência de múltiplos órgãos ( $p = 0,0002$ ). Níveis de LOS no plasma de  $< 25$ , 25-700, 700-10.000 e  $> 10.000$  ng/L estavam associados com 0%, 14%, 27% e 86% de mortalidade, respectivamente. Essas observações sugerem que a quantificação do LOS, usando o lisado de amebócito de *Limulus* associado a um substrato cromogênico, fornece informações importantes no prognóstico da doença meningocócica sistêmica.

Greenman et al.<sup>26</sup> (1991) avaliaram a eficácia de uma imunoterapia auxiliar com anticorpo monoclonal (IgM) antiendotoxina em pacientes com quadro de infecção gram-negativa e resposta séptica sistêmica. Foram registrados 316 pacientes com sepsis por microrganismos Gram-negativos. Estes pacientes receberam 2mg/Kg de

anticorpo monoclonal dirigido contra endotoxina ou placebo (grupo controle). Uma segunda infusão foi administrada 24 horas após. Dentre os pacientes com sepsis Gram-negativa que não estavam em choque quando entraram no estudo (n=137), o tratamento com o anticorpo monoclonal resultou em um significativo aumento no número de sobreviventes, com risco relativo de 2.3 (p=0,01). A recuperação de indivíduos com falência de múltiplos órgãos foi mais freqüente entre esses pacientes, ocorrendo em 19 (54%) dos 35 pacientes do grupo que recebeu o anticorpo contra oito (30%) dos 27 pacientes pertencentes ao grupo controle (placebo), com p=0,05. Assim, os autores concluíram que o tratamento com anticorpo antiendotoxina reduz a mortalidade e aumenta a chance de recuperação de pacientes com falência de órgãos, mas que não estavam em choque quando tratados.

Horiba et al.<sup>32</sup> (1992) investigaram a ativação do Sistema Complemento pelo LPS purificado de *Porphyromonas endodontalis*, *Veillonella parvula* e *Fusobacterium nucleatum*, bactérias Gram-negativas isoladas de canais radiculares infectados. A quantificação de C3 total (C3T) foi eleita para avaliar a ativação do Complemento pelo LPS. Foram preparadas soluções de LPS de 1.000, 500, 100 e 10µg/mL. Um volume de 0,1mL de cada LPS foi adicionado a 0,4mL de soro humano completo e incubado a 37°C por 60min. Conseqüentemente, a quantidade de LPS por 0,5mL da reação foi 100, 50, 10 e 1µg. Para quantificar a formação de C3T, a solução de LPS mais soro humano foi diluída a 400, 800, 1.200 e 1.600 com tampão. Subseqüentemente, a suspensão celular foi incubada a 37°C por 90 min e então resfriada. Solução fisiológica foi adicionada e as células foram centrifugadas a 3.000rpm por 10min. Hemólises na solução sobrenadante foram medidas com o uso de um espectrofotômetro e a atividade hemolítica do C3T foi determinada. Quando 1µg de LPS foi adicionada ao soro humano, o consumo de C3T foi menor que 10% para os LPSs de todas as espécies bacterianas usadas. Quando 10µg do LPS foram adicionados, o nível de consumo do

C3T foi de 15 a 25%, exceto para a cepa de *V. parvula*. Quando 50 $\mu$ g de LPS foram adicionados, o consumo do C3T foi maior que 60%, exceto para *F. nucleatum*. Com 100 $\mu$ g de LPS, o consumo foi maior que 70%, exceto para *V. parvula*. Assim, o consumo de C3T foi similar para os LPSs das quatro espécies bacterianas, quando testado em quantidade superior a 10 $\mu$ g.

Como evidenciado nesta revisão da literatura, as endotoxinas estão envolvidas na etiologia das reações inflamatórias crônicas do periápice dentário, especialmente daqueles dentes seriamente comprometidos pelo processo de cárie dentária e indicados para tratamento endodôntico. Assim, seria de grande utilidade analisar a eficiência dos medicamentos intracanal e sua capacidade de neutralizar ou destruir os LPS presentes nestes locais.

### **3 PROPOSIÇÃO**

A proposta deste trabalho foi avaliar, *in vitro*, a efetividade de curativos intracanal, a pasta de hidróxido de cálcio e a solução de Polimixina B, pura ou associada ao sulfato de neomicina e hidrocortisona, na eliminação das endotoxinas presentes nos canais radiculares.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Preparo das amostras

Esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP (Anexo A).

Foram utilizados 75 dentes humanos unirradiculados, extraídos na clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, por motivos diversos e com prévia autorização dos pacientes à disciplina. Os dentes ficaram 24h. em solução de formol a 10% e, posteriormente, foram limpos e imersos em solução fisiológica até o momento do uso. A seleção dos dentes foi feita de acordo com a anatomia externa e interna da raiz, apresentando um único canal reto. As coroas foram seccionadas com disco de carborundum próximo à junção cimento-esmalte e o terço apical de todas as raízes foi cortado em 3mm, padronizando o tamanho dos espécimes em 14mm (Figura 2).

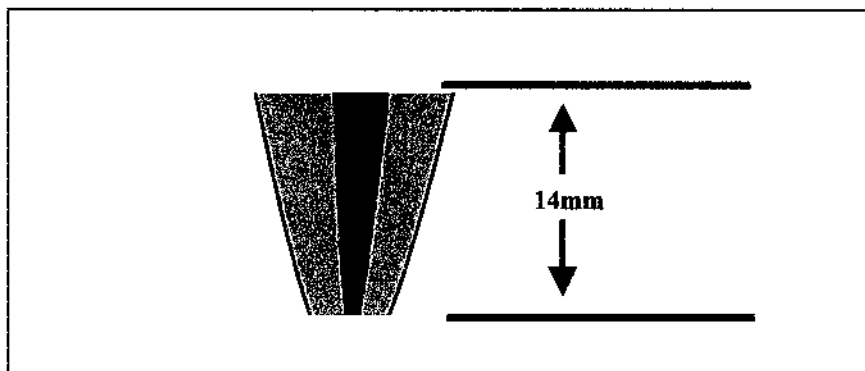


FIGURA 2 - Padronização dos espécimes.

A instrumentação dos canais radiculares foi realizada em toda a sua extensão, desde seu diâmetro anatômico até a lima tipo Kerr (Maillefer – Michigan – USA) número 80 e, em seguida, foi realizado o escalonamento utilizando-se brocas Gates Glidden n<sup>os</sup> 2, 3 e 4. Durante o preparo biomecânico, todos os canais foram abundantemente irrigados com solução de hipoclorito de sódio a 1% a cada troca de instrumento. Concluído o preparo, os canais radiculares foram preenchidos com solução de ácido etilenodiaminotetracético 17% (EDTA – Byofórmula Tecnpharma Farmácia de Manipulação – SJCampos - SP), que foi agitada por 3min. A neutralização e irrigação final foi realizada com 10mL de hipoclorito de sódio a 1%.

Em seguida, foi feito um vedamento da região apical utilizando-se resina composta fotopolimerizável Z-100 (3M – Dental Products – St Paul - USA) - (Figura 3) e as raízes foram impermeabilizadas externamente com duas camadas de adesivo epóxi ARALDITE (Brascola – SP – Brasil), exceto a região da abertura cervical.

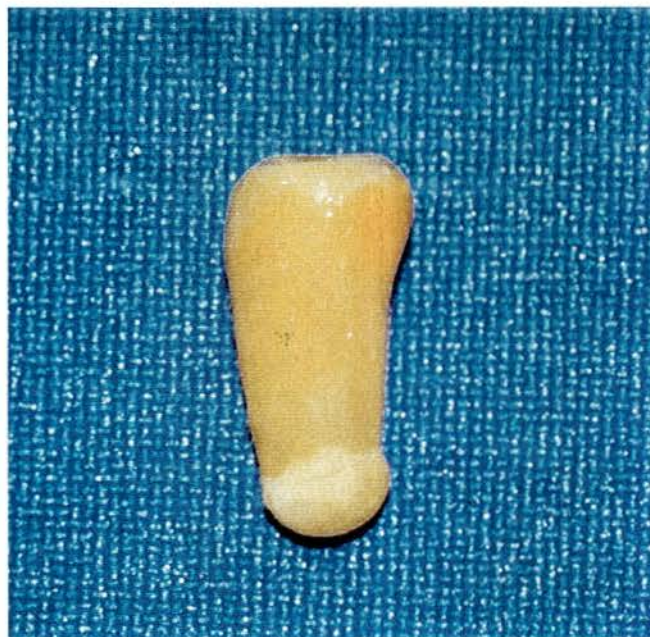


FIGURA 3 - Raiz com vedamento apical de resina fotopolimerizável.

Todos os espécimes foram colocados em frascos de vidro contendo solução fisiológica e foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20min. Em seguida, em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar), os espécimes foram irrigados com 10mL de solução fisiológica apirogênica e novamente foram armazenados em frascos de vidro estéreis, contendo solução fisiológica apirogênica, e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 min. Após, em ambiente estéril, os espécimes foram acondicionados aleatoriamente em cinco placas de polistireno de 96 furos (Costar – NY - USA), com 15 dentes em cada, como mostra a Figura 4.

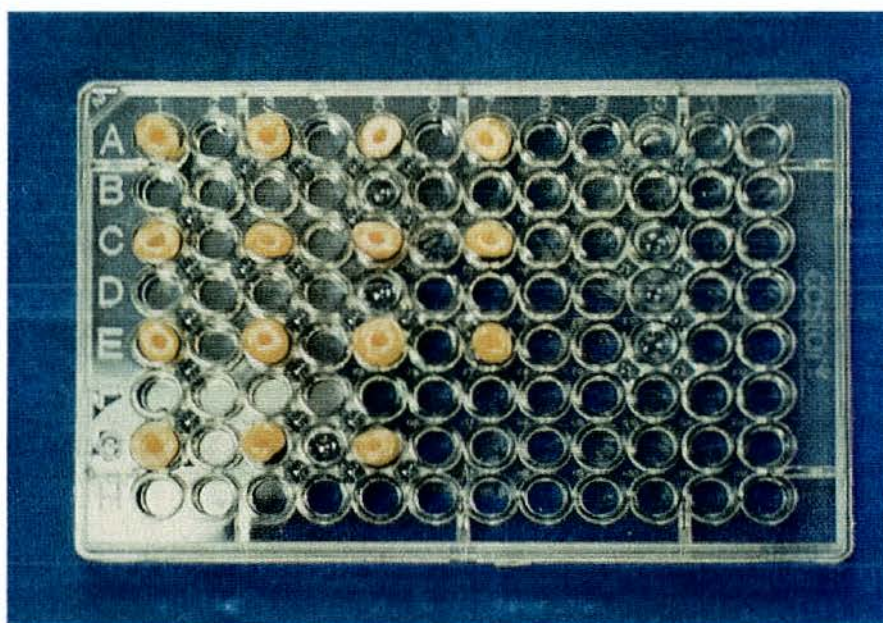


FIGURA 4 - Distribuição dos espécimes nas placas.

Estas placas foram tampadas, embaladas e enviadas à EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiação – Cotia - SP) para serem esterilizadas pela radiação gama com cobalto 60. Todos os materiais utilizados como pinça, gaze, algodão, tesoura, seringa Calen, explorador, ponteiros foram esterilizados em autoclave e, em seguida, pela radiação gama com cobalto 60.

A endotoxina utilizada foi de *Escherichia coli* n° 055:B5, adquirida do laboratório Sigma (St Louis - M.O. - USA). Em ambiente

estéril (câmara de fluxo laminar), 10µl de endotoxina (40 UI) foram inoculados, com o auxílio de uma micropipeta, no interior dos canais radiculares de sessenta espécimes (quatro placas), os quais permaneceram em estufa a 37°C com umidade relativa de 100% por 24 h.

No dia seguinte, os espécimes foram divididos em cinco grupos experimentais (15 dentes cada), da seguinte forma (Quadro 1): a) o grupo 1 recebeu como medicação intracanal uma pasta de hidróxido de cálcio (Calen - S.S.White Artigos Dentários – RJ - Brasil), como mostra a Figura 5; b) o grupo 2 recebeu uma solução de Polimixina B pura (Ophtalmos Fórmulas Oficiais Ltda – São Paulo - Brasil), de acordo com a Figura 6A; c) o grupo 3 recebeu uma solução contendo Polimixina B associada à hidrocortisona e sulfato de neomicina (OTOSPORIN– Glaxo Wellcome – SP - Brasil), como mostra a Figura 6B; d) o grupo 4 não recebeu nenhum medicamento (controle positivo); e) no grupo 5 não foi inoculada a endotoxina (controle negativo). Todos os espécimes foram selados com bolinha de algodão esterilizada e apirogênica, as placas foram fechadas, seladas com fita adesiva, embaladas em papel PVC e mantidas em estufa a uma temperatura de 37±1°C e umidade relativa 100% durante sete dias.

QUADRO 1 - Distribuição dos espécimes nos grupos experimentais.

<b>GRUPOS</b>	<b>MEDICAÇÃO</b>
<b>01</b> <b>(ENDOTOXINA)</b>	<b>HIDRÓXIDO DE CÁLCIO</b>
<b>02</b> <b>(ENDOTOXINA)</b>	<b>POLIMIXINA B</b>
<b>03</b> <b>(ENDOTOXINA)</b>	<b>POLIMIXINA B</b> <b>HIDROCORTISONA NEOMICINA</b>
<b>04</b> <b>(ENDOTOXINA)</b>	<b>NENHUMA</b>
<b>05</b> <b>(SEM ENDOTOXINA)</b>	<b>NENHUMA</b>



FIGURA 5 - Hidróxido de cálcio (pasta Calen), seringa Calen e agulha longa.



FIGURA 6 - A: Polimixina B pura, na forma de colírio; B: Polimixina B associada à hidrocortisona e sulfato de neomicina.

## 4.2 Testes para verificar a neutralização da endotoxina presente no canal radicular

Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar, sendo esta primeiramente submetida à desinfecção com álcool 70 e água apirogênica. Em seguida, a luz ultravioleta permaneceu ligada por 30 minutos e, posteriormente, a câmara foi forrada com duas camadas de gaze esterilizada e apirogênica.

Foram realizados dois testes para verificar a neutralização da endotoxina: o lisado de amebócito de *Limulus* e a produção de anticorpos em cultura de linfócitos B.

### 4.2.1 Lisado de amebócito de *Limulus*

A neutralização do conteúdo de endotoxina foi verificada utilizando-se o método de geleificação do lisado de amebócito de *Limulus* (Sigma – USA). O *Limulus* é constituído por um lisado dos amebócitos circulantes de cavalos marinhos que, quando exposto a quantidades pequenas de endotoxinas, aumenta sua opacidade bem como sua viscosidade, tornando-se um de gel duro.

O Kit lisado de *Limulus* E-Toxate (Figuras 7, 8A e 8B), obtido do laboratório Sigma (St Louis - USA) é composto por um frasco de 30mL de água apirogênica, um frasco de endotoxina padrão *Eschericchia coli* 055:B5 e um frasco contendo o lisado (pó). Assim, o lisado foi ressuscitado em 5mL de água apirogênica e, em seguida, distribuído em tubos de vidro apirogênicos 10x75mm (Charles River Endosafe - Alko do Brasil-RJ-Brasil) – Figura 9, sendo colocado 100µl do lisado em cada tubo.



FIGURA 7 - Kit lisado de amebócito de Limulus E-Toxate (Sigma).

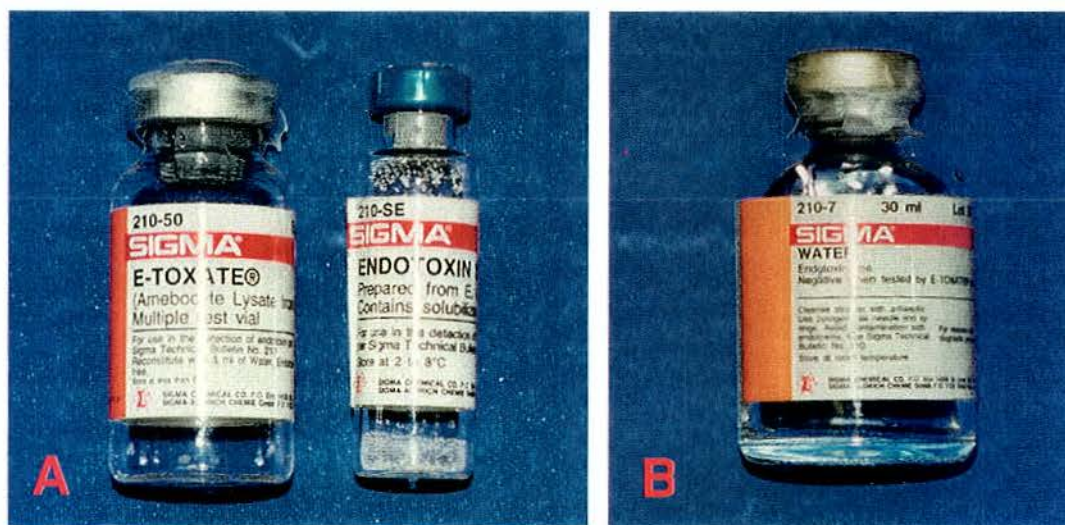


FIGURA 8 – A: O lisado de amebócito de Limulus e a endotoxina padrão de *E. coli*; B: A água apirogênica (30mL).



FIGURA 9 - Tubos apirogênicos.

Antes de realizar os testes, foi preciso verificar a sensibilidade do lisado de Limulus. Assim, foram feitas diluições de endotoxina (Quadro 2) a fim de determinar qual a concentração mínima de endotoxina (UI/mL) que o lisado de Limulus era capaz de detectar no momento do teste.

QUADRO 2 - Diluições da endotoxina e concentrações finais apresentadas.

<i>Tubo nº</i>	<i>Endotoxina padrão</i>	<i>Água apirogênica (mL)</i>	<i>Concentração Final (UI/mL)</i>
01	0,2mL de endotoxina	1,8	400
02	0,2mL do tubo nº1	1,8	40
03	0,2mL do tubo nº2	1,8	4
04	0,3mL do tubo nº3	2,1	0,5
05	1,0mL do tubo nº4	1,0	0,25
06	1,0mL do tubo nº5	1,0	0,125
07	1,0mL do tubo nº6	1,0	0,06
08	1,0mL do tubo nº7	1,0	0,03
09	1,0mL do tubo nº8	1,0	0,015

Para tanto, foram utilizados nove tubos apirogênicos contendo 100µl do lisado em cada um, onde foi acrescentado 100µl do conteúdo dos tubos de nº1 (400UI/mL) ao de nº9 (0,015UI/mL). Os tubos foram levemente agitados e incubados em estufa a 37°C por 1h. Decorrido este período, foi feita a análise da formação de gel duro inclinando-se os tubos. Verificou-se a formação de gel duro nos tubos de nºs 1, 2, 3, 4, 5 e 6 e não houve formação de gel nos tubos de nºs 7, 8 e 9. Assim, a concentração mínima de endotoxina detectada pelo lisado de Limulus foi de 0,125 UI/mL (tubo nº6).

Determinada a sensibilidade do lisado de amebócito de Limulus, deu-se prosseguimento aos testes de verificação da neutralização das endotoxinas presentes nos canais radiculares após a medicação intracanal.

Decorrido o período de sete dias da medicação, o selamento foi removido e os canais radiculares foram irrigados com 3mL de solução fisiológica apirogênica, com auxílio de seringas apirogênicas de 5mL (Injex – SP - Brasil) e agulhas apirogênicas 20x5,5mm (B.D – PR – Brasil), de modo que foram usadas duas seringas para cada canal, uma para irrigação e outra para aspiração (Figura 10).

Em seguida, o canal foi novamente preenchido com solução fisiológica e, com auxílio de uma seringa tipo insulina de 1mL (B.D – PR – Brasil), foi removido 100µl do conteúdo do canal, o qual foi colocado em um tubo apirogênico contendo 100µl do lisado de Limulus. O tubo foi agitado levemente e incubado em estufa a 37°C por 1 hora. Estes procedimentos foram repetidos para todos os espécimes. Após este período, foi verificada a formação ou não de gel duro inclinando-se os tubos.

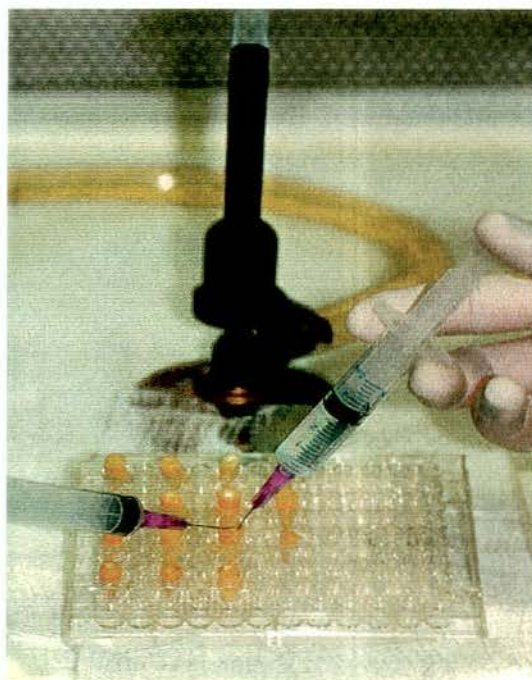


FIGURA 10 - Remoção do medicamento intracanal (irrigação e aspiração).

#### 4.2.2 Produção de anticorpos em cultura de linfócitos B

Três camundongos BALB/c de aproximadamente seis meses foram sacrificados e o baço de cada animal foi retirado (Figura 11) e macerado em um tubo cônico de plástico, esterilizado e apirogênico, com meio RPMI 1640 (5,2g de RPMI-1640-Sigma, 1,0g de  $\text{NaHCO}_3$ , 2,97g de Hepes-Sigma, água deionizada até completar 500mL e 0,5mL de gentamicina 20mg – pH 7.2), para obtenção dos linfócitos B. A seguir, foi acrescentado ao tubo 30mL de meio RPMI e este foi centrifugado por 10 min a 534,8xg. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento (Figura 12) foi acrescentado mais 30mL de meio RPMI e novamente centrifugado por 10 min a 534,8xg. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi acrescentado 30mL de meio RPMI completo, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Sigma).



FIGURA 11 - Remoção do baço de um camundongo BALB/c.

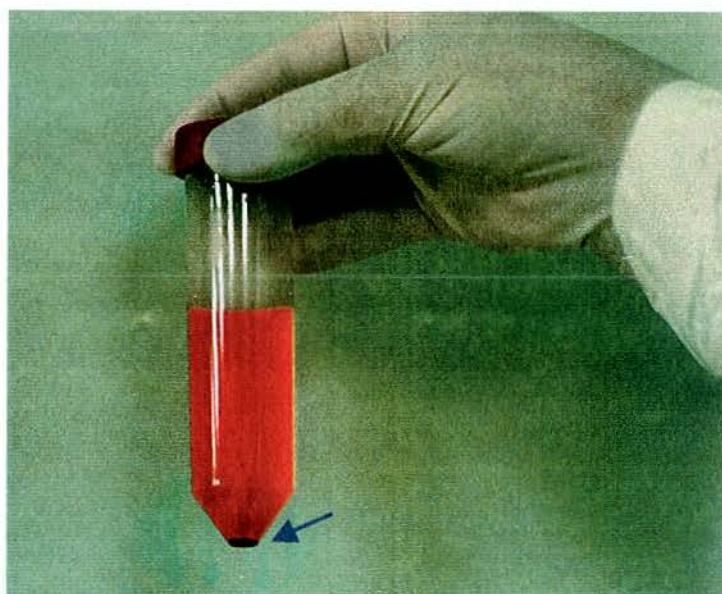


FIGURA 12 - Células do baço sedimentadas.

Em seguida, foi realizada a contagem das células B na câmara de Neubauer, utilizando o azul de tripan (Sigma – St Louis - USA) e um tampão para promover o rompimento de eritrócitos, obtendo-se o total de

$4,36 \cdot 10^6$  células por mL. Como a cultura preparada tinha 30mL, o total de células viáveis obtidas do baço de um camundongo foi de  $1,30 \cdot 10^8$  células. Após, foi colocada aproximadamente um milhão ( $1 \cdot 10^6$ ) de células viáveis em cada poço da placa de polistireno (apirrogênica) de 24 furos (Costar-NY-USA)- (Figura 13). Estas placas foram incubadas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  contendo 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas. Após este período, foi colocado 30 $\mu\text{l}$  do conteúdo aspirado de cada canal radicular, de todos os grupos experimentais, nos orifícios das placas contendo a cultura de linfócitos B e também foram deixados 15 orifícios contendo apenas a cultura celular pura, sem o conteúdo do canal radicular, que representou o grupo controle da cultura (G 06). Estas placas foram novamente incubadas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Decorridos quatro dias, foi realizado o teste ELISA para detectar a produção de anticorpos pelas células na presença de endotoxina.

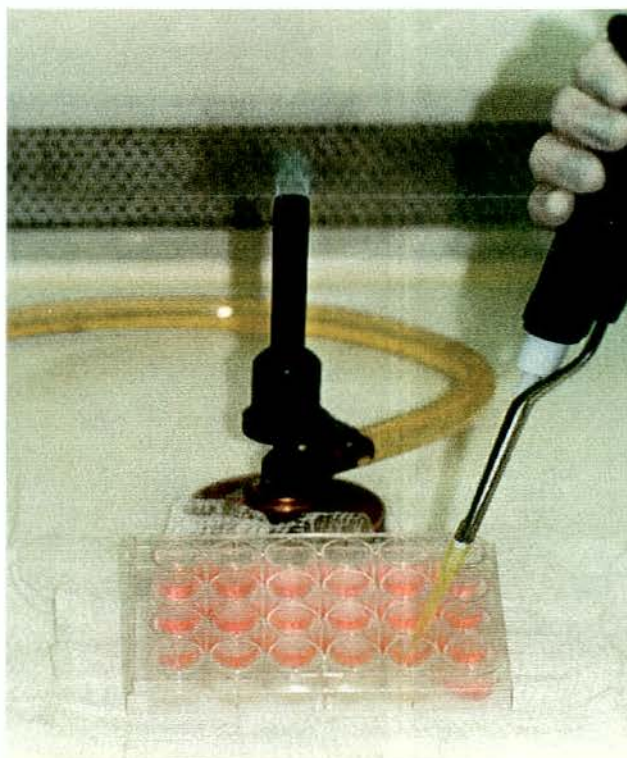


FIGURA 13 - Cultura de linfócitos B.

#### 4.2.2.1 Teste ELISA

Três placas de microtitulação de plástico flexível e fundo chato (Hemobag) de 96 furos foram sensibilizadas com conjugado anti-IgM de camundongo na concentração 0,5mg/mL. Essas placas foram incubadas 2h em estufa a 37°C. O conjugado utilizado era marcado com peroxidase, assim, realizou-se a inibição da peroxidase com azida 0,1% em PBS. As placas ficaram 1h em temperatura ambiente e, em seguida, permaneceram na geladeira até o momento do uso.

No dia do teste, as placas foram bloqueadas com 0,5% de gelatina em PBS por 45 min a 37°C. Após, foi realizado outro bloqueio com BSA 0,2%, também permanecendo 45 min em estufa a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,2% de Tween-20 (PBS-T) e foi colocado 100µl do sobrenadante de cada poço da cultura de linfócitos nos orifícios das placas. Os testes foram realizados em duplicata. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 2h e, logo após, foram lavadas abundantemente com PBS-T. A seguir, colocou-se 50µl do conjugado anti-IgM de camundongo marcado com peroxidase na concentração 1/2000. As placas ficaram 1h em estufa a 37°C e, em seguida, foram novamente lavadas abundantemente com PBS-T. Para verificar a reação, colocou-se 100µl, em cada orifício, de um reagente composto de 36mL de tampão citrato ácido cítrico 0,1M, 24mg de ortofenildiamino (OPD-Sigma-USA) e 30µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%. A reação foi revelada e, após 5 a 10 min, foi bloqueada com 50µl de ácido sulfúrico 2,5N. As densidades óticas (DO) foram lidas no leitor de ELISA (Modelo 3550 – BIORAD) com comprimento de onda de 490nm. Obtendo-se os valores da densidade ótica, fez-se as médias para cada espécime e os resultados foram analisados estatisticamente.

## 5 RESULTADOS

Com relação ao teste do lisado de Limulus, a Tabela 1 apresenta os resultados obtidos, sendo que o sinal + (positivo) significou que houve geleificação do lisado de amebócito de Limulus e o sinal - (negativo) que não houve tal geleificação.

Tabela 1 – Resultados do teste do lisado de amebócito de Limulus.

	G 01 <i>Ca(OH)<sub>2</sub></i>	G 02 <i>Polimixina B</i>	G 03 <i>Otosporin</i>	G 04 <i>Dentes sem medicação</i>	G 05 <i>Dentes sem endotoxina</i>
<b>01</b>	-	+	+	+	-
<b>02</b>	-	-	+	+	-
<b>03</b>	-	-	+	+	-
<b>04</b>	-	+	+	+	-
<b>05</b>	-	-	+	+	-
<b>06</b>	-	-	+	+	-
<b>07</b>	-	+	+	+	-
<b>08</b>	-	-	+	+	-
<b>09</b>	-	-	+	+	-
<b>10</b>	-	-	+	+	-
<b>11</b>	-	-	+	+	-
<b>12</b>	-	-	+	+	-
<b>13</b>	-	-	+	+	-
<b>14</b>	-	-	+	+	-
<b>15</b>	-	-	+	+	-

As Figuras 14A e 14B ilustram a geleificação ou não do lisado de Limulus ocorrida nos grupos experimentais.

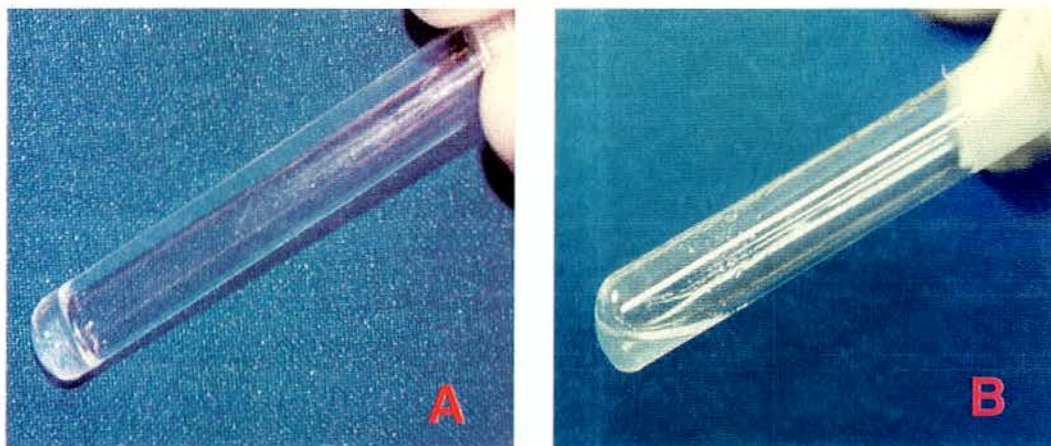


FIGURA 14 – Representação de um dos espécimes: A) em que houve geleificação do lisado de Limulus; B) em que não houve formação de gel duro.

Com base na Tabela 1, pôde-se perceber que o grupo 01 (hidróxido de cálcio) é semelhante, para a amostragem realizada, ao grupo 05 (dentes sem endotoxina – controle negativo), enquanto o grupo 03 (OTOSPORIN) é semelhante ao grupo 04 (dentes sem medicação – controle positivo). Assim, a análise foi realizada quanto a igualdade ou diferença significativa do grupo 02 (Polimixina B) com o grupo 05 (dentes sem endotoxina – controle negativo).

Para isso, o teste recomendado foi o teste não paramétrico de Mann-Whitney, aplicando-se escores para os sinais positivos e negativos: 0 – negativo, 1 – positivo. O resultado deste teste mostrou não haver diferença significativa do ponto de vista estatístico entre os grupos 02 e 05, apresentando um valor de p-nível igual a 0.072 com um grau de confiança de 95%. A semelhança entre os dois grupos só seria rejeitada caso o p-nível fosse inferior a 0.05.

A Figura 15 apresenta o histograma para os valores dos escores nos dois grupos analisados.

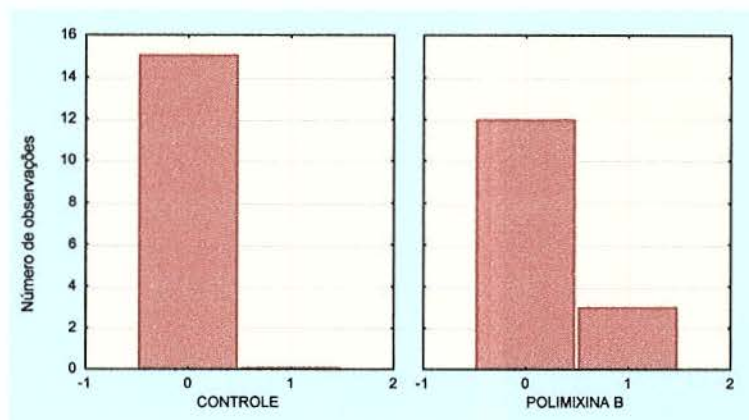


FIGURA 15 - Histograma de frequência dos escores entre o grupo 2 (Polimixina B) e o grupo 5 (Controle).

Com relação ao teste imunoenzimático (ELISA) para verificar a produção de anticorpos, os resultados obtidos da densidade ótica (DO) estão representados na Tabela 2. Neste teste foi adicionado um grupo controle (G 06), contendo apenas a cultura celular pura, sem o conteúdo do canal radicular.

Tabela 2 – Valores médios da densidade ótica (DO) para cada espécime dos grupos experimentais.

	G 01 (CaOH) <sub>2</sub>	G 02 Polimixi na B	G 03 Otospo rin	G 04 Dentes sem medicação	G 05 Dentes sem endotoxina	G 06 Cultura celular pura
01	0,690	1,033	1,206	1,292	0,763	0,725
02	0,825	0,924	1,230	1,284	0,722	0,491
03	0,909	0,994	1,270	1,260	0,822	0,504
04	0,680	0,996	1,254	1,287	0,994	0,489
05	0,841	0,866	1,200	1,268	0,779	0,614
06	0,735	0,878	1,121	1,308	0,819	0,656
07	0,730	0,933	1,115	1,350	0,849	0,562
08	0,873	0,875	1,205	1,196	0,806	0,675
09	0,856	0,695	1,079	1,314	0,963	0,678
10	0,739	0,865	1,152	1,287	0,952	0,491
11	0,556	0,875	1,288	1,242	0,990	0,764
12	0,569	0,671	1,191	1,265	1,004	0,766
13	0,735	0,753	1,181	1,273	0,966	0,698
14	0,740	0,831	1,185	1,197	0,945	0,782
15	0,399	0,846	1,127	1,213	1,007	0,764

Os valores médios da densidade ótica apresentados por cada grupo experimental estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores médios da DO apresentados por cada grupo.

	<i>G 01</i>	<i>G 02</i>	<i>G 03</i>	<i>G 04</i>	<i>G 05</i>	<i>G 06</i>
<i>Grupos</i>	<i>Ca(OH)<sub>2</sub></i>	<i>Polimixi na B</i>	<i>Otospo rin</i>	<i>Dentes sem medicação</i>	<i>Dentes sem endotoxina</i>	<i>Cultura celular pura</i>
<b>Valores</b>						
<b>Médios (DO)</b>	<b>0,725</b>	<b>0,867</b>	<b>1,187</b>	<b>1,268</b>	<b>0,890</b>	<b>0,643</b>

Estes resultados foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) uma vez que os dados apresentados são correspondentes a valores reais e contínuos. Como a amostragem foi composta com noventa dados, pôde-se supor, com 95% de confiança, que os mesmos possuem distribuição Normal graças ao teorema do limite central.

O valor de p-nível neste caso foi praticamente nulo, o que indica diferenças bastante significativas entre os seis grupos. Para identificar essas diferenças utilizou-se o teste de Tukey, que apresenta os p-níveis para cada par de grupos analisados, como representados no Quadro a seguir:

Quadro 3 - Representação dos p-níveis para cada par de grupos analisados.

	G 01	G 02	G 03	G 04	G 05	G 06
G 01 Ca(OH) <sub>2</sub>		0,00171	0,00012	0,00012	0,00026	0,21431
G 02 Polimixina B	0,00171		0,00013	0,00012	0,98700	0,00013
G 03 Otosporin	0,00012	0,00012		0,20363	0,00012	0,00012
G 04 Dente sem medicação	0,00012	0,00012	0,20363		0,00012	0,00012
G 05 Dente sem endotoxina	0,00026	0,98700	0,00012	0,00012		0,00012
G 06 Cultura pura	0,21431	0,00012	0,00012	0,00012	0,00012	

Assim, o teste de Tukey mostrou que:

- o grupo 01 (Hidróxido de cálcio) é semelhante ao grupo 06 (cultura pura), com p-nível de 0,21, e diferente dos demais grupos ( $p < 0,05$ );
- o grupo 02 (Polimixina B) é semelhante ao grupo 05 (dentes sem endotoxina), com p-nível de 0,98, e diferente dos demais grupos ( $p < 0,05$ );
- o grupo 03 (OTOSPORIN) é semelhante ao grupo 04 (dentes sem medicação), com p-nível de 0,20, e diferente dos demais grupos ( $p < 0,05$ );

Essas semelhanças e diferenças são visualizadas no gráfico de Box-Plot dos grupos (Figura 16).

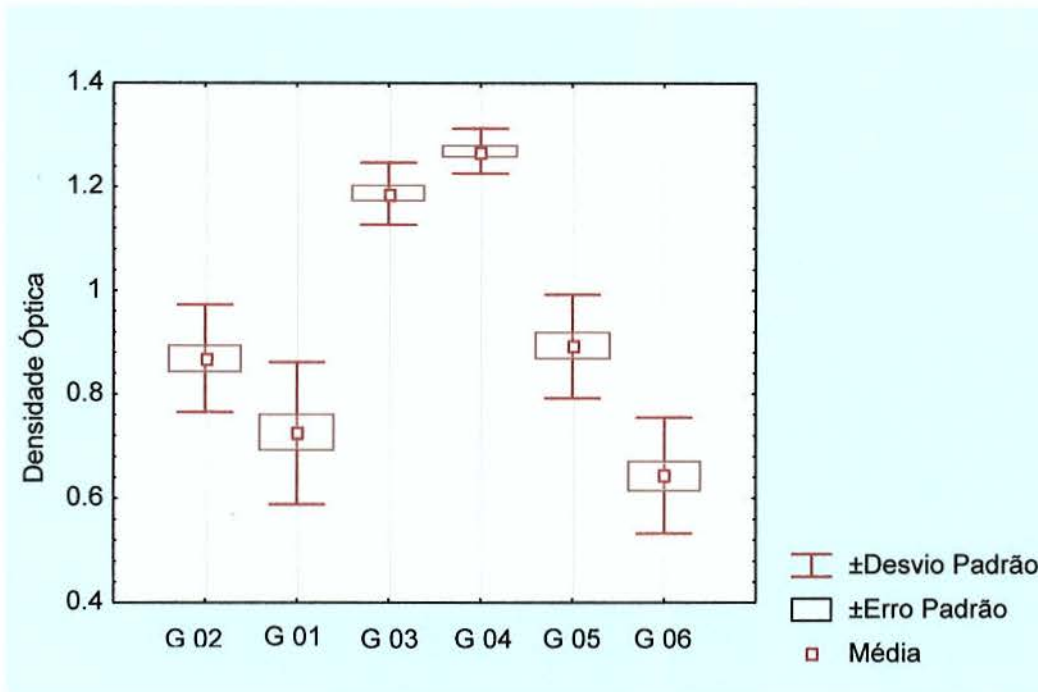


FIGURA 16 - *Box-Plot* referente aos dados da densidade óptica (DO), segundo o teste imunoenzimático (ELISA).

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Da escolha do tema

A maior parte das alterações patológicas que envolvem a polpa e os tecidos periapicais é de etiologia microbiana, sendo as bactérias e seus metabólitos fundamentais na indução e principalmente na manutenção destas lesões (Sundqvist<sup>93</sup>, 1994). Componentes bacterianos e subprodutos do metabolismo microbiano induzem reações inflamatórias agudas e crônicas nos canais radiculares e na região periapical (Kakehashi et al.<sup>35</sup>, 1965).

A baixa tensão de oxigênio, o suprimento de nutrientes e a perda de defesa natural, após a necrose pulpar, beneficiam as interações de microrganismos e podem levar à predominância de certas espécies como: *Eubacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium* (Sundqvist<sup>92</sup>, 1992). Análises da microbiota de canais radiculares infectados têm revelado a predominância das bactérias Gram-negativas anaeróbias (Wittgow Junior & Sabiston Junior<sup>107</sup>, 1975). Tani-Ishii et al.<sup>97</sup>, em 1994, estudou as alterações da microbiota do canal radicular, durante o desenvolvimento de lesões perirradiculares em ratos, e observaram que na fase ativa de destruição óssea e expansão das lesões havia o predomínio de anaeróbios estritos Gram-negativos, principalmente *Bacteroides*, *Prevotella* e *Neisseria* ssp.

As bactérias Gram-negativas possuem na sua parede externa endotoxinas, que são complexos lipopolisacarídicos (LPS) de potente ação citotóxica. Estas moléculas são importantes mediadores inflamatórios e são principalmente liberadas após a morte da célula

bacteriana. As bactérias Gram-negativas podem ser fagocitadas por macrófagos, tendo a parede degradada e a endotoxina liberada da célula com grande toxicidade (Petsch & Anspach<sup>64</sup>, 2000).

A endotoxina livre na circulação apresenta diferentes atividades pró-inflamatórias, como a indução da síntese de prostaglandinas, leucotrienos, fator ativador de plaquetas (PAF), sistema complemento e interleucina-1 (IL-1), entre outros. A ativação desses mediadores causa aumento da permeabilidade vascular, marginação de neutrófilos nas células endoteliais, quimiotaxia de neutrófilos, liberação de collagenase, indução de febre, ativação de linfócitos e numerosos outros efeitos biológicos, incluindo reabsorção óssea e formação de granulomas crônicos (Dwyer & Torabinejad<sup>14</sup>, 1981). O LPS estimula a infiltração dos tecidos por células mononucleares, com a conseqüente produção de mediadores inflamatórios, entre os quais se destacam citocinas e prostaglandinas. As citocinas são polipeptídeos de baixo peso molecular, produzidas por células hematopoiéticas e estruturais, e parecem ter uma função preponderante no desenvolvimento da periodontite apical. Entre as citocinas, destacam-se IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , o Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), produzidas por macrófagos ativados e TNF- $\beta$ , elaborado por células T ativadas. Essas substâncias químicas são ativadoras de osteoclastos, participando, portanto, da reabsorção óssea, manifestação expressiva no desenvolvimento da lesão periapical (Stashenko et al.<sup>89</sup>, 1991; Wang & Stashenko<sup>106</sup>, 1993).

Por outro lado, o LPS pode causar reabsorção óssea através de sua interferência nas reações comandadas pelos osteoblastos e osteoclastos, pois ao inibir os efeitos estimulantes dos fatores de crescimento sobre os osteoblastos, esse componente celular das bactérias Gram-negativas bloqueia a reparação óssea no sítio inflamatório (Stashenko et al.<sup>90</sup>, 1991). Além disso, o LPS, a IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  têm a capacidade de estimular a produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), por parte de fibroblastos, osteoblastos e macrófagos, que constitui importante

ativador de osteoclastos (Lindeman et al.<sup>43</sup>, 1988; Stashenko et al.<sup>89</sup>, 1991; Wang & Stashenko<sup>106</sup>, 1993; Nair<sup>56</sup>, 1997; Schwartz et al.<sup>78</sup>, 1997). Contudo, o LPS é um importante fator de virulência, determinando efeitos biológicos que resultam na amplificação das reações inflamatórias, pois mesmo quantidades pequenas de endotoxinas são capazes de induzir a resposta inflamatória periapical (Dwyer & Torabinejad<sup>14</sup>, 1981; Mattison et al.<sup>48</sup>, 1987; Estrela & Figueiredo<sup>16</sup>, 2001).

Schein & Schilder<sup>76</sup> (1975) verificaram que dentes com polpa necrosada contêm grande quantidade de endotoxina e os estudos de Schonfeld et al.<sup>77</sup> (1982) demonstraram que a presença de endotoxina em lesões endodônticas está altamente correlacionada com lesões granulomatosas. Dahlén et al.<sup>12</sup>, em 1981, comprovaram a capacidade do LPS de ativar a reabsorção óssea, cementária e dentinária em macacos, avaliando histopatologicamente a região periapical após três e sete meses da inoculação do LPS nos canais radiculares. Horiba et al.<sup>31</sup>, em 1991, observaram uma maior quantidade de endotoxina nos dentes sintomáticos e naqueles que apresentavam grandes áreas radiolúcidas periapicais.

Desta forma, o sucesso do tratamento endodôntico dependerá da máxima eliminação das bactérias e seus produtos do interior do sistema de canais radiculares, massa dentinária e erosão cementária apical através da instrumentação do canal radicular, da ação do agente irrigante utilizado e do medicamento intracanal. Devido a presença de endotoxina nos espaços pulpares e nas áreas periapicais potencialmente inflamadas, sua detoxificação pode facilitar a cura e reduzir a dor e o edema (Buck et al.<sup>5</sup>, 2001).

O hidróxido de cálcio é o agente antimicrobiano mais recomendado como medicação intracanal em diferentes situações clínicas, como infecções do canal radicular, apicificação, reabsorção radicular, entre outras (Byström et al.<sup>7</sup>, 1985; Tronstad<sup>102</sup>, 1988). É a medicação intracanal mais empregada atualmente. A dissociação iônica

do hidróxido de cálcio em íons cálcio e íons hidroxila e o efeito destes íons sobre os tecidos e microrganismos possibilitaram tal consagração. Estrela & Figueiredo<sup>16</sup> (2001) acreditam que seu representativo destaque entre os fármacos endodônticos deve-se a duas expressivas propriedades: a primeira é a inibição de enzimas bacterianas, a partir de sua ação em nível de membrana citoplasmática, conduzindo ao efeito antimicrobiano e a segunda é a ativação enzimática tecidual, observada por sua ação sobre a fosfatase alcalina, gerando efeito mineralizador. Estas propriedades são decorrentes de seu elevado pH, com valores aproximados a 12.6, o que estabelece alta liberação de íons hidroxila. Sjögren et al.<sup>85</sup> (1991) estudando o efeito do hidróxido de cálcio em dentes com lesões periapicais constataram que a destruição dos microrganismos foi eficaz aos sete dias, e que 13 das 14 espécies bacterianas isoladas eram Gram-negativas anaeróbias. Safavi & Nichols<sup>73</sup>(1993) demonstraram que a porção lipídica do LPS bacteriano foi hidrolizada pelo hidróxido de cálcio, após uma semana de exposição, resultando em ácidos graxos livres.

A Polimixina B é um antibiótico polipeptídico catiônico, muito utilizado em pacientes com sepsis bacteriana por microrganismos Gram-negativos e em choques endotóxicos (Rifkind<sup>69</sup>, 1967; Evans et al.<sup>20</sup>, 1999), pois é capaz de se ligar com alta afinidade ao lipídio A, neutralizando sua atividade biológica (Moore et al.<sup>53</sup>, 1986; Morrison & Jacobs<sup>54</sup>, 1976). A polimixina B inibe a ativação do complemento e a síntese de interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e interleucinas nos macrófagos ativados pelo LPS. Em modelos animais, a polimixina B inibe certas atividades biológicas induzidas pelo LPS, como a coagulação intravascular, a leucopenia, a reação de Schwartzman generalizada, inflamação associada com meningite bacteriana Gram-negativa e choque endotóxico (Evans et al.<sup>20</sup>, 1999).

Outros trabalhos preconizam a utilização de polimixina B sozinha (Darrow & Keithley<sup>13</sup>, 1996) ou associada com hidrocortisona e

sulfato de neomicina (Smith & Moodie<sup>86</sup>, 1990; Tong et al.<sup>99</sup>, 1996; Miró<sup>52</sup>, 2000) em infecções do ouvido médio causadas por bactérias Gram-negativas. Na Odontologia, as associações de corticosteróides e antibióticos também são usadas como medicação intracanal. Holland et al.<sup>28</sup>, em 1980, citado por Lopes & Siqueira Junior<sup>44</sup> (1999), propuseram a utilização do OTOSPORIN, uma associação de hidrocortisona com os antibióticos sulfato de polimixina B e sulfato de neomicina, em veículo aquoso. A hidrocortisona apresenta potencial antiinflamatório moderado, o sulfato de neomicina é um antibiótico de largo espectro, sendo eficaz contra um grande número de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, e o sulfato de polimixina B é efetivo contra bactérias Gram-negativas.

No presente trabalho foi utilizado o hidróxido de cálcio devido a sua grande utilização na prática odontológica e seus efeitos antimicrobianos satisfatórios, a polimixina B pura devido ao seu emprego de forma sistêmica em pacientes com sepsis por Gram-negativo, inibindo muitos dos efeitos biológicos provocados pela endotoxina e a polimixina B associada a hidrocortisona e ao sulfato de neomicina por ser um medicamento frequentemente usado na prática endodôntica.

## **6.2 Da metodologia**

Dentre os problemas encontrados para a realização de trabalhos utilizando dentes humanos pode-se citar a questão ética e a padronização da amostra. Quanto à ética, utilizou-se neste trabalho dentes extraídos na disciplina de Cirurgia da Faculdade de Odontologia – UNESP – câmpus de São José dos Campos, por motivos diversos e com prévia autorização dos pacientes à disciplina. Referente à padronização da amostra, existem dificuldades relativas à idade do dente, quantidade de dentina esclerosada, variáveis anatômicas, principalmente na região

apical, como delta apical, a presença de canais acessórios e crateras de reabsorção. Assim, nesta pesquisa, os 3mm apicais foram removidos a fim de minimizar tais variações anatômicas e a coroa foi seccionada padronizando o tamanho dos espécimes em 14mm.

Os espécimes foram instrumentados até a lima tipo Kerr nº 80 para promover um amplo alargamento do canal radicular e facilitar a inoculação da endotoxina e da medicação intracanal. Após o preparo biomecânico, a região apical foi vedada com resina fotopolimerizável para impossibilitar a saída da endotoxina e da medicação e, ainda, a raiz foi impermeabilizada externamente com resina epóxi ARALDITE para garantir um perfeito vedamento.

De acordo com o protocolo do laboratório Sigma<sup>82</sup> (St Louis - MA - USA), todo o material utilizado como pinças, tesouras, seringa Calen, algodão, gaze, tubos de vidro, deveria ser detoxificado pela esterilização em autoclave a 121°C por 1 hora e, em seguida, esterilização pelo calor seco, em estufa, a 175°C por 3 horas. Como recomendado, todo material foi, primeiramente, lavado em água destilada com 0,1% de triton X 100 e, após, enxaguado várias vezes em água destilada, deionizada, apirogênica e esterilizado em autoclave a 121°C por 1 hora e em estufa a 175°C por 3 horas. Entretanto, os resultados obtidos com este material, nos testes pilotos, indicavam a presença de endotoxina. Assim, com base na literatura (Csako et al.<sup>10</sup>, 1983; Snyder et al.<sup>87</sup>, 1986), verificou-se que a radiação gama com cobalto 60 neutraliza os pirógenos e, então, todo o material, inclusive os espécimes, foram encaminhados à EMBRARAD para realizar tal procedimento.

A endotoxina utilizada foi a de *Escherichia coli*, por ser uma endotoxina padrão, utilizada na maioria dos trabalhos relatados na literatura (Galanos et al.<sup>23</sup>, 1985; Shenep et al.<sup>81</sup>, 1985; Marra et al.<sup>45</sup>, 1992; Gough et al.<sup>25</sup>, 1996; Barthel<sup>3</sup>, 1997; Haight-Ponce et al.<sup>27</sup>, 1999; Petsch & Anspach<sup>64</sup>, 2000; Souza<sup>88</sup>, 2000; Parviainen et al.<sup>63</sup>, 2001). Quimicamente, as endotoxinas são lipopolissacarídeos que consistem de

três partes distintas. O componente lipídico não-polar é chamado lipídio A, além dele existe um corpo oligossacarídico e outro heteropolissacarídico, representado pelo antígeno O de superfície. O antígeno O é formado por repetidas unidades polissacarídicas, que são específicas de um grupo e determinadas pela identidade sorológica da respectiva bactéria, ou seja, esta região é única para cada cepa bacteriana (Rietschel et al.<sup>68</sup>, 1993). Os defeitos genéticos não diminuem a viabilidade do microrganismo nem o potencial biológico da endotoxina (Petsh & Anspach<sup>64</sup>, 2000). O corpo oligossacarídico tem uma estrutura conservada com uma região de KDO (ácido 2-keto-3-deoxioctônico)-heptose interna e outra externa. Em espécies de *E. coli* são demonstrados até cinco tipos diferentes de corpos e em espécies de *Salmonella* há apenas uma estrutura corpórea. Contudo, o lipídio A é o principal responsável pela atividade endotóxica do LPS. A estrutura primária do lipídio A é bem conservada entre as diferentes espécies de bactérias Gram-negativas (Nakano et al.<sup>58</sup>, 1975; Kirikae et al.<sup>38</sup>, 1997). O lipídio A carrega um total de carga negativa devido à presença de três grupos fosforil e dois a três grupos carboxil associados com a região interna do corpo, e mais dois grupos fosforil associados com a parte dissacarídica do lipídio A (Rietschel et al.<sup>68</sup>, 1993). Assim, mesmo que a *E. coli* não seja uma bactéria comumente encontrada no interior dos canais radiculares com polpa necrosada, sua endotoxina apresenta a estrutura básica do componente lipídico, que representa o centro ativo responsável pelas propriedades tóxicas dos LPSs.

O hidróxido de cálcio utilizado foi a pasta Calen (S.S.White – SP - Brasil), pois de acordo com o estudo de Leonardo et al.<sup>41</sup>, em 1976, citado por Leonardo & Leal<sup>40</sup> (1998), dentre 13 fórmulas contendo diferentes substâncias e veículos, a chamada fórmula 10, atualmente comercializada com o nome de Calen, foi a que ofereceu melhores resultados físico-químicos. Esta formulação apresenta o polietilenoglicol 400 como veículo, que embora considerado de peso molecular elevado, é

classificado como hidrossolúvel. Assim, na presente pesquisa, os canais radiculares do Grupo 1 foram preenchidos com tal medicação, com auxílio da seringa Calen e agulhas longas apirogênicas.

A polimixina B utilizada neste estudo foi manipulada na Farmácia de manipulação Ophtalmos Fórmulas Oficiais Ltda (São Paulo – Brasil), sob a forma de colírio, contendo 1mg/mL de sulfato de polimixina B, o que corresponde a 10.000 UI, mesma concentração presente nas soluções otológicas. Desta forma, os canais radiculares do grupo 2 foram preenchidos com 40µl (400 UI ) de tal medicação.

A polimixina B associada à hidrocortisona e ao sulfato de neomicina utilizada nesta pesquisa foi o OTOSPORIN (Glaxo Wellcome – SP - Brasil), uma solução otológica bastante utilizada na Endodontia e que possui a seguinte formulação em cada mL: 10mg de hidrocortisona, 5mg de sulfato de neomicina, 10.000 UI de polimixina B e 1mL de veículo. Os canais radiculares do Grupo 3 foram então preenchidos com 40µl desta medicação.

Dentre os vários métodos para detectar endotoxinas, o de geleificação do lisado de amebócito de *Limulus* (LAL) é o mais sensível e o mais econômico (Petsch & Anspach<sup>64</sup>, 2000). O LAL foi introduzido na rotina de laboratório pelos trabalhos de Levin & Bang<sup>42</sup> (1968). Quando comparado ao teste oficial de coelho USP, que tem sido historicamente utilizado para testes de pirógenos, o LAL não só é mais sensível como também é mais simples, mais rápido e menos dispendioso (Tomasulo et al.<sup>98</sup>, 1977). Este reagente é preparado de um lisado dos amebócitos circulantes de cavalos marinhos, *Limulus polyphemus*, e quando exposto a uma quantidade mínima de endotoxina, o lisado aumenta sua opacidade bem como sua viscosidade formando um gel duro (Levin & Bang<sup>42</sup>, 1968). O LAL possui sensibilidade para detectar até 0,02 UI/mL de endotoxina (Petsch & Anspach<sup>64</sup>, 2000). Embora o LAL seja o método mais sensível e confiável no monitoramento de endotoxina, muitas substâncias podem interferir, causando resultados falso negativos ou falso

positivos. Os resultados falso positivos podem ser causados pela presença na amostra de tripsina ou enzimas ligadas à tripsina (Tai et al.<sup>95</sup>, 1977) trombina, tromboplastina, polinucleotídeos e ribonuclease (Elin & Wolff<sup>15</sup>, 1973). Os resultados falso negativos podem ser atribuídos a inibidores da tripsina, EDTA e outros reagentes ligados ao cálcio (Levin & Bang<sup>42</sup>, 1968), alta concentração de sal (Nandan & Brow<sup>59</sup>, 1977) e penicilinas semisintéticas (Rhodes et al.<sup>72</sup>, 1974).

No presente trabalho, o hidróxido de cálcio foi removido do canal radicular por irrigação com 3mL de solução fisiológica apirogênica, entretanto, devido ao seu alto pH e a liberação de íons cálcio, o conteúdo do canal radicular avaliado poderia levar a um resultado falso negativo. Para contornar o problema procedeu-se a outro teste, o da produção de anticorpos por linfócitos B em cultura. O grupo tratado com o hidróxido de cálcio estimulou uma pequena produção de anticorpos por estas células, sem induzir morte celular ou efeitos tóxicos devido ao pH. Assim, comprovou-se a neutralização da endotoxina e a regularização do pH pelo agente irrigante.

Nesta pesquisa utilizou-se o teste de ativação celular, pois um dos efeitos biológicos causados pelo LPS é a ativação de linfócitos B, assim, estas células, na presença de endotoxina, proliferam e produzem anticorpos, que são detectados pelo teste ELISA. A ativação policlonal de células B, *in vitro* e em ratos, geralmente aumenta mais a síntese de IgM que a de IgG (Clagett et al.<sup>9</sup>, 1980, citado por Ito et al.<sup>34</sup>, 1988). Desta forma, neste estudo foi detectado o aumento da produção de anticorpos da classe IgM usando um conjugado anti-IgM de camundongo.

### 6.3 Dos resultados

Na Tabela 1, pôde-se verificar que o Grupo 01 (hidróxido de cálcio) não apresentou formação de gel duro, referente à presença de

endotoxina, em nenhum dos espécimes testados. Na Tabela 3, este mesmo grupo apresenta os menores valores de D.O., indicando uma produção de anticorpo similar ao grupo controle negativo (G 6 – cultura pura, sem endotoxina e sem espécime teste). Estes resultados concordam com os de outros autores que, utilizando metodologias diferentes, constataram *in vitro* que o hidróxido de cálcio pode alterar as propriedades biológicas do LPS (Safavi & Nichols<sup>73</sup>, 1993; Safavi & Nichols<sup>74</sup>, 1994; Barthel et al.<sup>3</sup>, 1997, Nelson Filho<sup>60</sup>, 2000) .

Safavi & Nichols<sup>73</sup>, em 1993, mostraram que o LPS tratado com hidróxido de cálcio libera quantidades elevadas de ácidos graxos livres, resultantes da hidrólise da porção lipídica da endotoxina. Estes resultados sugeriram que a degradação do LPS mediada pelo hidróxido de cálcio pode ser uma importante causa dos efeitos benéficos obtidos com o uso do hidróxido de cálcio na prática endodôntica. Segundo Safavi & Nichols<sup>74</sup> (1994) a produção de prostaglandina E<sub>2</sub> foi inibida em cultura de monócitos estimulados com LPS tratado com hidróxido de cálcio. Esses experimentos sugeriram que as propriedades biológicas do LPS requerem a presença de ácidos graxos hidroxilados ligados a junção éster e estas ligações são rompidas pelo tratamento com o hidróxido de cálcio. Em 1997, Barthel et al.<sup>3</sup> também avaliaram a capacidade do hidróxido de cálcio em neutralizar a atividade biológica de endotoxinas bacterianas, e concluíram que o LPS de *E. coli* tratado com hidróxido de cálcio não induzia a síntese de TNF- $\alpha$  em monócitos do sangue periférico. Nesta presente pesquisa, verificou-se que o hidróxido de cálcio altera a propriedade da endotoxina de estimular a ativação de linfócitos B, provavelmente devido à quebra da ligação éster-ácidos graxos, neutralizando seus efeitos tóxicos, que foi também verificado pela não geleificação do lisado de amebócito de *Limulus*.

A polimixina B pura, no presente estudo, também apresentou resultados satisfatórios como pode ser visto na Tabela 1. Somente três dentes induziram a geleificação do lisado de *Limulus* e, de acordo com a

Tabela 3, os valores da D.O., referentes à síntese de anticorpos pelas células B, são similares aos do grupo controle (G 05), em que não foi inoculada endotoxina nos canais radiculares. Esses resultados estão de acordo com os de outros autores (Rifkind<sup>69</sup>, 1967; Parviainen et al.<sup>63</sup>, 2001; Tani et al.<sup>96</sup>, 2001), que utilizaram polimixina B no tratamento de sepsis por microrganismos Gram-negativos e de choque endotóxico.

O efeito neutralizante da polimixina B na atividade do LPS foi observado primeiramente por Neter<sup>61</sup>, em 1956, citado por Bucklin et al.<sup>6</sup> (1995), quando o LPS foi incubado com a polimixina B e a aglutinação de eritrócitos, normalmente induzida pelo LPS, foi inibida. Desde então, outros autores têm demonstrado que a polimixina B pode inibir a letalidade endotóxica em galinhas, ratos, coelhos, cães e cavalos (RifKind<sup>69</sup>, 1967; Bucklin et al.<sup>6</sup>, 1995; Parviainen et al.<sup>63</sup>, 2001).

Rifkind & Palmer<sup>70</sup> (1966) e Rifkind<sup>69</sup> (1967) verificaram uma redução de letalidade endotóxica em embriões de galinhas e de ratos e também a neutralização da reação de Schwartzman em coelhos. Eles postularam um mecanismo de ação no qual a polimixina B, um antibiótico polipeptídico catiônico, liga-se covalentemente à carga eletronegativa do lipídio A da molécula de endotoxina. Essa ligação foi mais tarde confirmada *in vitro* por Morrison & Jacobs<sup>54</sup> (1976). A polimixina B tem a habilidade de se ligar com alta afinidade à porção de lipídio A, alterando, assim, a conformação tridimensional da molécula de LPS. Essa alteração conformacional possivelmente impede o complexo endotoxina-polimixina B de se ligar ao receptor de CD14 nos monócitos, inibindo a liberação de mediadores inflamatórios como, por exemplo, o TNF (Bucklin et al.<sup>6</sup>, 1995). Nesta presente pesquisa, a polimixina B impediu a capacidade do LPS de ativar linfócitos B e também inibiu a geleificação do lisado de amebócito de *Limulus*, provavelmente devido à alteração conformacional da molécula de endotoxina ligada a polimixina B.

Com relação à polimixina B associada à hidrocortisona e ao sulfato de neomicina, os resultados apresentados nas Tabelas 1 e 3 mostram, respectivamente, que houve geleificação do lisado de *Limulus* em todos os espécimes testados e valores altos de D.O., refletindo a alta síntese de IgM, muito semelhante ao obtido no G 04, onde a endotoxina não foi tratada com qualquer medicamento. Esses resultados discordam, em parte, dos obtidos por outros autores (Smith & Moodie<sup>86</sup>, 1990; Tong et al.<sup>99</sup>, 1996; Miró<sup>52</sup>, 2000), que utilizaram essa preparação farmacêutica com sucesso no tratamento de otites médias supurativas causadas por microrganismos Gram positivos e negativos. Entretanto, é importante enfatizar que, em nenhum desses trabalhos, os autores avaliaram a atividade neutralizante do OTOSPORIN sobre o LPS. Lopes & Siqueira Junior<sup>44</sup>, em 1999, realizaram um estudo em que testaram a atividade antimicrobiana do OTOSPORIN sobre microrganismos da saliva, após incubação em aerobiose e anaerobiose, e foi possível verificar que este medicamento apenas apresentava efeito inibitório na presença de oxigênio, sendo eficaz, portanto, sobre microrganismos aeróbios e facultativos, não inibindo os anaeróbios estritos. No presente trabalho, investigou-se a capacidade neutralizante do OTOSPORIN sobre o LPS, não se constatando qualquer atividade desta natureza. Esta ausência de atividade da preparação pode ser devida ao pH da solução, pois verificou-se, por exemplo, que a solução de polimixina B pura apresentava um pH em torno de 6.4 enquanto a polimixina B associada à hidrocortisona e ao sulfato de neomicina tinha um pH em torno de 5.4. Outra possibilidade a ser considerada é a interferência de um dos componentes da fórmula sobre a polimixina B. Estas e outras alterações podem ter influenciado sua ação neutralizante sobre as endotoxinas. Assim, a polimixina B associada ao sulfato de neomina e hidrocortisona tem seu uso limitado na Endodontia, sendo utilizada principalmente nos casos de tratamento de polpa viva devido a sua ação antiinflamatória satisfatória, e por preservar

a integridade do coto pulpar e dos tecidos perirradiculares (Holland et al.<sup>28</sup>, 1980, citado por Lopes & Siqueira Junior<sup>44</sup> em 1999).

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pôde-se concluir que:

- 1) O hidróxido de cálcio foi o mais efetivo agente neutralizante de endotoxinas quando usado por sete dias;
- 2) A polimixina B pura apresentou boa capacidade neutralizante, embora inferior a do hidróxido de cálcio, sendo que ambos podem ser recomendados como agentes neutralizantes de endotoxinas em Endodontia;
- 3) A polimixina B associada ao sulfato de neomicina e hidrocortisona não foi capaz de neutralizar as endotoxinas inoculadas no canal radicular, falhando em todos os casos e, assim, não deveria ser recomendada com a finalidade de neutralizar endotoxinas em Odontologia.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

- 1 ALVES, J.; WALTON, R.; DRAKE, D. Coronal leakage: endotoxin from mixed bacterial communities through obturated, post-prepared root canals. **J Endod**, v.24, n.9, p.587-91, Sept. 1998.
- 2 BARBOSA, C.A.M. et al. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. **J Endod**, v.23, n.5, p.297-300, May 1997.
- 3 BARTHEL, C.R. et al. TNF- $\alpha$  release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. **Int Endod J**, v.30, n.3, p.155-59, May 1997.
- 4 BRANDTZAEG, P. et al. Plasma endotoxina as a predictor de multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. **J Infect Dis**, v.159, n.2, p.195-204, Feb. 1989.
- 5 BUCK, R.A. et al. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hiyroxide. **J Endod**, v.27, n.5, p.325-7, May 2001.
- 6 BUCKLIN, S.E. et al. Therapeutic efficacy of a polymyxin B-dextran 70 conjugate in experimental model of endotoxemia. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, n.7, p.1462-66, July 1995.
- 7 BYSTRÖM, A.; CLAESSON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Endod Dent Traumatol**, v.1, n.5, p.170-75, Oct. 1985.

---

\* Baseado em:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Rio de Janeiro. Referências bibliográficas NBR6023. Rio de Janeiro, 2000. 22p.

- 8 CALISKAN, M.K.; SEN, B.H. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using calcium hydroxide: a long-term study. **Endod Dent Traumatol**, v.12, p.215-21, 1996.
- 9 CLAGETT, J.A.; ENGEL, D.; CHI, E. *In vitro* expression of immunoglobulin M and G subclasses by murine B lymphocytes in response to a polyclonal activator from *Actinomyces*. **Infect Immunol**, v.29, n.1, p.234-43, 1980 apud ITO, H et al. Possible role of T cells in the establishment of IgG plasma cell-rich periodontal lesion-Augmentation of IgG synthesis in the polyclonal B cell activation response by autoreactive T cells. **J Periodont Res**, v.23, p.39-45, 1988.
- 10 CSAKO, G. et al. Physical and biological properties of U.S. standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. **Infect Immunol**, v.41, n.1, p.190-6, July 1983.
- 11 DAHLÉN, G.; BERGENHOLTZ, G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. **J Dent Res**, v.59, n.6, p.1033-40, June 1980.
- 12 DAHLÉN, G.; MAGNUSSON, B.C.; MÖLLER, A. Histological and histochemical study of the influence of lipopolysaccharide extracted from *Fusobacterium nucleatum* on the periapical tissues in the monkey *Macaca fascicularis*. **Archs Oral Biol**, v.26, p.591-8, 1981.
- 13 DARROW, D.H.; KEITHLEY, E.M. Reduction of endotoxin-induced inflammation of the middle ear by Polymyxin B. **Laryngoscope**, v.106, n.8, p.1028-33, Aug. 1996.
- 14 DWYER, G.T.; TORABINEJAD, M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat. **J Endod**, v.7, n.1, p.31-35, Jan. 1981.
- 15 ELIN, R.J.; WOLFF, S.M. Nonspecificity of the limulus amoebocyte lysate test: positive reactions with polynucleotides and proteins. **J Infect Dis**, v.128, n.3, p.349-52, Sep. 1973 apud SIGMA CHEMICAL COMPANY. E-Toxate. **Technical Bulletin**, Saint Louis, n.210, p.1-4, Apr. 2001.
- 16 ESTRELA, C.; FIGUEIREDO, J.A.P. **Endodontia: princípios biológicos e mecânicos**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. 819p.

- 17 ESTRELA, C. et al. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. **J Endod**, v.24, n.1, p.15-17, Jan. 1998.
- 18 ESTRELA, C. et al. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. **J Endod**, v.25, n.6, p.416-18, June 1999.
- 19 ESTRELA, C. et al. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. **Int Endod J**, v. 34, n.5, p. 341-5, July 2001.
- 20 EVANS, M.E.; FEOLA, D.J.; RAPP, R.P. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant Gram-negative bacteria. **Ann Pharmacother**, v.33, n.9, p.960-7, Sept. 1999.
- 21 FARBER, P.A., SELTZER, S. Endodontic microbiology I. Etiology. **J Endod**, v.14, n.7, p.363-71, July 1988.
- 22 FAVA, L.R.G. Acute apical periodontitis: incidence of post-operative pain using two different root canal dressings. **Int Endod J**, v.31, n.5, p.343-47, Sept. 1998.
- 23 GALANOS, C. et al. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid a express identical endotoxic activities. **Eur J Biochem**, v.148, n.1, p.1-5, Apr. 1985.
- 24 GEORGIOPOULOU, M.; KONTAKIOTIS, E.; NAKOU, M. In vitro evaluation of the effectiveness of calcium hydroxide and paramonochlorophenol on anaerobic bacteria from the root canal. **End Dent Traumatol**, v.9, n.6, p.249-53, Dec. 1993.
- 25 GOUCH, M.; HANCOCK, R.E.W.; KELLY, N.H. Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. **Infect Immun**, v.64, n.12, p.4922-7, Dec. 1996.
- 26 GREENMAN, M.D. et al. A controlled clinical trial of E5 murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of Gram-negative sepsis. **J Am Med Assoc**, v.266, n.8, p.1097-102, Aug. 1991.
- 27 HAIGHT-PONCE, E.; ENDO, H.; HORIUCHI, H. Endotoxin activity measured by limulus assay. **Endod Dent Traumatol**, v.15, n.3, p.109-112, June 1999.

- 28 HOLLAND, R. et al. Emprego da associação corticosteroíde-antibiótico durante o tratamento endodôntico. **Rev Paul Odontol**, v.1, n.2, p.4-7, 1980 apud LOPES, H.P.; SIQUEIRA JUNIOR., J.F. **Endodontia: biologia e técnica**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999. 650p.
- 29 HORIBA, N. et al. Cytotoxicity against various cell lines of lipopolysaccharides purified from *Bacteroides*, *Fusobacterium*, and *Veillonella* isolated from infected root canals. **J Endod**, v.15, n.11, p.530-4, Nov. 1989.
- 30 HORIBA, N. et al. A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. **J Endod**, v.16, n.7, p.331-4, July 1990.
- 31 HORIBA, N. et al. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.71, n.4, p.492-95, Apr. 1991.
- 32 HORIBA, N. et al. Complement activation by lipopolysaccharides purified from gram-negative bacteria isolated from infected root canals. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.74, n.5, p.648-51, Nov. 1992.
- 33 HOSOYA, N. et al. Calcium concentration and pH of the periapical environment after applying calcium hydroxide into root canals in vitro. **J Endod**, v.27, n.5, p.343-6, May 2001.
- 34 ITO, H et al. Possible role of T cells in the establishment og IgG plasma cell-rich periodontal lesion- Augmentation of IgG synthesis in the polyclonal B cell activation response by autoreactive T cells. **J Periodontol Res**, v.23, n.1, p.39-45, Jan. 1988.
- 35 KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R.; FITZGERALD, R.J. The effect of surgical exposure of dental pulp in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg**, v.20, p. 340-9, 1965.
- 36 KHABBAZ, M.G.; ANASTASIADIS, P.L.; SYKARAS, S.N. Determination of endotoxins in caries: association with pulpal pain. **Int Endod J**, v.33, n.2, p.132-7, Mar. 2000.

- 37 KHABBAZ, M.G.; ANASTASIADIS, P.L.; SYKARAS, S.N. Determination of endotoxins in the vital pulpl of human carious teeth: association with pulpal pain. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.91, n.5, p.587-93, May 2001.
- 38 KIRIKAE, T.; NAKANO, M.; MORRISON, D.C. Antibiotic-induced endotoxin release from bacteria and its clinical significance. **Microbiol Immunol**, v.41, n.4, p.285-84, 1997.
- 39 JANEWAY, C.A. et al. **Imunologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. Trad. D. C. Machado et al. 4.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. 634p.
- 40 LEONARDO, M.R.; LEAL, J.M. **Endodontia: tratamento de canais radiculares**. 3.ed. São Paulo: Panamericana, 1998. 908p.
- 41 LEONARDO, M.R.; ARAUJO, C.H.; MENDES.A.J.D. Contribuição para o emprego das pastas à base de hidróxido de cálcio na obturação de canais radiculares- Estudo de propriedades físicas, químicas e biológicas. Parte I. **Rev Fac Farm Odontol Araraquara**, v.10, Supl. 1, p.125-35, 1976 apud LEONARDO, M.R.; LEAL, J.M. **Endodontia: tratamento de canais radiculares**. 3.ed. São Paulo: Panamericana, 1998. 908p.
- 42 LEVIN, J.; BANG, F.B. Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. **Thromb Diath Haemorrh**, v.31, n.1, p.186-97, 1968.
- 43 LINDEMANN, R.A.; ECONOMOU, J.S.; ROTHERMEL, H. Production of Interleucina-1 and Tumor Necrosis Factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. **J Dent Res**, v.67, n.8, p.1131-5, Aug. 1988.
- 44 LOPES, H.P.; SIQUEIRA JUNIOR., J.F. **Endodontia: biologia e técnica**. 1.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999. 650p.
- 45 MARRA, M.N. et al. The role of bactericidal/permeability-increasing proteins as a natural inhibitor of bacterial endotoxin. **J Immunol**, v.148, n.2, p.532-7, Jan.1992.

- 46 MARTICH, G.D.; BOUJOUKOS, A.J.; SUFFREDINI, A.F. Response of man to endotoxin. **Immunobiology**, v.187, n.3-5, p.403-16, Apr. 1993.
- 47 MATSUSHITA, K. et al. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. **J Endod**, v.25, n.12, p.795-9, Dec. 1999.
- 48 MATTISON, G.D. et al. The effect of *Eikenella corrodens* endotoxin on periapical bone. **J Endod**, v.13, n.12, p.559-65, Dec. 1987.
- 49 McCOY, S.A. et al. The concentration of lipopolysaccharide on individual root surfaces at varying times following *in vivo* root planing. **J Periodontol**, v.58, n.6, p.393-9, June 1987.
- 50 MICHEL, O. The role of endotoxin exposure in asthma. **Res Immunol**, v.149, p.227-8, Apr. 1998.
- 51 MILLAR, S.J. et al. Modulation of bone metabolism by two chemically distinct lipopolysaccharide fractions from *Bacteroides gingivalis*. **Infect Immun**, v.51, n.1, p.302-6, Jan. 1986.
- 52 MIRÓ, N.M.D. Controlled multicenters study on chronic suppurative otitis media treated with topical applications of ciprofloxacin 0,2% solution in single-dose containers or combinatio of polymyxin B, neomycin, and hydrocortisone suspension. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v.123, n.5, p.617-23, Nov. 2000.
- 53 MOORE, R. A.; BATES, N.C.; HANCOCK, R.E.W. Interaction of polycationic antibiotics with *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide and lipid A studied by using dansyl-polymyxin. **Antimicrob Agents Chemother**, v.29, n.3, p.496-500, Mar. 1986.
- 54 MORRISON, D.C.; JACOBS, D.M. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. **Immunochemistry**, v.13, n.10, p.813-8, Oct. 1976.
- 55 MORSE, D.R. Endodontic microbiology in the 1970s. **Int Endod J**, v.14, n.2, p.69-79, May 1981.

- 56 NAIR, P.N.R. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. **Periodontology** 2000, v.13, p.121-48, Feb. 1997.
- 57 NAKANE, A. et al. Effects of lipopolysaccharides on human dental pulp cells. **J Endod**, v.21, n.3, p.128-30, Mar. 1995.
- 58 NAKANO, M.; ASOU, H.; YAMAMOTO, I. Stimulation of phagocytic activity in the reticuloendothelial systems of mice by lipid A complexed with homologous or heterologous proteins. **Infect Immunity**, v.11, n.3, p.592-4, Mar. 1975.
- 59 NANDAN, R.; BROWN, D.R. An improved *in vitro* pyrogen test to detect picograms of endotoxin contamination in intravenous fluids using *Limulus* amoebocyte lysate. **J Lab Clin Med**, v.89, n.4, p.910-8, Apr. 1977 apud SIGMA CHEMICAL COMPANY. E-Toxate. **Technical Bulletin**, Sant Louis, n.210, p.1-4, Apr. 2001.
- 60 NELSON FILHO, P. et al. Avaliação do efeito do hidróxido de cálcio sobre a endotoxina *in vivo*. **Pesq Odontol Bras**, v.14, p.106, supl. 2000. (Trabalho apresentado à 17 Reunião Anual da SBPqO - Resumo A369).
- 61 NETER, E. Bacterial hemagglutination and hemolysis. **Bacteriol Rev**, v.20, p.166-88, 1956 apud BUCKLIN, S.E.; LAKE, P.; LÖGDBERG, L.; MORRISON, D.C. Therapeutic efficacy of a polymyxin B-dextran 70 conjugate in experimental model of endotoxemia. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, n.7, p.1462-66, July 1995.
- 62 NISSAN, R. et al. Ability of bacterial endotoxin to diffuse through human dentin. **J Endod**, v.21, n.2, p.62-4, Feb. 1995.
- 63 PARVIAINEN, A.K.; BARTON, M.H.; NORTON, N.N. Evaluation of polymyxin B in na ex vivo model of endotoxemia in horses. **Am J Vet Res**, v.62, n.1, p.72-6, Jan. 2001.
- 64 PETSCH, D.; ANSPACH, F.B. Endotoxin removal from protein solutions. **J Biotechnol**, v.76, n.2-3, p.97-119, Jan. 2000.
- 65 PINERO, G.J. et al. The effect of endotoxin on the synthesis of connective tissue matrix components by pulp fibroblasts in vitro. **J Endod**, v.9, n.1, p.2-7, Jan. 1983.

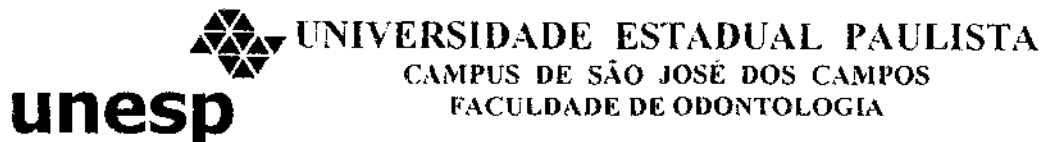
- 66 PITTS, D.L.; WILLIAMS, B.L.; MORTON JUNIOR, T.H. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. **J Endod**, v.8, n.1, p.10-8, Jan. 1982.
- 67 RAISZ, L.G. et al. Interactions between bacterial endotoxin and other stimulators of bone resorption in organ culture. **J Periodontol Res**, v.16, n.1, p.1-7, Jan. 1981.
- 68 RIETSCHEL, E.T. et al. The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. **Immunobiology**, v.187, n.3-5, p.169-90, Apr. 1993. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>. Acesso em: 18 Fev. 2002. (resumo).
- 69 RIFKIND, D. Prevention by polymyxin B of endotoxin lethality in mice. **J Bacteriol**, v.93, n.4, p.1463-4, Apr. 1967.
- 70 RIFKIND, D.; PALMER, J.D. Neutralization of endotoxin toxicity in chick embryos by antibiotics. **J Bacteriol**, v.92, n.4, p.815-9, Oct. 1966.
- 71 RIZZO, A.A.; MERGENHAGEN, S.E. Histopathologic effects of endotoxin injected into rabbit oral mucosa. **Archs Oral Biol**, v.9, p.659-70, 1964.
- 72 RHODES, B.A. KAMANETZ, G.S; WAGNER, H.N. The use of Limulus testing to reduce the incidence of adverse reactions to cisternographic agents. **Neurology**, v.24, n.9, p.810-2, Sep. 1974 apud SIGMA CHEMICAL COMPANY. E-Toxate. **Technical Bulletin**, Sant Louis, n.210, p.1-4, Apr. 2001.
- 73 SAFAVI, K.E.; NICHOLS, F.C. Effects of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. **J Endod**, v.19, n.2, p.76-8, Feb. 1993.
- 74 SAFAVI, K.E.; NICHOLS, F.C. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. **J Endod**, v.20, n.3, p.127-9, Mar. 1994.
- 75 SAFAVI, K.E.; NICHOLS, F.C. Effects of a bacterial cell wall fragment on monocyte inflammatory function. **J Endod**, v.26, n.3, p.153-5, Mar. 2000.

- 76 SCHEIN, B.; SCHILDER, H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod*, v.1, n.1, p.19-21, Jan. 1975.
- 77 SCHONFELD, S.E. et al. Endotoxic activity in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v.53, n.1, p.82-7, Jan. 1982.
- 78 SCHWARTZ, Z. et al. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontology 2000*, v.14, p.158-72, June 1997.
- 79 SEGAL, H. et al. Permeability of human dentin to bacterial endotoxin. *Periodontal Res*, v.29, p.355, 1990. (Abstract 1973).
- 80 SHAPIRO, L. et al. Endotoxin determinations in gingival inflammation. *J. Periodontol*, v.43, n.10, p.591-6, Oct. 1972.
- 81 SHENEP, J. L.; BARTON, R.P.; MORGAN, K. Role of antibiotic class in the rate of liberation of endotoxin during therapy for experimental Gram-negative bacterial sepsis. *J Infect Dis*, v.151, n.6, p.1012-8, June 1985.
- 82 SIGMA CHEMICAL COMPANY. E-Toxate. *Technical Bulletin*, Sant Louis, n.210, p.1-4, Apr. 2001.
- 83 SIQUEIRA JUNIOR, J.F.; UZEDA, M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod*, v.22, n.12, p.674-6, Dec. 1996.
- 84 SIQUEIRA JUNIOR, J.F.; UZEDA, M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endod*, v.23, n.3, p.167-9, Mar. 1997.
- 85 SJÖGREN, U. et al. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J*, v. 24, n.3, p.119-25, May 1991.

- 86 SMITH, R.B.; MOODIE, J. Comparative efficacy and tolerability of two antibacterial/anti-inflammatory formulations ("Otomize" spray and "Otosporin" drops) in the treatment of otitis externa in general practice. **Curr Med Res Opin**, v.11, n.10, p.661-7, 1990.
- 87 SNYDER, S.L. et al. Radioprotective properties of detoxified lipid A from *Salmonella minnesota* R595. **Radiat Res**, v.107, n.1, p.107-14, July 1986.
- 88 SOUZA, J.I.L. **Análise *in vitro* da eficácia da impermeabilização da dentina radicular com verniz tipo copal, em dentes obturados com os cimento N-Rickert e sealer-26 e preparados para retentor intra-radicular, empregando o método de infiltração e quantificação do nível de endotoxina.** 2000. 75p. Tese (Doutorado em Odontologia, Área de Concentração em Endodontia) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 89 STASHENKO, P. et al. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. **J Periodontol**, v.62, n.8, p.504-9, Aug. 1991.
- 90 STASHENKO, P. et al. Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v.18, n.7, p.548-54, Aug. 1991.
- 91 STOKES, D.C. et al. Polymyxin B prevent lipopolysaccharide induced release of tumor necrosis factor- $\alpha$  from alveolar macrophages. **J Infect Dis**, v.160, n.1, p.52-7, July 1989.
- 92 SUNDQVIST, G. Associations between microbial species in dental root canal infections. **Oral Microbiol Immunol**, v.7, n.4, p.257-62, Aug. 1992.
- 93 SUNDQVIST, G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.78, n.4, p.522-30, Oct. 1994.
- 94 SUNDQVIST, G.; JOHANSSON, E.; SJÖGREN, U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. **J Endod**, v.15, n.1, p.13-9, Jan. 1989.

- 95 TAI, J.Y. et al. Studies on Limulus amebocyte lysate II. Purification of the coagulogen and the mechanism of clotting. **J Biol Chem**, v.252, n.14, p.4773-6, July 1977 apud SIGMA CHEMICAL COMPANY. E-Toxate. **Technical Bulletin**, Sant Louis, n.210, p.1-4, Apr. 2001.
- 96 TANI, T. et al. Correlation between plasma endotoxin, plasma cytokines, and plasminogen activator inhibitor-1 in septic patients. **World J Surg**, v.25, n.2, p. 660-8, May 2001.
- 97 TANI-ISHII, N. et al. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. **Oral Microbiol Immunol**, v.9, n.2, p.129-35, April 1994.
- 98 TOMASULO, P.A. et al. Biological activities of tritiated endotoxins: correlation of the Limulus lysate assay with rabbit pyrogen and complement-activation assays for endotoxin. **J Lab Clin Med**, v.89, n.2, p.308-15, Feb. 1977. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>. Acesso em 18 Fev. 2002. (resumo).
- 99 TONG, M.C.F. et al. A double-blind comparative study of ofloxacin otic drops versus neomycin-polymyxin B-hydrocortisone otic drops in the medical treatment of chronic suppurative otitis media. **The Journal of Laryngol and Otology**, n.4, v.110, p.309-14, Apr. 1996.
- 100 TROPE, M.; CHOW, E.; NISSAN, R. *In vitro* endotoxin penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. **Endod Dent Traumatol**, v.11, n.2, p. 90-4, Apr. 1995.
- 101 TROPE, M. et al. Short vs. Long-term calcium hydroxide treatment of established inflammatory root resorption in replanted dog teeth. **Endod Dent Traumatol**, v.11, n.3, p. 124-8, June 1995.
- 102 TRONSTAD, L. Root resorption – etiology, terminology and clinical manifestations. **Endod Dent Traumatol**, v.4, n.6, p.241-52, Dec. 1988. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>. Acesso em 18 Fev. 2002. (resumo).
- 103 TSUJI, K.; HARRISON, S.J. Limulus amebocyte lysate – a means to monitor inactivation of lipopolysaccharide. **Prog Clin Biol Res**, v.29, p.367-78, 1979.

- 104 VAARA, M.; NIKAIDO, H. Outer membrane organization. In: Rietschel, E.T. **Handbook of endotoxin**. Amsterdam: Elsevier, 1984. v.1, p. 1-45 apud PETSCH, D.; ANSPACH, F.B. Endotoxin removal from protein solutions. **Journal Biotechnol**, v.76, n.2-3, p.97-119, Jan. 2000.
- 105 WALTON, R.E.; TORABINEJAD, M. Endodontic microbiology. In SAUNDERS, W.B. **Principles and practice of endodontics**. 2.ed. Philadelphia, 1996. p.271-9.
- 106 WANG, C.; STASHENKO, P. The role of interleukin-1 $\alpha$  in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. **Oral Microbiol Immunol**, v. 8, n.1, p.50-6, Feb. 1993.
- 107 WITTEGOW JUNIOR, W.C., SABISTON JUNIOR, C.B. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. **J Endod**, v.1, n.5, p.168-71, May 1975.
- 108 YAMAGUCHI, H. et al. Effects of irradiation of na erbium:YAG laser on root surfaces. **J Periodontol**, v.68, n.12, p.1151-5, Dec. 1997.
- 109 YAMASAKI, M. et al. Endotoxin and Gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. **J Endod**, v.18, n.10, p.501-4, Oct. 1992.

**ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****CERTIFICADO**

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 034/2000-PH/CEP, sobre “Estudo *in vitro* da efetividade de dois medicamentos intracanal, o Hidróxido de Cálcio e a Polimixina B, na eliminação das endotoxinas presentes nos canais radiculares”, sob a responsabilidade de Luciane Dias de Oliveira, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 17 de agosto de 2000.



---

**Prof. Dr. Paulo Vilela Santos Júnior**  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

OLIVEIRA, L.D. *Study in vitro of the effectiveness of the calcium hydroxide and the polymyxin B in the elimination of the present endotoxin in the root canal.* 2002. 109f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.

### ABSTRACT

*The cell walls of Gram-negatives bacteria contain a lipopolysaccharide complex, also called endotoxin, which may be released into the environment as blebs during bacterial cell growth or as large pieces of membrane upon cell death. Endotoxins are potent agents capable of initiating various biological responses, which include initiation of osteoclastic activity and subsequent bone resorption. The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of intracanal medicaments in the elimination of the endotoxins in the root canal. Seventy-five freshly extracted, single-rooted, straight human anterior teeth were used in the study. The crowns were removed and the apex cut in 3mm, standardizing the size of the specimens in 14mm. The root canals of the teeth were instrumented, and the roots apex hindered with light-cure resin. The specimens were sterilized and it was inoculated endotoxin of *Escherichia coli* inside sixty root canals. The teeth were divided in 5 experimental groups (15 teeth). The group 1 received as intracanal medicament the paste of calcium hydroxide, the group 2 received a solution contends Poyimyxin B pure, the group 3 received a solution contends Polymyxin B, neomycin sulfate and hydrocortisone, the group 4 (control positive) didn't receive any medicament and in the group 5 (controls negative) the endotoxin was not inoculated. The teeth were maintained in stove to a temperature of  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  and relative humidity 100% for 7 days. After this period, the neutralization of the endotoxin was verified being used *Limulus* lisate and the production of antibodies in lymphocyte B culture. The results obtained with the *Limulus* lisate were submitted to the statistical analysis using the test of Mann-Whitney and was verified that the treatments with the calcium hydroxide and with the Polymyxin B pure went effective in to neutralization of the endotoxin in the root canals. The results obtained in the lymphocyte B culture were submitted to the statistical analysis ANOVA, with level of significance of 5%, and to the test of Tukey, where it was verified that the calcium hydroxide presented the best results, with difference statistical significant in relation to the other groups. Thus, the results of this study suggest the calcium hydroxide as the best endotoxin neutralizant agent, being followed by the polymyxin B pure. The polymyxin associated to the neomycin sulfate and hydrocortisone didn't already exhibit capacity neutralizant of LPS and, therefore, it should not be recommended with this objectify.*

**KEY WORDS:** Endotoxin, calcium hydroxide, polymyxin B.