



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

BRUNA JORDÃO MOTTA CORAZZA

**PERFIL INFLAMATÓRIO E MICROBIOLÓGICO DE PACIENTES
COM INFECÇÃO ENDODÔNTICA PRIMÁRIA E PERIODONTITE
APICAL: estudo observacional**

BRUNA JORDÃO MOTTA CORAZZA

**PERFIL INFLAMATÓRIO E MICROBIOLÓGICO DE PACIENTES COM INFECÇÃO
ENDODÔNTICA PRIMÁRIA E PERIODONTITE APICAL: estudo observacional**

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

Área: Endodontia. Linha de pesquisa: Estudos Clínicos e Laboratoriais de Materiais e Técnicas Endodônticas.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

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

Corazza, Bruna Jordão Motta

Perfil inflamatório e microbiológico de pacientes com infecção endodôntica primária e periodontite apical: estudo observacional / Bruna Jordão Motta Corazza. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.
78 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.
Orientadora: Marcia Carneiro Valera.

1. Periodontite Apical. 2. Bactérias. 3. Citocinas. 4. Metaloproteinases da Matriz. 5. Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico. I. Carneiro Valera, Marcia, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Adj. Eduardo Bresciani

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Carlos Eduardo da Silveira Bueno

São Leopoldo Mandic

Faculdade de Odontologia

Campus de Campinas

Prof. Dra. Carla Renata Sipert

Universidade de São Paulo (USP)

Faculdade de Odontologia

Campus de São Paulo

Prof. Dra. Adriana de Jesus Soares

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Campus de Piracicaba

São José dos Campos, 24 de junho de 2022.

DEDICATÓRIA

Dedico esta pesquisa à Deus e aos meus pais e irmã, por serem apoio e porto seguro. Sem vocês eu não teria finalizado esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Uma vez li num livro de Jonathan Haidt que a gratidão serve para fortalecer nossos relacionamentos e para honrar aqueles que nos ajudaram, achei que essas palavras refletiam exatamente o que eu pretendia nessa sessão.

Primeiramente agradeço a Deus, pela força e coragem ao longo dessa jornada de aprimoramento.

Aos meus amados pais Claudia e Cezar e à minha amada irmã Nathalia, que acompanharam de perto cada dia dessa trajetória. O apoio, incentivo, paciência e confiança de vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

À minha querida avó Yvonne, pelo amor e apoio durante toda minha vida.

À minha orientadora Prof. Dra. Marcia Carneiro Valera, que dedicou muito do seu tempo me orientando de forma impecável, agradeço os conselhos fundamentais para cada fase do processo de pesquisa e finalização da tese, sem a senhora seria impossível concluir esta etapa de forma satisfatória, meu sucesso é também o seu. Obrigada.

Aos amigos de pós-graduação, Rayana, Giovanna, Cassia, Esteban, Felipe, Gustavo, Carol, Beatriz, Mariana e Fernando por contribuírem com a minha formação, pela amizade sincera e por todo apoio ao longo do processo. Encerro este ciclo com uma bagagem cheia de amor, empatia, bom convívio e acreditando que podemos construir um mundo melhor.

À professora Janete e à equipe de propedêutica, que me ajudaram muito permitindo que eu buscasse e triasse meus pacientes em sua clínica, que sempre se lembravam de me enviar casos para que eu pudesse alcançar minha meta, e dedicaram um pouco do seu tempo a me escutar e me auxiliar. Eu não tenho palavras para descrever a minha gratidão.

Ao professor Eduardo Bresciani, por pacientemente encaixar horários em sua agenda para me ajudar com análise estatística. Uma das características que considero imprescindível para um professor é a generosidade, um bom mestre oferece e estimula generosamente o conhecimento e sem dúvida o senhor é assim. Obrigada.

À minha aluna de iniciação científica Aline, obrigada por permitir que eu exercitasse e passasse meu conhecimento para você. Foi uma parceria incrível e que me proporcionou muito crescimento pessoal e profissional. Você vai longe, muito obrigada.

Ao professor Frederico Canato Martinho, minha total admiração a você, pessoa e profissional incrível. Sua presença e amizade trouxeram força e vontade para seguir em frente tendo a certeza do meu valor. Eu não tenho palavras para descrever a importância do senhor na minha vida profissional e pessoal. Obrigada por tudo!

Ao Sr. Carlos Guedes e Michelle Ramos, do Apoio à Fapesp, pela sempre muito atenciosa disposição em me atender e orientar diante de qualquer dúvida ou problema. Muito obrigada.

À Josi por sempre estar pronta a me auxiliar no agendamento de exames, atendimentos clínicos e materiais. Você é maravilhosa.

À triagem, em especial à Márcia, que com muita paciência nos recebia regularmente e montava listas de triagem para que pudéssemos realizar o agendamento e avaliação de pacientes para esta pesquisa.

Aos membros da banca que gentilmente cederam horários em sua agenda para participar dessa etapa tão importante para minha carreira.

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, através de sua Diretora, Prof. Dr. Rebeca Di Nicoló, e ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, sob coordenação do Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges.

À Capes, pela concessão de bolsa de doutorado.

À FAPESP, pela concessão do auxílio financeiro para essa pesquisa (processo: 2018/01703-9)

Aos pacientes, que se comprometeram e confiaram em nosso trabalho. Muito obrigada! Sem vocês essa pesquisa não seria possível.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.
Muito Obrigada!

“Sempre fiz algo que eu achava que estava pouco preparada para fazer. Quando você tem um momento de incerteza, mas persiste, é aí que você consegue avançar.”

Marissa Mayer

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Microbiota da infecção endodôntica primária e sua relação com sinais e sintomas.....	18
2.2 Papel das citocinas e MMPs na PA.....	24
2.3 Radiografia x Tomografia	30
3 PROPOSIÇÃO	35
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Procedimentos experimentais.....	36
4.1.1 Seleção de pacientes	36
4.1.2 Intervenções odontológicas	37
4.1.3 Preparo biomecânico	39
4.1.4 Análise da volumetria da destruição óssea periapical (mm ³).....	41
4.1.5 Análise por checkerboard.....	42
4.1.6 Quantificação de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) e MMPs (MMP-2, MMP-9).....	46
4.1.7 Quantificação de mediador lipídico (RvD2)	47
4.2 Análise estatística	48
5 RESULTADO	49
5.1 Correlação entre os mediadores inflamatórios e sinais e sintomas clínicos	49
5.2 Avaliação microbiológica	51
5.3 Análise Fatorial.....	54
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS.....	62

APÊNDICE	72
ANEXO	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Radiografia inicial de dente com infecção endodôntica primária e presença de lesão periapical	37
Figura 2 - Imagens ilustrativas da intervenção endodôntica: a- realização de barreira de resina; b- profilaxia com pasta profilática; c- desinfecção do campo operatório e coroa dental; d- abertura coronária e e- coleta microbiológica	39
Figura 3 - Imagens ilustrativas da intervenção endodôntica: a- início da instrumentação; b- odontometria; c- finalização da instrumentação; d- irrigação final; e- desbridamento foraminal e f- coleta do fluido intersticial	41
Figura 4 - Frequência e concentração de DNA (<10 ⁵ células, 10 ⁵ células, 10 ⁵ -10 ⁶ células, e 10 ⁶ células) de espécies de bactérias detectadas nos canais radiculares de dentes com infecção endodôntica primária com periodontite apical (PEIAP)	52
Figura 5 - Composição de espécies bacterianas para cada amostra coletada de dentes com infecção endodôntica primária e periodontite apical	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores medianos e de intervalo (pg/mL) dos mediadores inflamatórios	50
Tabela 2 - Correlação de Spearman entre os níveis de expressão de mediadores inflamatórios e sinais e sintomas clínicos	50
Tabela 3 - Os resultados da análise fatorial das bactérias analisadas	54
Tabela 4 - Resultados da modelagem dos escores fatoriais 1 e 2 (variáveis de resultado) em função de variáveis independentes	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCL-2	Ligante de quimiocina 2
CCR	Receptor de quimiocina
CXCR4	Receptor de quimiocina tipo 4
DP	Dor a palpação
EX	Exsudato
F	Fístula
GAPDH	Proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Ácido lipoteicóico
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito 1
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito 1
MMP	Metaloproteinase de matriz
OPG	Osteoprotegerina
PA	Periodontite apical
PAA	Periodontite apical assintomática
PAP	Periodontite apical primária
PAPT	Periodontite apical pós-tratamento
PAS	Periodontite apical sintomática
PBM	Preparo biomecânico
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PGE2	Prostaglandina E2
RANK	Receptor ativador do fator nuclear Kappa-Beta
RANKL	Receptor ativador do fator nuclear Kappa-Beta ligante
Rv	Resolvina
SP	Sensibilidade a percussão
TCFC	Tomografia computadorizada de feixe cônico
TNF	Fator de necrose tumoral

Corazza BJM. Perfil inflamatório e microbiológico de pacientes com infecção endodôntica primária e periodontite apical: estudo observacional [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil microbiológico e identificar padrões de agregação bacteriana, avaliar a associação desses padrões com os níveis de mediadores inflamatórios, MMPs e sinais e sintomas clínicos e ainda correlacionar os mediadores inflamatórios entre si e com os sinais e sintomas clínicos em dentes com infecção endodôntica primária e periodontite apical (PA). Para isso, 40 dentes uniradiculares, de pacientes com infecção endodôntica primária e PA, foram submetidos à avaliação clínica, com registro de sinais e sintomas, e tomográfica através do cálculo de volumetria das lesões periapicais com o software ITK Snap. Em seguida os dentes foram submetidos ao tratamento endodôntico. Logo após a abertura coronária, amostras foram coletadas de cada canal radicular utilizando cones de papel (S1) e submetidas ao método Checkerboard DNA-DNA hybridization para investigação de espécies bacterianas presentes. Foi realizado o preparo biomecânico (PBM) e em seguida o fluido intersticial da PA foi coletado (SF1) para a quantificação dos mediadores inflamatórios (IL1- β , IL-6, TNF- α , IL-10, MMPs -2 e -9) através do ensaio multiplex e a quantificação de RvD2 através de ensaio imunoenzimático ELISA. Para a análise de correlação o teste de correlação de Spearman foi utilizado. A análise fatorial foi usada para identificar padrões de agregação bacteriana e regressão linear foi realizada para associar os escores fatoriais, mediadores e características clínicas dos pacientes ($P=0,05$). Correlação positiva foi encontrada entre MMP-2, -9, IL-10, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e entre RvD2, MMP-9, IL-10, IL-1 β , IL-6 e TNF- α ($P<0,05$), e correlação negativa foi encontrada entre IL-1 β e sensibilidade a percussão ($P<0,05$). A análise microbiológica revelou presença de DNA bacteriano em 100% das amostras analisadas com presença de pelo menos 2 das 40 espécies bacterianas investigadas (média = 24,62) por canal. As espécies mais frequentemente detectadas foram *P. gingivalis*, *E. nodatum*, *F. nucleatum spp. vicentii*, *S. mitis*, *L. buccalis* e *A. actinomycetemcomitans*. Das 6 espécies mais detectadas, 4 delas eram gram negativas, destacando o predomínio de gram-negativos das infecções endodônticas primárias com PA. A análise fatorial determinou 2 padrões de associação bacteriana e os resultados de regressão para o fator 1 revelaram uma associação com aumento de dor a percussão (coeficiente (coef) $\beta=0,788$) e redução de dor a palpação (coef $\beta=-0,753$) e exsudato (coef $\beta=-0,479$). Níveis mais altos de exsudato e menores de dor a palpação foram associados a bactérias do fator 2 (coef $\beta=0,460$ e $-0,546$, respectivamente). Concluímos que os mediadores inflamatórios formam uma rede inter-relacionada e que as periodontites apicais assintomáticas e sintomáticas tem uma etiologia bacteriana heterogênea e com combinações de espécies diferentes.

Palavras-chave: Periodontite Apical. Bactérias. Citocinas. Metaloproteinases da Matriz. Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico.

Corazza BJM. Inflammatory and microbiological profile of patients with primary endodontic infection and apical periodontitis: observational study [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2020.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the microbiological profile and identify patterns of bacterial aggregation, evaluate the association of these patterns with the levels of inflammatory mediators, MMPs and clinical signs and symptoms, and also correlate the inflammatory mediators with each other and with the clinical signs and symptoms in teeth with primary endodontic infection and apical periodontitis (AP). For this, 40 single-rooted teeth, from patients with primary endodontic infection and PA, were submitted to clinical evaluation, with registration of signs and symptoms, and tomography through the calculation of volumetry of periapical lesions with the ITK Snap software. Then the teeth were submitted to endodontic treatment. Immediately after the coronal opening, samples were collected from each root canal using paper cones (S1) and submitted to the Checkerboard DNA-DNA hybridization method to investigate bacterial species present. Biomechanical preparation (BMP) was performed and then the AP interstitial fluid was collected (SF1) for the quantification of inflammatory mediators (IL1- β , IL-6, TNF- α , IL-10, MMPs -2 and -9) by the multiplex assay and the quantification of RvD2 by enzyme immunoassay ELISA. For correlation analysis, Spearman's correlation test was used. Factor analysis was used to identify bacterial aggregation patterns and linear regression was performed to associate factor scores, mediators and patients' clinical characteristics ($P=0.05$). Positive correlation was found between MMP-2, -9, IL-10, IL-1 β , IL-6 and TNF- α , and between RvD2, MMP-9, IL-10, IL-1 β , IL-6 and TNF- α ($P<0.05$), and a negative correlation was found between IL-1 β and sensitivity to percussion ($P<0.05$). The microbiological analysis revealed the presence of bacterial DNA in 100% of the samples analyzed with the presence of at least 2 of the 40 bacterial species investigated (mean = 24.62) per root canal. The most frequently detected species were *P. gingivalis*, *E. nodatum*, *F. nucleatum* spp. *vicentii*, *S. mitis*, *L. buccallis* and *A. actinomycetemcomitans*. Of the 6 most detected species, 4 of them were gram negative, highlighting the predominance of gram-negative primary endodontic infections with AP. Factor analysis determined 2 patterns of bacterial association and regression results for factor 1 revealed an association with increased pain on percussion (coefficient (coef) $\beta=0.788$) and reduced pain on palpation (coef $\beta=-0.753$) and exudate (coef $\beta=-0.479$). Higher levels of exudate and lower levels of pain on palpation were associated with factor 2 bacteria (coef $\beta=0.460$ and -0.546 , respectively). We conclude that inflammatory mediators form an interrelated network and that asymptomatic and symptomatic apical periodontitis has a heterogeneous bacterial etiology and combinations of different species.

Keywords: Apical Periodontitis. Bacteria. Cytokines. Matrix metalloproteinases. CBCT.

1 INTRODUÇÃO

A periodontite apical (PA) é uma das doenças inflamatórias orais com maior prevalência (Tibúrcio-Machado et al., 2021). Ela é causada por uma infecção microbiana do sistema de canais radiculares (Takehashi et al., 1965; Möller et al., 1981; Ricucci, Siqueira, 2010) que ocorre pela invasão de microrganismos através de lesões de cárie, trincas, periodonto ou vasos sanguíneos apicais (Tennert et al., 2014). Embora outros tipos de microrganismos, como fungos e vírus, tenham sido encontrados em associação com a periodontite apical (PA), as bactérias são os principais agentes etiológicos dessa doença (Sundqvist, 1976). Essa microbiota está organizada em comunidades complexas, conhecidas como biofilmes multiespécies, que estão localizados principalmente no interior do canal radicular (Siqueira, Rôças, 2022).

É conhecido que na infecção endodôntica primária, a microbiota presente é diversificada, com espécies Gram-positivas e Gram-negativas (Siqueira et al., 2004; Siqueira, Rôças, 2009). As espécies e filos encontrados em elevada prevalência incluem *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Veillonella parvula*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* espécies de *Streptococcus*, espécies de *Dialister*, *Filifactor alocis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, espécies de *Treponema* e membros do filo *Actinobacteria* (Cavalli et al., 2017; Ferreira et al., 2015; Machado et al., 2020; Siqueira, Rôças, 2009).

Essas informações já estão bem estabelecidas na literatura, contudo, para muitas doenças infecciosas causadas por membros da microbiota residente (patógenos oportunistas), o foco dos estudos mudou de determinados membros da comunidade microbiana, patógenos clássicos, para a percepção de que a comunidade é a unidade da patogenicidade (Amaral et al., 2022; Siqueira, Rôças, 2009; Siqueira, Rôças, 2022). Ou seja, as comunidades bacterianas como patógeno é que definem a doença, portanto, esse é o resultado da ação coletiva dos grupos de microrganismos, e suas manifestações são influenciadas pela composição e abundância relativa das espécies e pela rede de interações entre elas (Rôças, Siqueira, 2009). Assim, segundo Siqueira e Rôças (2022) o estudo isolado do papel

de cada cepa na periodontite apical é inadequado.

Após seu início, a infecção do canal radicular irá gradativamente avançar em direção à região apical até que bactérias e seus subprodutos atinjam os tecidos perirradiculares via forames apicais, laterais e perfurações radiculares iatrogênicas, desencadeando um processo inflamatório na região (Siqueira, Rôças, 2022). Esses subprodutos, liberados durante a morte e multiplicação das bactérias, são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão, presentes nas células de defesa do hospedeiro e células dos tecidos atingidos, (Akira et al., 2001) o que desencadeia a liberação de mediadores inflamatórios, como as citocinas, quimiocinas (Aderem, Ulevitch, 2000) e mediadores lipídicos como as resolvinas (Serhan et al., 2008).

As citocinas e quimiocinas são proteínas secretadas por células presentes nos tecidos lesados, que tem ação na modulação da atividade celular durante o processo inflamatório, alterando as funções celulares ou recrutando células de defesa para a região agredida (Borish, Steinke, 2003). Juntamente com as prostaglandinas, as citocinas, como as interleucinas (IL) e o fator de necrose tumoral (TNF), participam da iniciação e regulação da inflamação através da ativação e diferenciação dos osteoclastos, que são responsáveis pela reabsorção óssea apical (Nair et al., 1996).

A IL-1 β , é uma interleucina produzida em lesões periapicais por vários tipos de células, incluindo macrófagos, osteoclastos, polimorfonucleares (PMNs) e fibroblastos (Fouad, 1997). Essa citocina demonstrou ser um mediador potente da reabsorção óssea em doenças como osteoporose e exerce papel importante na reabsorção de lesões perirradiculares (He et al., 2020; Lim et al., 1994; Morsani et al., 2011). Além disso, essa citocina está correlacionada com presença de sinais e sintomas clínicos (Lim et al., 1994) e com uma grande destruição óssea periapical (Tani-Ishii et al., 1995).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica importante na remodelação óssea e na ativação e diferenciação de células imunes e osteoclastos (Jakovljevic et al., 2015). Essa citocina foi identificada na PA e níveis elevados foram verificados em lesões sintomáticas, epitelizadas e com maior destruição óssea do que em lesões assintomáticas e pequenas. Portanto, IL-6 pode desempenhar um papel pró-inflamatório, aumentando seus níveis e reabsorvendo osso na presença de

infecções. Contudo, quando a IL-6 não está presente, outras citocinas, como IL-1 e TNF- α , induzem a reabsorção óssea (Azuma et al., 2014).

TNF é uma citocina considerada um potente mediador inflamatório que causa efeito inflamatório e imunoregulatório (Gupta, 2002). Além disso, TNF- α atua nas células estromais provocando o aumento da expressão de fatores relacionados com a reabsorção óssea através do aumento da diferenciação de osteoclastos mesmo na ausência de níveis elevados de proteínas relacionadas à regulação e diferenciação de osteoclastos como RANKL, porém ambos os agentes, TNF- α e RANKL, individualmente e em combinação, causam grande impacto na diferenciação dos osteoclastos (Lam et al., 2000).

Além desses mediadores, as metaloproteinases de matriz (MMPs) apresentam papel fundamental na formação da lesão periapical. Elas constituem uma importante família de enzimas que degradam componentes da matriz extracelular (Tsuji et al., 2009). Essas enzimas também participam da iniciação do processo de reabsorção óssea, já que degradam a camada osteóide e a camada de colágeno da superfície, permitindo que os pré-osteoclastos se acoplem à matriz óssea mineralizada e completem sua diferenciação (Delaissé et al., 2000; Lima et al., 2021). MMP-2 e MMP-9 (colagenases A e B, respectivamente) são altamente expressas na periodontite apical e foi sugerido que desempenham um papel importante durante a fase inicial de desenvolvimento dessa doença (Corotti et al., 2009). Ainda, ambas as MMPs também foram relacionadas à presença de sintomas de origem endodôntica (Ahmed et al., 2013; Pereira Faustino et al., 2016).

Por outro lado, a IL-10, produzida por células imunes inatas e adaptativas, controla e suprime a inflamação a fim de regular negativamente a reação imune adaptativa e minimizar a destruição do tecido em resposta ao desafio microbiano; ela é um importante supressor endógeno da reabsorção óssea estimulada por infecções (Maynard, Weaver, 2008; Sasaki et al., 2000). Além disso, essa citocina também pode inibir a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e a IL-6 (Leon et al., 1998; Sasaki et al., 2000).

Outros mediadores que conduzem ativamente o término da inflamação também são secretados durante o processo inflamatório (Freire, Van Dyke, 2013). Esses mediadores de origem lipídica iniciam as vias que sinalizam o fim fisiológico da etapa inflamatória aguda (Levy et al., 2001) e ativam o processo de cicatrização

de feridas com regeneração tecidual em vez de fibrose ou cicatrização (Levy et al., 2012; Ortega-Gómez et al., 2013). Entre os conhecidos estão as resolvinas (Rv) produzidas endogenamente durante a fase de resolução do processo inflamatório. Especificamente a RvD2, entre outras funções, tem ação no controle de polimorfonucleares PMN e da função de osteoclastos e osteoblastos na cicatrização de feridas e regeneração óssea (Van Dyke et al., 2015; Herrera et al., 2008; El Kholi et al., 2018; Mizraji et al., 2018; Zhu et al., 2013). Ela é capaz de modular o eixo RANKL/OPG reduzindo a expressão de RANKL, enquanto regula positivamente os níveis de OPG (Mizraji et al., 2018). Estudos anteriores demonstraram que as Rv da série D, derivadas do ácido docosaenoico (DHA) são capazes de reduzir a inflamação, diminuindo a adesão de leucócitos-plaquetas (Serhan, Chiang, 2009).

Embora o papel da infecção microbiana e dos mediadores inflamatórios seja conhecido, a resposta imunológica do hospedeiro assim como as manifestações clínicas das doenças inflamatórias causadas por microrganismos, podem variar de acordo com as características da população estudada (Caires et al., 2019; Fouad et al., 2020; Nascimento et al., 2019). Diversas manifestações clínicas e radiográficas da periodontite apical são influenciadas pelo tipo e número de espécies bacterianas que ocorrem nos canais infectados (Gomes et al., 2004; Rôças, Siqueira, 2008) e Martinho et al., 2021 demonstraram que perfis bacterianos diferentes podem estar relacionados de forma diferente à expressão de proteínas inflamatórias e à manifestação de características clínicas.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil microbiológico e identificar padrões de agregação bacteriana, avaliar a associação desses padrões com os níveis de mediadores inflamatórios, MMPs e sinais e sintomas clínicos e ainda correlacionar os mediadores inflamatórios entre si e com os sinais e sintomas clínicos em dentes com infecção endodôntica primária e periodontite apical.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiota da infecção endodôntica primária e sua relação com sinais e sintomas

O estudo de Kakehashi et al. (1965) esclareceu a importância dos microrganismos na etiologia das alterações pulpares e periapicais. Nesse estudo em modelo animal foram utilizados dois grupos, um com ratos germ-free e outro com ratos apresentando microbiota normal. Em ambos os grupos foram confeccionadas cavidades para exposição pulpar e todos os animais receberam ração esterilizada durante o experimento. Ao final do experimento os pesquisadores observaram que no grupo dos animais com microbiota normal o tecido pulpar apresentava-se necrosado e com abscesso periapical, em contrapartida no grupo germ-free não havia necrose pulpar ou periodontite apical, o infiltrado inflamatório foi pequeno e havia reparo da região lesionada por dentina reparadora.

Em 1981 outro estudo foi realizado para demonstrar o papel dos microrganismos no desenvolvimento das lesões inflamatórias pulpares e periapicais. Möller et al. (1981) utilizaram nove macacos e provocaram necrose asséptica em 78 dentes desses animais, 26 dentes foram selados mantendo a cavidade pulpar asséptica e 52 foram contaminados por bactérias. Após 6 a 7 meses dos procedimentos foram realizadas análises radiográficas, clínicas, microbiológicas e histológicas que evidenciaram que nos casos de polpas necrosadas não infectadas os tecidos periapicais não apresentavam indícios de inflamação, entretanto nos dentes com polpa infectada, houve desenvolvimento de periodontite apical.

O perfil microbiano das infecções endodônticas primárias é bastante complexo, composto por bactérias Gram negativas e Gram positivas, com predomínio de microrganismos anaeróbios (Siqueira et al., 2004; Siqueira, Rôças, 2009). Nesse sentido Gomes et al. (2004) investigaram os microrganismos de 60 canais radiculares com infecções endodônticas primárias e secundárias e a associação das espécies com sinais e sintomas clínicos. Meios de cultura seletivos foram utilizados para cultivo e identificação dos microrganismos. Um total de 224

isolados cultiváveis, pertencentes a 56 espécies microbianas diferentes e 21 gêneros diferentes, foram recuperados das amostras coletadas. Os canais necróticos (41/60) renderam 188 isolados, 124 deles Gram-positivos e 137 bactérias anaeróbias estritas. As espécies bacterianas mais frequentemente recuperados dos canais radiculares com infecção endodôntica primária foram *P. micros*, *P. prevotii*, *F. necrophorum*, *P. intermedia / nigrescens*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus anginosus*, *S. sanguis*, *F. nucleatum*, *Gemella morbillorum*, *Streptococcus mitis*, *P. gingivalis*, *P. loescheii* e *Lactobacillus acidophilus*. Sintomas agudos de dor, história de dor prévia, sensibilidade à percussão e edema foram associados a espécies gram-negativas, especialmente *Prevotella*, *Porphyromonas spp.* e fusobactérias. *P. micros*, um coco gram-positivo, foi estatisticamente associado a dor, dor prévia, sensibilidade à percussão e canais úmidos. A microflora dos canais radiculares de dentes com infecção endodôntica primária e periodontite apical encontrada era mista, compreendendo microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos e principalmente anaeróbicos e geralmente contendo mais de 3 espécies por canal. Por outro lado, bactérias anaeróbias facultativas e Gram-positivas predominaram em canais com falha no tratamento endodôntico, esses canais geralmente apresentavam 1-2 espécies.

Sassone et al. (2008) avaliaram o perfil microbiológico de 60 dentes de pacientes com infecção endodôntica primária sintomática por método checkerboard DNA-DNA hibridização. Em casos sintomáticos, as espécies bacterianas mais frequentes foram *Fusobacterium nucleatum ssp. vincentii*, *Veillonella parvula*, *Treponema socranskii*, *E. faecalis*, *Campylobacter gracilis*, *Neisseria mucosa* e *Eubacterium saburreum*. Já nos casos assintomáticos foram *F. nucleatum ssp. vincentii*, *F. nucleatum ssp. nucleatum*, *E. faecalis*, *E. saburreum*, *N. mucosa* e *Peptostreptococcus micros*. Individualmente, a maioria das espécies avaliadas foram encontradas em níveis mais elevados nos casos sintomáticos assim como os gêneros *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Capnocytophaga*, *Campylobacter* e *Actinomyces*. Um nível médio significativamente mais alto de *T. forsythia* foi detectado nos casos sintomáticos. Portanto os dados coletados pelos autores sugeriram uma associação entre maiores contagens bacterianas totais e níveis de *T. forsythia* e a presença de sintomatologia dolorosa.

Rôças et al. (2011) analisaram a microbiota de infecções endodônticas

primárias em amostras de 43 pacientes noruegueses adultos utilizando o teste checkerboard hibridização DNA-DNA. Nos 21 dentes com periodontite apical assintomática as espécies mais frequentemente detectadas foram *D. invisus*, *F. nucleatum*, e *P. endodontalis*. Nos 9 dentes com abscesso apical crônico as espécies mais prevalentes foram *P. endodontalis*, *D. invisus*, *Parvimonas micra* e *S. moorei*. Já nos 13 dentes com periodontite apical sintomáticas as espécies mais prevalentes foram *D. Invisus*, *P. endodontalis*, *S. moorei*, *P. acnes*, e espécies de *Streptococcus*. A espécie *Selenomonas sputigena* foi significativamente mais frequente em casos dolorosos. Segundo os autores os resultados demonstraram que as espécies formaram diferentes parcerias e associações nas amostras coletadas e que é possível que algumas associações bacterianas possam resultar em uma comunidade multiespécie mais virulenta, dando origem a uma resposta inflamatória aguda nos tecidos perirradiculares. Contudo não se sabe se essas comunidades mais virulentas se desenvolvem desde o início do processo de infecção ou são o resultado de uma mudança devido a alterações ambientais.

Ferreira et al. (2015) avaliaram o perfil microbiológico resistente a diferentes medicações intracanaís em dentes com infecção endodôntica primária usando o método por cultura microbiológica e a técnica de hibridização DNA-DNA checkerboard. Para esse estudo os pesquisadores selecionaram 20 pacientes. Bactérias foram encontradas em todas as amostras iniciais coletadas. O tratamento endodôntico realizado reduziu o número de bactérias cultiváveis, mas não foram encontradas diferenças entre as coletas após o preparo biomecânico e após o uso de medicação intracanal. A análise por checkerboard DNA-DNA revelou que todos os canais radiculares investigados apresentaram DNA bacteriano para pelo menos 1 das 40 sondas testadas, na coleta inicial, com 5 a 36 (média = 11,75) espécies bacterianas por amostra. As espécies mais frequentes foram *Capnocytophaga ochracea* (70%) e *Fusobacterium nucleatum ssp. vincentii* (70%). Após o uso da medicação intracanal de hidróxido de cálcio associado à clorexidina, 8 canais radiculares investigados mostraram sinais bacterianos para pelo menos 1 das 40 sondas bacterianas de DNA testadas, e 2 canais radiculares não mostraram sinais bacterianos. A espécie mais frequentemente detectada foi *E. faecium* (40%).

Cavalli et al. (2017) correlacionaram o perfil microbiológico e níveis de endotoxina encontrados na infecção endodôntica primária com a presença de sinais

e sintomas clínicos e avaliaram a remoção de microrganismos e endotoxinas por meio de 3 diferentes técnicas de preparo biomecânico, Mtwo, Reciproc e Genius. Após análise por cultura microbiológica bactérias foram encontradas em 28 amostras iniciais dos 30 canais radiculares investigados. O preparo biomecânico foi eficaz na redução do número de bactérias cultiváveis, sendo observada diferença estatística entre a coleta inicial e a coleta após o preparo. Contudo, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os sistemas utilizados. presença de DNA bacteriano foi detectada em todos os canais investigados, na coleta inicial as espécies bacterianas mais prevalentes foram *Capnocytophaga ochracea* (53,33%), *Fusobacterium nucleatum ssp vicentii* (53,33%), *Porphyromonas gingivalis* (46,67%) e *Leptotrichia buccalis* (46,67%). Após o preparo dos canais as espécies bacterianas mais prevalentes foram *F. nucleatum ssp vicentii* (50%), *L. buccalis* (50%) e *P. gingivalis* (46,70%). Na coleta após o preparo biomecânico uma redução significativa no número de endotoxinas foi observada em todos os grupos. Foi observada presença de dor prévia relacionada a *Prevotella nigrescens*. Sensibilidade à percussão foi relacionada a *P. gingivalis*, *Veillonella parvula*, *Capnocytophaga sputigena*, *P. nigrescens* e *Eubacterium saburreum*. A presença de um trato sinusal foi relacionada a *Eikenella corrodens*, *Parvimonas micra*, *Campylobacter showae* e *E. saburreum*. Um trato sinusal também foi associado a microrganismos gram-positivos e anaeróbios facultativos.

Um estudo de 2018 avaliou a associação entre patógenos endodônticos selecionados e a expressão de vários mediadores envolvidos na destruição óssea em lesões periapicais e as relações dessas espécies com achados clínicos, radiográficos e histopatológicos. Foram detectadas Actinobacteria em 9/17 casos (53%), espécies de *Streptococcus* em 6/17 (35%), espécies de *Fusobacterium* e *P. micra* em 3/17 (18%) e espécies de *P. endodontalis* e *Dialister* em 2/17 (12%). As Actinobactérias foram associadas positivamente a granulomas, aumento da expressão de MMP-2, diminuição da expressão de OPG e maior razão RANKL: OPG. Esses achados sugerem que as Actinobactérias podem desempenhar um papel importante na indução de danos aos tecidos moles e duros relacionados à patogênese da periodontite apical (Takahama et al., 2018).

Rôças e Siqueira (2018) avaliaram a frequência e os níveis de 40 táxons bacterianos orais, em 133 amostras retiradas de abscessos apicais agudos e dentes

com periodontite apical assintomática. As espécies mais frequentemente detectadas nos dentes assintomáticos foram *P. endodontalis* (63%), *D. Invisus* (58%), *O. uli* (56%), e *F. nucleatum* (51%). As espécies mais prevalentes em abscessos eram *F. nucleatum* (60%), *P. endodontalis* (53%), *P. micra* (51%) e espécies de *Streptococcus* (45%). Os dados de frequência revelaram que nenhuma das espécies foram significativamente associados a casos sintomáticos. As espécies *Atopobium* sp. HOT416, *Campylobacter gracilis*, *Eubacterium sulcos*, *Gemella morbillorum*, *Prevotella nigrescens*, *Fretibacterium fastidiosum*, *T. parvum* e espécies de *Veillonella* foram significativamente mais detectados em dentes assintomáticos. Os dados semiquantitativos demonstraram que apenas *P. endodontalis*, *P. baroniae*, *Streptococcus* species e *Treponema denticola* foram significativamente mais prevalentes em níveis $>10^5$ em casos sintomáticos do que em casos assintomáticos.

Zargar et al. (2020) identificaram diferentes espécies bacterianas, alguns vírus e um fungo em 20 casos de pulpite irreversível e 21 casos de infecção endodôntica primária e correlacionaram esses microrganismos com achados clínicos e radiográficos. A identificação bacteriana foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento do rDNA 16s de colônias cultiváveis aeróbias e anaeróbias retiradas das placas de cultura dos pacientes. Um total de 16 cepas bacterianas foram identificadas neste estudo considerando espécies não cultiváveis, 5 das quais foram identificadas por métodos celulares moleculares, e o restante eram espécies cultiváveis. *Tannerella forsythia* foi a espécie mais prevalente (75%) no grupo com pulpite irreversível com lesão PA e *Porphyromonas gingivalis* (75%) e *Treponema denticola* (75%) foram as espécies mais prevalentes nos dentes com necrose pulpar sem lesão PA. Neste estudo 8 pacientes apresentaram sintomas de periodontite apical sintomática (PAS) e nesses casos as espécies mais prevalentes foram *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mitis* e *Fusobacterium nucleatum* (75%, 62,5% e 62,5%, respectivamente). Treze pacientes apresentaram sintomas de periodontite apical assintomática (PAA) no diagnóstico clínico e nas imagens radiográficas as espécies mais comuns nesses casos foram *Dialister invisus* e *Tannerella forsythia* (69,2%). Além disso, dois pacientes apresentaram sintomas de abscesso apical crônico com trato sinusal, nesses casos *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Dialister invisus* foram as espécies mais prevalentes (100%). Os autores ressaltaram que as comunidades

bacterianas eram diferentes em várias condições clínicas e radiográficas.

Machado et al. (2020) compararam a carga e a composição microbiana encontradas em 31 amostras de pacientes com periodontite apical primária (PAP) e 29 amostras de pacientes com periodontite apical pós-tratamento (PAPT), avaliaram os níveis de lipopolissacarídeos (LPS) e ácido lipoteicóico (LTA) e correlacionaram esses achados com sinais e sintomas clínicos e com o volume da lesão periapical. As espécies bacterianas mais prevalentes detectadas em PAP foram *S. intermedius* (45%), *E. faecalis* (42%), *P. acnes* (42%) e *S. constellatus* (35%), *P. gingivalis* (45%), *C. sputigena* (42%), *P. melaninogenica* (42%) e *L. buccalis* (39%). No PAPT, as espécies bacterianas mais prevalentes detectadas foram *E. nodatum* (65%), *S. mitis* (62%), *E. faecalis*, *S. constellatus*, *E. faecium* e *E. saburreum* (59%), *P. gingivalis* (72%), *C. rectus* (69 %), *C. sputigena* e *F. nucleatum. sp. vicentii* (66%). No PAP, a análise estatística revelou uma correlação positiva entre bactérias gram-positivas com dor espontânea e exsudato. Sensibilidade à percussão e dor à palpação foram correlacionadas à presença de bactérias gram-positivas e negativas. Além disso, foi observada correlação positiva entre níveis mais elevados de LPS presentes na PAP e um maior volume de destruição óssea determinado pela análise de TCFC. Já na PAPT, foi observada uma correlação positiva entre as bactérias gram-positivas e gram-negativas com o exsudato e o volume da lesão periapical e correlação entre os conteúdos de LPS e LTA com a destruição óssea periapical.

Martinho et al. (2021) investigaram se os sinais e sintomas clínicos e a expressão de citocinas (IL-10, TNF- α e IFN- γ) e quimiocinas (CCL2) poderiam estar relacionados aos padrões de colonização bacteriana em 21 dentes com infecção endodôntica primária e periodontite apical. Uma relação negativa foi detectada entre IL-10 e CCL2, TNF- α e INF- γ e uma associação positiva foi observada entre CCL2 e TNF- α . Além disso, foi encontrada uma relação positiva entre IL-10 e sintomas clínicos, incluindo dor pré-operatória, sensibilidade a percussão e dor pré-operatória/sensibilidade a percussão. As espécies mais frequentemente detectadas foram *Parvimonas micra* (76%), *Fusobacterium nucleatum spp. nucleatum* (71%), *Porphyromonas endodontalis* (66%), *F. nucleatum spp. vicentii* (61%), *Prevotella nigrescens* (57%), *Leptotrichia bucallis* (57%) e *F. nucleatum spp. polimorfo* (57%). Das 7 espécies mais detectadas, 6 delas eram Gram negativas, destacando sua predominância em infecções endodônticas primárias com PA. Os resultados da

regressão linear para o fator 1 (grupo de espécies bacterianas) revelaram uma associação com um tamanho da área radiotransparente ≥ 2 mm e dor pré-operatória/sensibilidade a percussão aumentado. Níveis mais elevados de CCL2 foram associados a maiores escores de bactérias no fator 2.

2.2 Papel das citocinas e MMPs na PA

Pezelj-Ribaric et al. (2007) determinaram os níveis de TNF- α em 60 amostras de exsudatos periapicais e avaliaram possíveis relações entre esta citocina e achados radiológicos nos dentes avaliados. Os indivíduos avaliados foram divididos em 3 grupos de acordo com o estado periapical em pericementite (controle), lesões menores do que 1cm e lesões maiores do que 1 cm. Diferenças nas concentrações de TNF- α entre o grupo controle (média: 28,15 pg / mL), o grupo com grandes áreas radiolúcidas (média: 582,95 pg / mL), bem como entre o controle e os canais associadas a pequenas áreas radiolúcidas (média: 278, 97 pg/mL) foram estatisticamente significativas. Também houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras com grandes áreas radiolúcidas e pequenas áreas radiolúcidas. Assim, demonstraram que TNF- α pode ser um marcador objetivo em lesões periapicais confirmadas radiograficamente.

Carneiro et al. (2009) analisaram a expressão de MMP-9 em 37 amostras de dentes com lesão periapical epitelizada ou não, em dentes indicados para cirurgia parodontal. Na análise imuno-histoquímica Células semelhantes a macrófagos, células semelhantes a fibroblastos, células semelhantes a neutrófilos PMN, células endoteliais e plasmáticas apresentaram imunomarcagem positiva para MMP-9 em ambos os tipos de lesões. Quando presentes, as células epiteliais, particularmente no estrato germinativo, foram positivas para MMP-9. Houve uma correlação positiva entre o número e a proporção de células MMP-9 + / total e CD68 + / células totais em lesões não epitelizadas. Nenhuma correlação significativa foi encontrada para lesões epitelizadas. Os autores sugeriram que há participação de várias células inflamatórias durante a expressão de MMP-9 na periodontite apical e essa MMP pode estar ativamente envolvida na degradação da matriz extracelular em lesões de

periodontite apical com ou sem epitélio contribuindo para o desenvolvimento da lesão.

Corotti et al. (2009) avaliaram os níveis teciduais de MMP-2 e -9 e sua distribuição nas lesões periapicais, em modelo de doença periapical em molar de rato Wistar. Controles positivos e negativos foram realizados durante todos os experimentos. A imunocoloração para MMP-2 e MMP-9 foi observada pelos autores em quase todos os períodos experimentais, exceto no dia 3, quando a lesão ainda não havia se estabelecido devido à vitalidade parcial da polpa. A imunoexpressão de MMP-2 e MMP-9 não diferiu significativamente entre 7–21 dias e 30–90 dias. No entanto, a imunomarcação de MMP-2 e MMP-9 em 7, 14 e 21 dias foi maior do que em 30, 60 e 90 dias. Nos primeiros períodos, predominava infiltrado inflamatório agudo, com sugestiva presença intensa de leucócitos, notadamente neutrófilos infiltrantes e a imunocoloração foi intensa para MMP-2 e MMP-9. Nos períodos subsequentes, a imunomarcação não foi intensa sugerindo que a MMP-2 e a MMP-9 desempenham um papel no desenvolvimento de lesões periapicais inflamatórias, provavelmente envolvidas no turnover da matriz extracelular durante a fase inicial de desenvolvimento da lesão.

Martinho et al. (2010) investigaram o perfil microbiano e os níveis de endotoxina encontrados em 21 amostras de pacientes com infecção endodôntica primária e periodontite apical e determinaram sua antigenicidade contra macrófagos através dos níveis de IL-1 β e TNF- α , avaliando sua relação com achados clínicos e radiográficos. Nesse estudo *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas endodontalis* e *Treponema socranskii* foram as três espécies bacterianas gram-negativas mais frequentemente detectadas. Foi encontrada uma correlação entre o número de diferentes espécies de bactérias gram-negativas e os níveis de IL-1 β . O ensaio LAL indicou que endotoxina estava presente em 100% das amostras de canais radiculares (21/21). Foi encontrada correlação entre o conteúdo de endotoxinas e os níveis de TNF- α liberados no meio de cultura. Um nível mediano mais alto de IL-1 β foi detectado quando um dos seguintes sintomas clínicos / achados radiográficos estava presente: dor à palpação (25,528 pg / mL), sensibilidade à percussão (25,528 pg / mL) ou tamanho da área radiolúcida $\geq$ 2 mm (25,291 pg / mL). Um maior nível de TNF- α foi encontrado nos dentes com exsudação (0,2870 pg / mL) do que na sua ausência (0,2340 pg / mL). Uma correlação entre os níveis de IL-1 β liberados no

meio de cultura e o tamanho da área radiotransparente foi encontrada neste estudo. Este estudo concluiu que a antigenicidade do conteúdo endodôntico contra macrófagos (liberação de IL- α e IL-1 β) não está apenas associada à quantidade de endotoxina, mas também ao número de bactérias gram-negativas envolvidas na infecção.

Martinho et al. (2012) investigaram a correlação entre diferentes sinais e sintomas clínicos e características radiográficas, de 21 pacientes, em relação aos níveis de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, prostaglandina E2 (PGE 2) e as redes produzidas por macrófagos endodônticos estimulados por conteúdo coletados de uma infecção endodôntica primária com periodontite apical. Todas as amostras de canal radicular foram positivas para DNA bacteriano (21/21) e endotoxina foi detectada em 100% dos canais investigados (21/21), com valor médio de 7.490 pg / mL, variando de 27 / pg / mL a 289.000 pg / mL. IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e PGE 2 foram detectados em todos os meios de cultura após estimulação com conteúdo de canal radicular. Os valores medianos registrados para cada citocina são os seguintes: IL-1 β (24.835 pg / mL), IL-6 (270.151 pg / mL), IL-10 (39.997 pg / mL), TNF- α (0,2830 pg / mL) e PGE 2 (124.530 pg / mL). O tamanho da lesão foi positivamente correlacionado com altos níveis de IL-6, bem como exsudação com TNF- α . A IL-10 apresentou correlação negativa com a presença de sintomatologia clínica. IL-1 β esteve presente e positivamente relacionada ao aumento dos níveis de produção de TNF- α . Os achados dos autores sugeriram que existem papéis diferentes para cada citocina no desenvolvimento da periodontite apical.

Ahmed et al. (2013) testaram a hipótese de que a expressão de MMP-9 está significativamente elevada em pacientes com periodontite apical sintomática e correlacionaram isso à quantidade detectada de bactérias gram-negativas. Para isso selecionaram 26 pacientes com necessidade de tratamento endodôntico. Esses pacientes foram divididos em dois grupos, assintomáticos e sintomáticos. Em relação às células gram-negativas, o grupo sintomático apresentou um número médio estatisticamente significativamente maior do que o grupo assintomáticos. Para a porcentagem da área imunopositiva para MMP-9, o grupo sintomático apresentou uma porcentagem da área média estatisticamente significativamente maior (37,6%) do que o grupo assintomático (12,1%). Células Gram-negativas e forte imunopositividade para MMP-9 nas células epiteliais, osteoclastos e

osteoblastos, células semelhantes a macrófagos, células semelhantes a fibroblastos e células endoteliais foram encontradas no grupo sintomático. Já no grupo no grupo assintomático, todas as seções testadas mostraram imunopositividade leve a moderada para MMP-9 nas células epiteliais, células inflamatórias subepiteliais e células endoteliais e um número reduzido de células Gram-negativas. Houve uma correlação positiva estatisticamente significativa entre o número de células gram-negativas e a porcentagem da área de MMP-9. Portanto os autores concluíram que há boas evidências de um papel significativo de bactérias gram-negativas e MMP-9 em lesões periapicais sintomáticas. Assim, talvez as bactérias gram-negativas desempenhem um papel importante na atividade da MMP-9 e nas lesões periapicais sintomáticas.

Araujo-Pires et al. (2014) investigaram simultaneamente os padrões de expressão de citocinas / marcadores Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Thf, Tr1 e Tregs em granulomas periapicais crônicos humanos e suas possíveis correlações com o padrão de atividade das lesões. Para isso os autores coletaram 110 granulomas periapicais de pacientes encaminhados para cirurgia parendodôntica. A análise das amostras foi feita através do teste Real-time PCR. Quando as lesões foram comparadas com base no padrão de expressão de RANKL/OPG, 40 amostras foram consideradas ativas ($RANKL > OPG$), enquanto 70 apresentavam um perfil de lesão inativa ($RANKL \leq OPG$). Os níveis de mRNA de $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$, IL-17A e IL-21 foram significativamente maiores nos granulomas ativos, já nas lesões inativas os níveis de expressão de IL-4, IL-9, IL-10, IL-22 e FOXP3 foram maiores. Os níveis de IL-23 e IL-33 em lesões ativas e inativas foram semelhantes do ponto de vista estatístico. Quando o perfil global de expressão de citocinas em lesões periapicais foi comparado com tecidos saudáveis de controle, a expressão de todas as citocinas/marcadores investigados foi significativamente aumentada nas lesões. Considerando o cenário de lesões ativas, a expressão de $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$, IL-17 e IL-21 prevalecem nessas lesões. Os autores concluíram que existe uma nítida dicotomia no perfil de expressão de citocinas em lesões periapicais inativas e ativas. Embora a expressão disseminada de citocinas pareça ser uma característica de tais lesões crônicas, a análise de agrupamento hierárquico demonstra a associação de $TNF-\alpha$, IL-21, IL-17 e $IFN-\gamma$ com a atividade das lesões, e a associação de FOXP3, IL-10, IL-9, IL-4 e IL-22 com a inatividade das lesões.

Martinho et al. (2014) investigaram a presença de diferentes espécies de bactérias Gram-negativas e os níveis de endotoxinas em 21 amostras coletadas de dentes com infecção endodôntica primária e periodontite apical, determinando sua capacidade de estimulação contra macrófagos através dos níveis de IL-1, IL-6, IL-10 e TNF- α e avaliaram sua relação com os achados clínicos e radiográficos. Uma combinação de duas ou mais espécies de bactérias Gram-negativas foi encontrada em 17/21 amostras de canais radiculares. A análise estatística revelou que o aumento do número de espécies Gram-negativas foi considerado um fator de risco para a presença de uma área radiotransparente > 2 mm. As espécies bacterianas mais frequentes foram *P. nigrescens*, *Treponema spp.*, *Treponema médioe* e *Treponema amylovorum* e foi encontrada associação positiva entre *Treponema lecithinolyticum* e *P. nigrescens* com a presença de exsudação em canais radiculares. Endotoxina foi detectada em 100% dos canais investigados (21/21). A presença de dor pré-operatória foi positivamente associada aos níveis de endotoxina, IL-1 β e IL-6 e negativamente associado a IL-10. Foram encontradas correlações entre os teores de endotoxinas e os níveis de TNF- α e IL-1, enquanto uma correlação negativa foi encontrada entre os níveis de endotoxinas e a quantidade de IL-10 secretado. Os autores concluíram que o conteúdo infeccioso endodôntico bacteriano é um estímulo potente para a produção de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 em macrófagos.

Pereira Faustino et al. (2016) avaliaram as possíveis associações entre o diagnóstico histopatológico, o perfil do infiltrado inflamatório, a presença de dor e a imunoexpressão de MMP-2 e MMP-9 em 51 amostras de lesões periapicais de dentes com infecção endodôntica primária. A análise microscópica revelou 28 casos de granulomas periapicais (54,90%) e 23 casos de cistos periapicais (45,10%). O infiltrado inflamatório mostrou predomínio de inflamação mista em granulomas periapicais (19 casos, 67,85%) e cistos (12 casos, 52,17%). Esse infiltrado inflamatório era composto principalmente de plasmócitos nos granulomas periapicais e linfócitos e plasmócitos nos cistos periapicais. A imunohistoquímica mostrou células positivas em todos os casos com o uso de ambos os anticorpos. De acordo com a contagem de células positivas, tanto a MMP-2 quanto a MMP-9 foram expressas mais em granulomas periapicais do que em cistos periapicais, mas essa diferença foi estatisticamente significativa apenas para MMP-2. O teste de

correlação de Pearson mostrou uma correlação moderada positiva entre a expressão de MMP-2 e MMP-9. Pacientes com dor eram mais propensos a ter um infiltrado inflamatório misto. A porcentagem de células imunopositivas para MMP-2 e MMP-9 foi maior nos pacientes com sintomas, mas apenas para MMP-2 essa relação foi estatisticamente significativa. Todos os 3 pacientes com trato sinusal também apresentavam dor e uma média elevada de expressão de MMP.

Caires et al. (2019) compararam as respostas imunológicas perirradiculares em duas populações geneticamente diversas. Para isso coletaram amostras clínicas do líquido intersticial adjacente ao canal radicular infectado em ambos os grupos imediatamente após a instrumentação do sistema de canais radiculares e sete dias após esses procedimentos. A expressão das citocinas TNF- α , IL-1- β , IL-9, IFN- γ , IL-17 e IL-10 e das quimiocinas CXCR4, CCL2 / MCP-1 e CCR6 foram avaliadas por PCR real-time. A avaliação revelou aumentos significativos na expressão de TNF- α , MCP-1, CXCR4 e CCR6 na coleta após 7 dias do tratamento em comparação com a coleta inicial, após preparo dos canais apenas nos indivíduos do grupo urbano. Por outro lado, o nível de mRNA do gene IFN- γ foi aumentado no dia 7 para a população indígena. Os níveis de expressão de IL-17A e de IL-10 aumentaram em ambas as populações no dia 7. Com isso os autores concluíram que variantes regulatórias menores que surgiram ao longo do tempo em resposta a fatores ambientais causam variabilidade genética quantitativa significativa entre os hospedeiros na regulação da resposta imune periapical. Como a plasticidade funcional e a redundância do sistema imunológico complicam o estudo experimental de cada um de seus componentes, os resultados deste estudo contribuem para a compreensão geral das respostas imunológicas específicas que predominam na área periapical em cada população urbana e indígena individualizada após a instituição terapia endodôntica clínica.

Maia et al. (2020) avaliaram, através de RT-PCR, quantitativamente, a expressão de mRNA das citocinas IL-9, TNF- α , IL-1, INF- γ , IL-17A e IL-10 e das quimiocinas CCL-2 / MCP-1 e CCR -6 em amostras coletadas de fluido intersticial de lesões periapicais. As amostras foram coletadas imediatamente após o término do procedimento e 7 dias após a terapia endodôntica. A expressão do mRNA foi quantificada por comparação com o gene de controle interno GAPDH. A análise dos resultados revelou um aumento significativo nos níveis de mRNA de IL-9, bem como

TNF- α , IL-1 β , INF- γ e IL-10 no dia 7 em comparação com o dia 0. A citocina IL-17A e as quimiocinas CCL-2 / MCP-1 e CCR-6 não apresentaram diferenças significativas na expressão de mRNA entre os dois períodos de análise. Foi demonstrado que a resposta pró-inflamatória mediada por citocinas e quimiocinas parece ser modulada de uma maneira dependente de IL-9 / IL-10.

2.3 Radiografia x Tomografia

Bornstein et al. (2011) avaliaram a capacidade de detecção de lesões periapicais (LP), suas dimensões, sua relação com o canal mandibular, dados anatômicos gerais e a espessura da cortical óssea vestibular, usando imagens de TCFC em comparação com radiografias periapicais (PA) convencionais para avaliação de molares inferiores antes da cirurgia apical. Para isso os pesquisadores selecionaram 38 pacientes com dentes indicados para realização de microcirurgia endodôntica. Ao todo 75 raízes foram avaliadas através de radiografias PA pela técnica de paralelismo e imagens de TCFC. Os resultados gerais mostraram que 15 (25,86%) LP detectadas em cortes sagitais de TCFC foram perdidas na radiografia PA. Em relação às dimensões das LP detectadas, a avaliação dos cortes sagitais de TCFC resultou em mais lesões sendo classificadas com o maior diâmetro da lesão medindo mais de 5 mm. A distância entre os ápices dos primeiros molares inferiores e a borda superior do canal mandibular não foi mensurável em 44 radiografias de 68 (64,7%). Além disso, deve-se esperar um osso cortical com espessura média de 1,7 mm e distância média de acesso de 5,3 mm. Assim, os autores concluíram que, em geral, a imagem limitada de TCFC pode ser considerada um método diagnóstico valioso para a avaliação de áreas anatomicamente complexas antes da cirurgia apical.

Balasundaram et al. (2012) compararam o tamanho da lesão e a escolha do tratamento em relação às informações radiográficas disponíveis da radiografia periapical e da TCFC. Foram avaliados exames de 24 pacientes. Embora não tenha havido significância estatística entre as duas modalidades em termos de tamanho da lesão medido por observadores individuais, houve uma variabilidade apreciável

quando as medidas do tamanho da lesão de todos os seis observadores foram calculadas. Este estudo demonstrou que a escolha do tratamento em endodontia não muda significativamente, mesmo com a inclusão de uma modalidade de imagem avançada, como a TCFC. Embora a TCFC tenha apresentado resultados semelhantes aos obtidos com a radiografia periapical, as vantagens potenciais da TCFC em outras áreas da endodontia, incluindo a avaliação da proximidade dos dentes a estruturas anatômicas, como canal mandibular e seio maxilar, não podem ser subestimadas. Este estudo também prova o potencial diagnóstico robusto das modalidades de imagem bidimensionais tradicionais.

Abella et al. (2014) compararam a prevalência de radiolucências PA associadas a raízes individuais de dentes não vitais não tratados endodonticamente quando visualizados com radiografias PA e TCFC. De 161 dentes, 15 foram diagnosticados com necrose pulpar com tecido apical normal, 50 com periodontite apical sintomática, 55 com periodontite apical assintomática, 16 com abscesso apical agudo e 25 com abscesso apical crônico. Cento e quarenta e uma (41,5%) raízes não tinham radiolucências PA discerníveis quando avaliadas com radiografias PA e TCFC. As duas modalidades detectaram 129 (37,9%) raízes com lesões de PA (fig. 3); A TCFC detectou 67 (19,7%) raízes com radiolucências PA que não foram detectadas pelas radiografias PA. Três raízes (0,88%) com radiolucências PA foram identificadas apenas nas radiografias PA. No geral, os resultados mostraram que a TCFC detectou mais radiolucências PA do que radiografias PA. Um adicional de 15 (4,4%) raízes foram identificadas com varredura TCFC sozinho em comparação com aquelas analisadas com radiografias PA. Destas 15 raízes adicionais, 4 corresponderam às raízes disto-linguais (2 primeiros e 2 segundos molares inferiores), 5 às raízes linguais (3 incisivos centrais inferiores e 2 segundos pré-molares inferiores) e 6 às terceiras raízes (3 primeiros e 3 segundos superiores pré-molares). Quatro dessas 15 raízes tinham radiolucências de PA. No total, 200 (56,3%) raízes foram detectadas com radiolucências PA das 355 raízes identificadas com varredura de TCFC. Nos dentes com diagnóstico de necrose pulpar (com tecido apical normal), periodontite apical sintomática ou abscesso apical agudo, as imagens de TCFC revelaram um número significativamente maior de radiolucências do que o revelado por radiografias PA. As radiografias PA e TCFC mostraram que 15,1% e 48,2%, respectivamente, das raízes de dentes com periodontite apical

sintomática tinham lesões de PA. Nenhuma diferença estatística foi observada entre as radiografias PA e a TCFC para dentes com periodontite apical assintomática ou abscesso apical crônico.

Weissman et al. (2015) correlacionaram a evidência de periodontite apical avaliada com imagens radiográficas 2D PA e volumes 3D de TCFC com sinais e sintomas clínicos. Quatrocentos e noventa e oito casos foram avaliados. Trinta e oito de 67 dentes (57%) mostraram a presença de radiolucências apicais tanto em radiografias PA quanto em TCFC, enquanto 14 dentes (21%) não tinham evidência de radiolucências apicais em qualquer modalidade de imagem. Quinze casos (22%) mostraram a presença de radiolucências apicais visíveis na imagem TCFC que não eram visíveis nas radiografias PA. Não houve casos com lesões visíveis nas radiografias PA, mas não na imagem TCFC. A probabilidade de radiolucências apicais foi de 57% para radiografias PA e 79% para volumes de TCFC, e a diferença entre essas probabilidades foi altamente significativa. Entre os pacientes que relataram edema localizado, radiolucências apicais foram identificadas em todos os casos (71% visíveis nas imagens PA e TCFC e 29% visíveis apenas na imagem TCFC). Em contraste, entre os pacientes sem edema localizado, radiolucências apicais não foram identificadas em 26% dos casos, mas eram visíveis em ambas as modalidades em 53% dos casos e visíveis apenas na imagem de TCFC em 21% dos casos. Para o exame clínico, a sensibilidade dos dentes foi significativamente associada à presença de periodontite apical confirmada em imagens radiográficas. Especificamente, a determinação de uma polpa vital foi associada a uma diminuição do risco para a presença de periodontite apical. Pacientes com sensibilidade à percussão tendem a apresentar risco aumentado de periodontite apical, no entanto, essa associação não foi estatisticamente significativa.

Ramis-Alario et al. (2019) compararam a sensibilidade para detectar lesões apicais em dentes programados para cirurgia periapical e o tamanho dessas lesões, utilizando três diferentes técnicas de diagnóstico radiográfico: radiografia periapical, panorâmica e TCFC. Os pesquisadores selecionaram pacientes com dentes programados para cirurgia periapical, que haviam feito os três tipos de exame. Imagens de tomografia computadorizada de feixe cônico foram utilizadas para calibração e avaliação da precisão interexaminador, medindo a distância do ápice da

raiz mesial do primeiro molar inferior à margem superior do canal mandibular. No estudo global, cada medida foi realizada por dois examinadores, com cálculo da média de ambas as medidas. As técnicas convencionais bidimensionais (radiografia periapical e radiografia panorâmica) apresentaram sensibilidade de 82%, em termos percentuais, as técnicas bidimensionais falharam em registrar 4,5% das lesões anteriores e 13,5% das lesões posteriores. Em contraste, a TCFC registrou todas as 45 áreas hipodensas. A medida vertical média da área apical encontrada foi de 5,48 mm com a radiografia periapical, 5,04 mm com a radiografia panorâmica e os resultados no caso de TCFC foram 6,36 mm nos cortes coronais e 6,38 mm nos cortes sagitais. Não houve diferenças significativas entre as técnicas bidimensionais (radiografia periapical e radiografia panorâmica), embora diferenças significativas tenham sido observadas nas medidas verticais entre as técnicas bidimensionais e TCFC. Em relação às medidas horizontais, os valores médios foram 4,80 mm no caso das radiografias periapicais e 5,01 no caso das radiografias panorâmicas. No caso da TCFC, os valores foram 5,63 mm nos cortes coronais e 5,10 mm nos cortes sagitais. Não foram observadas diferenças significativas na comparação das diferentes técnicas radiográficas. Assim, os autores concluíram que as técnicas radiográficas bidimensionais mostraram sensibilidade significativamente menor para detectar lesões periapicais do que a TCFC. Em relação à dimensão vertical das lesões apicais, foram observadas diferenças significativas entre as técnicas convencionais bidimensionais e a TCFC.

Sheth et al. (2020) compararam as radiografias de TCFC e PA para determinar a proximidade da lesão de AP às estruturas anatômicas na área pré-maxilar para tomada de decisão antes da cirurgia de AP. Uma diferença significativa no plano de tratamento selecionado pelos observadores entre radiografias PA e imagens TCFC foi revelada. As imagens de TCFC revelaram um aumento no número de dentes envolvidos com a lesão e uma mudança no plano de tratamento foi observada após a visualização de informações adicionais com TCFC. Assim, a TCFC ajudou no planejamento preciso do tratamento e forneceu um tratamento mais seguro, apresentando ao clínico informações relevantes, como espessura do osso, angulação da raiz e posição das estruturas anatômicas.

Toia et al. (2021) compararam o retratamento endodôntico de dentes com periodontite apical pós-tratamento realizado em uma visita versus duas visitas na redução da carga microbiana, níveis de endotoxinas (LPS) e ácido lipoteicoico (LTA) e volume de lesão periapical após 18 meses de acompanhamento usando TCFC. Quarenta pacientes foram incluídos nesta pesquisa. Bactérias foram encontradas em trinta e nove amostras das 40 coletadas. Em ambos os grupos uma redução significativa de bactérias foi observada após o protocolo de retratamento. Nenhuma bactéria cultivável foi recuperada de 14 dos 20 canais radiculares retratados em uma visita e de 5 dos 20 canais radiculares tratados em duas visitas. Na coleta inicial, LPS foi detectado em 100% dos canais radiculares com um valor médio de 27,65 EU / mL. Não foi observada diferença significativa entre os grupos. Em ambos os grupos, os níveis de LPS foram significativamente mais baixos após o protocolo de retratamento. LTA foi detectado em 100% das amostras iniciais, com um valor médio de 125,21 pg/mL (40 de 40), variando de 47,03 - 321,8 pg/mL. No grupo de 1 visita, nenhuma diferença significativa foi observada antes da intervenção endodôntica e após o protocolo de retratamento, contudo, no grupo de 2 visitas, uma redução significativa nos níveis de LTA foi observada após o uso de medicação intracanal por 14 dias. O volume médio inicial geral da lesão periapical determinado por TCFC foi de 60 mm³ (10 - 470 mm³) no exame pré-operatório. Não foi observada diferença estatística entre os grupos quanto à distribuição do volume da lesão periapical. Trinta e quatro participantes compareceram à visita de acompanhamento. No grupo 1-visita o volume médio de lesão periapical foi 54 milímetros no exame pré-operatório e 10 milímetros aos 18 meses de acompanhamento. No grupo 2-visita o volume médio de lesão periapical foi 60 milímetros no exame pré-operatório e 5,5 milímetros após 18 meses do retratamento. Ambos os grupos apresentaram redução estatisticamente significativa do volume da lesão periapical entre o exame pré-operatório e a avaliação após 18 meses, sem diferença estatística entre eles.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo são:

- a) Analisar o perfil microbiológico em dentes com infecção endodôntica primária e PA e os padrões de colonização bacteriana nesse tipo de infecção;
- b) Analisar o perfil inflamatório, através da quantificação de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, MMP-2, MMP-9 e RvD2, em dentes com infecção endodôntica primária e PA;
- c) Avaliar o volume inicial da lesão periapical em dentes com infecção endodôntica primária e PA;
- d) Avaliar sinais e sintomas clínicos na infecção endodôntica primária e PA;
- e) E investigar a correlação dos sinais e sintomas clínicos, a expressão de mediadores inflamatórios, o volume das lesões entre si e com padrões de colonização bacteriana na infecção endodôntica primária e PA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos local, sob o protocolo no. 2.651.035, e registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (REBEC) (RBR-3xbnnn). Os procedimentos foram conduzidos de acordo com a declaração de Helsinque, e todos os voluntários assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

4.1 Procedimentos experimentais

4.1.1 Seleção de pacientes

Quarenta pacientes com idade adulta e necessidade de tratamento endodôntico foram selecionados e atendidos na Clínica de Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora do Instituto de Ciências e Tecnologia (UNESP) de São José dos Campos (SP), Brasil de outubro de 2019 a fevereiro de 2022.

Para maior padronização da amostra todos os dentes selecionados eram permanentes, com infecção endodôntica primária, unirradiculares, com presença de um único canal e periodontite apical comprovados radiograficamente (Figura 1). Os critérios de exclusão foram: pacientes com presença de bolsa periodontal maior do que 4 mm, dentes que não puderam ser isolados com o dique de borracha, dentes com fratura radicular ou exposição da câmara pulpar, dentes com ápice incompleto ou com tratamento endodôntico prévio, pacientes que haviam feito uso de antibióticos ou antifúngicos até 3 meses antes do início do tratamento ou que apresentavam doença sistêmica.

Para todos os pacientes foram realizadas anamneses com registro dos sinais e sintomas clínicos; o diagnóstico de necrose pulpar foi confirmado pela resposta negativa ao teste de sensibilidade a frio. Foram feitos ainda, os testes de

percussão vertical e palpação apical. Em seguida, os pacientes foram submetidos à radiografia inicial e à TCFC Classic I-Cat (Imaging Science International, Hatchfield, EUA) na região dos dentes selecionados, antes da intervenção odontológica, confirmando a presença de destruição óssea periapical.

Figura 1 - Radiografia inicial de dente com infecção endodôntica primária e presença de lesão periapical



Legenda: Dente com infecção endodôntica primária com presença de lesão periapical (*).

Fonte: Elaborado pelo autor.

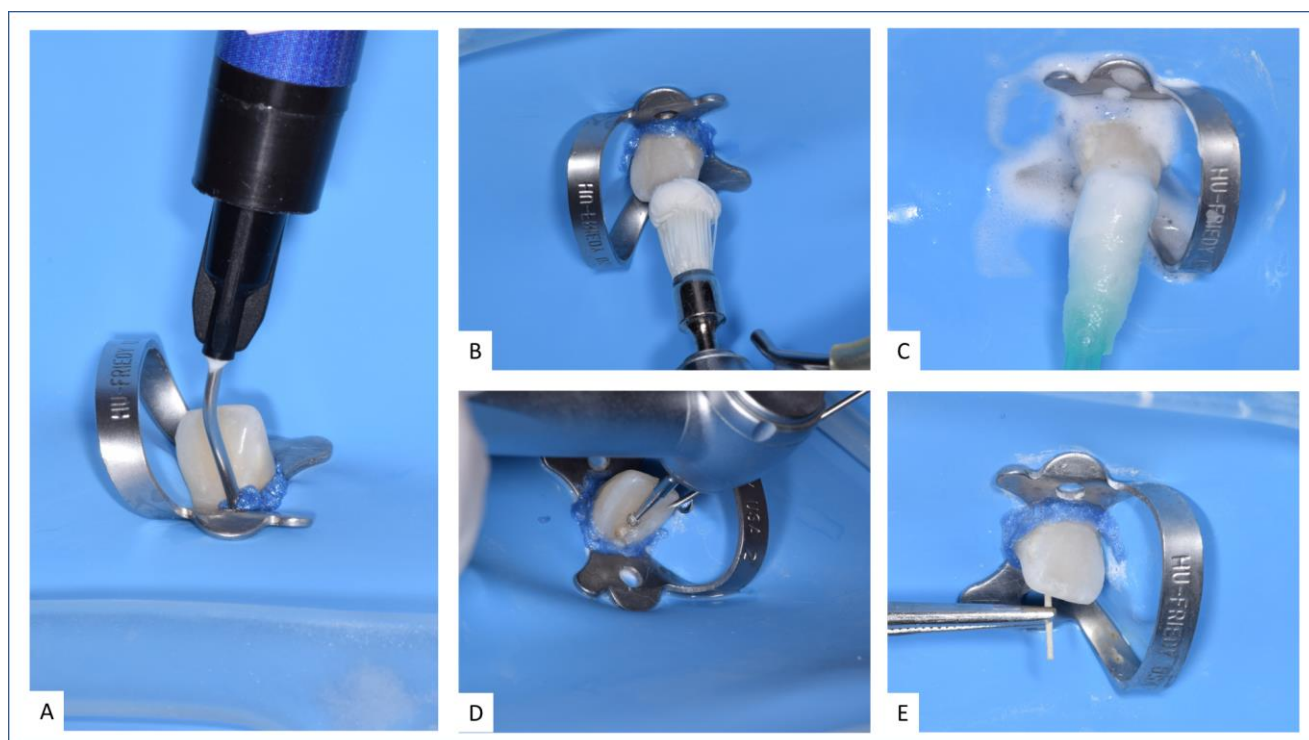
4.1.2 Intervenções odontológicas

Todos os procedimentos foram realizados por um único operador especialista. Todas as limas endodônticas, instrumentos odontológicos e outros materiais utilizados nesse estudo foram esterilizados com radiação gama Co60 pelo Ipen (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP, Brasil). Os dentes foram isolados com dique de borracha e lavados com soro fisiológico, em seguida foi feita uma barreira física de resina fotopolimerizável (Top Dam – FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil) (Figura 2a). A coroa e estruturas adjacentes foram submetidas a profilaxia com pasta profilática (Vigodent S/A Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e escova de Robinson (Microdont – Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 2b) e desinfetadas

com swabs (Jiangsu Medical Materials Co. Ltda, Jiangsu, China) estéreis (Figura 2c) umedecidos em água oxigenada (H₂O₂) 30% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil), seguido por NaOCl 5.25%. Para evitar contaminação química do canal radicular com essa solução e a interferência com a cultura microbiológica, realizou-se a neutralização do NaOCl com o tiosulfato de sódio 5% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil). A esterilidade das superfícies externas da coroa foi confirmada com o auxílio de um swab que foi colocado em contato com o ágar-sangue presente em placas de cultura, que foram incubadas em ambiente aeróbio e anaeróbio (Machado et al., 2020).

A abertura coronária foi realizada sob irrigação manual com solução salina estéril e apirogênica usando uma broca diamantada em alta rotação (Figura 2d). A primeira etapa foi realizada para promover a remoção de contaminantes, incluindo lesões cariosas e restaurações. Na segunda fase, antes de entrar na câmara pulpar, a cavidade de acesso foi novamente desinfetada de acordo com o protocolo descrito anteriormente (Cardoso et al., 2015). A esterilidade da superfície interna da cavidade de acesso foi verificada como previamente descrito, e todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas. Feito o acesso, uma primeira coleta (S1) do conteúdo do canal foi realizada através da introdução de 3 cones de papel estéreis/apirogênicos (#15; Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça), um de cada vez, no comprimento aparente do dente, determinado radiograficamente, e mantidos em posição por 60 segundos. Imediatamente após, os cones de papel foram colocados em um microtubo estéril contendo 1 mL de meio de transporte VMGA II. Na presença de canais secos, eles foram umedecidos com solução salina estéril para garantir a viabilidade da amostragem microbiana (Figura 2e).

Figura 2 - Imagens ilustrativas da intervenção endodôntica: a- realização de barreira de resina; b- profilaxia com pasta profilática; c- desinfecção do campo operatório e coroa dental; d- abertura coronária e e- coleta microbiológica



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.3 Preparo biomecânico

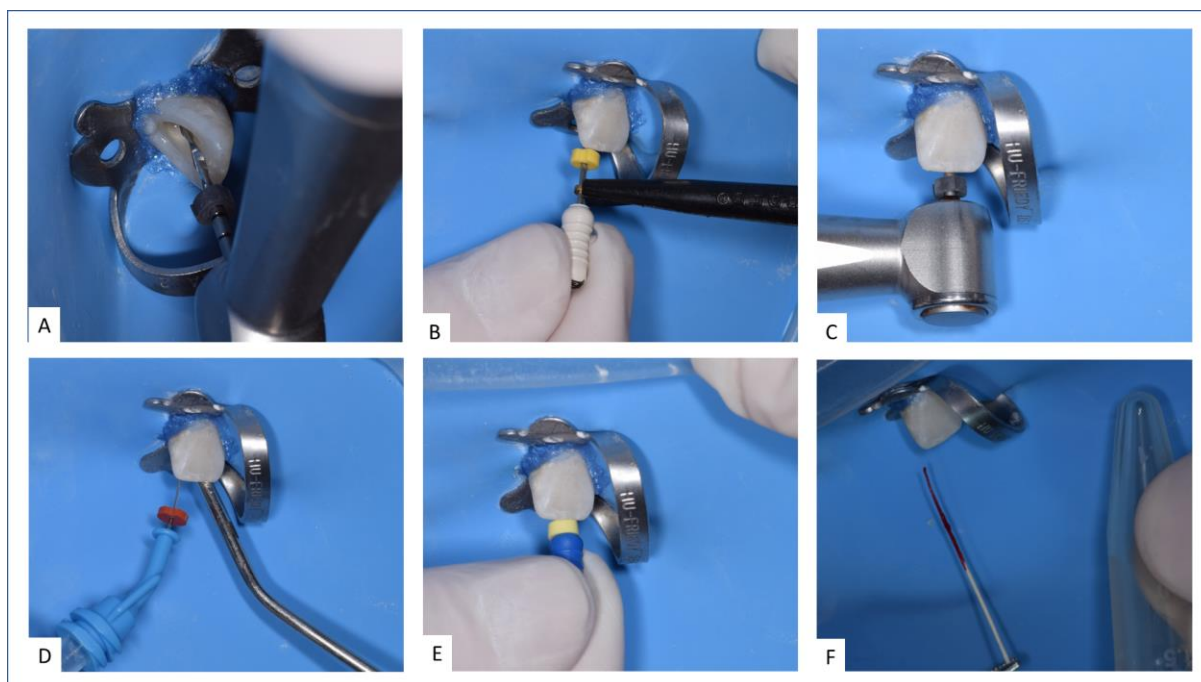
Após a coleta das primeiras amostras para análise molecular (S1), os canais foram preparados com limas Reciproc® R40 (VDW, Munique, Alemanha); as limas foram adaptadas em motor elétrico (VDW, Munique- Alemanha) instrumentando-se inicialmente os terços cervical e médio (Figura 3a) e irrigando-se o canal com seringa e agulha 30G (Navi-tips, Ultradent, Indaiatuba - SP, Brasil) contendo 8 ml de NaOCl 2,5% a cada terço instrumentado. O comprimento do canal radicular foi confirmado com o auxílio de um localizador foraminal (RomiApex A15- Romidan; Qiryat Ono Israel) e o comprimento de trabalho foi definido em 1mm aquém do ápice

(Figura 3b). Em seguida foi realizado o preparo do terço apical (Figura 3c). Durante o preparo, a patência do canal foi verificada após cada irrigação, com lima manual #15, ultrapassando 1 mm do comprimento real do dente. Ao final da instrumentação, o canal foi irrigado com 8 mL de NaOCl 2,5%, seguido de irrigação com 5 mL de tiosulfato de sódio 0,5% durante 1 minuto para inativação do NaOCl e este último foi removido do canal com irrigação com 10 mL de solução salina estéril (Figura 3d).

Em seguida um instrumento K#30 foi introduzido no canal, ultrapassando 1 mm além do comprimento real para desobstrução do forame apical, permitindo assim a inserção de cones de papel para coleta do fluido intersticial (SF1) da periodontite apical (Figura 3e). Foi introduzido 1 cone de papel no canal, ultrapassando o comprimento do dente, e estes permaneceram por 60 segundos em posição (Figura 3f), sendo em seguida armazenados em microtubo contendo 2 mL de solução tampão (PBS – tampão fosfato salino), 0,1% de solução Tween 20 e 1 µl de coquetel de inibidores de protease. Em seguida os microtubos foram armazenados a -80°C para posterior quantificação de marcadores imunológicos (RvD2, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, MMP-2 e MMP-9) por ensaio multiplex e ensaio imunoenzimático (ELISA).

Ao final da coleta SF1 os canais foram inundados com EDTA 17% por 3 minutos, que foi agitado com uma lima K #30 após esse período, seguido de uma irrigação final com 10 mL de solução salina. Após 14 dias os tratamentos do canal radicular foram concluídos para todos os pacientes.

Figura 3 - Imagens ilustrativas da intervenção endodôntica: a- início da instrumentação; b- odontometria; c- finalização da instrumentação; d- irrigação final; e- desbridamento foraminal e f- coleta do fluido intersticial



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.4 Análise da volumetria da destruição óssea periapical (mm³)

As tomografias computadorizadas de feixe cônico (TCFC) foram realizadas no Departamento de Diagnóstico e Cirurgia do Instituto de Ciência de Tecnologia de São José dos Campos (ICT- SJC). Para a aquisição das imagens por TCFC, o plano oclusal do paciente foi orientado paralelamente ao plano horizontal (correspondente ao plano axial) conforme o protocolo recomendado pelo fabricante. Os exames foram realizados usando o tomógrafo Classic I-Cat (Imaging Science International, Hatchfield, EUA) com 6x6 cm de campo de visão ou FOV (field of view), voxel isotrópico de 0,25 mm, 120 kVp, 36,15 mAs e 12 bits de profundidade de escala de

46 cinza. Todos os arquivos foram trabalhados em formato DICOM (Digital Image and Communication in Medicine) e lidos em software específico. Os dados DICOM de cada varredura foram salvos em arquivos separados, importados e avaliados com o software ITK-SNAP v. 3.8.0 (Cognitica, Philadelphia, PA, USA). O processo de segmentação e as medições volumétricas no software ITK-SNAP v. 3.8.0 foram baseados no seguinte protocolo com orientação no longo eixo do dente para a referência dos cortes.

As coordenadas multiplanares (“X”, “Y” e “Z”) foram posicionadas nos planos axial, sagital e coronal, de acordo com a região de interesse avaliada, de forma que todos os cortes passassem pela maior dimensão da lesão periapical na reconstrução. Em seguida, foi determinada a região de interesse (ROI) a ser segmentada, compreendendo o ápice dos dentes avaliados, a lesão periapical e o osso adjacente. Para isso, foi utilizada a ferramenta Snake ROI (região de interesse). Um intervalo de limite (cerca de -200 a -50 para o limite inferior e 400 a 700 para o superior) foi estabelecido pelo examinador para fixar o topo e a base do processo de segmentação, para construir um modelo tridimensional (3D) da lesão periapical. A seleção da área foi interativa, ou seja, baseada na distinção visual do examinador entre as lesões periapicais, osso e terço apical dos dentes. Posteriormente, bolhas foram adicionadas no interior da lesão para posterior preenchimento com base na faixa de limiar previamente selecionada. Ao final das etapas de segmentação, o software disponibilizou o modelo 3D da lesão periapical segmentada e seu volume em milímetros cúbicos (mm³).

4.1.5 Análise por checkerboard

O método Checkerboard DNA-DNA hybridization, foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Odontologia II – Microbiologia, Imunologia e Biologia Molecular da Universidade de Guarulhos (UnG), onde as amostras obtidas foram submetidas ao teste, investigando 40 espécies bacterianas. Os tubos eppendorf contendo os 3 cones de papel (amostra matriz) armazenados em 1 mL de meio de transporte pré reduzido VMGA III foram agitados até a dessorção do conteúdo para

facilitar a dispersão dos micro-organismos e 300 µL de cada amostra foram transferidos para outro tubo eppendorf. Após esse procedimento, os tubos foram centrifugados a 8.000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante neles contido foi descartado e o pellet ressuspendido com 150 µL de solução TE (10 Mm Tris-HCL, 1 Mm EDTA pH 7.6). A cada tubo plástico contendo amostras e solução tampão TE foram acrescentados 100 µL de NaOH (Labsynth) a 0,5M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por um longo período. Em seguida, as amostras foram armazenadas sob refrigeração a -20°C para posterior análise.

A lista das 40 cepas bacterianas utilizadas nesta pesquisa para o preparo das sondas de DNA está apresentada no quadro 1. As espécies avaliadas foram selecionadas devido a sua associação às infecções endodônticas ou a sua presença em outras infecções orais e saliva. Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA) ou do Forsyth Institute (Boston, MA, EUA).

As suspensões contendo as amostras coletadas foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 mL de acetato de amônia ($C_2H_7NO_2$) a 5 M. Com isto, as células bacterianas foram lisadas e o DNA ficou suspenso na solução. Uma membrana de nylon (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences, Chicago, IL – EUA) foi montada em Minislot 30® (Immunetics, Cambridge, MA – EUA). Suspensão de cada amostra contendo DNA livre foi depositada nas fendas do Minislot 30® e o DNA permaneceu depositado na membrana de nylon. As duas últimas canaletas do Minislot 30® foram reservadas para a colocação dos controles, contendo uma mistura das espécies dos micro-organismos que foram investigados pelas sondas de DNA, em duas concentrações, 10⁵ e 10⁶ células bacterianas, ou seja, 0,001 µg e 0,01 µg de cada espécie, respectivamente. A membrana foi removida do aparato e o DNA, previamente depositado na mesma, foi fixado por intermédio de aquecimento em forno a 120 °C, por 20 minutos. A membrana contendo o DNA fixado foi pré-hibridizada a 42 °C, por uma hora, em uma solução de 50% formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% caseína (Vetec), 5 x solução salina citrada (SSC) (1 x SSC = 150 mM NaCl) (Vetec), 15M de citrato de sódio (pH 7,0) (J.T.Baker, Edo. Fr Méx., México), 25 mM de fosfato de sódio (pH 6,5) (Labsynth) e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Sigma). Em seguida a membrana foi posicionada no Miniblotter 45®

(Immunetics, Cambridge, MA – EUA) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles perpendiculares às canaletas do aparato. Cada sonda de DNA contida numa solução de hibridização [45% formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/mL de RNA levedura, 10% de sulfato de dextrano, 1% de caseína e 20 mg/mL de sonda de DNA] foi colocada em uma canaleta do Miniblotter 45®, de modo que cada canaleta foi preenchida com 135 µL de uma determinada sonda. As sondas hibridizaram perpendicularmente às linhas contendo o DNA bacteriano fixado, propiciando um formato xadrez, uma vez que as linhas de DNA horizontais se cruzaram com as verticais correspondentes às canaletas contendo as sondas de DNA. O aparato Miniblotter 45® e a membrana 41 com as sondas e o DNA das amostras bacterianas fixadas, foram colocados dentro de um saco plástico umedecido para evitar a desidratação das mesmas e incubado a 42 °C para que a hibridização ocorresse. A hibridização das membranas com as sondas ocorreu durante um período mínimo de 12 horas (overnight). Após a hibridização com as sondas, as membranas foram removidas do Miniblotter 45® e lavadas por 40 minutos a 65 °C, numa solução adstringente composta por 1% de SDS, 1 mM de EDTA e 20 mM de Na₂HPO₄, a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por 1 hora sob agitação, em uma solução bloqueadora contendo 1% de ácido maleico (Vetec), 3 M NaCl, 0,2 M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína (pH 8,0) e, logo após, por 30 minutos na mesma solução contendo anticorpo anti-digoxigenina (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments – Roche Diagnostics GmbH, Mannheim – Alemanha) conjugado à fosfatase alcalina (Roche), em uma concentração de 1:10000. As membranas foram, então, lavadas 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1 M ácido maleico, 3 M NaCl, 0,2 M NaOH, 0,3% Tween 20, pH 8,0, e uma vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1 M de Tris HCl, 0,1 M de NaCl (pH 9,5). Para detecção dos sinais, as membranas foram incubadas por 45 minutos a 37 °C em uma solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina, CDP-Star Detection Reagent® (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire – Reino Unido). Em seguida, as membranas foram colocadas em um cassete, Chassi Radiográfico 30 x 40 cm (Konex, São Paulo, SP, Brasil) sob um filme radiográfico (Kodak® X-OMAT Kodak Brasileira Com. E Ind. Ltda, São José dos Campos, SP) e foi radiografado por aproximadamente 40 minutos. Os filmes foram posteriormente

revelados manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com as orientações do fabricante. A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, calibrado e cego para as terapias empregadas. A leitura foi realizada 2 vezes, em dias diferentes, para conferência de resultados. Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra dos canais radiculares foi comparado, em intensidade, ao sinal produzido pela mesma sonda nas 2 linhas de controles contendo 10^5 e 10^6 células bacterianas. A intensidade de hibridização foi dividida em classes diferentes em relação aos níveis observados de contagem: (0) não detectado; (1) $<10^5$ células; (2) cerca de 10^5 células; (3) entre 10^5 e 10^6 células; (4) cerca de 10^6 células ou mais.

Quadro 1 - Sondas de DNA utilizadas na avaliação microbiológica utilizando o teste molecular checkerboard DNA-DNA hybridization para dentes com infecção endodôntica primária e periodontite apical

(continua)

Espécie	Cepa
<i>Actinomyces israelii</i>	12102*
<i>Actinomyces oris</i>	43146*
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929*
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (a+b)	43718* + 29523*
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236*
<i>Campylobacter rectus</i>	33238*
<i>Campylobacter showae</i>	51146*
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624*
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596*
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612*
<i>Eikenella corrodens</i>	23834*
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212*
<i>Enterococcus faecium</i>	6569*
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099*
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271*
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>Polymorphum</i>	10953*
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>Nucleatum</i>	25586*
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>Vicentii</i>	49256*
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693*
<i>Gemella morbillorum</i>	27824*
<i>Leptotrichia bucallis</i>	14201*

(conclusão)

<i>Neisseria mucosa</i>	19696*
<i>Parvimonas micra</i>	33270*
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406*
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277*
<i>Prevotella intermedia</i>	25611*
<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845*
<i>Prevotella nigrescens</i>	33563*
<i>Propionibacterium acnes</i> (a+b)	11827* + 11828*
<i>Selenomonas noxia</i>	43541*
<i>Streptococcus anginosus</i>	33397*
<i>Streptococcus constellatus</i>	27823*
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558*
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335*
<i>Streptococcus mitis</i>	49456*
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556*
<i>Tanarella forsythia</i>	43037*
<i>Treponema denticola</i>	B1 ⁺
<i>Treponema socranskii</i>	S1 ⁺
<i>Veillonella parvula</i>	10790*

* American Type Culture Collection (ATCC)

+ Forsyth Institute, Boston, MA

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.6 Quantificação de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) e MMPs (MMP-2, MMP-9)

A quantificação dos níveis das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF α e das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 foi realizada através de um imunoensaio com microesferas do tipo multiplex (Merck - São Paulo) através de kits específicos para esses mediadores (kits). Todo o procedimento seguiu as recomendações do fabricante. Foram utilizadas placas de 96 poços nas quais foram plaqueadas microesferas com anticorpos monoclonais contra os alvos analisados. Em seguida foram pipetados 50 microlitros da curva padrão (fornecida pelo fabricante) e das amostras obtidas, as placas foram então incubadas e permaneceram sob agitação durante 1 hora à 37°C. Após esse período os poços foram lavados e aspirados para colocação dos anticorpos secundários, permanecendo incubadas durante 1 hora

novamente. Na sequência a streptavidina foi adicionada aos poços e após 30 minutos de incubação foi realizada a quantificação em um analisador multiplex Luminex® xMAP®, das citocinas e metaloproteínases a partir da curva padrão. Os dados obtidos foram expressos em pg/mL.

4.1.7 Quantificação de mediador lipídico (RvD2)

Após a coleta do fluido intersticial (SF), as amostras foram agitadas por 30 segundos, centrifugadas a 3.000 rpm por 15 min, e divididas em alíquotas para a quantificação do mediador lipídico por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA-enzyme linked immunisorbent assay). O mediador avaliado foi a RvD2 (MyBioSource, San Diego, CA, USA). Antes do início da análise todos os reagentes fornecidos pelo kit foram levados à temperatura ambiente e a solução diluente foi adicionada em cada poço contendo o anticorpo monoclonal específico para cada marcador a ser quantificado. A curva padrão foi feita com os padrões fornecidos no kit pelo fabricante. A quantificação foi feita em duplicata, e revelada com solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio, e as densidades ópticas (DO) foram lidas em leitor de placas para ELISA, com comprimento de onda de 450 nm.

Durante o teste ELISA, o anticorpo de um antígeno particular é adsorvido no poço da placa. Depois, o antígeno é adicionado e se liga ao anticorpo. Um segundo e diferente anticorpo ligado à biotina é adicionado. Na sequência, é adicionada a estreptavidina conjugada a peroxidase, que irá se ligar na biotina do anticorpo secundário e a porção peroxidase ficará exposta para reagir com o substrato cromogênico. É então adicionado o substrato cromogênico [(solução A (H_2O_2) + Solução B (Tetrametilbenzodina – TMB)], no qual, o H_2O_2 é quebrado pela peroxidase em $\text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$. Por sua vez, o O_2 age sobre o TMB, mudando de incolor para cor azul. Finalmente é adicionada uma solução de parada (2 N H_2SO_4), tornando a reação amarela, e permitindo a mensuração da quantidade de antígeno presente na amostra, de acordo com a intensidade da cor amarela lida em espectrofotômetro, numa densidade óptica (DO) de 450 nm.

4.2 Análise estatística

Os dados foram tabulados e analisados no Stata 14.2 (StataCorp, College Station, TX). A correlação entre volumetria, DP, SP, EX, F, MMP-2, MMP-9, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , RvD2 e sinais e sintomas clínicos foi analisada usando o teste de correlação de Spearman. Foi realizado o cálculo de diversidade alfa, para avaliar a diversidade de espécies nas amostras coletadas. A análise fatorial foi usada para identificar automaticamente padrões de agregação de bactérias de acordo com Martinho et al., 2021. A análise fatorial foi escolhida para reduzir a quantidade de dados devido aos graus de liberdade limitados. Múltiplas variáveis foram combinadas no menor número de fatores possível, modelando as variáveis como um arranjo linear de fatores. A sugestão do número final de fatores foi decidida considerando autovalores e scree plots. Para rotação fatorial, aplicou-se o método varimax para facilitar a interpretação dos resultados. Variáveis carregadas em ambos os fatores foram desconsideradas da análise porque não puderam ser usadas para diferenciar uma variável de fator em particular. Para cada fator previamente identificado, o escore do fator foi determinado pela soma dos valores padronizados das variáveis por indivíduo e para cada fator. Os escores dos fatores foram então padronizados para levar em conta o número de variáveis combinadas em cada fator. Modelos de regressão linear foram realizados para estimar a associação entre os escores fatoriais que representam as espécies bacterianas, níveis de mediadores e características clínicas. Variáveis com valor de $p < 0,05$ foram assumidas significativamente associadas ao desfecho.

5 RESULTADO

Quarenta pacientes voluntários, 15 do sexo feminino e 25 do sexo masculino contribuíram com 1 dente cada. A média de idade dos pacientes foi de 39,8 anos (desvio padrão= 13,62). As amostras foram coletadas de 31 incisivos, 16 superiores e 15 inferiores, 4 caninos, 1 superior e 3 inferiores e 5 pré-molares inferiores. As características clínicas observadas foram, dor a palpação (DP) (3/40), sensibilidade a percussão (SP) (2/40), exsudação (EX) (5/40), presença de fístula (F) (6/40) e volume da lesão periapical.

5.1 Correlação entre os mediadores inflamatórios e sinais e sintomas clínicos

MMP-2, MMP-9, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e RvD2 foram detectados em todas as coletas do fluido intersticial (40/40). Os valores de mediana e intervalo estão apresentados na Tabela 1. Correlação positiva foi encontrada entre MMP-2, MMP-9, IL-10, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e entre RvD2, MMP-9, IL-10, IL-1 β , IL-6 e TNF- α (todos $P < 0,05$). Além disso, uma correlação negativa foi encontrada entre IL-1 β e SP e correlação positiva foi encontrada entre presença de F e volume da lesão PA. Correlação positiva foi encontrada entre SP e DP, SP e F e entre F e EX. A Tabela 2 mostra a correlação entre os mediadores inflamatórios e sinais e sintomas.

Tabela 1 - Valores medianos e de intervalo dos mediadores inflamatórios(pg/mL) e da volumetria das lesões

Mediadores inflamatórios	Mediana (pg/mL)	Intervalo (pg/mL)
IL- 10	1,040	0,8100 - 4,700
IL-1 β	0,5800	0,3500 - 277,8
IL-6	0,8300	0,5200 - 20,84
TNF- α	0,4800	0,3700 - 3,390
MMP-2	45,05	18,20 – 17567
MMP-9	1864	4,600 – 30651
RvD2	67,54	18,18 – 1071
Volumetria	Mediana (mm³)	Intervalo (mm³)
	82,29	6,470 – 3044

IL- Interleucina, TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa, MMP -Metaloproteinase, Rv - Resolvina
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 2 - Correlação de Spearman entre os níveis de expressão de mediadores inflamatórios e sinais e sintomas clínicos

	Vol (mm ³)	MMP-2	MMP-9	IL-10	IL-1 β	IL-6	TNF- α	RvD2	SP	DP	F	EX
Vol (mm ³)	-	0,117	0,104	-0,022	0,029	-0,050	0,050	0,187	-	-	-	-
MMP-2	-	-	0,580 [†]	0,500 [†]	0,420*	0,562*	0,628*	0,279	-	-	-	-
MMP-9	-	-	-	0,440 [†]	0,738*	0,731*	0,757*	0,704*	-	-	-	-
IL-10	-	-	-	-	0,666*	0,688*	0,730*	0,499*	-	-	-	-
IL-1 β	-	-	-	-	-	0,774*	0,868*	0,716*	-	-	-	-
IL-6	-	-	-	-	-	-	0,874*	0,481*	-	-	-	-
TNF- α	-	-	-	-	-	-	-	0,604*	-	-	-	-
RvD2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SP	0,305	0,157	-0,075	-0,176	-0,319*	-0,129	-0,150	-0,258	-	-	-	-
DP	0,175	0,260	0,049	-0,004	-0,169	-0,029	-0,004	-0,095	0,806 [†]	-	-	-
F	0,359*	0,163	0,074	-0,030	0,082	-0,124	-0,050	0,156	0,370*	0,279	-	-
EX	0,273	0,013	-0,216	0,119	-0,046	-0,069	-0,030	-0,246	0,260	0,179	0,466 [†]	-

*P <0,05 SP – sensibilidade a percussão; DP – dor a palpação; F-fístula; EX- exsudato

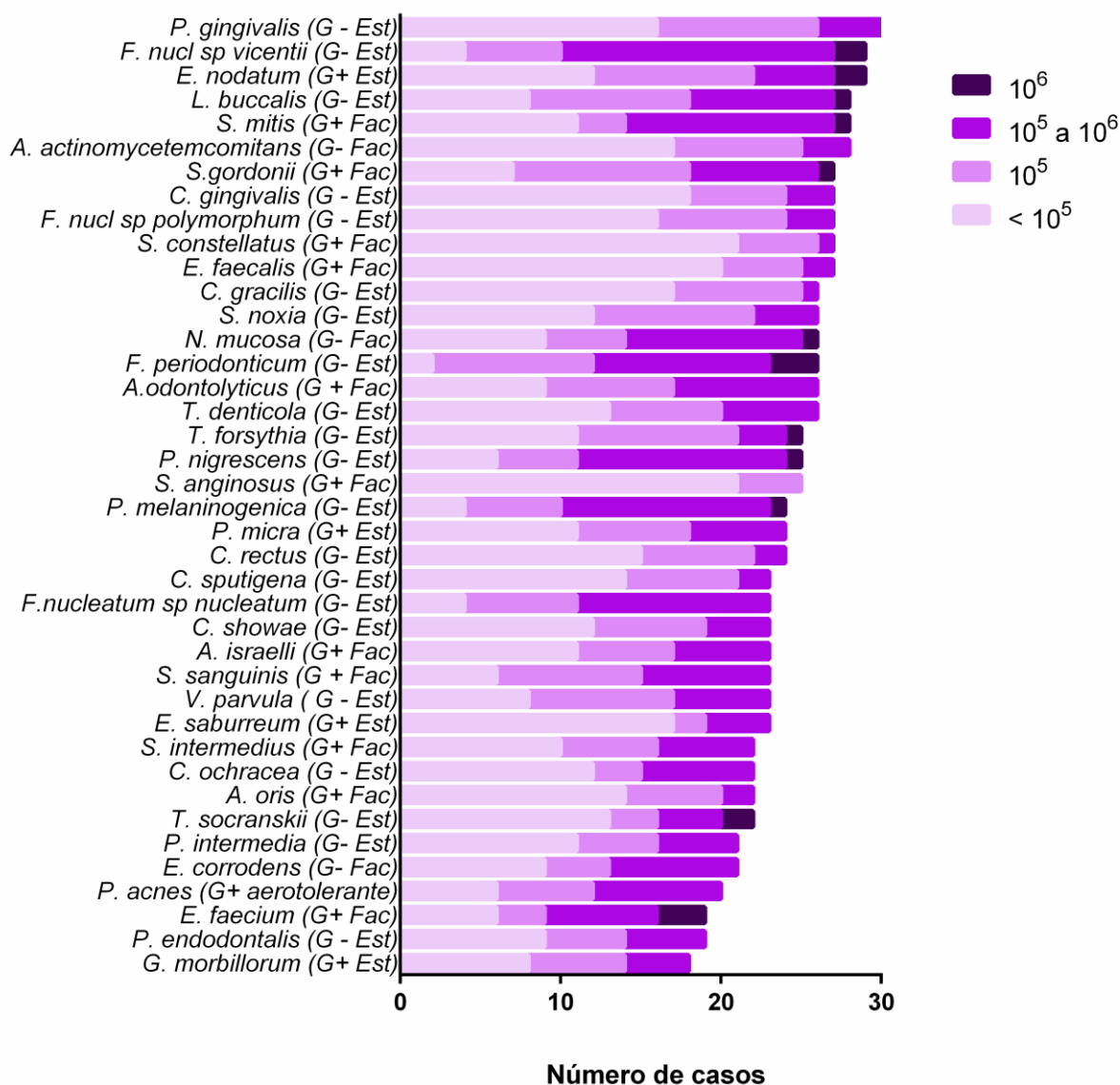
[†]P <0,01

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Avaliação microbiológica

Os resultados da análise pelo método Checkerboard DNA-DNA Hybridization revelaram presença de DNA bacteriano em 100% das amostras analisadas e mostraram presença de pelo menos 2 espécies bacterianas testadas, variando de 2 a 40 (média = 24,42) espécies por canal radicular (Quadro 1). As bactérias mais frequentemente detectadas foram *Porphyromonas gingivalis* (75%), *Eubacterium nodatum* (73%), *Fusobacterium nucleatum* spp. *vicentii* (73%), *Streptococcus mitis* (70%), *Leptotrichia bucallis* (70%) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (70%). A Figura 1 mostra a frequência e concentração de DNA das espécies bacterianas investigadas. Das 6 espécies mais detectadas, 4 delas foram gram negativas, e 2 gram positivas destacando a característica polimicrobiana com predomínio de gram negativos das infecções endodônticas primárias com periodontite apical. Adicionalmente, a concentração de DNA para *F. nucleatum* spp. *Vicentii*, *E. nodatum*, *L. bucallis*, *S. mitis*, *F. periodonticum*, *E. faecium*, *P. melaninogenica*, *N. mucosa*, *S. gordonii*, *T. forsythia*, *P. nigrescens* e *T. socranskii* foi maior do que todas as outras espécies bacterianas alvo (10^6).

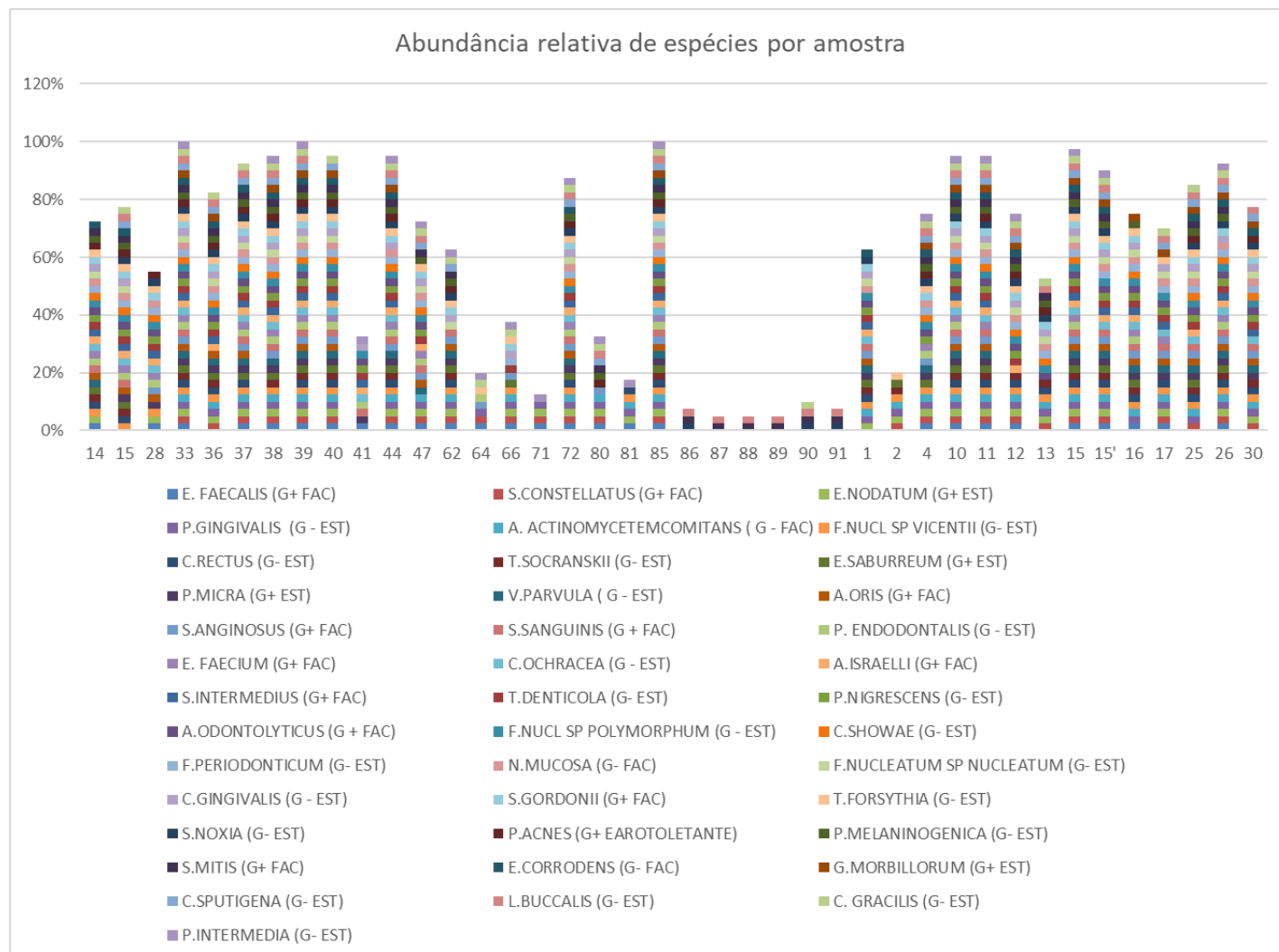
Figura 4 - Frequência e concentração de DNA (<10⁵ células, 10⁵ células, 10⁵ -10⁶ células, e 10⁶ células) de espécies de bactérias detectadas nos canais radiculares de dentes com infecção endodôntica primária com periodontite apical (PEIAP)



Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura 2 apresenta a abundância relativa de espécies bacterianas para cada uma das 40 amostras coletadas dos canais radiculares, que variou de 2 a 40 (média = 24,42) espécies.

Figura 5 – Abundância relativa das espécies bacterianas para cada amostra coletada de dentes com infecção endodôntica primária e periodontite apical



5.3 Análise Fatorial

A análise fatorial permitiu agregar as espécies bacterianas em 2 fatores, que foram nomeados como “Menor virulência” (fator 1) e “Maior virulência” (fator 2) conforme mostrado na Tabela 3. Os resultados da regressão linear para o fator 1 baseado em espécies bacterianas, revelaram associação com casos de dor a percussão (coeficiente $\beta=0,788$) e casos sem dor a palpação (coeficiente $\beta=-0,753$) e exsudato (coeficiente $\beta=-0,479$). Casos com exsudato e ausência de sensibilidade a percussão foram associados ao fator 2 (coeficiente $\beta=0,460$ e $-0,546$, respectivamente). O conjunto completo de resultados e valores de P são mostrados na tabela 4.

Tabela 3 - Os resultados da análise fatorial das bactérias analisadas

(continua)

Espécies bacterianas	Fator 1	Fator 2	Parede celular	Tolerância ao O ₂
<i>E. saburreum</i>	-	-	G+	Estrito
<i>C. sputigena</i>	-	-	G-	Estrito
<i>C. gracilis</i>	-	-	G-	Estrito
<i>L. buccalis</i>	0,529	-	G-	Estrito
<i>C. gingivalis</i>	0,533	-	G-	Estrito
<i>S. mitis</i>	0,557	-	G+	Facultativo
<i>T. socranskii</i>	0,581	-	G-	Estrito
<i>P. acnes</i>	0,584	-	G+	Aerotolerante
<i>F. nucl sp vicentii</i>	0,600	-	G-	Estrito
<i>C. ochracea</i>	0,642	-	G-	Estrito
<i>A. oralis</i>	0,643	-	G+	Facultativo
<i>G. morbillorum</i>	0,650	-	G+	Estrito
<i>E. faecium</i>	0,660	-	G+	Facultativo
<i>C. rectus</i>	0,669	-	G-	Estrito
<i>P. micra</i>	0,671	-	G+	Estrito
<i>A. israeli</i>	0,674	-	G+	Facultativo
<i>P. melaninogenica</i>	0,684	-	G-	Estrito
<i>V. parvula</i>	0,689	-	G-	Estrito
<i>C. showae</i>	0,694	-	G-	Estrito
<i>E. corrodens</i>	0,705	-	G-	Facultativo
<i>S. noxia</i>	0,707	-	G-	Estrito
<i>S.gordonii</i>	0,730	-	G+	Facultativo
<i>T. denticola</i>	0,735	-	G-	Estrito

(conclusão)				
<i>S. sanguinis</i>	0,738	-	G+	Facultativo
<i>S. intermedius</i>	0,745	-	G+	Facultativo
<i>F.nucleatum sp nucleatum</i>	0,778	-	G-	Estrito
<i>N. mucosa</i>	0,792	-	G-	Facultativo
<i>P. nigrescens</i>	0,794	-	G-	Estrito
<i>A.odontolyticus</i>	0,807	-	G+	Facultativo
<i>F. periodonticum</i>	0,814	-	G-	Estrito
<i>F. nucl sp polymorphum</i>	0,846	-	G-	Estrito
<i>P. endodontalis</i>	-	0,526	G-	Estrito
<i>T. forsythia</i>	-	0,580	G-	Estrito
<i>E. faecalis</i>	-	0,649	G+	Facultativo
<i>S. anginosus</i>	-	0,656	G+	Facultativo
<i>P. intermedia (G- Est)</i>	-	0,725	G-	Estrito
<i>A. actinomyces comitans</i>	-	0,731	G-	Facultativo
<i>E. nodatum</i>	-	0,745	G+	Estrito
<i>P. gingivalis</i>	-	0,822	G-	Estrito
<i>S. constellatus</i>	-	0,872	G+	Facultativo

Tabela 4 - Resultados da modelagem dos escores fatoriais 1 e 2 (variáveis de resultado) em função de variáveis independentes

Bactérias	Coeficiente (β)	IC 95%	P
Menor virulência			
Sensibilidade a Percussão	0,788	0,390 - 1,185	0,0004
Dor a Palpação	-0,753	-1,069 - -0,4372	<0,0001
Exsudato	-0,479	-0,6463 - -0,3111	<0,0001
Maior virulência			
Sensibilidade a Percussão	-0,546	-1,003 - -0,08988	0,0208
Exsudato	0,460	0,2675 - 0,6524	<0,0001

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como foco avaliar o perfil microbiológico, inflamatório e sinais e sintomas clínicos da infecção endodôntica primária com periodontite apical e refinar o conhecimento sobre como as comunidades bacterianas se organizam e influenciam na expressão de citocinas, mediadores lipídicos e sinais e sintomas clínicos, através da correlação dessas informações.

Quando as bactérias e seus subprodutos, presentes na infecção endodôntica, alcançam os tecidos periapicais, há início da síntese de diferentes mediadores capazes de modular a ação das células de defesa locais e de atraí-las para a região (Aderem, Ulevitch, 2000; Siqueira, Rôças, 2022), assim, cada grupo celular irá desempenhar um papel importante na resposta imune, como o reconhecimento de patógenos e a liberação das citocinas pró-inflamatórias e imunorreguladoras (Gomes, Herrera, 2018).

A quantificação dos mediadores inflamatórios demonstrou que MMP-2, MMP-9, IL-10, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e RvD2 foram detectados em todas as coletas. Foi observamos correlação positiva entre MMP-2, MMP-9, IL-10, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e entre RvD2, MMP-9, IL-10, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , demonstrando que há um trabalho em conjunto dessas proteínas e lipídios. Esses mediadores estabelecem diferentes inter-relações em rede que estão relacionadas com diferentes padrões de características clínicas e radiográficas para doenças endodônticas (Martinho et al., 2012). Correlação positiva foi encontrada entre o volume das lesões e a presença de fístula, o que está de acordo com estudo anterior de Huang et al. (1990).

Embora IL-1 β tenha sido positivamente correlacionado com sinais e sintomas clínicos em estudos prévios (Gomes et al., 2022; Martinho et al., 2012), em nosso estudo ela se correlacionou negativamente com sensibilidade a percussão. Caires et al. (2019) demonstraram que a resposta inflamatória e os tipos de citocinas liberados durante esse processo podem variar em populações diferentes. Além disso, Loureiro et al. (2021) evidenciaram através de análise proteômica quantitativa que a resposta imunologia do hospedeiro na periodontite apical sintomática é diferente daquela avaliada em pacientes com periodontite apical não sintomática,

portanto, as características individuais do hospedeiro irão determinar o desenvolvimento de uma resposta inflamatória aguda ou uma resposta crônica. O que nós observamos foi uma alta variabilidade na liberação de mediadores inflamatórios para os pacientes avaliados, o que corrobora com esses estudos anteriores. Assim, a reabsorção óssea ocorre principalmente através de estímulos derivados do hospedeiro, e não pelos efeitos diretos das bactérias no osso (Gomes, Herrera, 2018).

As MMPs -2 e 9 foram altamente expressas nas lesões periapicais incluídas neste estudo, o que está de acordo com estudos anteriores (Ahmed et al., 2013; Corotti et al., 2009; Pereira Faustino et al., 2016). Essas MMPs constituem uma importante família de enzimas que degradam componentes da matriz extracelular (Tsuji et al., 2009) e participam da iniciação do processo de reabsorção óssea, através da degradação da camada osteóide e da camada de colágeno da superfície óssea, permitindo que pré-osteoclastos se acoplem à matriz mineralizada e completem sua diferenciação (Delaissé et al., 2000; Lima et al., 2021). A expressão das MMPs pode ocorrer pela presença de bactérias ou então por ação de citocinas na região periapical (Panagakos et al., 1996). Ainda, foi relatado anteriormente que a MMP-9 apresenta correlação com bactérias gram-negativas, e embora isso não tenha sido avaliado em nosso estudo, sabe-se que as infecções endodônticas primárias tem predomínio dessas bactérias, o que pode explicar a expressão elevada desta enzima (Ahmed et al., 2013).

Para a coleta do fluido periapical foram utilizados cones de papel absorventes. Esse método tem sido amplamente utilizado em Endodontia para a investigação de mediadores inflamatórios (Corazza et al., 2020; Martinho et al., 2015; Safavi, Rossomando, 1991). Recentemente, Virdee et al. (2019), em revisão sistemática, pontuaram que outros métodos já foram utilizados, como aspiração por agulha fina ou até mesmo através de acessos cirúrgicos, contudo, a utilização de cones de papel é a metodologia mais utilizada. O acesso cirúrgico direto é um método invasivo e sensíveis à técnica (Ajuz et al., 2014; Torabinejad et al., 1992). As seringas não têm capacidade para coleta de volumes tão pequenos de amostras e as pontas de papel são eficientes na absorção de pequenas quantidades de fluido (Hartroth et al., 1999).

Em relação a análise microbiológica, a identificação das espécies

bacterianas em nosso estudo foi realizada, através do método Checkerboard DNA-DNA hybridization. Esse método é um ensaio multiplex que permite a investigação de múltiplas espécies de bactérias simultaneamente. Neste estudo identificamos 40 espécies bacterianas diferentes. Estudos anteriores utilizaram a mesma metodologia para identificação do perfil microbiológico de diversos tipos de infecção endodôntica (Arruda-Vasconcelos et al., 2021; Cavalli et al., 2017; Ferreira et al., 2015; Machado et al., 2020; Rôças, Siqueira, 2008). Uma das desvantagens dessa técnica é a possibilidade de reações cruzadas entre espécies microbianas devido às regiões comuns do DNA compartilhadas por espécies intimamente relacionadas, contudo, a prevalência de reações cruzadas é muito baixa (Socransky et al., 2004).

Os resultados obtidos revelaram uma alta variabilidade interindividual na diversidade bacteriana do canal radicular, e demonstraram que não há duas comunidades iguais. Isso está de acordo com estudos anteriores que avaliaram infecções endodônticas (Amaral et al., 2022; Li et al., 2010; Machado de Oliveira et al., 2007). Segundo Amaral et al. (2022) devido a homogeneidade do ambiente do canal radicular, em termos de umidade, temperatura e fontes de nutrientes para as bactérias, espera-se que haja padronização na colonização microbiana desse ambiente. Contudo, essa alta variabilidade entre os indivíduos em relação ao microbioma oral, relacionadas a genética, dieta, hábitos e condições sistêmicas leva a variabilidade interindividual encontrada nos canais radiculares (Siqueira, Rôças, 2022).

A realização da análise fatorial permitiu a agregação das bactérias em 2 fatores. Esse tipo de análise permite investigar as relações entre muitas variáveis e organizá-las em um conjunto menor de fatores (Hair JF et al., 2005). Os fatores podem ser nomeados de maneira que seja possível representar as variáveis presentes nele. Após a extração dos fatores e o cálculo dos escores fatoriais, é possível identificar o quanto uma variável se identifica com o fator ao qual ela pertence e quanto maior for a carga, mais a variável se identifica com o que quer que o fator represente. Estes valores, que geralmente são menores do que 1 e podem ser negativos ou positivos, podem ser utilizados como substitutos das variáveis originais em análises posteriores. Através da análise de regressão, os 2 fatores identificados foram distintamente associados a características clínicas, ao perfil inflamatório e à volumetria das lesões nos casos de infecção endodôntica

primária e PA.

Estão presentes, no fator 1, 28 bactérias das 40 investigadas, sendo 17 gram-negativas e 11 gram-positivas, estas bactérias foram associadas positivamente com casos de sensibilidade a percussão e negativamente com casos de dor a palpação e presença de exsudato. A partir desses resultados, confirma-se a associação de vários microrganismos na periodontite apical crônica, como verificado em estudos anteriores que demonstraram que esse tipo de infecção está relacionado com alta diversidade bacteriana (Hsiao et al., 2012; Santos et al., 2011).

No estudo de Martinho et al. (2021) um maior número de bactérias também estava presente no fator 1, contudo nosso estudo apresentou diferenças nas espécies presentes nesse fator, o que pode estar relacionado a diferenças na localidade das populações estudadas, bem como com a alta variabilidade entre os participantes das pesquisas (Amaral et al., 2022; Machado de Oliveira et al., 2007; Siqueira et al., 2008).

Casos com presença de exsudato e ausência de dor a palpação foram associados as bactérias do fator 2. Esse fator apresentou um menor número de espécies bacterianas, 9 das 40 avaliadas, sendo 5 gram-negativas e 4 gram-positivas e foi nomeado como “Maior virulência” devido a presença de 2 espécies do complexo vermelho *T. forsythia* e *P. gingivalis*. Estudos *in vivo* em modelos animais demonstraram que a combinação de *P. gingivalis* com *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, espécie também presente no fator 2, e *T. forsythia*, por exemplo, estão associadas a processos inflamatórios agudos (Chen et al., 1996; Yoneda et al., 2001). Um estudo de Siqueira et al. (2001) demonstrou que *bacteroides forsythus*, *P. gingivalis* e *S. constellatus*, estavam presentes na maioria de casos de pacientes com abscessos perirradiculares agudos. A carga fatorial para a bactéria *P. gingivales* e *S. constellatus* foi extremamente alta (0,822 e 0,872, respectivamente) demonstrando sua forte relação com o fator 2. Assim, pudemos relacionar o fator 2 com manifestações agudas da periodontite apical, em que há a presença de exsudato.

Tanto no fator 1 quanto no fator 2 houve predomínio de bactérias gram-negativas, o que está de acordo com estudos anteriores que mostram que este tipo de bactéria é predominante nas infecções endodônticas primárias (Martinho et al., 2010a; Rôças, Siqueira, 2010).

Em relação ao perfil inflamatório e ao tamanho da lesão periapical, não encontramos associação com os fatores determinados neste estudo. As citocinas estão presentes na região periapical modulando o processo inflamatório desencadeado pela infecção intracanal. Esse processo é controlado por diferentes mediadores como MMP-2, MMP-9, IL-10, IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α que desempenham um importante papel na formação da lesão e no reparo tecidual (Ahmed et al., 2013; Azuma et al., 2014; Fouad, 1997; Gupta, 2002; He et al., 2020; Lim et al., 1994; Maynard, Weaver, 2008; Sasaki et al., 2000; Tsuji et al., 2009). Associado a isso, verificou-se a presença de RvD2, mediador sintetizado a partir do ácido graxo poli-insaturado ômega 3 que possui efeito protetor e reparador (Cianci et al., 2016; Croasdell et al., 2016; Zhang et al., 2016).

Diferentemente do estudo de Martinho et al. (2021), não observamos nenhuma associação dos fatores com os mediadores pró- e anti-inflamatórios avaliados. Acreditamos que isso tenha ocorrido devido a diferenças nas populações estudadas, bem como às diferentes espécies bacterianas carregadas para cada fator. Além disso, a metodologia de quantificação dos mediadores não foi a mesma. Ainda, de acordo com Siqueira e Rôças (2022), a não associação com o perfil inflamatório pode indicar que diferentes combinações de espécies podem levar a desfechos semelhantes da doença.

É importante ressaltar também que embora os pacientes incluídos neste estudo não tenham relatado doenças sistêmicas prévias, dados mais aprofundados referentes a estresse (Khoury et al., 2020) e alimentação (Azuma et al., 2021) podem ser preditores de diferenças na resposta inflamatória do hospedeiro ao estímulo agressor.

Até a finalização do presente estudo, somente mais um estudo na literatura identificou os grupamentos bacterianos e suas relações com sinais e sintomas clínicos observados, mais estudos são necessários para corroborar os dados encontrados em nosso trabalho.

7 CONCLUSÃO

Concluimos que os mediadores inflamatórios formam uma rede inter-relacionada que aparentemente não está correlacionada com sinais e sintomas clínicos. Comprovou-se que existe uma alta variabilidade de espécies bacterianas entre os indivíduos incluídos neste estudo. Além disso, nossas descobertas são o início para uma maior elucidação de como ocorre a agregação de comunidades bacterianas e como essas comunidades interferem nos sinais e sintomas clínicos dos pacientes. Por fim, constatou-se que as periodontites apicais assintomáticas e sintomáticas tem uma etiologia bacteriana heterogênea e com combinações de espécies diferentes.

REFERÊNCIAS*

- Abella F, Patel S, Durán-Sindreu F, Mercadé M, Bueno R, Roig M. An evaluation of the periapical status of teeth with necrotic pulps using periapical radiography and cone-beam computed tomography. *Int Endod J*. 2014;47(4):387–96. doi: 10.1111/iej.12159.
- Aderem A, Ulevitch R. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000;406(6797):782–7. doi: 10.1038/35021228. PMID: 10963608.
- Ahmed GM, El-Baz AA, Hashem AAR, Shalaan AK. Expression Levels of Matrix Metalloproteinase-9 and Gram-negative Bacteria in Symptomatic and Asymptomatic Periapical Lesions. *J Endod*. 2013;39(4):444–8. doi: 10.1016/j.joen.2012.11.009.
- Ajuz NC, Antunes H, Mendonça TA, Pires FR, Siqueira JF, Armada L. Immunoexpression of Interleukin 17 in Apical Periodontitis Lesions. *J Endod*. 2014;40(9):1400–3. doi: 10.1016/j.joen.2014.03.024. PMID: 25043329.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001. doi: 10.1038/90609.
- Amaral RR, Braga T, Siqueira JF, Rôças IN, da Costa Rachid CTC, Oliveira AGG, et al. Root Canal Microbiome Associated With Asymptomatic Apical Periodontitis as Determined by High-Throughput Sequencing. *J Endod*. 2022;48(4):487–95. doi: 10.1016/j.joen.2022.01.012.
- Araujo-Pires AC, Francisconi CF, Bigueti CC, Cavalla F, Aranha AMF, Letra A, et al. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *J Appl Oral Sci*. 2014;22(4):336–46. doi: 10.1590/1678-775720140140. PMID: 25141207.
- Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, Feres M, Tomson PL, Cooper PR, Gomes BPFA. Investigation of microbial profile, levels of endotoxin and lipoteichoic acid in teeth with symptomatic irreversible pulpitis: a clinical study. *Int Endod J*. 2021;54(1):46–60. doi: 10.1111/iej.13402. PMID: 32892394.
- Azuma MM, Cardoso C de BM, Samuel RO, Pipa CB, Bomfim SRM, Narciso LG, et al. Omega-3 Fatty Acids Alter Systemic Inflammatory Mediators Caused by Apical Periodontitis. *J Endod*. 2021;47(2):272–7. doi: 10.1016/j.joen.2020.11.015.
- Azuma MM, Samuel RO, Gomes-Filho JE, Dezan-Junior E, Cintra LTA. The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. *Int Endod J*. 2014;47(7):615–21. doi: 10.1111/iej.12196. PMID: 24224782.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Balasundaram A, Shah P, Hoen MM, Wheeler MA, Bringas JS, Gartner A, et al. Comparison of Cone-Beam Computed Tomography and Periapical Radiography in Predicting Treatment Decision for Periapical Lesions: A Clinical Study. *Int J Dent*. 2012;2012:1–8. doi: 10.1155/2012/920815.

Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(2):S460–75. doi: 10.1067/mai.2003.108.

Bornstein MM, Lauber R, Sendi P, von Arx T. Comparison of Periapical Radiography and Limited Cone-Beam Computed Tomography in Mandibular Molars for Analysis of Anatomical Landmarks before Apical Surgery. *J Endod*. 2011;37(2):151–7. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.014.

Caires NCM, Espaladori MC, Tavares WLF, Brito LCN de, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Influence of genetic regulatory effects modified by environmental immune activation on periapical disease. *Braz Oral Res*. 2019;33:e109. doi: 10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0109.

Cardoso FGR, Ferreira NS, Martinho FC, Nascimento GG, Manhães LRC, Rocco MA, et al. Correlation between Volume of Apical Periodontitis Determined by Cone-beam Computed Tomography Analysis and Endotoxin Levels Found in Primary Root Canal Infection. *J Endod*. 2015;41(7):1015–9. doi: 10.1016/j.joen.2015.02.005. PMID: 25935504.

Carneiro E, Menezes R, Garlet GP, Garcia RB, Monteiro Bramante C, Figueira R, et al. Expression analysis of matrix metalloproteinase-9 in epithelialized and nonepithelialized apical periodontitis lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(1):127–32. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.07.030.

Cavalli D, Toia CC, Flores Orozco EI, Khoury RD, Cardoso FG da R, Alves MC, et al. Effectiveness in the Removal of Endotoxins and Microbiological Profile in Primary Endodontic Infections Using 3 Different Instrumentation Systems: A Randomized Clinical Study. *J Endod*. 2017;43(8):1237–45. doi: 10.1016/j.joen.2017.03.032. PMID: 28606669.

Chen PB, Davern LB, Katz J, Eldridge JH, Michalek SM. Host responses induced by co-infection with *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a murine model. *Oral Microbiol Immunol*. 1996;11(4):274–81. doi: 10.1111/j.1399-302X.1996.tb00181.x.

Cianci E, Recchiuti A, Trubiani O, Diomedea F, Marchisio M, Miscia S, et al. Human Periodontal Stem Cells Release Specialized Proresolving Mediators and Carry Immunomodulatory and Prohealing Properties Regulated by Lipoxins. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(1):20–32. doi: 10.5966/sctm.2015-0163. PMID: 26607175.

Corazza BJM, Martinho FC, Khoury RD, Toia CC, Orozco EIF, Prado RF, et al.

Clinical influence of calcium hydroxide and N-acetylcysteine on the levels of resolvins E1 and D2 in apical periodontitis. *Int Endod J*. 2021 Jan;54(1):61-73. doi: 10.1111/iej.13403. Epub 2020 Oct 3. PMID:32896000.

Corotti M V., Zambuzzi WF, Paiva KBS, Menezes R, Pinto LC, Lara VS, et al. Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. *Arch Oral Biol*. 2009;54(8):764–71. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.04.013.

Croasdell A, Sime PJ, Phipps RP. Resolvin D2 decreases TLR4 expression to mediate resolution in human monocytes. *FASEB J*. 2016;30(9):3181–93. doi: 10.1096/fj.201600375R.

Delaissé J-M, Engsig MT, Everts V, del Carmen Ovejero M, Ferreras M, Lund L, et al. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta*. 2000;291(2):223–34. doi: 10.1016/S0009-8981(99)00230-2.

Van Dyke TE, Hasturk H, Kantarci A, Freire MO, Nguyen D, Dalli J, et al. Proresolving nanomedicines activate bone regeneration in periodontitis. *J Dent Res*. 2015;94(1):148–56. doi: 10.1177/0022034514557331. PMID: 25389003.

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

Fouad AF. IL-1 α and TNF- α Expression in Early Periapical Lesions of Normal and Immunodeficient Mice. *J Dent Res*. 1997;76(9):1548–54. doi: 10.1177/00220345970760090601.

Fouad AF, Khan AA, Silva RM, Kang MK. Genetic and Epigenetic Characterization of Pulpal and Periapical Inflammation. *Front Physiol*. 2020 Feb 4;11:21. doi: 10.3389/fphys.2020.00021.

Freire M, Van Dyke T. Natural resolution of inflammation. *Periodontol* 2000. 2013;63(1):149–64. doi: 10.1111/prd.12034. PMID: 23931059.

Gomes BPF de A, Herrera DR. Etiologic role of root canal infection in apical periodontitis and its relationship with clinical symptomatology. *Braz Oral Res*. 2018 Oct 18;32(suppl 1):e69. doi: 10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0069.

Gomes BPFA, Berber VB, Marinho ACS, Louzada LM, Arruda-Vasconcelos R, Passini MRZ, et al. Chemomechanical preparation influences the microbial community and the levels of LPS, LTA and cytokines in combined endodontic-periodontal lesions: A clinical study. *J Periodontal Res*. 2022;57(2):341–56. doi: 10.1111/jre.12964.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004;19(2):71–6. doi: 10.1046/j.0902-0055.2003.00116.x. PMID: 12205886.

Gupta S. A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling. *J Clin Immunol*. 2002;22(4):185–94. doi: 10.1023/a:1016089607548. PMID: 12148593.

Hair JF, Anderson RE, Tatham RL, Black WC. *Análise multivariada de dados*. 5ª Ed. Porto Alegre: Bookman; 2005.

Hartroth B, Seyfahrt I, Conrads G. Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters. *Oral Microbiol Immunol*. 1999;14(5):326–30. doi: 10.1034/j.1399-302X.1999.140510.x.

He Z, Sun Y, Wu J, Xiong Z, Zhang S, Liu J, et al. Evaluation of genetic variants in IL-1B and its interaction with the predisposition of osteoporosis in the northwestern Chinese Han population. *J Gene Med*. 2020;22(10). doi: 10.1002/jgm.3214.

Herrera BS, Ohira T, Gao L, Omori K, Yang R, Zhu M, et al. An endogenous regulator of inflammation, resolvin E1, modulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Br J Pharmacol*. 2008;155(8):1214–23. doi: 10.1038/bjp.2008.367.

Hsiao WWL, Li KL, Liu Z, Jones C, Fraser-Liggett CM, Fouad AF. Microbial transformation from normal oral microbiota to acute endodontic infections. *BMC Genomics*. 2012;13(1):345. doi: 10.1186/1471-2164-13-345.

Huang TJ, Roan RT, Lin HT. [Sinus tracts of dental origin. A clinical study. Part I]. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi*. 1990;6(12):653–60. doi: 2266570. PMID: 2266570.

Jakovljevic A, Knezevic A, Karalic D, Soldatovic I, Popovic B, Milasin J, et al. Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: Correlation with clinical and histological findings. *Aust Endod J*. 2015;41(2):72–7. doi: 10.1111/aej.12072.

Takehashi S, Stanley HRR, Fitzgerald RJJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol*. 1965;20(3):340–9. doi: [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(65\)90166-0](https://doi.org/10.1016/0030-4220(65)90166-0). PMID: 5221556.

El Kholy K, Freire M, Chen T, Van Dyke TE. Resolvin E1 Promotes Bone Preservation Under Inflammatory Conditions. *Front Immunol*. 2018;9:1300. doi: 10.3389/fimmu.2018.01300.

Khoury RD, Prado RF do, Matos F de S, Meireles BR de, Cardoso FG da R, Oliveira LD de, et al. The influence of adrenergic blockade in rats with apical periodontitis under chronic stress conditions. *Arch Oral Biol*. 2020;110:104590. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104590. PMID: 31743801.

Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF- α induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest*. 2000. doi: 10.1172/JCI111176.

Leon LR, Kozak W, Kluger MJ. Role of IL-10 in inflammation: Studies using cytokine knockout mice. *Ann N Y Acad Sci*. 1998 Sep 29;856:69–75. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb08314.x.PMID: 9917866.

Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: Signals in resolution. *Nat Immunol*. 2001;2(7):612–9. doi: 10.1038/89759. PMID: 11429545.

Levy BD, Vachier I, Serhan CN. Resolution of Inflammation in Asthma. *Clin Chest Med*. 2012;33(3):559–70. doi: 10.1016/j.ccm.2012.06.006.

Li L, Hsiao WWL, Nandakumar R, Barbuto SM, Mongodin EF, Paster BJ, et al. Analyzing Endodontic Infections by Deep Coverage Pyrosequencing. *J Dent Res*. 2010;89(9):980–4. doi: 10.1177/0022034510370026.

Lim GC, Torabinejad M, Kettering J, Linkhardt TA, Finkelman RD. Interleukin 1 β in symptomatic and asymptomatic human periradicular lesions. *J Endod*. 1994;20(5):225–7. doi: 10.1016/S0099-2399(06)80282-7.

Lima TCS, Amaro RG, dos Santos LCM, Coste SC, Silva EFE, Barbato-Ferreira DA, et al. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in replanted teeth with external root resorption: A cross-sectional study. *Arch Oral Biol*. 2021;129:105194. doi: 10.1016/j.archoralbio.2021.105194.

Loureiro C, Buzalaf MAR, Moraes FRN, Ventura TMO, Pelá VT, Pessan JP, et al. Quantitative proteomic analysis in symptomatic and asymptomatic apical periodontitis. *Int Endod J*. 2021;54(6):834–47. doi: 10.1111/iej.13480.

Machado de Oliveira JC, Siqueira JF, Rôças IN, Baumgartner JC, Xia T, Peixoto RS, et al. Bacterial community profiles of endodontic abscesses from Brazilian and USA subjects as compared by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22(1):14–8. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00311.x.

Machado FP, Khoury RD, Toia CC, Flores Orozco EI, de Oliveira FE, de Oliveira LD, et al. Primary versus post-treatment apical periodontitis: microbial composition, lipopolysaccharides and lipoteichoic acid levels, signs and symptoms. *Clin Oral Investig*. 2020 Sep;24(9):3169–3179. doi: 10.1007/s00784-019-03191-6.

Maia LM, Espaladori MC, Diniz JMB, Tavares WLF, de Brito LCN, Vieira LQ, et al. Clinical endodontic procedures modulate periapical cytokine and chemokine gene expressions. *Clin Oral Investig*. 2020;24(10):3691–7. doi: 10.1007/s00784-020-03247-y. PMID: 32088762.

Martinho FC, Chiesa WMM, Leite FRM, Cirelli JA, Gomes BPFA. Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1 β and tumor necrosis factor α . *J Endod.* 2010a;36(9):1467–74. doi: 10.1016/j.joen.2010.06.012. PMID: 20728711.

Martinho FC, Chiesa WMM, Leite FRMM, Cirelli JA, Gomes BPFAFA. Antigenic Activity of Bacterial Endodontic Contents from Primary Root Canal Infection with Periapical Lesions against Macrophage in the Release of Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor α . *J Endod.* 2010b;36(9):1467–74. doi: 10.1016/j.joen.2010.06.012. PMID: 20728711.

Martinho FC, Chiesa WMMM, Leite FRMM, Cirelli JA, Gomes BPFAFA. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. *J Endod.* 2012;38(6):740–5. doi: 10.1016/j.joen.2012.02.021. PMID: 22595105.

Martinho FC, Leite FRM, Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, Darveau RP, Gomes BPFA. Influence of Bacterial Profiles in Cytokine and Clinical Features of Endodontic Disease. *J Endod.* 2021;47(8):1265–71. doi: 10.1016/j.joen.2021.04.026. PMID: 34015415.

Martinho FC, Leite FRM, Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, Darveau RP, Gomes BPFA. Influence of Bacterial Profiles in Cytokine and Clinical Features of Endodontic Disease. *J Endod.* 2021;47(8):1265–71. doi: 10.1016/j.joen.2021.04.026.

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

Martinho FC, Nascimento GG, Leite FRM, Gomes APM, Freitas LF, Camões ICG. Clinical influence of different intracanal medications on Th1-type and Th2-type cytokine responses in apical periodontitis. *J Endod.* 2015;41(2):169–75. doi: 10.1016/j.joen.2014.09.028. PMID: 25453567.

Maynard CL, Weaver CT. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. *Immunol Rev.* 2008;226(1):219–33. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00711.x.

Mizraji G, Heyman O, Van Dyke TE, Wilensky A. Resolvin D2 Restrains Th1 Immunity and Prevents Alveolar Bone Loss in Murine Periodontitis. *Front Immunol.* 2018;9:785. doi: 10.3389/fimmu.2018.00785.

Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical

tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res.* 1981;89(6):475–84. doi: 10.1111/j.1600-0722.1981.tb01711.x. PMID: 6951246.

Morsani JM, Aminoshariae A, Han YW, Montagnese TA, Mickel A. Genetic Predisposition to Persistent Apical Periodontitis. *J Endod.* 2011;37(4):455–9. doi: 10.1016/j.joen.2011.01.009.

Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect Immun.* 1996;64(7):2371–80. PMID: 8698454.

Nascimento GG, Danielsen B, Baelum V, Lopez R. Identification of inflammatory response patterns in experimental gingivitis studies. *Eur J Oral Sci.* 2019;127(1):33–9. doi: 10.1111/eos.12588.

Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med.* 2013;5(5):661–74. doi: 10.1002/emmm.201202382.

Panagakos FS, O'Boskey JF, Rodriguez E. Regulation of pulp cell matrix metalloproteinase production by cytokines and lipopolysaccharides. *J Endod.* 1996;22(7):358–61. doi: 10.1016/S0099-2399(96)80218-4.

Pereira Faustino IS, Azevedo RS, Takahama A. Metalloproteinases 2 and 9 Immunoexpression in Periapical Lesions from Primary Endodontic Infection: Possible Relationship with the Histopathological Diagnosis and the Presence of Pain. *J Endod.* 2016;42(4):547–51. doi: 10.1016/j.joen.2015.12.020.

Pezelj-Ribaric S, Magašić K, Prpic J, Miletic I, Karlovic Z. Tumor Necrosis Factor-Alpha in Peripical Tissue Exudates of Teeth with Apical Periodontitis. *Mediators Inflamm.* 2007;2007:1–4. doi: 10.1155/2007/69416.

Ramis-Alario A, Tarazona-Alvarez B, Cervera-Ballester J, Soto-Penaloza D, Penarrocha-Diago M, Penarrocha-Oltra D, et al. Comparison of diagnostic accuracy between periapical and panoramic radiographs and cone beam computed tomography in measuring the periapical area of teeth scheduled for periapical surgery. A cross-sectional study. *J Clin Exp Dent.* 2019:e732–8. doi: 10.4317/jced.55986.

Ricucci D, Siqueira JF. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 2010;36(8):1277–88. doi: 10.1016/j.joen.2010.04.007. PMID: 20647081.

Rôças IN, Siqueira JF. Frequency and levels of candidate endodontic pathogens in acute apical abscesses as compared to asymptomatic apical periodontitis. *PLoS One.* 2018;13(1):e0190469. doi: 10.1371/journal.pone.0190469.

Rôças IN, Siqueira JF. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *J Endod.* 2010;36(1):45–52. doi: 10.1016/j.joen.2009.10.022. PMID: 20003934.

Rôças IN, Siqueira JF. Prevalence of New Candidate Pathogens *Prevotella baroniae*, *Prevotella multisaccharivorax* and As-yet-uncultivated *Bacteroidetes* clone X083 in Primary Endodontic Infections. *J Endod.* 2009;35(10):1359–62. doi: 10.1016/j.joen.2009.05.033.

Rôças IN, Siqueira JF. Root Canal Microbiota of Teeth with Chronic Apical Periodontitis. *J Clin Microbiol.* 2008;46(11):3599–606. doi: 10.1128/JCM.00431-08.

Rôças IN, Siqueira JF, Debelian GJ. Analysis of Symptomatic and Asymptomatic Primary Root Canal Infections in Adult Norwegian Patients. *J Endod.* 2011;37(9):1206–12. doi: 10.1016/j.joen.2011.05.026.

Safavi KE, Rossomando EF. Tumor necrosis factor identified in periapical tissue exudates of teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 1991;17(1):12–4. doi: 10.1016/S0099-2399(07)80154-3.

Santos AL, Siqueira JF, Rôças IN, Jesus EC, Rosado AS, Tiedje JM. Comparing the Bacterial Diversity of Acute and Chronic Dental Root Canal Infections. *PLoS One.* 2011;6(11):e28088. doi: 10.1371/journal.pone.0028088.

Sasaki H, Hou L, Belani A, Wang C-Y, Uchiyama T, Müller R, et al. IL-10, But Not IL-4, Suppresses Infection-Stimulated Bone Resorption In Vivo. *J Immunol.* 2000;165(7):3626–30. doi: 10.4049/jimmunol.165.7.3626.

Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, Guerra R, Figueiredo L, Fidel SR, et al. A Microbiological Profile of Symptomatic Teeth with Primary Endodontic Infections. *J Endod.* 2008;34(5):541–5. doi: 10.1016/j.joen.2008.02.004.

Serhan CN, Chiang N. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *Br J Pharmacol.* 2009;153(S1):S200–15. doi: 10.1038/sj.bjp.0707489. PMID: 17965751.

Serhan CN, Yacoubian S, Yang R. Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2008;3(1):279–312. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151409. PMID: 18233953.

Sheth K, Kapoor S, Daveswar S. Comparison of Cone-beam Computed Tomography and Periapical Radiography to Determine the Proximity of Periapical Lesions to Anatomical Structures in Premaxillary Area prior to Surgical Endodontics: A Clinical Study. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2020;13(4):322–6. doi: 10.5005/jp-journals-10005-1783.

Siqueira JF, Rôças IN. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. *Int Endod J*. 2022. doi: 10.1111/iej.13677.

Siqueira JF, Rôças IN. Diversity of Endodontic Microbiota Revisited. *J Dent Res*. 2009;88(11):969–81. doi: 10.1177/0022034509346549.

Siqueira JF, Rôças IN. Community as the unit of pathogenicity: An emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2009;107(6):870–8. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.01.044.

Siqueira JF, Rôças IN, Alves FRF, Santos KRN. Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: a molecular investigation. *J Endod*. 2004;30(9):638–43. doi: 10.1097/01.DON.0000125875.88377.85. PMID: 15329567.

Siqueira JF, Rôças IN, Debelian GJ, Carmo FL, Paiva SSM, Alves FRF, et al. Profiling of Root Canal Bacterial Communities Associated with Chronic Apical Periodontitis from Brazilian and Norwegian Subjects. *J Endod*. 2008;34(12):1457–61. doi: 10.1016/j.joen.2008.08.037.

Siqueira JF, Rôças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;92(4):451–7. doi: 10.1067/moe.2001.118620.

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

Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Umeå: Umeå University, 1976.

Takahama A, Rôças IN, Faustino ISP, Alves FRF, Azevedo RS, Gomes CC, et al. Association between bacteria occurring in the apical canal system and expression of bone-resorbing mediators and matrix metalloproteinases in apical periodontitis. *Int Endod J*. 2018;51(7):738–46. doi: 10.1111/iej.12895. PMID: 29363148.

Tani-Ishii N, Wang C-Y, Stashenko P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol Immunol*. 1995;10(4):213–9. doi: 10.1111/j.1399-302X.1995.tb00145.x.

Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K, et al. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod*. 2014;40(5):670–7. doi: 10.1016/j.joen.2013.10.005. PMID: 24767562.

Tibúrcio-Machado CS, Michelon C, Zanatta FB, Gomes MS, Marin JA, Bier CA. The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J*. 2021;54(5):712–35. doi: 10.1111/iej.13467. PMID: 33378579.

Toia CC, Khoury RD, Motta Corazza BJ, Flores Orozco EI, Valera MC. Effectiveness of one-visit and two-visit endodontic retreatment of teeth with persistent/secondary endodontic infection: a randomized clinical trial with 18-months of follow-up. *J Endod*. 2022 Jan;48(1):4-14. doi: 10.1016/j.joen.2021.09.004. PMID: 34555421.

Torabinejad M, Cotti E, Jung T. Concentrations of leukotriene B4 in symptomatic and asymptomatic periapical lesions. *J Endod*. 1992;18(5):205–8. doi: 10.1016/S0099-2399(06)81261-6.

Tsuji M, Yamasaki M, Amano K, Matsui H, Morimoto T, Nakamura H. Histochemical localization of neutral proteases released during development of rat periradicular lesion. *Arch Oral Biol*. 2009;54(12):1128–35. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.10.003.

Virdee SS, Butt K, Grant M, Camilleri J, Cooper PR, Tomson PL. A systematic review of methods used to sample and analyse periradicular tissue fluid during root canal treatment. *Int Endod J*. 2019;52(8):1108–27. doi: 10.1111/iej.13104.

Weissman J, Johnson JD, Anderson M, Hollender L, Huson T, Paranjpe A, et al. Association between the Presence of Apical Periodontitis and Clinical Symptoms in Endodontic Patients Using Cone-beam Computed Tomography and Periapical Radiographs. *J Endod*. 2015;41(11):1824–9. doi: 10.1016/j.joen.2015.06.004.

Yoneda M, Hirofuji T, Anan H, Matsumoto A, Hamachi T, Nakayama K, et al. Mixed infection of *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus* in a murine abscess model: involvement of gingipains in a synergistic effect. *J Periodontal Res*. 2001;36(4):237–43. doi: 10.1034/j.1600-0765.2001.036004237.x.

Zargar N, Ashraf H, Marashi SMA, Sabeti M, Aziz A. Identification of microorganisms in irreversible pulpitis and primary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *Clin Oral Investig*. 2020;24(6):2099–108. doi: 10.1007/s00784-019-03075-9.

Zhang MJ, Sansbury BE, Hellmann J, Baker JF, Guo L, Parmer CM, et al. Resolvin D2 Enhances Postischemic Revascularization While Resolving Inflammation. *Circulation*. 2016;134(9):666–80. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021894.

Zhu M, Van Dyke TE, Gyurko R. Resolvin E1 regulates osteoclast fusion via DC-STAMP and NFATc1. *FASEB J*. 2013;27(8):3344–53. doi: 10.1096/fj.12-220228.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro(a) Senhor(a)

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: **“INFECÇÃO ENDODÔNTICA PRIMÁRIA VERSUS SECUNDÁRIA: PERFIL INFLAMATÓRIO E LIPÍDICO, PERFIL MICROBIANO, NÍVEIS DE ENDOTOXINAS E DE LTA ANTES E DURANTE A TERAPIA ENDODÔNTICA E SUCESSO APÓS 18 MESES DE TRATAMENTO”**.

O objetivo deste estudo é avaliar diferentes métodos de tratamento que serão utilizados durante o tratamento de canal. Para esta avaliação, será coletado material do interior do canal dos dentes e, em seguida, o material será submetido à análise laboratorial. O tratamento de canal será realizado de forma convencional, utilizando equipamentos de última geração, buscando um resultado adequado e satisfatório.

O paciente como beneficiário, receberá tratamento endodôntico gratuitamente, com técnicas avançadas, seguindo protocolos consagrados que contribuirão para o sucesso do caso. Além disso, os medicamentos a serem utilizados possuem comprovação científica de ausência de efeitos tóxicos para o organismo, sendo que todo o tratamento de canal será realizado dentro das normas de biossegurança e serão realizados por profissionais altamente capacitados; os resultados obtidos trarão benefícios para outras pessoas uma vez que a pesquisa irá gerar avanços científicos com melhoras no tratamento de canal realizado na atualidade.

O projeto proposto tem riscos mínimos ao paciente por se tratar de um procedimento invasivo; podendo ocorrer imprevistos durante o atendimento em função do próprio tratamento. Os riscos podem ser próprios às condições do dente a ser tratado, como: a) fratura do mesmo durante o procedimento caso o elemento se encontre enfraquecido ou com presença de trincas; b) fratura do instrumento (não há complicações diretas em decorrência a este risco, uma vez que o material é inerte e estéril); c) dor pós-operatória (ocorre devido a um processo inflamatório

superficial dos tecidos periapicais decorrentes da instrumentação do canal). No caso de algum imprevisto, o paciente será amparado e receberá todos os cuidados necessários para controlar quaisquer eventualidades.

Os pacientes serão chamados para acompanhamento radiográfico e tomográfico.

INFORMAÇÕES E CONTATOS

Informações do pesquisador responsável:

Marcia Carneiro Valera, professora Titular da Disciplina de Endodontia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP, portadora do CPF 039.137.548-22, estabelecido à Avenida Eng. Francisco José Longo, 777, na cidade de São José dos Campos-SP, telefone para contato (12) 3947 9048.

Contato Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do ICT-UNESP:

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a)

portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa das informações constantes neste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa proposta. Fica claro que o participante da pesquisa, pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica, ou inserir aqui o Código de Ética do sigilo profissional de sua profissão). Por fim, como pesquisador(a) responsável pela pesquisa, comprometo-me a cumprir todas as exigências contidas no item IV.3 e IV.4 (se pertinente) da resolução do CNS/MS n. 466 de dezembro de 2012, publicada em

13 de junho de 2013. Por estarmos de acordo com o presente termo o firmamos em duas vias. A primeira via ficará de posse do participante da pesquisa e a outra do pesquisador (caso o participante seja paciente, serão três vias, sendo que a terceira via fará parte do prontuário). Todas as vias serão rubricadas em todas as suas páginas e assinadas ao seu término

Assinatura Paciente

Assinatura Pesquisador

Professora Titular da Disciplina de Endodontia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

TERMO DE ASSENTIMENTO PARA MENORES DE IDADE

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

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

NOME DO PACIENTE

RESPONSÁVEL

RG _____ CPF _____

ENDEREÇO COMPLETO

Assinatura responsável

Assinatura Pesquisador

Professora Titular da Disciplina de Endodontia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética

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

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: INFECÇÃO ENDODÔNTICA PRIMÁRIA VERSUS SECUNDÁRIA: PERFIL INFLAMATÓRIO E LIPÍDICO, PERFIL MICROBIANO, NÍVEIS DE ENDOTOXINAS E DE LTA ANTES E DURANTE A TERAPIA ENDODÔNTICA E SUCESSO APÓS 18 MESES DE TRATAMENTO

Pesquisador: Marcia Carneiro Valera

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 83576618.0.0000.0077

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.651.035

Apresentação do Projeto:

O projeto foi reformulado e se apresenta adequado.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar e monitorar níveis de endotoxinas e ácido lipoteicoico e carga e perfil microbiano nas infecções endodônticas primárias e secundárias antes do tratamento, após o preparo biomecânico e após o uso das medicações intracanaais, em sessão única ou múltipla.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto proposto poderá acarretar em riscos mínimos ao paciente por se tratar de um procedimento invasivo; podem ocorrer imprevistos durante o atendimento em função do próprio tratamento.

O paciente como beneficiário, receberá tratamento endodôntico gratuitamente, com técnicas avançadas, seguindo protocolos consagrados que contribuirão para o sucesso do caso.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

a pesquisa é viável

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O termo foi adequado, porem há um termo de assentimento em anexo também, mas a pesquisa

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

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



Continuação do Parecer: 2.651.035

não ira abranger menores de idade.

Recomendações:

- Não utilizar o termo de assentimento, retirá-lo do projeto
- O benefício não é específico para o paciente e sim para a pesquisa que poderá beneficiar diversos indivíduos. Portanto modificar o benefício, deixando claro que este protocolo contribuirá para o sucesso do tratamento endodontico como um todo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer do(a) Relator(a).

O (a) pesquisador(a) irá receber e-mail da Secretaria do CEPH-ICT-CAMPUS DE SJCAMPOS-UNESP, para envio de relatórios parciais/final, para não incorrer na penalidade de não o fazendo, em não ter novas submissões avaliada pelo Comitê de Ética, até que sane a pendência de envio do relatório, na forma de notificação através do sistema da Plataforma Brasil. Obs:- No site do www.ict.unesp.br – Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos, encontrará o formulário para envio do Relatório parcial/final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1077637.pdf	11/04/2018 12:05:32		Aceito
Outros	formulariorespend.pdf	11/04/2018 12:04:56	Marcia Carneiro Valera	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoreformulado.pdf	11/04/2018 12:03:38	Marcia Carneiro Valera	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEreformulado.pdf	11/04/2018 11:59:43	Marcia Carneiro Valera	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoMarcia.pdf	21/02/2018 09:45:31	Marcia Carneiro Valera	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLEprojetao.pdf	20/02/2018 10:33:17	Marcia Carneiro Valera	Aceito

Endereço: Av.Eng° Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

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



Continuação do Parecer: 2.651.035

Ausência	TCLEprojetao.pdf	20/02/2018 10:33:17	Marcia Carneiro Valera	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_atual.pdf	20/02/2018 10:07:03	Marcia Carneiro Valera	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 11 de Maio de 2018

Assinado por:
Denise Nicodemo
(Coordenador)

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph@fosjc.unesp.br