

**LUCIANE DIAS DE OLIVEIRA**

**EFETIVIDADE *IN VITRO* DE AGENTES IRRIGANTES NA  
NEUTRALIZAÇÃO DE ENDOTOXINAS EM CANAIS  
RADICULARES**



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

**Orientador: Prof Tit Antonio Olavo Cardoso Jorge**

**São José dos Campos  
2005**

## DEDICATÓRIA

Ao Senhor, que está sempre abençoando e iluminando meus caminhos, dando-me força e orientação. Senhor, eu te glorifico por este trabalho, pois foi graças a Ti que eu pude concluir mais este importante passo em minha vida. Obrigada pela paz, segurança e conforto que me deste nos momentos difíceis e pelo amor, saúde e proteção que me dás todos os dias. Senhor eu te louvo e te agradeço por tudo em nome do seu filho Jesus Cristo. Amém!

*Somente em Deus eu encontro paz*

*E nele ponho minha esperança.*

*Somente ele é a rocha que me salva;*

*Ele é o meu protetor e o meu abrigo.*

*Confie sempre em Deus!*

*Abram o coração para Deus, pois ele é o nosso refúgio;*

*O seu amor por nós é forte,*

*E a sua fidelidade dura para sempre.*

*Salmos 62:5-8; 117.*

Aos meus pais Alberto e Dirce, por todo amor que tens me dado, pelo apoio e dedicação que sempre me deram, pela criação maravilhosa que eu tive, pelos grandes esforços que fizeram para que eu pudesse estar aqui hoje, realizando um grande sonho. Eu tenho muito orgulho de tê-los como meus pais. Obrigada pela alegria de estar sempre perto de vocês, que são pessoas muito especiais. Amo muito vocês!

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

*Provérbios 1:8*

Ao Cláudio, meu marido, pela companhia maravilhosa, pela dedicação e carinho que sempre tem me dado, pela paciência e compreensão nas horas de estresse, pelo apoio e incentivo. Eu agradeço a Deus por ter colocado você em minha vida e por abençoar nosso amor. Obrigada pelos momentos muito felizes que temos passado juntos, por lutar pelos nossos sonhos e por me amar. Te amo muito!

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

*Coríntios 13:4-8*

Aos meus irmãos Ricardo e Andrea pela saudável infância que tivemos, pela amizade e amor que nos une, pelos momentos felizes que vivemos juntos e pelo incentivo que sempre me deram. Amo muito vocês! A minha cunhada Fabiane pela amizade e carinho e ao meu sobrinho Ricardinho, que é muito especial para mim, pelo amor e felicidade de ser tua tia Lu.

Aos meus avós Maria, Manuel (*in memorium*), Alice (*in memorium*) e Juan (*in memorium*) por todo amor, carinho, dedicação e ensinamentos valiosos durante os inesquecíveis momentos que passamos juntos. Em especial, à minha avó Maria, pelo amor e apoio que sempre tem me dado ao longo desta caminhada.

Aos meus sogros Antonio e Graça, que são meus segundos pais, pelo amor, carinho e amizade que muito nos tem unido. Obrigada pelo grande apoio e incentivo na minha carreira. Vocês são pessoas muito importantes para mim. Agradeço a Deus por vocês fazerem parte da minha vida. Amo vocês!

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

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, pela orientação que me deu ao longo deste curso, pelos conhecimentos transmitidos, pelo incentivo e apoio que me deu em todos os momentos, pelas oportunidades que tem me dado, pela confiança que depositou em mim, pelo convívio saudável que tivemos e pela amizade que cresceu entre nós. Professor, eu te admiro muito e é muito bom tê-lo como meu orientador. Obrigada por tudo.

À Prof<sup>a</sup>. Adj. Carmelinda Schmidt Unterkircher, pela amizade que temos, pelos conhecimentos e valiosos ensinamentos que me deu durante esta longa caminhada, pelos conselhos e incentivo que sempre tem me dado. Professora, a senhora é muito especial para mim. Eu te respeito e te admiro muito. Obrigada!

À Profª Adj. Márcia Carneiro Valera, pela grande amizade que temos, pelos conselhos em todos os momentos, pelo maravilhoso convívio, pelas oportunidades que tem me dado, por me apoiar, me incentivar e me orientar, pelas palavras de consolo e conforto nas horas difíceis, pelos conhecimentos transmitidos, pelo grande carinho que temos. Você é muito importante para mim. Eu te admiro muito e agradeço a Deus por tê-la colocado em minha vida. Obrigada por tudo que fez e tem feito por mim!

A Profª. Ana Paula Martins Gomes, pela amizade, apoio e incentivo desde o período da graduação, por ter me despertado para a pesquisa, por orientar meu primeiro trabalho científico e pela confiança que depositou em mim. Eu tenho muito a te agradecer, e se hoje eu estou seguindo carreira acadêmica foi porque você plantou esta semente em mim. Você é uma pessoa muito especial, que eu admiro muito. Obrigada por tudo!

A Profª Cristiane Yumi Koga-Ito, pela amizade que cresceu entre nós durante este curso, pelos grandes conhecimentos que me foram transmitidos, pela experiência maravilhosa de trabalharmos juntas, por me ajudar, me apoiar e me incentivar em todos os momentos. Eu te admiro como profissional, pela sua seriedade e competência e como pessoa, pelo seu caráter e dedicação. Muito obrigada!

## **AGRADECIMENTOS**

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

Ao Prof Adjunto Paulo Villela Santos Júnior, diretor da FOSJC – UNESP, por investir na qualidade do ensino, por incentivar os cursos de Pós-Graduação, pela amizade e apoio.

A FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio à pesquisa e pela concessão de minha bolsa de estudo durante todo o curso de Pós-Graduação (Processo nº 02/06467-3).

À Profª Drª Rosilene Fernandes da Rocha, coordenadora do curso de Pós-Graduação, pelo incentivo à pesquisa, pela força e dedicação, pelos conhecimentos transmitidos durante este curso e pelo apoio, auxílio e amizade.

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

Ao Departamento de Odontologia Restauradora FOSJC, em especial à disciplina de Endodontia, por permitir que eu desenvolvesse parte deste trabalho em seu laboratório.

A Mariella Vieira Pereira Leão, pela grande amizade que temos, pela ajuda que sempre me deu, pelos ensinamentos, apoio e incentivo que tem me dado. Eu tenho grande carinho e admiração por você. Obrigada por tudo.

A Clélia Aparecida de Paiva Martins pelo suporte técnico.

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

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

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

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

Ao professor Ivan Balducci, pela realização da análise estatística dos resultados desta pesquisa.

Ao Carlos Guedes por toda colaboração referente à bolsa de estudo da FAPESP.

A EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiação), pelos serviços oferecidos.

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

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação, pelo convívio, pelas experiências compartilhadas e pela amizade que temos.

Aos amigos Emmanuel, Marcia, Beatriz, Marcio, Samira, Ique, Marcia Maciel, Isa, Leonardo, Vanessa, Francisco, Evanice, Maria Helena, Vinícius e Helena, pela grande amizade que nasceu e cresceu entre nós, pelo convívio saudável e maravilhoso, pela imensa ajuda que têm me dado, pelo consolo e conforto nas horas difíceis, pelos ótimos momentos que compartilhamos na presença do Senhor.

Às tias: Leila, Sarita, Marita e Lúcia e aos tios Ale, Luis, Saler (*in memorium*) e Francisco pelo laço de amor que nos une, pela amizade, carinho, apoio e incentivo que sempre me deram.

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

Aos amigos Helder e Carla, pela grande amizade que nos une, pelos momentos maravilhosos de descontração, pelo intenso apoio e incentivo que sempre me deram. Vocês são muito especiais. Obrigada por tudo.

Aos amigos Arlindo e Silvinha, pela forte amizade, pelos momentos de alegria e descontração que passamos juntos, pelo apoio e força que sempre me deram e pelo grande carinho que temos.

Aos amigos Alessandra, Alexandre, Carlos e Adriana, pela amizade, incentivo, pelos bons momentos compartilhados e pelo saudável convívio que temos.

Aos amigos Silvia e Sérgio, pelo apoio, carinho e forte amizade que nos une.

Aos amigos Alessandro, Rodrigo e Thayse, Fabio e Dani, pela ajuda, dedicação e incentivo, pelo ótimo convívio que temos, pelos bons momentos compartilhados, pela amizade que nos une.

Às amigas Adriana e Maria Angélica pelo apoio e amizade.

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

## SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS.....	12
	LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	14
	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	16
	RESUMO.....	18
1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1	Endotoxina e sua ação sobre a polpa e os tecidos periapicais.....	22
2.2	Hidróxido de cálcio: ação sobre canais radiculares infectados e endotoxina.....	29
2.3	Polimixina B e sua ação sobre endotoxina.....	34
2.4	Irrigantes endodônticos: ação antimicrobiana e sobre endotoxina.....	38
3	PROPOSIÇÃO.....	46
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1	Preparo das amostras.....	47
4.2	Verificação da neutralização de endotoxinas no canal radicular.....	52
4.2.1	Lisado de amebócito de Limulus.....	52
4.2.2	Produção de anticorpos em cultura de linfócitos B.....	55

4.2.2.1	Teste ELISA.....	56
5	RESULTADOS.....	58
5.1	Lisado de amebócitos de <i>Limulus</i> .....	58
5.2	Produção de anticorpos em cultura de linfócitos B.....	64
6	DISCUSSÃO.....	70
6.1	Da metodologia.....	70
6.2	Dos resultados.....	75
7	CONCLUSÕES.....	83
6	REFERÊNCIAS.....	84
	ANEXO.....	99
	<i>ABSTRACT</i> .....	100

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Estrutura química da endotoxina de <i>Escherichia coli</i> .....	23
FIGURA 2 -	Padronização do tamanho dos espécimes.....	47
FIGURA 3 -	Raiz de dente humano extraído com tamanho padronizado e vedamento apical com resina composta fotopolimerizável.....	48
FIGURA 4 -	Distribuição e fixação dos espécimes em placas de cultura celular de 24 poços.....	49
FIGURA 5 -	Preparo biomecânico do canal radicular: A) Instrumentação com lima tipo Kerr; B) Irrigação e aspiração com auxílio de seringas apirogênicas de 5 mL.....	51
FIGURA 6 -	Lisado de amebócitos de <i>Limulus</i> e água apirogênica (Charles River Endosafe) .....	53
FIGURA 7 -	Tubos de vidro apirogênicos 10x75 mm (Charles River Endosafe) utilizados para o teste do lisado de amebócito de <i>Limulus</i> .....	53
FIGURA 8 -	Preparo de cultura de linfócitos B: A) células do baço sedimentadas em meio RPMI; B) placa de cultura de células contendo linfócitos B.....	56

FIGURA 9 -	Representação de um dos espécimes: A) em que houve geleificação do lisado de <i>Limulus</i> ; B) em que não houve formação de gel duro.....	58
FIGURA 10 -	Esquema dos cinco números ( <i>Box-Plot</i> ) dos dados em escores obtidos pelos grupos experimentais na coleta imediata e após sete dias, pelo lisado de <i>Limulus</i> .....	64
FIGURA 11 -	Representação gráfica dos valores médios de densidade óptica e desvio-padrão obtidos pelos grupos experimentais na coleta imediata e após sete dias, pelo ELISA.....	69

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 -	Distribuição dos espécimes nos grupos experimentais (n=14) de acordo com a solução irrigadora utilizada.....	50
QUADRO 2 -	Esquema representativo da quantidade de endotoxina presente no canal radicular após cada diluição em base de dois a partir da amostra inicial.....	54
TABELA 1 -	Resultados do teste do lisado de amebócito de Limulus (análise qualitativa) obtidos na primeira coleta (imediate).....	59
TABELA 2 -	Resultados do teste do lisado de amebócito de Limulus (análise qualitativa) obtidos na segunda coleta (após sete dias).....	59
TABELA 3 -	Resultados (em escores) do teste de lisado de Limulus (análise semiquantitativa) obtidos na primeira coleta (imediate).....	60
TABELA 4 -	Resultados (em escores) do teste de lisado de Limulus (análise semiquantitativa) obtidos na segunda coleta (sete dias).....	61
TABELA 5 -	Valores da mediana apresentados por cada grupo experimental (primeira coleta) e representação dos grupos homogêneos.....	62
TABELA 6 -	Valores da mediana apresentados por cada grupo experimental (segunda coleta) e representação dos grupos homogêneos.....	63

TABELA 7 -	Valores médios de densidade óptica (DO) apresentados por cada espécime dos grupos experimentais (primeira coleta).....	65
TABELA 8 -	Valores médios de densidade óptica (DO) apresentados por cada espécime dos grupos experimentais (segunda coleta).....	66
TABELA 9 -	Valores médios de densidade óptica (DO) $\pm$ desvio-padrão apresentados por cada grupo na primeira coleta (imediata) e representação dos grupos homogêneos.....	67
TABELA 10 -	Valores médios de densidade óptica (DO) $\pm$ desvio-padrão apresentados por cada grupo na segunda coleta (sete dias) e representação dos grupos homogêneos.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

BSA = soro albumina bovino

Ca(OH)<sub>2</sub> = hidróxido de cálcio

DNA = ácido desoxiribonucléico

D.O. = densidade óptica

EDTA = ácido etilenodiamino-tetra-acético

*E. coli* = *Escherichia coli*

ELISA = ensaio imunabsorvente ligado à enzima

EMBRARAD = Empresa Brasileira de Radiação

°C = grau Celsius

h = hora

IgG = Imunoglobulina G

IgM = Imunoglobulina M

IL = Interleucina

K = lima tipo Kerr

KDO = ácido 2-Keto-3-deoxioctônico

Kg = Kilograma

LAL = Lisado de amebócito de *Limulus*

LOS = lipooligossacarídeo

LPS = Lipopolissacarídeo

LTA = ácido lipoteicóico

M = Molar

MDP = muramil dipeptídeo

min = minuto

mm = milímetro (unidade de medida equivalente a 10<sup>-3</sup>m)

mL = mililitro

NaCl = cloreto de sódio

NaOCl = hipoclorito de sódio

ng = nanograma

nm = nanômetro (equivalente a  $10^{-9}$ m)

OPD = ortofenildiamino

PAF = Fator Ativador de Plaquetas

PBS = solução salina fisiológica tamponada com fosfato

PBS-T = solução salina fisiológica tamponada com fosfato acrescida de Tween

PGE<sub>2</sub> = Prostaglandina E<sub>2</sub>

pH = potencial de hidrogênio iônico

PMN = polimorfonuclear

s = segundo

SDS = dodecil sulfato de sódio

TNF = Fator de Necrose Tumoral

UFC = Unidade Formadora de Colônia

UI = Unidade Internacional

Xg = gravidade

% = porcentagem

μ = micron (unidade de medida equivalente a  $10^{-6}$ m)

μg = micrograma

μL = microlitro

μm = micrômetro

OLIVEIRA, L.D. **Efetividade *in vitro* de agentes irrigantes na neutralização de endotoxinas em canais radiculares**. 2005. 100f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração: Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.

## RESUMO

A proposta deste trabalho foi avaliar *in vitro* a efetividade das soluções de hipoclorito de sódio, clorexidina, hidróxido de cálcio e polimixina B, como agentes irrigantes, na neutralização de endotoxinas nos canais radiculares. Foram utilizados 98 dentes humanos unirradiculados, que tiveram suas coroas e ápices seccionados, padronizando o tamanho dos espécimes em 14 mm. Os mesmos foram esterilizados por radiação gama cobalto 60 e endotoxina de *Escherichia coli* foi inoculada nos canais radiculares de 84 espécimes. Após 24 h, todos os dentes foram instrumentados até a lima K 50, escalonados até K 80 e foram divididos em sete grupos (n=14), de acordo com a solução irrigadora: G1) NaOCl 2,5%; G2) NaOCl 5,25%; G3) clorexidina 2%; G4) Ca(OH)<sub>2</sub> 0,14%; G5) polimixina B; G6 (controle positivo): água aprotogênica; G7 (controle negativo) sem endotoxina e água aprotogênica como agente irrigante. Foram realizadas duas coletas do conteúdo do canal radicular para verificar neutralização de endotoxinas, uma logo após a instrumentação (coleta imediata) e outra após sete dias (segunda coleta). A neutralização da endotoxina foi verificada tanto pelo método do lisado de amebócitos de *Limulus* como pela produção de anticorpos em cultura de linfócitos B. Os resultados obtidos no lisado foram submetidos à análise estatística (Kuskall-Wallis e Dunn) e os obtidos na produção de anticorpos foram analisados por ANOVA e teste de Tukey (5%). Na coleta imediata, verificou-se que os grupos G1 (NaOCl 2,5%), G2 (NaOCl 5,25%) e G3 (clorexidina 2%) não neutralizaram endotoxinas, sendo estatisticamente semelhantes ao G6 (controle positivo) (p>0,05), enquanto que os grupos G4 (Ca(OH)<sub>2</sub> 0,14%) e G5 (polimixina B) demonstraram efetividade sobre LPS, com resultados estatisticamente semelhantes ao G7 (controle negativo) (p>0,05) e diferentes dos demais grupos (p<0,05). Na coleta após sete dias, foi detectada presença de LPS nos grupos G4 e G5, sendo significativamente inferior à apresentada pelos grupos G1, G2 e G3. A produção de anticorpos também foi significativamente inferior nos grupos G4 e G5 em relação aos grupos G1, G2 e G3. Assim, pôde-se concluir que somente as soluções de Ca(OH)<sub>2</sub> e polimixina B reduziram significativamente a quantidade de endotoxinas nos canais radiculares, sendo que as soluções de hipoclorito de sódio e clorexidina não apresentaram efeito sobre LPS.

**PALAVRAS-CHAVE:** Endotoxinas; irrigantes do canal radicular; hidróxido de cálcio; polimixina B.

## I INTRODUÇÃO

As alterações patológicas que envolvem a polpa e os tecidos periapicais são, na maioria das vezes, de etiologia microbiana, de modo que bactérias e seus produtos exercem um papel significativo na indução e principalmente na manutenção destas lesões (KAKEHASHI et al.<sup>52</sup>, 1965; SUNDQVIST<sup>120</sup>, 1994). Em dentes com necrose pulpar e periodontite apical, a inflamação purulenta é induzida por combinações específicas de bactérias anaeróbias facultativas e estritas, principalmente Gram-negativas (SUNDQVIST et al.<sup>121</sup>, 1989; WITTGOW JUNIOR & SABISTON JUNIOR<sup>139</sup>, 1975). Tani-Ishii et al.<sup>126</sup>, em 1994, estudaram as alterações da microbiota do canal radicular durante o desenvolvimento de lesões periapicais em ratos e observaram que, na fase ativa de destruição óssea e expansão das lesões, havia predomínio de bactérias anaeróbias estritas Gram-negativas.

Bactérias Gram-negativas apresentam endotoxinas na membrana externa da parede celular, que são complexos lipopolissacarídicos (LPS) com potente ação citotóxica, liberadas durante sua duplicação ou morte celular, representando o principal fator de virulência dessas bactérias (PETSCH & ANSPACH<sup>90</sup>, 2000). As endotoxinas exercem vários efeitos biológicos que podem resultar na amplificação das respostas inflamatória e imunológica (STASHENKO et al.<sup>115</sup>, 1998). No sangue e nos tecidos, as endotoxinas ligam-se ao receptor CD14 na superfície de monócitos e macrófagos, e estas células ativadas secretam interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), superóxido ( $O_2^-$ ), óxido nítrico, interferons  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , e moléculas lipídicas como o fator ativador de plaquetas e prostaglandinas (JANEWAY et al.<sup>57</sup>, 2000). Estes fatores são fundamentais no

desenvolvimento de reabsorção óssea periapical (WANG & STASHENKO<sup>136</sup>, 1993).

Importantes correlações têm sido demonstradas entre os níveis de endotoxina intracanal e a sintomatologia clínica da polpa e dos tecidos periapicais (SCHEIN & SCHILDER<sup>101</sup>, 1975; HORIBA et al.<sup>49</sup>, 1991). Khabbaz et al.<sup>53-4</sup> (2000, 2001) demonstraram que endotoxinas também estão presentes em lesões cariosas de dentes sintomáticos e assintomáticos e no tecido pulpar de todos os dentes cariados. Dessa forma, os estudos têm sugerido que as endotoxinas são os principais fatores etiológicos envolvidos na patogênese da inflamação pulpar e periapical (DWYER & TORABINEJAD<sup>29</sup>, 1981; PITTS et al.<sup>91</sup>, 1982; YAMASAKI et al.<sup>141</sup>, 1992; BARTHEL et al.<sup>6</sup>, 1997; MURAKAMI et al.<sup>76</sup>, 2001; HONG et al.<sup>47</sup>, 2004). A inoculação de LPS no interior dos canais radiculares de animais (macacos, cães e gatos) produziu reação inflamatória periapical, com reabsorção óssea, em todos os casos (DAHLÉN et al.<sup>25</sup>, 1981; DWYER & TORABINEJAD<sup>29</sup>, 1981; PITTS et al.<sup>91</sup>, 1982; NELSON-FILHO et al.<sup>81</sup>, 2002; SILVA et al.<sup>104</sup>, 2002).

A principal meta do tratamento endodôntico é a eliminação de bactérias do sistema de canais radiculares por meios mecânicos e químicos (BYSTRÖM et al.<sup>16</sup>, 1985). Entretanto, é possível que, mesmo após a remoção das bactérias, endotoxinas com capacidade para induzir ou manter lesões periapicais permaneçam no sistema de canais (BARTHEL et al.<sup>6</sup>, 1997), predispondo o caso ao insucesso. Desta forma, o tratamento de canais radiculares infectados não deve apenas destruir bactérias, mas também inativar endotoxinas e demais produtos tóxicos (LEONARDO & LEAL<sup>62</sup>, 1998; SILVA et al.<sup>104</sup>, 2002).

Durante o preparo biomecânico do canal radicular, várias soluções têm sido utilizadas como irrigantes endodônticos (LEONARDO & LEAL<sup>62</sup>, 1998). O hipoclorito de sódio tem sido largamente utilizado devido a suas propriedades antimicrobianas e capacidade de dissolver tecidos (BYSTRÖM & SUNDQVIST<sup>14</sup>, 1983; YELSILSOY et al.<sup>142</sup>, 1995;

SIQUEIRA JUNIOR et al.<sup>107</sup>, 1998). A clorexidina também tem sido utilizada como irrigante em função de seus efeitos antimicrobianos, substantividade e relativa ausência de citotoxicidade (VAHDATY et al.<sup>133</sup>, 1993; LEONARDO et al.<sup>65</sup>, 1999; FERRAZ et al.<sup>37</sup>, 2001; MENEZES et al.<sup>71</sup>, 2004). A atividade antimicrobiana tanto do hipoclorito de sódio como da clorexidina, em diferentes concentrações, tem sido relatada por diversos autores (JEANSONNE & WHITE<sup>58</sup> 1994; YESILSOY et al.<sup>142</sup> 1995; SIQUEIRA JUNIOR et al.<sup>107,109</sup>, 1998 e 2002; VIANNA et al.<sup>134</sup>, 2004), entretanto, a ação de soluções irrigadoras sobre LPS durante o preparo biomecânico do canal radicular ainda não está bem estabelecida.

O hidróxido de cálcio tem demonstrado efetiva ação sobre LPS quando usado como medicação de demora (NELSON-FILHO et al.<sup>81</sup>, 2002; SILVA et al.<sup>104</sup>, 2002; OLIVEIRA et al.<sup>85</sup>, 2002; TANOMARU et al.<sup>129</sup>, 2003), pois promove hidrólise da porção lipídica da endotoxina, neutralizando seus efeitos biológicos (SAFAVI & NICHOLS<sup>98</sup>, 1993), o que despertou o interesse de analisar sua ação sobre LPS quando usado como agente irrigante.

Na área médica, tem-se verificado que a polimixina B, antibiótico polipeptídico catiônico, bloqueia muitos dos efeitos biológicos causados pela endotoxina (CRAIG et al.<sup>21</sup>, 1974; CORRIGAN & BELL<sup>20</sup>, 1971; MORRISON & JACOBS<sup>74</sup>, 1976), sendo utilizada no tratamento de pacientes com sepsis por microrganismos Gram-negativos (RIFKIND<sup>94</sup>, 1967; EVANS et al.<sup>35</sup>, 1999). Na odontologia, sua utilização como medicação de demora por sete dias foi eficiente em neutralizar LPS em canais radiculares (OLIVEIRA, 2002), tornando importante verificar seus efeitos como solução irrigadora.

A presença marcante de endotoxinas nos canais radiculares infectados sugere a necessidade de novos estudos que avaliem a eficácia de agentes irrigantes sobre LPS, a fim de eliminar ou neutralizar estas substâncias flogísticas que participam ativamente do processo de reabsorção óssea periapical.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Endotoxina e sua ação sobre a polpa e os tecidos periapicais

A presença de grande quantidade de endotoxina em canais radiculares com polpa necrosada vem sendo relatada desde os estudos de Schein & Schilder<sup>101</sup> (1975), onde se verificou, através do teste do lisado de *Limulus*, que dentes com polpas necrosadas tinham uma concentração mais alta de endotoxina que dentes com polpas vitais. E ainda, os dentes sintomáticos também apresentavam mais endotoxinas que os assintomáticos. Horiba et al.<sup>49</sup> (1991) também demonstraram níveis maiores de endotoxinas em dentes com sintomatologia, com áreas radiolúcidas periapicais e com exsudação do que em dentes sem essas características. Em 2000, Khabbaz et al.<sup>53</sup> detectaram quantidade significativamente maior de endotoxina em lesões cariosas de dentes sintomáticos em comparação com os assintomáticos e, em 2001, esses autores (KHABBAZ et al.<sup>54</sup>) também verificaram maior conteúdo de endotoxina nos tecidos pulpare de dentes sintomáticos, sugerindo que a endotoxina representa importante papel na patogênese da doença pulpar e que é possível uma associação dos níveis de endotoxina com severidade de dor pulpar. Dhalén & Bergenholtz<sup>24</sup> (1980) observaram que a presença de endotoxina nas amostras de canais radiculares de dentes com polpas necrosadas estava correlacionada com a presença e o número de bactérias Gram-negativas.

Quimicamente, as endotoxinas constituem-se de três partes diferentes: o componente lipídico não-polar, chamado lipídio A, um corpo oligossacarídico e outro heteropolissacarídico, representado pelo antígeno O de superfície (Figura 1). O lipídio A é constituído por unidades

dissacarídicas de glicosamina fosforilada ligadas a vários ácidos graxos de cadeia longa. O antígeno O é formado por repetidas unidades polissacarídicas, que são determinadas pela identidade sorológica da respectiva bactéria (RIETSCHEL et al.<sup>93</sup>, 1993). O corpo oligossacarídico tem uma estrutura conservada com uma região KDO (ácido 2-keto-3-deoxioctônico)-heptose interna e uma região hexose externa. Contudo, o lipídio A é o principal responsável pela atividade endotóxica do LPS e sua estrutura é bem conservada entre as diferentes espécies de bactérias Gram-negativas (NAKANO et al.<sup>79</sup>, 1975; KIRIKAE et al.<sup>55</sup>, 1997).

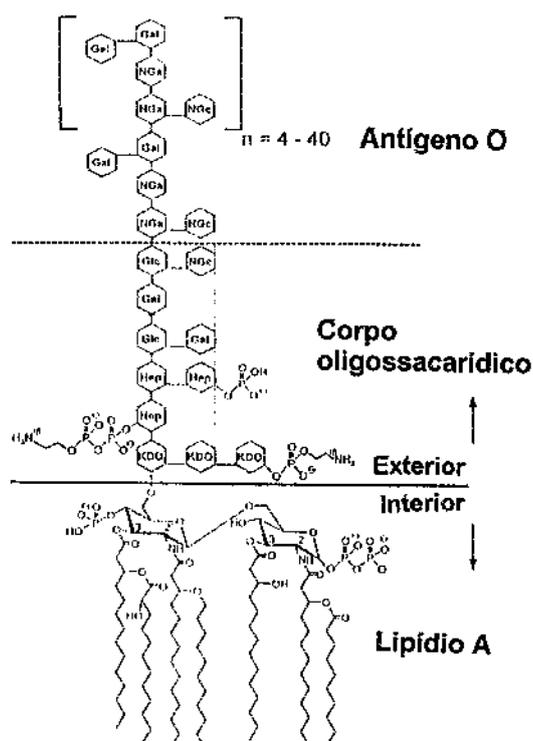


FIGURA 1 – Estrutura química da endotoxina de *Escherichia coli*<sup>90</sup>.

Diversos estudos demonstraram que as endotoxinas são os principais fatores etiológicos envolvidos na patogênese e na manutenção da inflamação periapical, incluindo reabsorção óssea (DWYER & TORABINEJAD<sup>29</sup>, 1981; PITTS et al.<sup>91</sup>, 1982; MATTISON et al.<sup>70</sup>, 1987; YAMASAKI et al.<sup>141</sup>, 1992; MURAKAMI et al.<sup>76</sup>, 2001; HONG et al.<sup>47</sup>, 2004). A endotoxina causa importantes efeitos biológicos pró-

inflamatórios, como ativação do sistema complemento, quimiotaxia de polimorfonucleares (PMN), indução de febre, leucopenia, hipotensão e choque, coagulação intravascular, reação de Schwartzman localizada e generalizada, liberação de colagenase pelos macrófagos, ativação policlonal de linfócitos B (HARPER et al.<sup>45</sup>, 1994; OLIVEIRA<sup>85</sup>, 2002), indução da síntese de prostaglandinas, leucotrienos, fator ativador de plaquetas (PAF) e citocinas (MORSE<sup>75</sup>, 1981; MATSUSHITA et al.<sup>69</sup>, 1999; JANEWAY et al.<sup>57</sup>, 2000). Estes fatores apresentam importantes funções no desenvolvimento da periodontite apical e formação de abscesso maxilofacial (MURAKAMI et al.<sup>76</sup> 2001). Entre as citocinas, destacam-se IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), produzidas por macrófagos ativados e TNF- $\beta$ , elaborado por células T ativadas. Essas substâncias químicas são ativadoras de osteoclastos, participando, portanto, da reabsorção óssea, manifestação expressiva no desenvolvimento da lesão periapical (STASHENKO et al.<sup>116-7</sup>, 1991; WANG & STASHENKO<sup>136</sup>, 1993; MURAKAMI et al.<sup>76</sup>, 2001).

Por outro lado, LPS pode causar reabsorção óssea através de sua interferência direta em osteoblastos e osteoclastos, inibindo os efeitos estimulantes dos fatores de crescimento sobre os osteoblastos e bloqueando a reparação óssea no sítio inflamatório (STASHENKO et al.<sup>116</sup>, 1991). Além disso, LPS, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  possuem capacidade de estimular a produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) pelos fibroblastos, osteoblastos e macrófagos, que constitui importante ativador de osteoclastos (LINDEMANN et al.<sup>68</sup>, 1988; STASHENKO et al.<sup>117</sup>, 1991; WANG & STASHENKO<sup>136</sup>, 1993; NAIR<sup>78</sup>, 1997). Jiang et al.<sup>59</sup> (2003) demonstraram que LPS exerce efeitos diretos na gênese de osteoclastos. Assim, LPS é um importante fator de virulência, determinando efeitos biológicos que resultam na amplificação das reações inflamatórias, pois mesmo quantidades pequenas de endotoxinas são capazes de induzir a resposta inflamatória periapical (DWYER & TORABINEJAD<sup>29</sup>, 1981;

PITTS et al.<sup>91</sup>, 1982; MATTISON et al.<sup>70</sup>, 1987; ESTRELA & FIGUEIREDO<sup>32</sup>, 2001).

A importância do LPS na patogênese da inflamação periapical foi demonstrada por Dahlén et al.<sup>25</sup> (1981), que verificaram de forma histológica e histoquímica a influência do lipopolissacarídeo (LPS) de *Fusobacterium nucleatum* em tecidos periapicais de *Macaca fascicularis*. Um volume de 5 a 10 µL da solução de LPS foi introduzido em 27 canais radiculares e os dentes observados por três meses (Grupo I, 18 dentes) e sete meses (Grupo II, nove dentes). Dezesete dentes foram utilizados como controle. Radiografias foram realizadas no final de cada período para verificar alterações na região periapical. Os animais foram sacrificados e observou-se reação inflamatória nos tecidos periapicais de todos os dentes experimentais, com reabsorção óssea e dentária. Mesmo quando a inflamação era moderada, as células do tecido ósseo apical apresentavam aumento da atividade enzimática, sugestivo de reabsorção óssea ativa.

Dwyer & Torabinejad<sup>29</sup> (1981) também avaliaram radiográfica e histologicamente o efeito da endotoxina de *Escherichia coli* nos tecidos periapicais de gatos. Os autores estudaram a reação induzida por três concentrações de endotoxina nos tecidos periapicais de dez animais. Nos canais radiculares de caninos superiores e inferiores de seis gatos foi depositado 0,1 mL de endotoxina nas concentrações: 100 µg/mL, 10 µg/mL e 1 µg/ml e solução fisiológica, respectivamente. Nos canais radiculares de três gatos foi utilizada endotoxina neutralizada e um gato foi usado como controle adicional, no qual foi colocada solução fisiológica em seus canais. Os tecidos periapicais foram examinados radiográfica e histologicamente duas, quatro e seis semanas após. Os resultados sugeriram indiretamente que as endotoxinas têm uma participação na iniciação e perpetuação das lesões inflamatórias periapicais em humanos.

O papel da endotoxina na inflamação periapical de cães foi investigada primeiramente por Pitts et al.<sup>91</sup> (1982). Nos canais radiculares

do grupo experimental os autores injetaram 0,1 mL de endotoxina de *Salmonella minnesota* (R-595) e nos canais do grupo controle solução fisiológica esterilizada. Exames radiográficos foram feitos semanalmente e avaliações histológicas foram feitas após quatro ou cinco semanas. As alterações radiográficas periapicais ocorridas foram mais severas nas raízes contendo endotoxinas do que nas raízes contendo solução fisiológica. A avaliação histológica também demonstrou maior destruição óssea periapical e maior resposta inflamatória nos espécimes contendo endotoxinas. Os resultados do estudo indicaram que as endotoxinas podem apresentar papel relevante na inflamação periapical e na destruição óssea.

Continuando na mesma linha, Mattison et al.<sup>70</sup> (1987) examinaram a reação do osso periapical de cães à endotoxina de *Eikenella corrodens*. Os canais foram preparados biomecanicamente e foi depositado 0,1 mL de endotoxina de *E. corrodens* em 42 raízes, 0,1 mL de endotoxina de *E. coli* em oito raízes (controle positivo) e 0,1 mL de água apirogênica em seis raízes (controle negativo). O procedimento foi repetido por quatro semanas. Radiografias e amostras sangüíneas foram obtidas semanalmente durante 12 semanas e um animal foi sacrificado para análise histológica no final de cada período testado. Radiograficamente, 90,4% das raízes tratadas com endotoxina de *E. corrodens* e 75% das raízes tratadas com endotoxina de *E. coli* exibiram lesões periapicais. O exame histológico demonstrou significativa perda óssea e intenso infiltrado inflamatório. Os resultados demonstraram que a endotoxina apresentou importante papel na iniciação e perpetuação da inflamação e na perda óssea associada a problemas endodônticos.

Como vários estudos vinham sugerindo e demonstrando a participação de LPS no processo de reabsorção óssea periapical, Millar et al.<sup>72</sup> (1986) decidiram estudar a influência de duas frações com pesos moleculares diferentes de LPS de *Porphyromonas gingivalis* sobre o metabolismo ósseo. Foram examinados seus efeitos diretos na

modulação da reabsorção óssea, colágeno ósseo e síntese protéica não-colagenosa. Na reabsorção óssea, as duas frações de LPS estimularam a liberação de cálcio de ossos fetais de ratos nas concentrações de 0,5 e 3 µg/mL e também promoveram uma redução de 30 a 40% na formação protéica de colágeno na concentração de 10 µg/mL. As frações de alto peso molecular inibiram significativamente a formação de proteína não-colagenosa. Os resultados mostraram que o LPS de *P. gingivalis* inibiu a formação de colágeno ósseo e promoveu potente reabsorção óssea.

Várias citocinas estão envolvidas no desenvolvimento da reabsorção óssea. Assim, Lindemann et al.<sup>68</sup> (1988) analisaram a produção de interleucina 1 (IL-1) e do Fator de Necrose Tumoral (TNF) pelos monócitos do sangue periférico humano, ativados por bactérias periodontais e LPS. As bactérias testadas foram: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4, *Eikenella corrodens*, *Haemophilus aphrophilus*, *Porphyromonas gingivalis*. *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* induziram níveis mais altos de TNF e produção de IL-1, enquanto *E. corrodens* e *H. aphrophilus* induziram quantidades menores. LPS purificado de *A. actinomycetemcomitans* Y4, na concentração de 1 ng/mL, foi capaz de induzir a liberação de IL-1 e TNF. Os resultados indicaram que os monócitos são ativados por LPS livre ou ligado às bactérias periodontais Gram-negativas e que suas citocinas induzem a reabsorção óssea pelos osteoclastos, podendo contribuir para a destruição óssea periodontal.

Bactérias Gram-negativas em polpas necrosadas de dentes com lesões periapicais induzem reabsorção óssea através dos efeitos de liberação de LPS. Como bactérias Gram-positivas não contêm LPS, seu papel no desenvolvimento de lesões periapicais não está claramente compreendido. Com isso, Safavi & Nichols<sup>100</sup> (2000) decidiram em seus estudos avaliar os efeitos do muramil dipeptídeo (MDP), um componente da parede celular tanto de bactérias Gram-negativas como de Gram-positivas, na liberação de citocinas pelos monócitos. Culturas de

monócitos humanos foram tratadas com MDP ou LPS e níveis de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) foram estimados nos sobrenadantes. MDP e LPS estimularam a liberação de citocinas, mas o efeito do MDP foi significativamente menor que do LPS.

Em 2002, Oliveira<sup>85</sup> verificou *in vitro* que a presença de endotoxinas no conteúdo coletado do canal radicular promoveu ativação policlonal de linfócitos B, estimulando produção significativa de anticorpos da classe IgM em cultura de linfócitos. As endotoxinas são antígenos T-independentes, e quando se ligam nos receptores de células B, promovem a ativação de diferentes clones, os quais se proliferam em muitas células-filhas e se diferenciam em plasmócitos (células secretoras de anticorpos) (JANEWAY et al.<sup>57</sup>, 2000).

Além da grande quantidade de endotoxina em canais radiculares infectados e na região periapical, LPS apresenta também capacidade de difusão através da dentina humana. Segundo Nissan et al.<sup>83</sup> (1995), a endotoxina foi capaz de passar através de 0,5 mm de dentina, em direção apical, num período que variou de 15 min a 4 h e 30 min. Horiba et al.<sup>48</sup> (1990) avaliaram o conteúdo de endotoxina de uma série de amostras de dentina (1 mm<sup>2</sup>) da superfície pulpar de canais radiculares infectados até o cimento, independentemente do tempo, e verificaram que a quantidade de endotoxina foi maior nas amostras da superfície pulpar a 300  $\mu$ m de profundidade que nas amostras de 301 a 800  $\mu$ m de profundidade. Em 2003, Oliveira et al.<sup>86</sup> verificaram a capacidade de difusão da endotoxina pelos túbulos dentinários em direção ao cimento e concluíram que o tempo requerido para que a endotoxina pudesse atingir a região externa da raiz foi a partir de 24 horas.

Endotoxina também pode penetrar através da obturação de canais radiculares em dentes sem selamento coronário e atingir a região periapical, com período médio de infiltração de 23 dias, enquanto para bactérias inteiras este período foi de 62 dias (ALVES et al.<sup>3</sup>, 1998;

LAGHIOS et al.<sup>60</sup>, 2000). Com isso, Souza<sup>113</sup> (2000) avaliou a eficácia de impermeabilização das paredes dentinárias do canal radicular com verniz tipo copal, em dentes obturados com cimentos a base de óxido de zinco e eugenol (N-Rickert) e a base de hidróxido de cálcio (Sealer 26) e preparados para retentor intra-radicular, e verificaram que a endotoxina penetrou apical e lateralmente em todos os grupos experimentais, porém, essa infiltração foi reduzida pela impermeabilização com verniz. Tang et al.<sup>125</sup> (2002) relataram que a obturação retrógrada do canal radicular com agregado trióxido mineral (MTA) reduziu significativamente a infiltração de endotoxina quando comparado com IRM, amálgama e Super-EBA, nos períodos de avaliação de 1, 2, 6 e 12 semanas. Em 2003, Akisue<sup>2</sup> analisaram *in vitro* a capacidade de vedamento do sistema de canais radiculares utilizando técnicas de obturação termoplastificada por ondas contínuas de condensação e convencional (condensação lateral) e verificaram que a endotoxina percolou as obturações de ambas as técnicas no período de trinta dias, sendo que o sistema termoplástico apresentou menor infiltração ( $p < 0.05$ ).

Contudo, se as endotoxinas não forem eliminadas ou neutralizadas durante o tratamento endodôntico, a sua permanência pode ser responsável pela indução e manutenção da lesão periapical, predispondo o caso ao insucesso.

## **2.2 Hidróxido de cálcio: ação sobre canais radiculares infectados e endotoxina**

O hidróxido de cálcio vem sendo largamente utilizado na Endodontia, sendo o agente antimicrobiano mais recomendado como medicação intracanal em diferentes situações clínicas como nas infecções do canal radicular, apicificação, reabsorção radicular, entre outras (BYSTRÖM et al.<sup>16</sup>, 1985; LEONARDO et al.<sup>63</sup>, 1993; TROPE et al.<sup>132</sup>, 1995). É a medicação intracanal mais empregada atualmente. A

dissociação iônica do hidróxido de cálcio em íons cálcio e hidroxila e o efeito destes íons sobre tecidos e microrganismos possibilitaram tal consagração. Segundo Estrela & Figueiredo<sup>32</sup> (2001), seu representativo destaque entre os fármacos endodônticos deve-se a duas expressivas propriedades: a inibição de enzimas bacterianas, a partir de sua ação sobre a membrana citoplasmática, conduzindo ao efeito antimicrobiano e a ativação enzimática tecidual, observada por sua ação sobre a fosfatase alcalina, gerando efeito mineralizador. Estas propriedades são decorrentes de seu elevado pH, com valores aproximados a 12,6, o que estabelece alta liberação de íons hidroxila.

Diversos estudos têm demonstrado uma efetiva atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio sobre microrganismos comumente encontrados em canais radiculares infectados (GEORGOPOLOU et al.<sup>39</sup>, 1993; SIQUEIRA JUNIOR & UZEDA<sup>105</sup>, 1996; BARBOSA et al.<sup>5</sup>, 1997; ESTRELA et al.<sup>33-4</sup>, 1998 e 2001). Sjögren et al.<sup>110</sup> (1991) estudaram o efeito do hidróxido de cálcio em dentes com lesões periapicais e constataram ação antimicrobiana aos sete dias, sendo que 13 das 14 espécies bacterianas isoladas eram anaeróbias Gram-negativas. Haenni et al.<sup>43</sup> (2003) verificaram os efeitos químicos e antimicrobianos do hidróxido de cálcio (pó) misturado com soluções irrigadoras, como clorexidina (0,5%), hipoclorito de sódio (1%) e iodo, em comparação com a pasta convencional [Ca(OH)<sub>2</sub> e solução salina], contra *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Os resultados demonstraram que nenhuma das pastas realizadas aumentou o efeito antimicrobiano apresentado pela pasta convencional.

Com relação ao uso do hidróxido de cálcio no tratamento de periodontites apicais, Caliskan & Sem<sup>17</sup> (1996) verificaram que em 80,8% dos casos houve cura completa da lesão periapical, no período de avaliação que variou de dois a cinco anos. Weiger et al.<sup>137</sup> (2000) também verificaram sucesso no tratamento em mais de 90% dos casos avaliados após período de cinco anos.

O uso do hidróxido de cálcio está estabelecido em endodontia, mostrando resultados clínicos satisfatórios em diversas situações, principalmente na reparação das lesões periapicais, onde promove um meio ambiente favorável à deposição de tecido duro (Leonardo & Leal<sup>62</sup>, 1998). Assim, sabendo-se que as endotoxinas são importantes no desenvolvimento e manutenção destas lesões, alguns autores despertaram-se para o estudo da atuação do hidróxido de cálcio sobre endotoxinas. O trabalho de Safavi & Nichols<sup>98</sup>, em 1993, foi o primeiro a relatar a capacidade do hidróxido de cálcio em neutralizar a porção lipídica do LPS bacteriano, demonstrando que quantidades elevadas de ácidos graxos livres eram liberadas em amostras de LPS tratadas com hidróxido de cálcio. Segundo os autores, a porção lipídica do LPS bacteriano foi hidrolizada pelo hidróxido de cálcio, resultando ácidos graxos livres. Os resultados sugeriram que a degradação do LPS mediada pelo hidróxido de cálcio pode apresentar importância nos efeitos benéficos obtidos com o uso deste medicamento na endodontia.

Em outro trabalho, Safavi & Nichols<sup>99</sup> (1994) estudaram a alteração das propriedades biológicas do lipopolissacarídeo (LPS) pelo tratamento com hidróxido de cálcio. Para isso, culturas de monócitos foram estimuladas com LPS ou LPS tratado com hidróxido de cálcio e os sobrenadantes das culturas analisados quanto ao conteúdo de prostaglandina E<sub>2</sub> usando cromatografia gasosa. Foi identificada prostaglandina E<sub>2</sub> nos sobrenadantes de monócitos estimulados pelo LPS, mas não naqueles estimulados com LPS tratado com hidróxido de cálcio, demonstrando que o tratamento com hidróxido de cálcio pode alterar as propriedades biológicas do LPS.

Barthel et al.<sup>6</sup> (1997) investigaram se o potencial tóxico do LPS de *Escherichia coli* poderia ser reduzido ou eliminado pelo hidróxido de cálcio, verificando a liberação do Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) pelos monócitos. Quatro concentrações de LPS foram preparadas: 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL e 1000 ng/mL. As amostras foram testadas

em duplicata, sendo que, em metade dessas amostras, foram adicionados 25 mg de hidróxido de cálcio, resultando numa solução saturada. Monócitos foram coletados do sangue periférico humano de um doador saudável por centrifugação e plaqueados a uma densidade de  $4 \times 10^6$  células/mL. As diferentes soluções de LPS foram adicionadas aos orifícios da placa no quinto dia. Após 4 horas, os sobrenadantes foram coletados e o TNF- $\alpha$  quantificados por ELISA. Os resultados indicaram que o hidróxido de cálcio pode eliminar a capacidade indutora do LPS de *E. coli* em estimular a produção de TNF- $\alpha$  pelos monócitos do sangue periférico ( $p < 0.0001$ ).

Seguindo a mesma linha de pesquisa, Olsen et al.<sup>87</sup> (1999) avaliaram os efeitos de inibição de LPS pelo hidróxido de cálcio na liberação de IL-1 $\beta$  em monócitos humanos. O tratamento de LPS com hidróxido de cálcio, por vários períodos de tempo entre 10 min e 24 horas, reduziu significativamente a liberação de IL-1 $\beta$  pelos monócitos em todos os períodos testados. Em 2002, Oliveira<sup>85</sup> verificou que o tratamento da endotoxina com hidróxido de cálcio por sete dias reduziu de forma significativa a produção de anticorpos em cultura de linfócitos B.

Silva et al.<sup>104</sup> (2002) avaliaram *in vivo* o efeito da endotoxina, associada ou não ao hidróxido de cálcio, sobre os tecidos apicais e periapicais de dentes de cães, por meio de avaliação histopatológica. Foram utilizados sessenta premolares que, após abertura coronária e biopulpectomia, foram preenchidos com um dos seguintes materiais: Grupo I) LPS; Grupo II) LPS associado ao hidróxido de cálcio; Grupo III) soro fisiológico. No Grupo IV, os canais radiculares ficaram expostos à cavidade oral por cinco dias e, após, foram selados para induzir lesões periapicais. Após trinta dias, os animais foram sacrificados e as peças submetidas ao processamento histológico. Os resultados obtidos demonstraram que a intensidade do infiltrado inflamatório, a espessura do ligamento periodontal e a presença de reabsorções no Grupo I foram semelhantes ao Grupo IV, enquanto que no Grupo II foram semelhantes

ao Grupo III. Os autores concluíram que a endotoxina bacteriana ocasionou o desenvolvimento de reação periapical e que o hidróxido de cálcio foi capaz de inativar seus efeitos tóxicos. Nelson-Filho et al.<sup>81</sup> (2002) realizaram trabalho semelhante, porém, avaliaram radiograficamente o efeito da endotoxina sozinha ou associada ao hidróxido de cálcio na região periapical de cães e verificaram que a endotoxina causou lesões periapicais visíveis radiograficamente, entretanto, quando associada ao hidróxido de cálcio, a lâmina dura manteve-se intacta, provando que seus efeitos tóxicos foram neutralizados. Tanomaru et al.<sup>129</sup> (2003) também verificaram que o hidróxido de cálcio como medicação de demora por sessenta dias inativou os efeitos induzidos pela endotoxina na região periapical de cães.

Jiang et al.<sup>59</sup> (2003) estudaram os efeitos diretos do LPS na gênese de osteoclastos e a capacidade do hidróxido de cálcio em inibir a formação de osteoclasto estimulada pela endotoxina. Com base nos resultados obtidos, os autores relataram que o tratamento do LPS com hidróxido de cálcio por sete dias reduziu significativamente sua habilidade de ativar a diferenciação de células semelhantes aos osteoclastos.

Durante dez anos, diversos estudos utilizando diferentes metodologias têm comprovado a capacidade do hidróxido de cálcio em detoxificar endotoxina. Na endodontia, os estudos mostraram a eficiência do hidróxido de cálcio como medicação de demora em neutralizar LPS (OLIVEIRA<sup>85</sup>, 2002; NELSON-FILHO et al.<sup>81</sup>, 2002; SILVA et al.<sup>104</sup>, 2002; TANOMARU et al.<sup>129</sup>, 2003), entretanto, estudos da ação sobre LPS de soluções de hidróxido de cálcio, utilizadas como agentes irrigantes durante o preparo biomecânico do canal radicular, não são encontrados na literatura.

x 162x



### 2.3 Polimixina B e sua ação sobre endotoxina

Polimixina B é um antibiótico polipeptídico catiônico que foi isolado de *Bacillus polymyxa*, em 1947 (STORM et al.<sup>119</sup>, 1977) e, desde então, tem sido bastante estudado por sua capacidade de bloquear muitos dos efeitos biológicos causados pela endotoxina, incluindo reação generalizada de Schwartzman (CRAIG et al.<sup>21</sup>, 1974), coagulação intravascular, leucopenia (CORRIGAN & BELL<sup>20</sup>, 1971), atividade mitogênica, produção de superóxidos por macrófagos (TAKADA et al.<sup>123</sup> 1988), ativação do complemento (MORRISON & JACOBS<sup>74</sup>, 1976), síntese de interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e interleucinas pelos macrófagos (STOKES et al.<sup>118</sup>, 1989), inflamação associada com meningite bacteriana Gram-negativa, entre outros. Este antibiótico é muito utilizado em pacientes com sepsis bacteriana por microrganismos Gram-negativos e em choque endotóxico (RIFKIND<sup>94</sup>, 1967; EVANS et al.<sup>35</sup>, 1999), pois é capaz de se ligar com alta afinidade ao lipídio A, alterando a conformação dimensional do lipopolisacarídeo e, assim, neutralizando sua atividade biológica (MORRISON & JACOBS<sup>74</sup>, 1976; MOORE et al.<sup>73</sup>, 1986). Esta alteração conformacional impede, por exemplo, que a molécula endotoxina-polimixina B se ligue ao receptor CD14 nos monócitos, inibindo a liberação de mediadores inflamatórios e citocinas (BUCKLIN et al.<sup>11</sup>, 1995; EVANS et al.<sup>35</sup>, 1999).

Polimixinas são os únicos antibióticos que possuem atividade antiendotoxina em adição à atividade antimicrobiana (GUDMUNDSSON & CRAIG<sup>42</sup>, 1986, citado por EVANS et al.<sup>35</sup>, 1999). Os efeitos benéficos do tratamento com polimixina B em animais com endotoxemia têm sido documentados em ratos, cães, cabras e também em humanos (BUCKLIN et al.<sup>11</sup>, 1995; PARVIAINEN et al.<sup>89</sup>, 2001; BARTON et al.<sup>7</sup>, 2004). Rifkind & Palmer<sup>95</sup> (1966) e Rifkind<sup>94</sup> (1967) verificaram, na presença de polimixina B, uma redução da letalidade endotóxica em embriões de galinhas e em ratos e neutralização da reação de Schwartzman em

coelhos. Estes autores sugeriram um mecanismo de ação no qual a polimixina B liga-se covalentemente à porção eletronegativa do lipídio A. Estes achados foram confirmados posteriormente por Morrison & Jacobs<sup>74</sup> (1976) como uma relação estequiométrica na qual uma molécula de polimixina B liga-se a uma unidade monomérica de lipopolissacarídeo.

Outros estudos têm confirmado a eficácia da polimixina B. Chia et al.<sup>18</sup> (1989) comparam os efeitos da polimixina B e de anticorpos monoclonais reativos com LPS, e verificaram que o antibiótico apresentou maior efeito inibitório que os anticorpos. Stokes et al.<sup>118</sup> (1989) examinaram o efeito inibidor da polimixina B, *in vivo* e *in vitro*, sobre a liberação de TNF dos macrófagos alveolares de ratos em resposta a endotoxina de *E. coli* (0111:b4). Foram preparadas culturas de macrófagos e a produção de TNF- $\alpha$  (*in vitro*) foi bloqueada pela polimixina B nas concentrações de 100, 10 e 1  $\mu\text{g/mL}$ . Efeitos inibitórios similares também foram induzidos pela polimixina B em modelo *in vivo*, no qual a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos foi estimulada pela injeção intratraqueal de LPS. Como muitos dos efeitos do LPS são mediados pelo TNF- $\alpha$ , sua inibição pode explicar a proteção oferecida pela polimixina B contra a toxicidade induzida pelo mesmo.

Darrow & Keithley<sup>27</sup> (1996) estudaram o efeito da polimixina B na redução da inflamação induzida por endotoxina no ouvido médio de porcos. Trinta e seis porcos foram divididos em três grupos e, em cada grupo, quatro animais receberam endotoxina em um ouvido e PBS (solução fisiológica tamponada com fosfato) no outro; quatro animais receberam endotoxina mais polimixina B em um ouvido e no oposto PBS e quatro animais receberam polimixina B em um e PBS no outro ouvido. Os animais foram sacrificados após dois, cinco e oito dias. Os resultados demonstraram que os ouvidos que receberam endotoxina apresentaram edema de mucosa, efusão e infiltrado celular, enquanto os ouvidos tratados com polimixina B, nos mesmos animais, exibiram uma marcante redução na resposta inflamatória. Assim, este estudo demonstrou a

eficácia da polimixina B na inibição da inflamação induzida por endotoxina no ouvido médio dos animais.

Parviainen et al.<sup>89</sup> (2001) avaliaram os efeitos da polimixina B na resposta de cavalos à endotoxina. Foram utilizados oito cavalos doentes, três doses de polimixina B (1.000, 5.000 e 10.000 UI/Kg do peso corporal) e solução fisiológica como controle. Amostras sanguíneas foram coletadas antes e após 24 horas da administração da polimixina B e incubadas a 37°C por 4 h com 1 ng de endotoxina de *E. coli*. Comparando-se com os valores do controle, a polimixina B produziu diminuição significativa da atividade de TNF induzida pela endotoxina, principalmente na concentração de 10.000 UI/Kg. Os resultados do estudo demonstraram que a polimixina B é um efetivo inibidor da inflamação induzida por endotoxina em cavalos doentes. Barton et al.<sup>7</sup> (2004) avaliaram os efeitos da administração sistêmica de polimixina B na sintomatologia de endotoxemia induzida experimentalmente em cavalos e verificaram que a polimixina B reduziu febre, taquicardia e níveis séricos de TNF, demonstrando sua efetividade no tratamento de endotoxemia.

A concentração plasmática de endotoxina e de TNF- $\alpha$  em humanos e em ratos com choque séptico tem sido significativamente reduzida pelo tratamento com polimixina B (TANI et al.<sup>127</sup>, 2001; GIACOMETTI et al.<sup>40</sup>, 2002). Sosroseno et al.<sup>112</sup> (2002) demonstraram que a produção de óxido nítrico em linhagem de macrófagos (RAW264.7) estimulada por LPS de *A. actinomycetemcomitans* foi bloqueada pela polimixina B. Yagi et al.<sup>140</sup> (2002) relataram que a elevação de IL-6 em ratos submetidos a estresse físico/psíquico foi abolida pela neutralização *in vivo* de LPS com infusões contínuas de polimixina B. Em 2003, Prebeck et al.<sup>92</sup>, utilizando linhagem de macrófagos (RAW264.7), também verificaram que a secreção de TNF estimulada por endotoxina de *E. coli* (055:B5) foi inibida pela polimixina B. Yin et al.<sup>143</sup> (2003) afirmaram que, sendo a polimixina B uma molécula simples capaz de se ligar

seletivamente ao lipídio A, ela pode servir como modelo para o posterior desenvolvimento de novos agentes ligantes e neutralizantes de lipídio A.

De acordo com os resultados apresentados com a utilização da polimixina B na área médica, Oliveira<sup>85</sup> (2002) avaliou *in vitro* a eficácia deste medicamento na Odontologia, assim, avaliou a efetividade do hidróxido de cálcio, da polimixina B pura ou associada ao sulfato de neomicina e hidrocortisona, como curativos intracanal, na eliminação de endotoxinas inoculadas nos canais radiculares. Utilizou 75 dentes humanos unirradiculados, que foram preparados biomecanicamente, impermeabilizados externamente e esterilizados. Foi inoculada endotoxina de *E. coli* no interior de sessenta canais radiculares. Os espécimes foram divididos em cinco grupos experimentais (n=15), de acordo com a medicação: G1) hidróxido de cálcio, G2) polimixina B, G3) polimixina B associada ao sulfato de neomicina e hidrocortisona, G4) não recebeu medicamento e no G5 não foi inoculada endotoxina. Após sete dias, a neutralização da endotoxina foi verificada utilizando-se o método do lisado de amebócito de *Limulus* e a produção de anticorpos em cultura de linfócitos B. Os resultados demonstraram o hidróxido de cálcio como o melhor neutralizante de endotoxinas, seguido pela polimixina B pura. Já a polimixina B associada a neomicina e hidrocortisona não exibiu capacidade neutralizante de LPS e, portanto, não deveria ser utilizada com este objetivo. Em 2004, Hong et al.<sup>47</sup> verificaram que a polimixina B inibiu significativamente a liberação de IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$  de macrófagos estimulados por LPS e, ainda, a administração de polimixina B reduziu em 76% a extensão da reabsorção óssea associada à lesão apical em ratos (Wistar).

Como a polimixina B foi efetiva na neutralização de endotoxinas quando usada como medicação intracanal por sete dias (OLIVEIRA<sup>85</sup>, 2002), tornou-se de grande importância analisar sua efetividade como solução irrigadora durante o preparo biomecânico de canais radiculares.

## 2.4 Irrigantes endodônticos: ação antimicrobiana e sobre endotoxina

O principal objetivo da terapia endodôntica é desinfetar o complexo sistema de canais radiculares antes da obturação dos condutos, com a finalidade de eliminar restos teciduais necróticos, bactérias e seus produtos e garantir o sucesso do tratamento (SCHILDER<sup>102</sup>, 1974). Segundo Byström & Sundqvist<sup>13</sup> (1981), o preparo mecânico dos canais radiculares usando solução salina reduz significativamente o número de microrganismos presentes, mas não a ponto de se obter culturas negativas. Para tanto, o preparo do canal radicular deve ser realizado em associação com soluções irrigadoras efetivas, que devem apresentar como pré-requisitos atividade antimicrobiana, capacidade de dissolver tecidos e ausência de toxicidade aos tecidos periapicais (SPANGBERG et al.<sup>114</sup>, 1973). Vários agentes irrigantes vêm sendo utilizados com esta finalidade, como hipoclorito de sódio, clorexidina, peróxido de hidrogênio, ácido cítrico, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), tergenol, endo PTC (associação de peróxido de uréia, Tween 80 e carbowax), RC Prep (associação de EDTA, peróxido de uréia e carbowax), água de hidróxido de cálcio (água de cal), entre outros (LEONARDO & LEAL<sup>62</sup>, 1998).

O hipoclorito de sódio tem sido largamente utilizado como solução irrigadora desde sua introdução na endodontia por Walker<sup>135</sup>, em 1936 (citado por SIQUEIRA JUNIOR et al.<sup>106</sup>, 1997), e tornou-se o mais popular agente irrigante em razão dos seus importantes efeitos antimicrobianos e de dissolução de tecidos necróticos (BYSTRÖM & SUNDQVIST<sup>14</sup>, 1983; JEANSONNE & WHITE<sup>58</sup>, 1994, YESILSOY et al.<sup>142</sup>, 1995, SIQUEIRA JUNIOR et al.<sup>107</sup>, 1998). A atividade antibacteriana do hipoclorito de sódio, quando em contato com restos orgânicos, resulta da formação de ácido hipocloroso (HOCl), que contém cloro ativo, um forte agente oxidante, o qual exerce seu efeito pela oxidação irreversível dos sistemas enzimáticos bacterianos, rompendo assim as funções metabólicas do microrganismo (SIQUEIRA JUNIOR et al.<sup>106</sup>, 1997). O

cloro pode também combinar com componentes citoplasmáticos para formar complexos tóxicos que destroem microrganismos (MURRAY et al.<sup>77</sup>, 1994, citado por SIQUEIRA JUNIOR et al.<sup>106</sup>, 1997).

As diluições do hipoclorito de sódio mais comumente utilizadas são 0,5%, 1%, 2,5% e 5,25%. Com relação à efetividade antimicrobiana dessas diferentes concentrações existem resultados conflitantes. Alguns estudos (CVEK et al.<sup>23</sup>, 1976; BYSTRÖM & SUNDQVIST<sup>15</sup>, 1985; D'ARCANGELO et al.<sup>26</sup>, 1999) não encontraram diferença significativa no efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio a 0,5% e 5%. Entretanto, outros trabalhos (SIQUEIRA JUNIOR et al.<sup>107</sup>, 1998; YESILSOY et al.<sup>142</sup>, 1995, AYHAN et al.<sup>4</sup>, 1999) têm verificado que sua eficiência antimicrobiana é significativamente reduzida após diluições do produto. Leonardo et al.<sup>64</sup> (1995) induziram lesões periapicais crônicas em dentes de cães e realizaram tratamento endodôntico utilizando como irrigante hipoclorito de sódio 5,25% (Grupo 1) e 0,5% (Grupo 2). Os dois grupos foram medicados com hidróxido de cálcio e obturados. Os autores verificaram que G1 apresentou melhor reparo apical que G2, mostrando diferença na eficácia do hipoclorito de sódio quando utilizado em concentração maior.

Devido às controvérsias com relação à atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio, Siqueira Junior et al.<sup>108</sup> (2000) compararam *in vitro* a redução de *Enterococcus faecalis* intracanal proporcionada pela instrumentação associada a soluções de hipoclorito de sódio 1%, 2,5% e 5,25%. Após o preparo do canal radicular usando as diferentes soluções, as amostras foram coletadas, diluídas e semeadas em placas de ágar *Mitis Salivarius*, que permaneceram a 37°C por 48 horas. A seguir, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). Os efeitos inibitórios das três soluções de hipoclorito de sódio sobre *E. faecalis* também foram avaliados por meio do teste de difusão em ágar. Todas as soluções testadas reduziram significativamente o número de células bacterianas no canal radicular, não havendo diferença significativa

entre as três soluções testadas ( $p > 0.05$ ). Em 2002, os mesmos autores<sup>109</sup> avaliaram a eficácia de técnicas de instrumentação utilizando movimentos rotatórios alternados e agentes irrigantes, como hipoclorito de sódio 2,5% e gluconato de clorexidina 2%, na redução de *E. faecalis* do interior de canais radiculares e verificaram que todas as técnicas e soluções reduziram significativamente o número de bactérias, não havendo diferença significativa entre os grupos.

Spangberg et al.<sup>114</sup> (1973) demonstraram que, além do hipoclorito de sódio 5,25% apresentar concentração maior que o necessário para eliminar cepas bacterianas frequentemente encontradas em canais radiculares infectados, ele foi considerado muito citotóxico para ser usado rotineiramente na terapia endodôntica. Por outro lado, Thè et al.<sup>130</sup> (1980) avaliaram a resposta tecidual de várias concentrações de NaOCl em preás e observaram que não houve diferença significativa na toxicidade entre concentrações de 2% a 8%. Yelsilsoy et al.<sup>142</sup> (1995) relataram que o hipoclorito de sódio 5,25% apresentou a mesma toxicidade que hipoclorito de sódio 2,5%. Contudo, embora seja um efetivo agente antimicrobiano, o hipoclorito de sódio pode causar danos quando em contato com tecidos periapicais (HÜLSMANN & HAHN<sup>50</sup>, 2000).

Em decorrência da citotoxicidade apresentada pelo hipoclorito de sódio, outras substâncias irrigadoras com atividade antimicrobiana e biocompatíveis, como as soluções de clorexidina, vêm sendo utilizadas como alternativa para o tratamento de canais radiculares infectados (DELANY et al.<sup>28</sup>, 1982; VAHDATY et al.<sup>133</sup>, 1993; JEANSONNE & WHITE<sup>58</sup>, 1994; WHITE et al.<sup>138</sup>, 1997; FERRAZ et al.<sup>37</sup> 2001; TANOMARU FILHO et al.<sup>128</sup>, 2002; MENEZES et al.<sup>71</sup>, 2004; VIANNA et al.<sup>134</sup>, 2004). A clorexidina é um irrigante freqüentemente utilizado no tratamento periodontal e o seu uso na endodontia foi sugerido por Delany et al.<sup>28</sup> (1982), que verificaram *in vitro* que a clorexidina 0,2% é um efetivo agente antimicrobiano quando usado como irrigante endodôntico.

Leonardo et al.<sup>65</sup> (1999) comprovaram clinicamente que a clorexidina 2% como solução irrigadora previne atividade microbiana *in vivo*, com efeitos residuais no sistema de canais radiculares até 48 h.

A clorexidina apresenta amplo espectro de ação antimicrobiana (LEE et al.<sup>61</sup>, 1990; ROSSI et al.<sup>97</sup>, 2002; MENEZES et al.<sup>71</sup>, 2004; ERCAN et al.<sup>31</sup>, 2004), substantividade (FARDAL & TURNBULL<sup>36</sup>, 1986; WHITE et al.<sup>138</sup>, 1997; LEONARDO et al.<sup>65</sup>, 1999; BASRANI et al.<sup>8</sup>, 2002) e relativa ausência de toxicidade (LEE et al.<sup>61</sup>, 1990; TANOMARU FILHO et al.<sup>128</sup>, 2002), que são propriedades desejáveis num irrigante ideal. Entretanto, segundo Jeansonne & White<sup>58</sup> (1994), não se tem conhecimento sobre a capacidade da clorexidina de dissolver tecidos, dessa forma, tem-se estudado uma possível associação da clorexidina com hipoclorito de sódio na irrigação do canal radicular (KURUVILLA & KAMATH<sup>56</sup>, 1998). Rossi et al.<sup>97</sup> (2002) verificaram que a atividade antimicrobiana dessa associação é menor que a dos irrigantes sozinhos.

Vários mecanismos de ação são responsáveis pelos efeitos antimicrobianos apresentados pela clorexidina, como: capacidade de se ligar a regiões eletronegativas da bactéria; ataque à membrana citoplasmática bacteriana causando a perda do balanço osmótico e liberação do material intracelular. A clorexidina pode também se ligar à hidroxiapatita e aos tecidos moles, competindo com a aderência bacteriana (HELING & CHANDLER<sup>46</sup>, 1998).

A eficácia antimicrobiana da clorexidina 2% vem sendo comparada ao hipoclorito de sódio 5,25% (JEANSONNE & WHITE<sup>58</sup>, 1994; VIANNA et al.<sup>134</sup>, 2004). De acordo com o estudo de Ônçag et al.<sup>88</sup> (2003), o gluconato de clorexidina 2% e Cetrexidin® (gluconato de clorexidina 0,2% com cetrímide 0,2%) são ainda mais efetivos sobre *E. faecalis* que hipoclorito de sódio 5,25% por 5 min e 48 h, apresentando maiores efeitos residuais e menor toxicidade ao final de duas semanas. Ercan et al.<sup>31</sup> (2004) compararam a atividade antimicrobiana da solução de clorexidina 2% e hipoclorito de sódio 5,25% em canais radiculares com

necrose pulpar e lesão periapical e verificaram que ambas soluções foram efetivas na redução de diferentes microrganismos presentes nestes canais. Vianna et al.<sup>134</sup> (2004) avaliaram *in vitro* a ação antimicrobiana de diferentes concentrações de clorexidina (gel e líquida) e hipoclorito de sódio contra patógenos endodônticos e verificaram que o tempo requerido para a solução de clorexidina 2% eliminar todos os microrganismos avaliados foi o mesmo que do hipoclorito de sódio 5,25%. Desta forma, a clorexidina pode substituir o hipoclorito de sódio como irrigante, principalmente nos casos de dentes com ápices amplos, em que o hipoclorito de sódio pode atingir a região periapical e causar efeitos tóxicos aos tecidos (JEANSONNE & WHITE<sup>58</sup>, 1994).

Siqueira Junior et al.<sup>107</sup> (1998) avaliaram os efeitos de irrigantes endodônticos contra quatro bactérias anaeróbias Gram-negativas produtoras de pigmentos negros e quatro anaeróbias facultativas, utilizando-se difusão em ágar. As soluções irrigadoras usadas foram: NaOCl 4%, NaOCl 2,5%, clorexidina 2%, clorexidina 0,2%, EDTA e ácido cítrico. Todas as soluções usadas inibiram todas as cepas bacterianas testadas. Baseado no diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano, do maior para o menor, as soluções foram ordenadas da seguinte forma: NaOCl 4%, NaOCl 2,5%, clorexidina 2%, clorexidina 0,2%, EDTA, ácido cítrico e NaOCl 0,5%.

Utilizando também técnica de difusão em ágar, Leonardo et al.<sup>66</sup> (2001) avaliaram a atividade das seguintes soluções irrigadoras: irrigante a base de óleo de mamona (Endoquil), solução de gluconato de clorexidina 2% e hipoclorito de sódio 0,5% contra cocos Gram-positivos (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*) e bacilos Gram-negativos (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Os resultados demonstraram que o gluconato de clorexidina 2% inibiu todas as cepas bacterianas, o Endoquil foi efetivo contra microrganismos Gram-positivos e o hipoclorito de sódio 0,5% foi efetivo

apenas contra *S. aureus*. Por outro lado, Buck et al.<sup>9</sup> (1999) avaliaram a efetividade do hipoclorito de sódio 0,525%, clorexidina 0,12%, RC Prep (associação de EDTA com peróxido de uréia) e desinfetante a base de iodo 0,5% nos túbulos dentinários e verificaram que todos os irrigantes penetraram no interior dos túbulos em concentração suficiente para matar *Micrococcus luteus* e *Bacillus megaterium* inoculadas no canal radicular.

Tanto hipoclorito de sódio como clorexidina, em diferentes concentrações, têm apresentado importantes efeitos antimicrobianos quando utilizados como irrigantes de canais radiculares infectados, entretanto, poucos estudos têm se preocupado com a efetividade desses irrigantes sobre LPS.

Os efeitos detoxificantes do hipoclorito de sódio sobre endotoxinas foram primeiramente estudados por Buttler & Crawford<sup>12</sup>, em 1982, que utilizaram três concentrações do hipoclorito de sódio 0,58%, 2,7% e 5,2% em estudos *in vitro* e *in vivo*. Os resultados demonstraram que pequenas quantidades de endotoxinas foram detoxificadas por todas as diluições do hipoclorito, em contato durante uma hora, porém, quantidades maiores de endotoxinas não foram neutralizadas pelas concentrações 0,58% e 2,7% e, ainda, que os resultados usando hipoclorito de sódio 5,25% foram inconclusivos. Contudo, os autores admitiram que a metodologia aplicada pode ter sofrido alguns problemas técnicos que possivelmente influenciaram nos resultados obtidos, necessitando de novos estudos.

Haight-Ponce et al.<sup>44</sup> (1999) investigaram a atividade de ligação da endotoxina (*Escherichia coli* 0111) no pó de dentina pré-tratada com hipoclorito de sódio 10% e peróxido de hidrogênio 3% por períodos de tempo variados. Vinte dentes humanos unirradiculados anteriores foram utilizados e as amostras de pó de dentina foram coletadas utilizando limas tipo Kerr números 15, 20 e 25. A endotoxina foi diluída em três concentrações (10 pg/mL; 1 ng/mL e 100 ng/mL). Uma microplaca foi dividida em três grupos (A, B e C) e nos orifícios da placa foram

colocados 100  $\mu$ L da solução contendo o pó de dentina. Foram adicionados ao grupo A 100  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio 3%, ao grupo B hipoclorito de sódio 10% e ao grupo C água destilada (controle positivo) por 1, 10 e 30 min. Em seguida, a endotoxina foi acrescentada aos orifícios da placa. Após 30 min, foi realizada lavagem com água apirogênica e o teste cromogênico do lisado de *Limulus* foi usado para determinar a quantidade de endotoxina nas amostras de dentina, medido em leitor ELISA. O nível de endotoxina foi significativamente menor no pó de dentina tratada com hipoclorito de sódio 10% do que na tratada com peróxido de hidrogênio 3% a 1 e a 10 min. A atividade de ligação da endotoxina na dentina foi mais baixa para o período de 30 min em todos os grupos experimentais.

A capacidade da clorexidina em inativar LPS foi investigada por Aibel & Stevens<sup>1</sup> (1999), que verificaram a produção de IL-6 por macrófagos na presença de LPS e de LPS tratado com clorexidina 1,2% por 40 min. Os autores concluíram que o tratamento com clorexidina 1,2% causou pouca ou nenhuma inativação do LPS na sua habilidade de induzir produção de IL-6 por macrófagos.

Buck et al.<sup>10</sup> (2001) analisaram os efeitos de irrigantes endodônticos e hidróxido de cálcio sobre LPS usando uma técnica altamente seletiva de espectrometria de massa e cromatografia gasosa com monitoramento iônico seletivo. Em tubos de vidro apirogênicos foram misturados 25  $\mu$ L de LPS, 0,5 mL de água apirogênica e 0,5 mL de cada um dos irrigantes testados, por 30 min: água, clorexidina 0,12%, EDTA 15%, hipoclorito de sódio 2,6%, etanol 95% e associações de irrigantes como clorexidina 0,12% com hipoclorito de sódio 2,6%, clorexidina 0,12% mais hipoclorito de sódio 2,6% mais etanol 95% (CNE). Como o hidróxido de cálcio é comumente utilizado como medicação de demora, ele foi aplicado ao LPS por um, dois e cinco dias. A inativação do LPS foi medida pela quantificação dos ácidos graxos livres liberados. Pelos resultados apresentados, a água, o EDTA, o etanol, a clorexidina 0,12%,

a clorexidina mais hipoclorito de sódio e o hipoclorito de sódio sozinho demonstraram pequena ou nenhuma degradação do LPS. O hidróxido de cálcio (um dia) e a associação de clorexidina, etanol e hipoclorito de sódio detoxificaram moléculas de LPS pela hidrólise de ligações éster das cadeias de ácidos graxos do lipídio A.

Tan et al.<sup>124</sup> (2001) compararam os efeitos do formocresol, fenol canforado e metronidazol sobre os níveis de endotoxinas nos canais radiculares de pacientes com periodontites crônicas e verificaram que tais substâncias não apresentam efeitos significantes sobre endotoxinas presentes nos canais. Segundo Tanomaru et al.<sup>129</sup> (2003), diferentes soluções irrigadoras (hipoclorito de sódio 1%, 2,5%, 5% e digluconato de clorexidina 2%) utilizadas durante o preparo biomecânico do canal radicular não inativaram os efeitos da endotoxina em induzir resposta inflamatória com reabsorção óssea na região periapical de cães, enquanto a medicação intracanal com hidróxido de cálcio por sessenta dias apresentou eficiente atividade em inativar os efeitos causados pelas endotoxinas *in vivo*.

Como evidenciado nesta revisão da literatura, as endotoxinas estão envolvidas na etiologia das reações inflamatórias do periápice dentário, com papel importante na indução da reabsorção óssea. Assim, a sua presença em dentes seriamente comprometidos pelo processo de cárie e indicados para tratamento endodôntico, seja biopulpectomia ou necropulpectomia, sugere a necessidade de analisar a eficácia de diferentes agentes irrigantes em neutralizar ou destruir endotoxinas presentes nos canais radiculares.

### **3 PROPOSIÇÃO**

A proposta desta pesquisa foi avaliar *in vitro* a efetividade das soluções de hipoclorito de sódio, clorexidina, hidróxido de cálcio e polimixina B, como agentes irrigantes, na neutralização de endotoxinas inoculadas nos canais radiculares.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, Protocolo nº 034/2002 (Anexo A).

### 4.1 Preparo das amostras

Foram utilizados 98 dentes humanos unirradiculados, recém-extraídos por motivos diversos e com prévia autorização dos pacientes através do consentimento livre e esclarecido. Os dentes ficaram 24 horas em solução de formol a 10% e, posteriormente, foram limpos e imersos em solução fisiológica até o momento do uso. O terço apical de todas as raízes foi cortado em 3 mm e as coroas foram seccionadas com disco de carborundum (Carbodont Gysi S.A., Buenos Aires, Argentina), padronizando o tamanho dos espécimes em 14 mm (Figura 2).

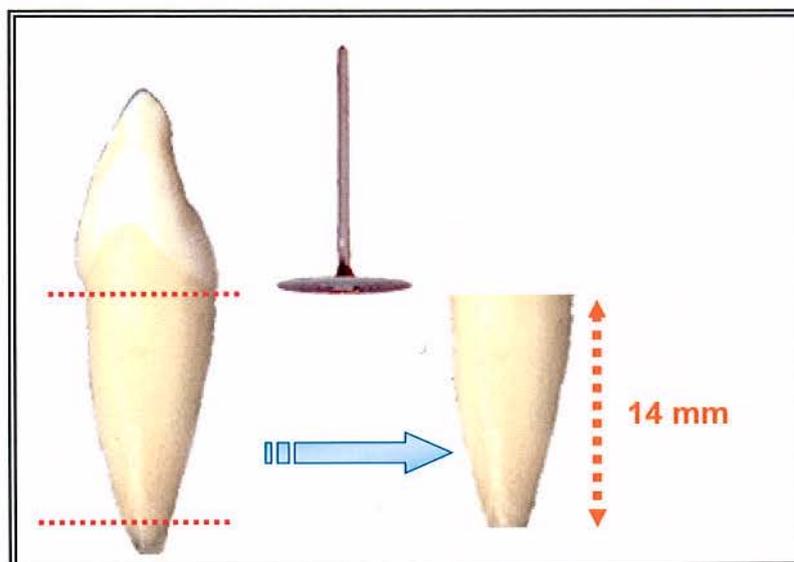


FIGURA 2 - Padronização do tamanho dos espécimes.

A instrumentação inicial dos canais radiculares foi realizada em toda a sua extensão, desde seu diâmetro anatômico até a lima tipo Kerr (Maillefer, Michigan, USA) número 30. Os canais foram irrigados com solução de hipoclorito de sódio a 1% (Farmácia de Manipulação Aqua Marina, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) a cada troca de instrumento, sendo a irrigação final com 10 mL de solução fisiológica. Em seguida, foi feito vedamento da região apical dos dentes utilizando-se resina composta fotopolimerizável Z-100 (3M, Dental Products, St Paul, USA) (Figura 3) e as raízes foram impermeabilizadas externamente com duas camadas de adesivo epóxi ARALDITE (Brascola, São Paulo, Brasil), exceto a região da abertura cervical.



FIGURA 3 - Raiz de dente humano extraído com tamanho padronizado e vedamento apical com resina composta fotopolimerizável.

Todos os espécimes foram colocados em frascos de vidro contendo solução fisiológica e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 min. Em seguida, em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar), os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em sete placas de cultura celular de 24 poços (Costar, New York, USA), com 14 dentes em cada,

fixados com resina acrílica quimicamente ativada (Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, Brasil) (aproximadamente 5 mm de altura) (Figura 4).



FIGURA 4 – Distribuição e fixação dos espécimes em placas de cultura celular de 24 poços.

Estas placas foram tampadas, embaladas e enviadas a EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiação, Cotia, São Paulo, Brasil) para serem esterilizadas por radiação gama com cobalto 60. Todos os materiais utilizados (limas, pinças, gaze, algodão, tesouras, exploradores e ponteiros, entre outros) foram esterilizados por radiação gama com cobalto 60 (20 KGy por 6 horas) para neutralizar endotoxinas pré-existentes (CSAKO et al.<sup>22</sup>, 1983).

Em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar), 10  $\mu$ L (40 UI) de endotoxina de *Escherichia coli* (nº 055:B5, Sigma, St Louis, USA) foram inoculados, com o auxílio de micropipeta, no interior dos canais radiculares de 84 dentes (seis placas), os quais permaneceram em estufa a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  com umidade relativa de 100% por 24 h (Oliveira et al.<sup>86</sup>, 2003). No dia seguinte, todos os espécimes foram instrumentados até a lima tipo Kerr nº 50 e escalonados até a lima K nº 80, utilizando-se 3 mL

do agente irrigante a cada troca de instrumento, sendo a irrigação e aspiração realizada com auxílio de seringas apirogênicas de 5 mL (Injex – SP - Brasil) e agulhas apirogênicas 20 x 5,5 mm (B.D – PR – Brasil) (Figura 5). Assim, os espécimes foram divididos em sete grupos experimentais (n=14), de acordo com a solução irrigadora utilizada (Quadro 1): a) para o grupo 1, utilizou-se hipoclorito de sódio 2,5% (Farmácia de Manipulação Aqua Marina, São José dos Campos, São Paulo, Brasil); b) para o grupo 2, utilizou-se hipoclorito de sódio 5,25% (Farmácia de Manipulação Aqua Marina, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) como agente irrigante; c) para o grupo 3, utilizou-se solução de clorexidina 2% (Farmácia de Manipulação Aqua Marina, São José dos Campos, São Paulo, Brasil); d) para o grupo 4, utilizou-se solução de hidróxido de cálcio (0,14%); e) para o grupo 5, utilizou-se solução de polimixina B (10.000 UI/mL) com veículo oleoso (Ophtalmos, Fórmulas Oficiais, São Paulo, Brasil); f) o grupo 6 (Controle positivo) recebeu solução fisiológica (NaCl a 0,9%) apirogênica (Beker Produtos Fármaco Hospitalares, São Paulo, Brasil) como agente irrigante; g) no grupo 7 (Controle negativo) não foi inoculada endotoxina e o agente irrigante foi solução fisiológica apirogênica (Beker Produtos Fármaco Hospitalares, São Paulo, Brasil).

Quadro 1 - Distribuição dos espécimes nos grupos experimentais (n=14) de acordo com a solução irrigante utilizada

<b>GRUPOS</b>	<b>AGENTE IRRIGANTE</b>
<b>1</b>	<b>hipoclorito de sódio 2,5%</b>
<b>2</b>	<b>hipoclorito de sódio 5,25%</b>
<b>3</b>	<b>clorexidina 2%</b>
<b>4</b>	<b>solução de Ca(OH)<sub>2</sub> 0,14%</b>
<b>5</b>	<b>solução de polimixina B</b>
<b>6 (Controle +)</b>	<b>solução fisiológica apirogênica</b>
<b>7 (Controle -)</b>	<b>solução fisiológica apirogênica</b>

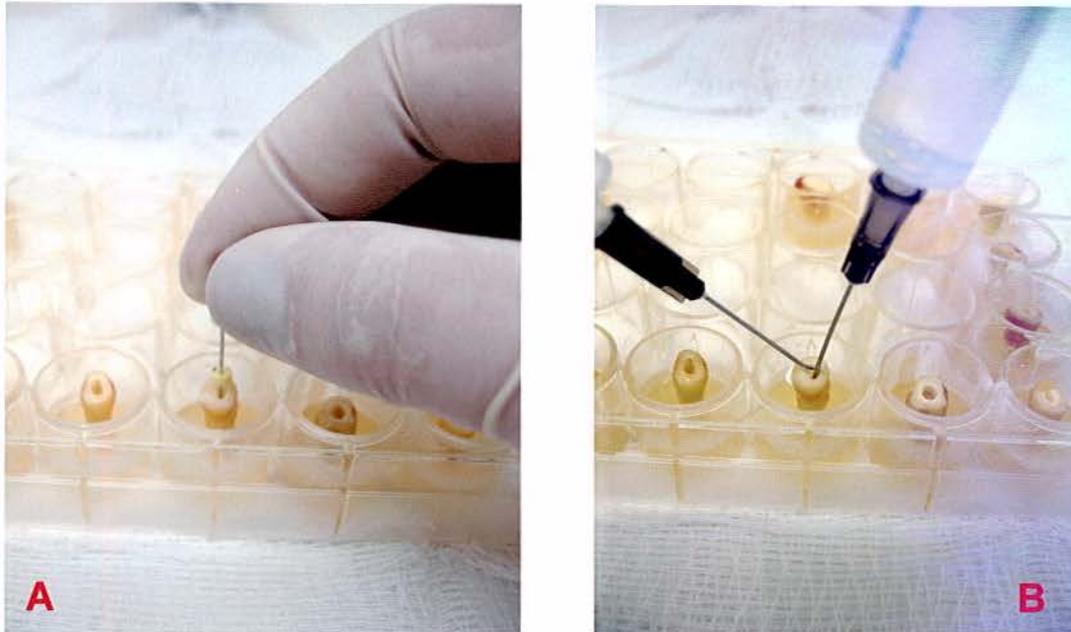


FIGURA 5 – Preparo biomecânico do canal radicular: A) Instrumentação com lima tipo Kerr; B) Irrigação e aspiração com auxílio de seringas apirogênicas de 5 mL.

Imediatamente após a instrumentação dos espécimes, em todos os canais radiculares foi realizada irrigação e aspiração com 3 mL de solução fisiológica apirogênica, para remoção do agente irrigante. Em seguida, os canais foram preenchidos com água apirogênica (Charles River Endosafe, Alko do Brasil, RJ, Brasil) e foram coletados 230  $\mu$ L do conteúdo do canal radicular (primeira coleta), com auxílio de uma seringa tipo insulina de 1 mL, para verificar a neutralização de endotoxinas. A seguir, os dentes foram novamente preenchidos com água apirogênica e selados com bolinha de algodão apirogênica. As placas contendo os espécimes foram fechadas, seladas com fita adesiva, embaladas em papel PVC e mantidas em estufa a temperatura de  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa 100% por sete dias. Decorrido este período, foi realizada a segunda coleta do conteúdo do canal radicular.

## 4.2 Verificação da neutralização de endotoxinas no canal radicular

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

Foram realizados dois testes para verificar a neutralização da endotoxina: o lisado de amebócitos de *Limulus* (análise qualitativa e semiquantitativa) e a produção de anticorpos em cultura de linfócitos B (análise quantitativa), tanto para o conteúdo do canal radicular coletado imediatamente como para o conteúdo coletado após sete dias.

### 4.2.1 Lisado de amebócito de *Limulus*

A neutralização do conteúdo de endotoxina foi verificada utilizando-se o método de geleificação do lisado de amebócito de *Limulus* (LAL). O *Limulus* é constituído por um lisado dos amebócitos circulantes de cavalos marinhos que, quando exposto a quantidades pequenas de endotoxinas, aumenta sua opacidade bem como sua viscosidade, tornando-se um gel duro (LEVIN & BANG<sup>67</sup>, 1968).

O lisado de *Limulus*, obtido do laboratório Charles River Endosafe (Alko do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil), é um teste semiquantitativo, que possui sensibilidade para detectar a presença de endotoxina a partir de 0,125 UI/mL. É composto por um frasco contendo o lisado em pó, o qual foi ressuspendido em 5,2 mL de água apirogênica e, em seguida, distribuído em tubos de vidro apirogênicos 10x75 mm (Charles River Endosafe, Alko do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil) (Figuras 6 e 7), sendo colocado 100 µL do lisado em cada tubo. Estes tubos contendo o lisado podem ser congelados por no máximo trinta dias até sua utilização.



FIGURA 6 – Lisado de amebócitos de Limulus e água apirrogênica (Charles River Endosafe).

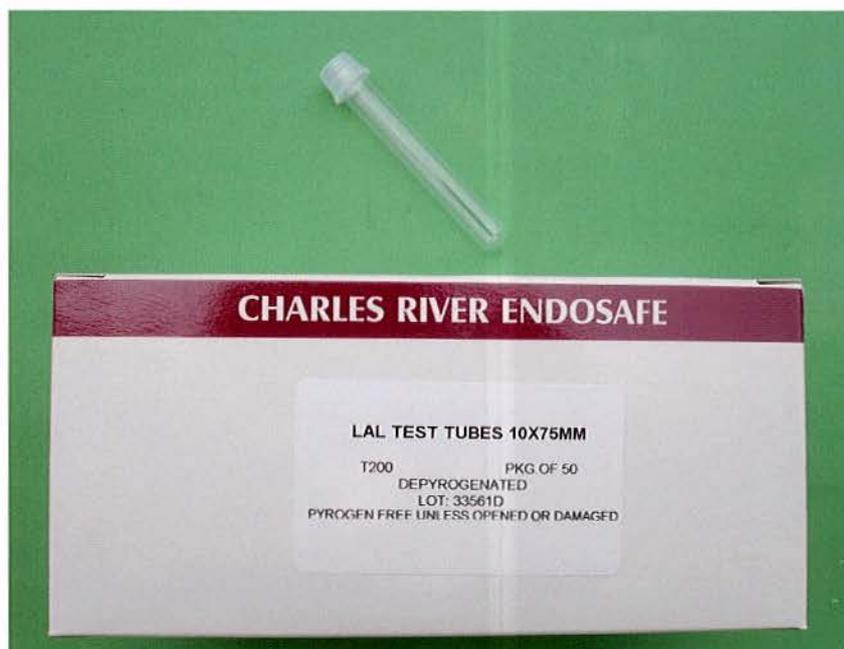


FIGURA 7 – Tubos de vidro apirrogênicos 10x75 mm (Charles River Endosafe) utilizados para o teste do lisado de amebócito de Limulus.

Nos dias do teste, imediatamente após o término do preparo biomecânico e após sete dias, uma alíquota de 100  $\mu$ L do conteúdo do canal radicular foi colocada num tubo apirrogênico contendo 100  $\mu$ L do

lisado de *Limulus*. O tubo foi agitado levemente e mantido em banho-maria a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  por 1 hora. Estes procedimentos foram repetidos para todos os espécimes. Após este período, foi verificada a formação ou não de gel inclinando-se os tubos (análise qualitativa).

Nos tubos em que foi detectada presença de endotoxina, o conteúdo final do canal radicular foi diluído várias vezes até não haver mais a formação de gel. A diluição foi feita da seguinte forma: em uma placa apirogênica de polistireno de 96 poços foram colocados 100  $\mu\text{L}$  de água apirogênica em cada poço da placa, sendo que no primeiro poço foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do conteúdo removido do canal radicular, sendo repassado 100  $\mu\text{L}$  desta mistura para o poço seguinte e, assim, foram realizadas nove diluições em base de dois para cada dente. Desta forma, o valor aproximado da quantidade de endotoxina presente no conteúdo coletado do canal radicular pôde ser obtido como demonstrado no Quadro 2 (análise semiquantitativa).

Quadro 2 - Esquema representativo da quantidade de endotoxina presente no canal radicular após cada diluição em base de dois a partir da amostra inicial

<b>Escores</b>	<b>Diluições</b>	<b>Endotoxina (UI)</b>
<b>0</b>	<b>0</b>	<b>&lt;0,125</b>
<b>1</b>	<b>1:2</b>	<b>0,125 – 0,249</b>
<b>2</b>	<b>1:4</b>	<b>0,250 – 0,499</b>
<b>3</b>	<b>1:8</b>	<b>0,5 – 0,999</b>
<b>4</b>	<b>1:16</b>	<b>1,0 – 1,999</b>
<b>5</b>	<b>1:32</b>	<b>2,0 – 3,999</b>
<b>6</b>	<b>1:64</b>	<b>4,0 – 7,999</b>
<b>7</b>	<b>1:128</b>	<b>8,0 – 15,999</b>
<b>8</b>	<b>1:256</b>	<b>16,0 – 31,999</b>
<b>9</b>	<b>1:512</b>	<b>32,0 – 40,0</b>

Os resultados deste teste foram submetidos à análise estatística pelo método não-paramétrico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn com nível de significância 5%.

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

Quatro camundongos (*Mus musculus*) Swiss machos de aproximadamente seis meses de idade foram sacrificados e o baço de cada animal foi retirado e macerado em um tubo cônico de plástico, esterilizado e apirogênico, com 3 mL de meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA), pH 7,2, para obtenção dos linfócitos B. A seguir, foi acrescentado ao tubo 27 mL de meio RPMI e este foi centrifugado por 10 min a 500 Xg. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento (Figura 8A) foi acrescentado mais 30 mL de meio RPMI e novamente centrifugado por 10 min a 500 Xg. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi acrescentado 30 mL de meio RPMI completo, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Sigma, St. Louis, USA).

Em seguida, foi realizada a contagem dos linfócitos em câmara de Neubauer, utilizando azul de tripan (Sigma, St Louis, USA) e tampão para promover o rompimento de eritrócitos. Após, foi colocada aproximadamente um milhão ( $1.10^6$ ) de células viáveis em cada poço da placa de polistireno (apirogênica) de 24 poços (Costar, New York, USA) (Figura 8B). Estas placas foram incubadas em estufa a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  contendo 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas. Após este período, foram colocados 30  $\mu\text{L}$  do conteúdo aspirado de cada canal radicular nos orifícios das placas contendo a cultura de linfócitos B. Estas placas foram novamente incubadas em estufa a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Decorridos quatro dias, foi realizado teste imunoenzimático (ELISA) para detectar a produção de anticorpos (IgM) pelas células na presença de endotoxina.

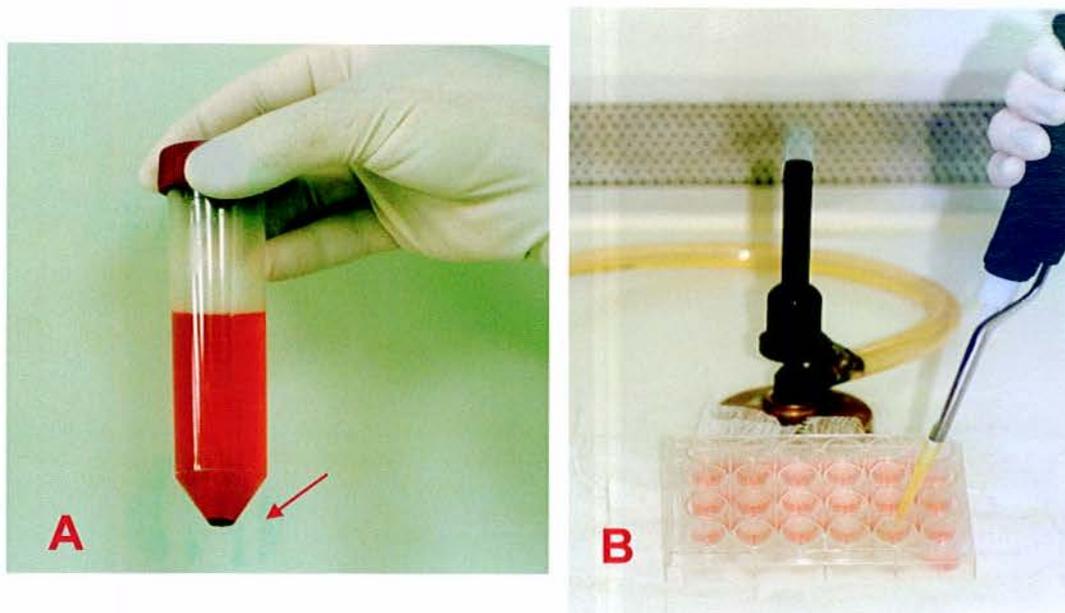


FIGURA 8 – Preparo de cultura de linfócitos B: A) células do baço sedimentadas em meio RPMI; B) placa de cultura de células contendo de linfócitos B.

#### 4.2.2.1 Teste ELISA

Oito placas de microtitulação de plástico flexível e fundo chato (Hemobag, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) de 96 poços foram sensibilizadas com conjugado anti-IgM de camundongo marcado com peroxidase (Sigma, St Louis, USA) na concentração 0,5 mg/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 2h e, em seguida, foi realizada inibição da peroxidase com azida 0,1% em PBS por 1h em temperatura ambiente.

No dia do teste, as placas foram bloqueadas com 0,5% de gelatina em PBS por 45 min a 37°C. A seguir, foi realizado outro bloqueio com soro albumina bovino (BSA) 0,2%, também permanecendo 45 min em estufa a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,2% de Tween-20 (PBS-T) e foram colocados 100  $\mu$ L do sobrenadante de cada poço da cultura de linfócitos nos orifícios das placas. Os testes foram realizados em duplicata. As placas foram

incubadas em estufa a 37°C por 2h e, logo após, foram lavadas abundantemente com PBS-T. A seguir, foram colocados 50 µL do conjugado anti-IgM de camundongo marcado com peroxidase (Sigma, St Louis, USA) na concentração 1/2000. As placas ficaram 1 h em estufa a 37°C e, em seguida, foram novamente lavadas abundantemente com PBS-T. Após, a reação foi revelada com um reagente composto de 36 mL de tampão citrato ácido cítrico 0,1M, 24 mg de ortofenildiamino (OPD-Sigma-USA) e 30 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% (100 µL em cada poço da placa) e, após 5 a 10 min, a reação foi bloqueada com 50 µL de ácido sulfúrico 2,5 N. As densidades ópticas (DO) foram lidas no leitor de microplacas (Biorad, Modelo 3550, Hercules, CA) com comprimento de onda de 490 nm. Obtendo-se os valores da densidade óptica, tanto da coleta imediata como da segunda coleta, foram feitas as médias para cada espécime e os resultados foram analisados estatisticamente, pela análise de variância ANOVA, com nível de significância de 5%, e pelo teste de Tukey.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Lisado de amebócito de Limulus

Os resultados obtidos pela análise qualitativa do teste do lisado de Limulus na primeira e segunda coleta estão apresentados nas Tabela 1 e 2, respectivamente. O sinal positivo significa presença de endotoxina (geleificação do lisado) e o sinal negativo ausência de endotoxina ou quantidade inferior a 0,125 UI (sem geleificação). As Figuras 9A e 9B ilustram a geleificação ou não do lisado de Limulus ocorrida nos grupos experimentais.

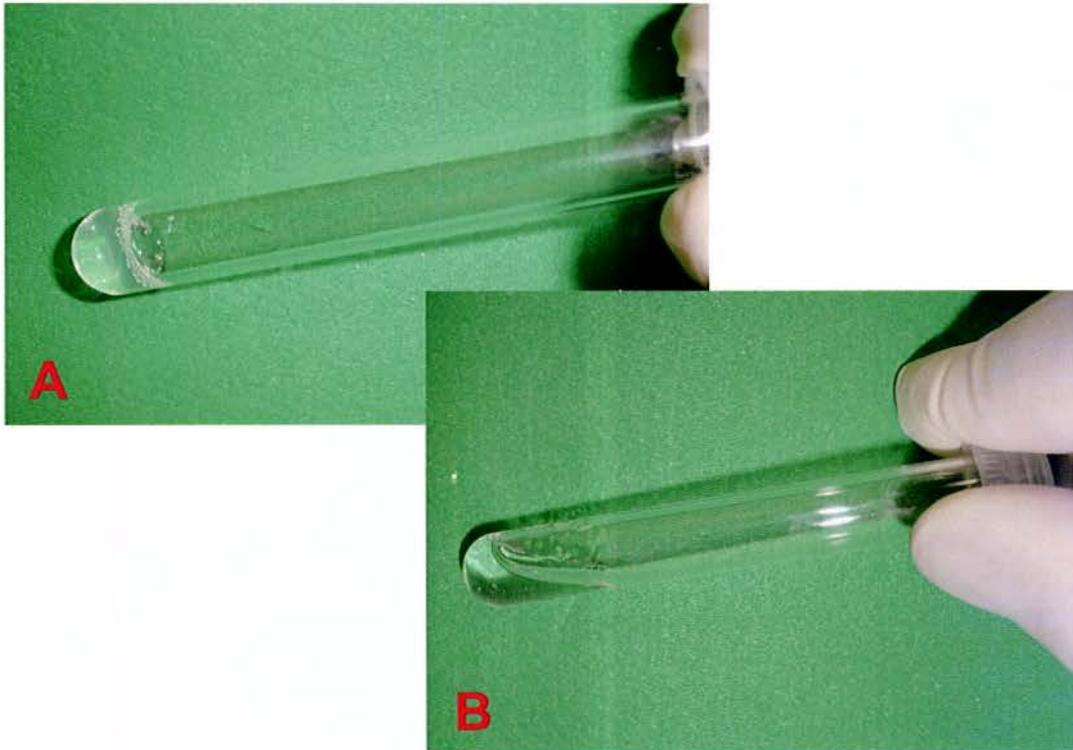


FIGURA 9 – Representação de um dos espécimes: A) em que houve geleificação do lisado de Limulus; B) em que não houve formação de gel duro.

Tabela 1 – Resultados do teste do lisado de amebócito de Limulus (análise qualitativa) obtidos na primeira coleta (imediate)

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
1	+	+	+	-	-	+	-
2	+	+	+	-	-	+	-
3	+	+	+	-	-	+	-
4	+	+	+	-	-	+	-
5	+	+	+	-	-	+	-
6	+	+	+	-	-	+	-
7	+	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	-	-	+	-
9	+	+	+	-	-	+	-
10	+	+	+	-	-	+	-
11	+	+	+	-	-	+	-
12	+	+	+	-	-	+	-
13	+	+	+	-	-	+	-
14	+	+	+	-	-	+	-

G1 (NaOCl 2,5%); G2 (NaOCl 5,25%); G3 (clorexidina 2%); G4 (Ca(OH)<sub>2</sub> 0,14%); G5 (polimixina B); G6 (controle positivo); G7 (controle negativo).

Tabela 2 – Resultados do teste do lisado de amebócito de Limulus (análise qualitativa) obtidos na segunda coleta (após sete dias)

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
1	+	+	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	+	+	-
6	+	+	+	+	+	+	-
7	+	+	+	+	+	+	-
8	+	+	+	+	+	+	-
9	+	+	+	-	+	+	-
10	+	+	+	+	+	+	-
11	+	+	+	+	+	+	-
12	+	+	+	+	+	+	-
13	+	+	+	+	+	+	-
14	+	+	+	+	+	+	-

G1 (NaOCl 2,5%); G2 (NaOCl 5,25%); G3 (clorexidina 2%); G4 (Ca(OH)<sub>2</sub> 0,14%); G5 (polimixina B); G6 (controle positivo); G7 (controle negativo).

Analisando-se as Tabelas 1 e 2, pôde-se verificar que houve diferenças significantes entre a coleta imediata e após sete dias para os grupos G4 (hidróxido de cálcio) e G5 (polimixina B), que apresentaram resultado negativo (ou seja, não formou gel duro – endotoxina < 0,125

UI/mL) na coleta imediata e resultado positivo em praticamente todos os espécimes na coleta após sete dias. Os demais grupos experimentais, G1 (NaOCl 2,5%), G2 (NaOCl 5,25%) e G3 (clorexidina 2%), apresentaram resultado positivo (presença de endotoxina) em todos os espécimes nas duas coletas, sendo estes resultados semelhantes ao grupo controle positivo. O grupo controle negativo apresentou resultado negativo em ambas as coletas.

Após diluições do conteúdo removido dos canais radiculares, os resultados obtidos pela análise semiquantitativa na primeira e segunda coleta estão apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Foram aplicados escores de acordo com o número de diluições, como demonstrado no Quadro 2.

Tabela 3 – Resultados (em escores) do teste de lisado de *Limulus* (análise semiquantitativa) obtidos na primeira coleta (imediata)

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
<b>1</b>	4	4	5	0	0	6	0
<b>2</b>	4	4	4	0	0	5	0
<b>3</b>	3	2	4	0	0	4	0
<b>4</b>	5	4	3	0	0	5	0
<b>5</b>	4	4	4	0	0	4	0
<b>6</b>	4	5	4	0	0	5	0
<b>7</b>	4	5	5	0	0	5	0
<b>8</b>	5	4	5	0	0	4	0
<b>9</b>	5	4	4	0	0	4	0
<b>10</b>	4	5	4	0	0	5	0
<b>11</b>	5	5	4	0	0	3	0
<b>12</b>	5	4	5	0	0	4	0
<b>13</b>	4	3	4	0	0	6	0
<b>14</b>	3	4	4	0	0	5	0

G1 (NaOCl 2,5%); G2 (NaOCl 5,25%); G3 (clorexidina 2%); G4 (Ca(OH)<sub>2</sub> 0,14%); G5 (polimixina B); G6 (controle positivo); G7 (controle negativo).

Tabela 4 – Resultados (em escores) do teste de lisado de Limulus (análise semiquantitativa) obtidos na segunda coleta (sete dias)

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
<b>1</b>	4	5	4	2	2	5	0
<b>2</b>	5	4	5	3	2	5	0
<b>3</b>	4	2	4	1	2	6	0
<b>4</b>	4	4	5	2	1	4	0
<b>5</b>	3	5	4	2	1	4	0
<b>6</b>	4	5	5	1	2	5	0
<b>7</b>	4	4	4	2	3	5	0
<b>8</b>	5	4	4	2	2	5	0
<b>9</b>	4	5	5	0	2	4	0
<b>10</b>	5	4	4	2	2	2	0
<b>11</b>	5	5	4	3	2	5	0
<b>12</b>	5	4	3	2	1	5	0
<b>13</b>	4	3	4	1	2	4	0
<b>14</b>	4	4	5	2	1	4	0

G1 (NaOCl 2,5%); G2 (NaOCl 5,25%); G3 (clorexidina 2%); G4 (Ca(OH)<sub>2</sub> 0,14%); G5 (polimixina B); G6 (controle positivo); G7 (controle negativo).

Com base na Tabela 3, pôde-se verificar que, na primeira coleta, os grupos G4 (hidróxido de cálcio) e G5 (polimixina B) apresentaram escore zero (quantidade de endotoxina inferior a 0,125 UI/mL) em todos os espécimes, sendo semelhantes ao G7 (controle negativo). Grupos G1 (NaOCl 2,5%), G2 (NaOCl 5,25%), G3 (clorexidina 2%) e G6 (controle positivo) apresentaram formação de gel duro em todos os espécimes, com escores variados entre eles.

Aplicando-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, verificou-se diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Através do teste de Dunn, pôde-se visualizar estas diferenças (Tabela 5), sendo os grupos

G1, G2, G3 e G6 semelhantes entre si e diferentes dos demais ( $p < 0,05$ ) e os grupos G4, G5 e G7 semelhantes entre si e diferentes dos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Os valores da mediana apresentados pelos grupos na coleta imediata e a formação de grupos homogêneos estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores da mediana apresentados por cada grupo experimental (primeira coleta) e representação dos grupos homogêneos

GRUPOS	MEDIANA	Grupos homogêneos*
G1 (NaOCl 2,5%)	4	A
G2 (NaOCl 5,25%)	4	A
G3 (clorexidina 2%)	4	A
G4 (Ca(OH) <sub>2</sub> 0,14%)	0	B
G5 (polimixina B)	0	B
G6 (controle positivo)	5	A
G7 (controle negativo)	0	B

\*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Com base na Tabela 4, pôde-se verificar que, na segunda coleta, os grupos G4 (hidróxido de cálcio) e G5 (polimixina B) apresentaram formação de gel duro em praticamente todos os espécimes, com escores variando de 1 a 3 (quantidade de endotoxina de 0,125 a 0,999 UI), resultados diferentes ao da primeira coleta. O grupo G7 (controle negativo) continuou apresentando escore zero em todos os espécimes. Os grupos G1 (NaOCl 2,5%), G2 (NaOCl 5,25%), G3 (clorexidina 2%) e G6 (controle positivo) continuaram apresentando formação de gel duro em todos os espécimes, com variados escores entre eles.

Aplicando-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, verificou-se diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Através do teste de

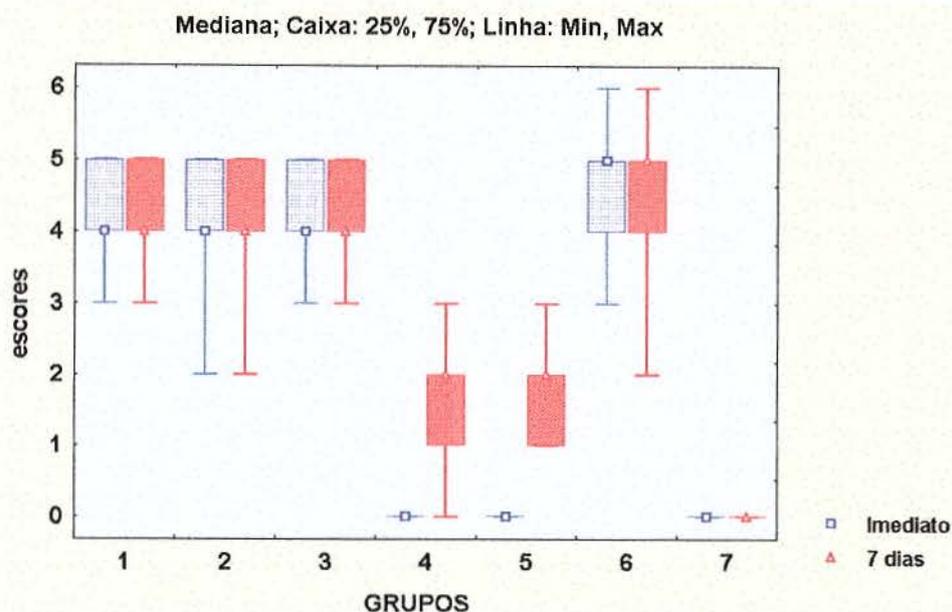
Dunn, pôde-se visualizar estas diferenças (Tabela 6). Embora os grupos G4 e G5 tenham apresentado formação de gel duro em praticamente todos os espécimes, suas diluições foram pequenas, o que representa baixa quantidade de endotoxina em suas amostras, não apresentando diferença significativa em relação ao G7 (controle negativo) ( $p>0,05$ ). Os grupos G1, G2, G3 e G6 apresentaram valores superiores de LPS, sendo semelhantes entre si e significativamente diferentes dos demais grupos ( $p<0,05$ ). Os valores da mediana apresentados pelos grupos na coleta após sete dias e a formação de grupos homogêneos estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6 – Valores da mediana apresentados por cada grupo experimental (segunda coleta) e representação dos grupos homogêneos

GRUPOS	MEDIANA	Grupos homogêneos*
G1 (NaOCl 2,5%)	4	A
G2 (NaOCl 5,25%)	4	A
G3 (clorexidina 2%)	4	A
G4 (Ca(OH) <sub>2</sub> 0,14%)	2	B
G5 (polimixina B)	2	B
G6 (controle positivo)	5	A
G7 (controle negativo)	0	B

\*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Os resultados obtidos pelos grupos experimentais na coleta imediata e após sete dias estão representados no esquema dos cinco números (*Box-Plot*): mediana, caixas 25% e 75%, linhas mínima e máxima (Figura 10).



G1 (NaOCl 2,5%); G2 (NaOCl 5,25%); G3 (clorexidina 2%); G4 ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$  0,14%); G5 (polimixina B); G6 (controle positivo); G7 (controle negativo).

FIGURA 10 – Esquema dos cinco números (*Box-Plot*) dos dados em escores obtidos pelos grupos experimentais na coleta imediata e após sete dias, pelo lisado de *Limulus*.

## 5.2 Produção de anticorpos em cultura de linfócitos B

Com relação ao teste imunoenzimático (ELISA) para verificar a produção de anticorpos, os resultados obtidos da densidade óptica (DO) na primeira e segunda coleta estão apresentados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente. Neste teste, foi adicionado um grupo controle (G8), contendo apenas a cultura celular pura, sem estimulação pelo conteúdo coletado dos canais radiculares.

Tabela 7 – Valores médios de densidade óptica (DO) apresentados por cada espécime dos grupos experimentais (primeira coleta)

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
<b>1</b>	0,671	0,496	0,676	0,311	0,324	0,661	0,293	0,254
<b>2</b>	0,731	0,690	0,725	0,240	0,311	0,581	0,422	0,286
<b>3</b>	0,572	0,658	0,582	0,258	0,314	0,736	0,307	0,277
<b>4</b>	0,621	0,547	0,565	0,432	0,233	0,653	0,310	0,276
<b>5</b>	0,579	0,548	0,677	0,334	0,405	0,651	0,348	0,331
<b>6</b>	0,617	0,662	0,580	0,326	0,249	0,580	0,299	0,352
<b>7</b>	0,730	0,657	0,640	0,292	0,426	0,695	0,323	0,311
<b>8</b>	0,571	0,674	0,665	0,257	0,348	0,728	0,250	0,285
<b>9</b>	0,655	0,682	0,757	0,274	0,262	0,809	0,299	0,190
<b>10</b>	0,660	0,584	0,591	0,338	0,281	0,579	0,309	0,301
<b>11</b>	0,546	0,731	0,685	0,224	0,326	0,647	0,321	0,285
<b>12</b>	0,710	0,564	0,647	0,328	0,325	0,738	0,415	0,293
<b>13</b>	0,673	0,707	0,668	0,330	0,309	0,662	0,332	0,272
<b>14</b>	0,603	0,599	0,602	0,189	0,245	0,705	0,234	0,185

G1 (NaOCl 2,5%); G2 (NaOCl 5,25%); G3 (clorexidina 2%); G4 (Ca(OH)<sub>2</sub>); G5 (polimixina B); G6 (controle positivo); G7 (controle negativo); G8 (controle cultura celular).

Tabela 8 – Valores médios de densidade óptica (DO) apresentados por cada espécime dos grupos experimentais (segunda coleta)

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
<b>1</b>	0,552	0,472	0,525	0,430	0,373	0,643	0,250	0,254
<b>2</b>	0,652	0,544	0,592	0,394	0,508	0,677	0,301	0,278
<b>3</b>	0,567	0,586	0,640	0,449	0,353	0,556	0,365	0,239
<b>4</b>	0,562	0,546	0,679	0,381	0,386	0,567	0,234	0,189
<b>5</b>	0,625	0,616	0,705	0,401	0,465	0,672	0,286	0,321
<b>6</b>	0,718	0,729	0,599	0,337	0,293	0,531	0,338	0,198
<b>7</b>	0,473	0,537	0,587	0,424	0,283	0,685	0,277	0,263
<b>8</b>	0,583	0,693	0,634	0,372	0,449	0,698	0,273	0,337
<b>9</b>	0,731	0,621	0,703	0,224	0,456	0,571	0,334	0,192
<b>10</b>	0,548	0,571	0,701	0,403	0,415	0,714	0,288	0,260
<b>11</b>	0,668	0,593	0,589	0,397	0,378	0,639	0,267	0,279
<b>12</b>	0,566	0,614	0,621	0,504	0,429	0,735	0,296	0,327
<b>13</b>	0,553	0,701	0,645	0,411	0,421	0,751	0,289	0,284
<b>14</b>	0,653	0,556	0,573	0,435	0,531	0,632	0,276	0,273

G1 (NaOCl 2,5%); G2 (NaOCl 5,25%); G3 (clorexidina 2%); G4 (Ca(OH)<sub>2</sub>); G5 (polimixina B); G6 (controle positivo); G7 (controle negativo); G8 (controle cultura celular).

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando os programas computacionais STATISTICA (versão 5.5, StatSoft Inc., 2000) e STATISTIX (versão 8.0, Analytical Software, 2003). Foi realizada estatística descritiva, sendo os valores médios de densidade óptica (DO) e os desvios-padrão obtidos por cada grupo experimental na primeira e segunda coleta demonstrados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente.

Como a amostragem foi composta por 112 dados (em cada coleta), pôde-se supor com 95% de confiança, que os mesmos possuem distribuição normal considerando-se o teorema do limite central, sendo o nível de significância de 5%. Pela Análise de Variância (ANOVA), verificou-se diferenças significativas entre os oito grupos ( $p < 0,05$ ). Para

identificar estas diferenças foi realizado o teste de comparação múltipla de Tukey.

Analisando-se os resultados da primeira coleta, pôde-se verificar que os grupos G1 (NaOCl 2,5%), G2 (NaOCl 5,25%), G3 (clorexidina 2%) e G6 (controle positivo) são semelhantes entre si ( $p>0,05$ ) e diferentes dos demais grupos ( $p<0,05$ ). Os grupos G4 (hidróxido de cálcio) e G5 (polimixina B) são semelhantes entre si ( $p>0,05$ ), semelhantes aos controles G7 (controle negativo) e G8 (controle da cultura celular) ( $p>0,05$ ) e diferentes dos demais grupos ( $p<0,05$ ) (Tabela 9).

Tabela 9 – Valores médios de densidade óptica (DO)  $\pm$  desvio-padrão apresentados por cada grupo na primeira coleta (imediate) e representação dos grupos homogêneos

GRUPOS	DO $\pm$ desvio-padrão	Grupos homogêneos*
G1 (NaOCl 2,5%)	0,638 $\pm$ 0,060	A
G2 (NaOCl 5,25%)	0,628 $\pm$ 0,071	A
G3 (clorexidina 2%)	0,647 $\pm$ 0,057	A
G4 (Ca(OH) <sub>2</sub> 0,14%)	0,292 $\pm$ 0,060	B
G5 (polimixina B)	0,311 $\pm$ 0,056	B
G6 (controle positivo)	0,673 $\pm$ 0,067	A
G7 (controle negativo)	0,318 $\pm$ 0,051	B
G8 (controle cultura celular)	0,278 $\pm$ 0,045	B

\*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Analisando-se os resultados da segunda coleta (sete dias), pôde-se verificar que os grupos G1 (NaOCl 2,5%), G2 (NaOCl 5,25%), G3 (clorexidina 2%) e G6 (controle positivo) continuam semelhantes entre si ( $p>0,05$ ) e diferentes dos demais grupos ( $p<0,05$ ). Já os grupos G4 (hidróxido de cálcio) e G5 (polimixina B) são semelhantes entre si ( $p>0,05$ ), diferentes dos controles G7 (controle negativo) e G8 (controle

da cultura celular) ( $p < 0,05$ ) e também diferentes dos demais grupos experimentais ( $p < 0,05$ ) (Tabela 10).

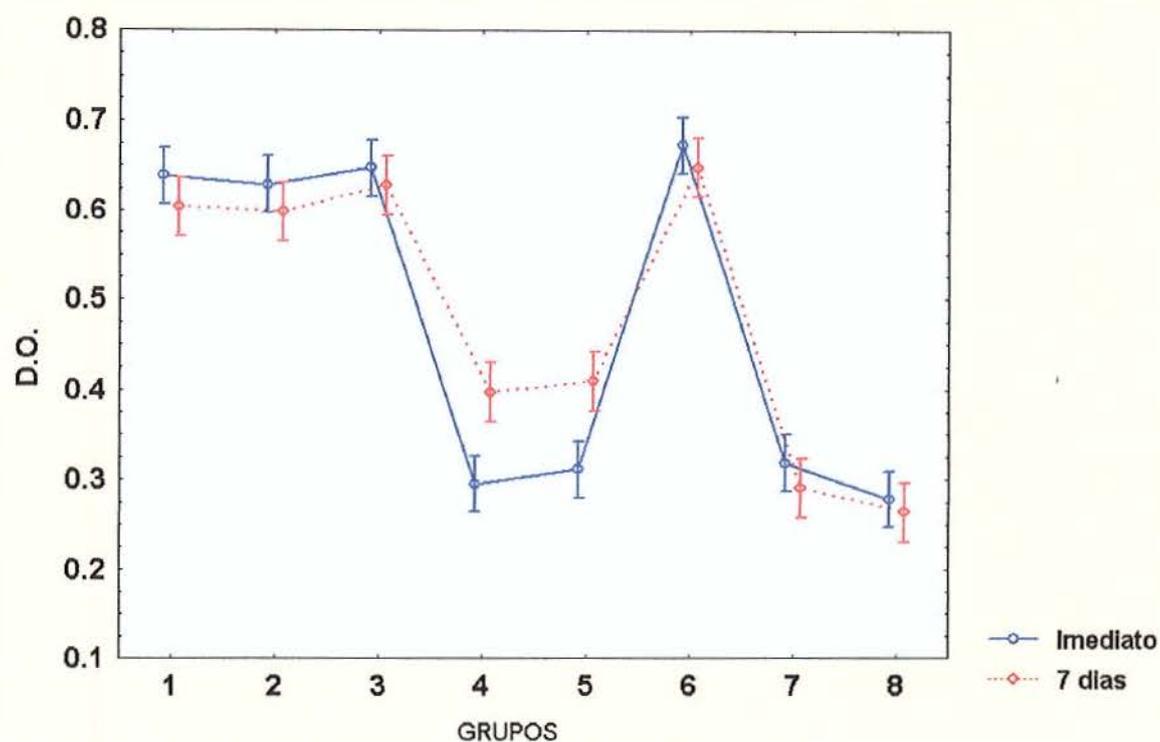
Tabela 10 – Valores médios de densidade óptica (DO)  $\pm$  desvio-padrão apresentados por cada grupo na segunda coleta (sete dias) e representação dos grupos homogêneos

GRUPOS	DO $\pm$ desvio-padrão	Grupos homogêneos*
G1 (NaOCl 2,5%)	0,603 $\pm$ 0,072	A
G2 (NaOCl 5,25%)	0,598 $\pm$ 0,071	A
G3 (clorexidina 2%)	0,628 $\pm$ 0,054	A
G4 (Ca(OH) <sub>2</sub> 0,14%)	0,397 $\pm$ 0,063	B
G5 (polimixina B)	0,410 $\pm$ 0,072	B
G6 (controle positivo)	0,647 $\pm$ 0,069	A
G7 (controle negativo)	0,291 $\pm$ 0,035	C
G8 (controle cultura celular)	0,263 $\pm$ 0,047	C

\*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Comparando-se os grupos em função do tempo (imediate e sete dias), pôde-se verificar que apenas os grupos G4 (hidróxido de cálcio) e G5 (polimixina B) apresentaram resultados significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre a primeira e segunda coleta.

A Figura 11 apresenta os valores médios de densidade óptica e desvio-padrão obtidos pelos grupos experimentais na coleta imediata e após sete dias. Observou-se diferença significativa entre os grupos G4 (hidróxido de cálcio) e G5 (polimixina B).



G1 (NaOCl 2,5%); G2 (NaOCl 5,25%); G3 (clorexidina 2 %); G4 (Ca(OH)<sub>2</sub> 0,14%); G5 (polimixina B); G6 (controle positivo); G7 (controle negativo).

FIGURA 11 - Representação gráfica dos valores médios de densidade óptica e desvio-padrão obtidos pelos grupos experimentais na coleta imediata e após sete dias, pelo ELISA.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Da metodologia

Pesquisas *in vitro* com a utilização de dentes humanos enfrentam dificuldades em relação à questão ética, à dificuldade de obtenção dos mesmos e à padronização da amostra. Quanto à ética, utilizou-se neste trabalho dentes extraídos em clínicas odontológicas particulares e populares, por motivos diversos e com prévia autorização dos pacientes através do consentimento livre e esclarecido. Referente à padronização da amostra, existem dificuldades relativas à idade do dente, quantidade de dentina esclerosada, variações anatômicas, principalmente na região apical, como delta apical, presença de canais secundários e acessórios e crateras de reabsorção. Assim, nesta pesquisa, os 3 mm apicais foram removidos a fim de minimizar tais variações anatômicas e a coroa foi seccionada padronizando o tamanho dos espécimes em 14 mm. Os espécimes foram inicialmente instrumentados até lima Kerr nº 30 para padronizar o diâmetro do canal radicular. Foi realizada vedação da região apical com resina fotopolimerizável para impossibilitar a saída da endotoxina e dos agentes irrigantes durante a instrumentação e a raiz foi impermeabilizada externamente com resina epóxi para garantir perfeito vedamento.

Os espécimes e todo material utilizado na pesquisa como pinças, tesouras, exploradores, limas, algodão e gaze, foram detoxificados pela radiação gama cobalto 60. Estudos de Csako et al.<sup>22</sup> (1983) e Snyder et al.<sup>111</sup> (1986) verificaram que a radiação gama com cobalto 60 neutraliza pirógenos. Csako et al.<sup>22</sup> (1983) indicaram que a

detoxificação é provavelmente devido a múltiplos efeitos da radiação sobre LPS, envolvendo destruição da porção polissacarídica e alteração do lipídio A, responsável pela toxicidade do LPS. Assim, para eliminar endotoxinas pré-existentes, todo material usado na pesquisa foi encaminhado à EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiação) para realizar tal procedimento.

A endotoxina utilizada foi de *Escherichia coli*, por ser uma endotoxina padrão, utilizada na maioria dos trabalhos relatados na literatura (GALANOS et al.<sup>38</sup>, 1985; GOUGH et al.<sup>41</sup>, 1996; BARTHEL<sup>6</sup> 1997; HAIGHT-PONCE et al.<sup>44</sup>, 1999; PETSCH & ANSPACH<sup>90</sup>, 2000; SOUZA<sup>113</sup>, 2000; PARVIAINEN et al.<sup>89</sup>, 2001; OLIVEIRA<sup>85</sup>, 2002; OLIVEIRA et al.<sup>86</sup>, 2003). Quimicamente, as endotoxinas são lipopolissacarídeos que consistem de três partes distintas. O componente lipídico não-polar é chamado lipídio A, além dele existe um corpo oligossacarídico e outro heteropolissacarídico, representado pelo antígeno O de superfície. O antígeno O é formado por repetidas unidades oligossacarídicas, que são específicas de um grupo e determinadas pela identidade da respectiva bactéria, ou seja, esta região é única para cada cepa bacteriana (RIETSCHEL et al.<sup>93</sup>, 1993). Os defeitos genéticos não diminuem a viabilidade do microrganismo nem o potencial biológico da endotoxina (PETSCH & ANSPACH<sup>90</sup>, 2000). O corpo oligossacarídico tem uma estrutura conservada com uma região de KDO (ácido 2-keto-3-deoxioctônico)-heptose interna e uma região hexose externa. Em espécies de *E. coli* são demonstrados até cinco tipos diferentes de corpos e em espécies de *Salmonella* há apenas uma estrutura corpórea. Contudo, o lipídio A é o principal responsável pela atividade endotóxica do LPS e sua estrutura primária é bem conservada entre as diferentes espécies de bactérias Gram-negativas (NAKANO et al.<sup>79</sup>, 1975; KIRIKAE et al.<sup>55</sup>, 1997). O lipídio A carrega um total de carga negativa devido à presença de três grupos fosforila e dois a três grupos carboxila associados com a região interna do corpo, e mais dois grupos fosforila

associados com a parte dissacarídica do lipídio A (RIETSCHEL et al.<sup>93</sup>, 1993). Assim, mesmo que *E. coli* não seja uma bactéria comumente encontrada no interior dos canais radiculares com polpa necrosada, sua endotoxina apresenta a estrutura básica do componente lipídico, que representa o centro ativo responsável pelas propriedades tóxicas do LPS.

A endotoxina foi inoculada no canal radicular e esperou-se o período de 24 horas para iniciar a instrumentação dos canais, pois, segundo Oliveira et al.<sup>86</sup> (2003), este é o período de tempo necessário para endotoxina difundir-se pelos túbulos dentinários em direção ao cimento.

Com relação aos agentes irrigantes, houve interesse em avaliar o hidróxido de cálcio, pois como medicação de demora, por sete até sessenta dias, ele tem apresentado importante eficiência em neutralizar endotoxinas inoculadas nos canais radiculares tanto em estudos *in vitro* (SAFAVI & NICHOLS<sup>98-9</sup>, 1993 e 1994; BARTHEL et al.<sup>6</sup>, 1997; OLIVEIRA<sup>85</sup>, 2002; JIANG et al.<sup>59</sup>, 2003) como em estudos *in vivo* (SILVA et al.<sup>104</sup>, 2002; NELSON-FILHO et al.<sup>81</sup>, 2002; TANOMARU et al.<sup>129</sup>, 2003). Entretanto, não foi verificada na literatura trabalhos que avaliassem a eficácia do hidróxido de cálcio como agente irrigante em neutralizar LPS, por este motivo, foi incluído no presente estudo o hidróxido de cálcio na forma de água de cal,  $\text{Ca(OH)}_2$  pró-análise dissolvido em água apirogênica na concentração 0,14% (LEONARDO & LEAL<sup>62</sup>, 1998), como solução irrigadora.

Segundo Oliveira<sup>85</sup> (2002), a polimixina B como medicação intracanal (sete dias) também foi capaz de neutralizar endotoxinas inoculadas nos canais radiculares, o que tornou interessante avaliar sua eficácia como agente irrigante. A polimixina B utilizada neste estudo foi manipulada na Farmácia de manipulação Ophtalmos Fórmulas Oficiais Ltda (São Paulo – Brasil), sob a forma de colírio, contendo 1 mg/mL de sulfato de polimixina B, o que corresponde a 10.000 UI, mesma

concentração presente nas soluções otológicas. Desta forma, os canais radiculares do grupo 5 foram irrigados com tal medicação.

As demais soluções irrigadoras (hipoclorito de sódio e clorexidina) foram incluídas no estudo, pois são as mais comumente utilizadas na clínica endodôntica, apresentando importantes efeitos antimicrobianos (YESILSOY et al.<sup>142</sup>, 1995; AYHAN et al.<sup>4</sup>, 1999; ROSSI et al.<sup>97</sup>, 2002; MENEZES et al.<sup>71</sup>, 2004). As soluções de hipoclorito de sódio foram testadas nas concentrações mais altas (2,5% e 5,25%) utilizadas no tratamento de dentes com necrose pulpar e periodontite apical, para verificar sua real eficácia sobre LPS. Se nestas concentrações, o hipoclorito de sódio tivesse neutralizado LPS, seria interessante analisar concentrações mais baixas (0,5% e, principalmente, 1%), que são mais frequentemente utilizadas durante o preparo biomecânico do canal radicular. Foi também utilizada solução de clorexidina a 2%, pois, além de apresentar efeitos residuais no sistema de canais radiculares até 48 horas (LEONARDO et al.<sup>65</sup>, 1999), a eficácia antimicrobiana nesta concentração foi comparada à do hipoclorito de sódio 5,25% (JEANSONNE & WHITE<sup>56</sup>, 1994), sendo interessante comparar também a efetividade destas duas substâncias sobre LPS.

Dentre os vários métodos para detectar endotoxinas, o de geleificação do lisado de amebócito de *Limulus* (LAL) é o mais sensível e o mais econômico (PETSCH & ANSPACH<sup>90</sup>, 2000). O LAL foi introduzido na rotina de laboratório pelos trabalhos de Levin & Bang<sup>67</sup> (1968). Quando comparado ao teste oficial de coelho USP, que tem sido historicamente utilizado para testes de pirógenos, o LAL não só é mais sensível como também é mais simples, mais rápido e menos dispendioso (TOMASULO et al.<sup>131</sup>, 1977). Este reagente é preparado de um lisado dos amebócitos circulantes de cavalos marinhos, *Limulus polyphemus*, e quando exposto a uma quantidade mínima de endotoxina, o lisado aumenta sua opacidade bem como sua viscosidade formando um gel duro (LEVIN & BANG<sup>67</sup>, 1968).

O LAL possui sensibilidade para detectar até 0,02 UI/mL de endotoxina (PETSCH & ANSPACH<sup>90</sup>, 2000). Na presente pesquisa, o LAL utilizado apresentava capacidade para detectar a partir de 0,125 UI/mL. Desta forma, desenvolvemos um método capaz de semiquantificar endotoxina restante no canal radicular a partir de diluições do conteúdo do canal, quando este apresentava resultados positivos no teste de geleificação (presença de quantidade superior a 0,125 UI/mL). Assim, com base no Quadro 2, nos casos, por exemplo, em que foram necessárias 32 diluições (score 5) do conteúdo do canal para não haver mais geleificação do lisado de *Limulus*, pôde-se afirmar que a quantidade restante de endotoxina no canal equivale ao intervalo de 2,0 a 3,999 UI/mL. Existe no mercado um teste cromogênico do lisado de *Limulus* que permite quantificar endotoxinas com maior precisão. Este teste é utilizado por muitos autores (HAIGH-PONCE et al.<sup>44</sup>, 1999; KHABBAZ et al.<sup>53-4</sup>, 2000 e 2001; SOUZA<sup>113</sup>, 2000), entretanto, por ser um método muito dispendioso, que requer equipamentos específicos, não foi aplicado na atual pesquisa. Contudo, para atender a proposta deste estudo, a análise semiquantitativa foi suficiente para verificar quais agentes irrigantes são efetivos contra LPS.

Embora o LAL seja o método mais sensível e confiável no monitoramento de endotoxina, muitas substâncias podem interferir, causando resultados falso negativos ou falso positivos. Os resultados falso positivos podem ser causados pela presença na amostra de tripsina ou enzimas ligadas à tripsina (TAI et al.<sup>122</sup>, 1977), trombina, tromboplastina, polinucleotídeos e ribonuclease (ELIN & WOLFF<sup>30</sup>, 1973). Os resultados falso negativos podem ser atribuídos a inibidores da tripsina, EDTA e outros reagentes ligados ao cálcio (LEVIN & BANG<sup>67</sup>, 1968), alta concentração de sal (NANDAN & BROW<sup>80</sup>, 1977) e penicilinas semisintéticas (RHODES et al.<sup>96</sup>, 1974, citado por Sigma<sup>103</sup>, 2001).

No presente trabalho, após a instrumentação do canal radicular, o mesmo foi irrigado com 3 mL de solução fisiológica

apirrogênica, para remover resíduos dos agentes irrigantes. O grupo irrigado com hidróxido de cálcio (água de cal), por exemplo, poderia apresentar resultados falso negativos devido ao alto pH da solução e a presença de íons cálcio. Para contornar o problema procedeu-se a outro teste, o da produção de anticorpos por linfócitos B em cultura. O grupo tratado com o hidróxido de cálcio estimulou uma pequena produção de anticorpos por estas células, principalmente na primeira coleta, sem induzir morte celular ou efeitos tóxicos devido ao pH. Assim, comprovou-se a neutralização da endotoxina e a regularização do pH pela irrigação final com solução fisiológica apirrogênica.

Nesta pesquisa utilizou-se o teste de ativação celular, pois um dos efeitos biológicos causados pelo LPS é a ativação policlonal de linfócitos B, assim, estas células, na presença de endotoxina, proliferam e produzem anticorpos, que foram detectados pelo teste ELISA. A ativação policlonal de células B, *in vitro* e em ratos, geralmente aumenta mais a síntese de IgM que a de IgG (CLAGETT et al.<sup>19</sup>, 1980, citado por ITO et al.<sup>51</sup>, 1988). Desta forma, neste estudo foi detectado o aumento da produção de anticorpos da classe IgM usando conjugado anti-IgM de camundongo. A adição deste método de avaliação foi muito importante, pois após instrumentação e ação dos agentes irrigantes, pode haver redução significativa de LPS, verificada pelo lisado de Limulus, entretanto, será que após a ação de irrigantes efetivos, uma pequena quantidade de endotoxina restante no canal ainda pode causar efeitos biológicos, como ativação celular?

## 6.2 Dos resultados

De acordo com os resultados obtidos com o uso do hidróxido de cálcio e da polimixina B como agentes irrigantes, na primeira coleta (imediate), pôde-se verificar que estes dois grupos não apresentaram formação de gel duro, referente à presença de endotoxina, em nenhum

dos espécimes testados, apresentando também os menores valores de D.O., indicando uma produção de anticorpos similar aos grupos controles negativos G7 e G8 (cultura pura, sem endotoxina e sem espécime teste). Estes resultados concordam com os de outros autores que, utilizando metodologias diferentes, constataram *in vitro* que o hidróxido de cálcio pode alterar as propriedades biológicas do LPS (SAFAVI & NICHOLS<sup>98</sup>, 1993; SAFAVI & NICHOLS<sup>99</sup>, 1994; BARTHEL et al.<sup>6</sup>, 1997, NELSON-FILHO et al.<sup>81</sup>, 2002; OLIVEIRA<sup>85</sup>, 2002) e com os estudos que demonstraram a eficácia da polimixina B no tratamento de sepsis por microrganismos Gram-negativos e de choque endotóxico (RIFKIND<sup>94</sup>, 1967; PARVIAINEN et al.<sup>89</sup>, 2001; TANI et al.<sup>127</sup>, 2001). Estes resultados demonstraram que tanto a irrigação dos canais radiculares com água de cal ( $\text{Ca(OH)}_2$  0,14%) como com polimixina B foi eficiente em reduzir significativamente a quantidade de endotoxinas presentes na luz do canal. Entretanto, após o período de sete dias, na segunda coleta, foi verificada presença de endotoxinas em praticamente todos os espécimes do G4 (hidróxido de cálcio) e G5 (polimixina B). Após a realização das diluições, constatou-se pelo lisado de *Limulus* que a quantidade de LPS detectada nestes grupos variava de 0,125 a 0,999 UI/mL (escores 1 a 3). Estes resultados não apresentaram diferença significante em relação ao grupo controle negativo G7 ( $p < 0,05$ ), demonstrando que a quantidade de LPS restante no canal radicular não foi significativa. Entretanto, pelo teste de ativação celular, pôde-se verificar que o conteúdo coletado dos canais radiculares dos grupos G4 e G5 após sete dias estimulou maior produção de anticorpos pelos linfócitos B, sendo que os resultados da D.O. apresentados por estes grupos foram superiores aos grupos controles negativos G7 e G8 (controle da cultura pura) com diferença estatística significante ( $p < 0,05$ ), porém inferiores aos demais grupos experimentais ( $p < 0,05$ ). Na presente pesquisa, o teste biológico, de ativação celular, mostrou maior sensibilidade que o de geleificação do lisado de *Limulus*.

Desta forma, pode-se afirmar que a irrigação do canal radicular com hidróxido de cálcio ou polimixina B reduz significativamente a quantidade de LPS em relação aos demais agentes irrigantes testados, entretanto, não elimina completamente, sendo que a quantidade de endotoxina restante apresenta ainda capacidade de ativar linfócitos B, embora significativamente inferior à ativação obtida pelos grupos do hipoclorito de sódio e clorexidina..

Com estes resultados, foi demonstrado que o hidróxido de cálcio e polimixina B apresentam capacidade de neutralizar endotoxinas, o que foi detectado na primeira coleta, entretanto, durante o preparo biomecânico, as soluções irrigadoras provavelmente não penetram em profundidade nos túbulos dentinários a fim de atuar sobre LPS presentes nestas porções mais distantes. Com isso, após sete dias, foi possível detectar LPS restante na luz do canal. Vahdaty et al.<sup>133</sup> (1993) analisaram a capacidade da irrigação com clorexidina e hipoclorito de sódio em desinfetar túbulos dentinários e verificaram eficácia nos primeiros 100 µm de profundidade dos túbulos, entretanto, em níveis mais profundos os agentes irrigantes foram pouco efetivos, pois não conseguiram penetrar em profundidade suficiente no tempo avaliado. Assim, o hidróxido de cálcio e a polimixina B apresentaram importante ação sobre LPS, porém, a irrigação não foi suficiente para atingir todo LPS contido nos túbulos dentinários. Contudo, como a quantidade de endotoxina remanescente nestes grupos foi significativamente inferior a dos demais grupos experimentais (hipoclorito de sódio e clorexidina), pode-se afirmar que o hidróxido de cálcio e polimixina B são efetivos sobre LPS.

Safavi & Nichols<sup>98</sup>, em 1993, mostraram que o LPS tratado com hidróxido de cálcio libera quantidades elevadas de ácidos graxos livres, resultantes da hidrólise da porção lipídica da endotoxina. Estes resultados sugeriram que a degradação do LPS mediada pelo hidróxido de cálcio pode ser uma importante causa dos efeitos benéficos obtidos com o uso do hidróxido de cálcio na prática endodôntica. Segundo Safavi & Nichols<sup>99</sup>

(1994), a produção de prostaglandina  $E_2$  foi inibida em cultura de monócitos estimulados com LPS tratado com hidróxido de cálcio. Esses experimentos sugeriram que as propriedades biológicas do LPS requerem a presença de ácidos graxos hidroxilados ligados a junção éster e estas ligações são rompidas pelo tratamento com o hidróxido de cálcio. Em 1997, Barthel et al.<sup>6</sup> também avaliaram a capacidade do hidróxido de cálcio em neutralizar a atividade biológica de endotoxinas bacterianas, e concluíram que LPS de *E. coli* tratado com hidróxido de cálcio não estimula produção de TNF- $\alpha$  em monócitos do sangue periférico. Olsen et al.<sup>87</sup> (1999) apresentaram resultados semelhantes analisando produção de IL-1 $\beta$  por monócitos. Silva et al.<sup>104</sup> (2002), Nelson-Filho et al.<sup>81</sup> (2002) e Tanomaru et al.<sup>129</sup> (2003) verificaram que o hidróxido de cálcio, como medicação de demora, neutralizou endotoxinas, inibindo sua capacidade de causar lesões periapicais em cães. Na presente pesquisa, verificou-se na primeira coleta que o hidróxido de cálcio altera a propriedade da endotoxina de estimular a ativação de linfócitos B, provavelmente devido à quebra da ligação éster-ácidos graxos, neutralizando seus efeitos tóxicos, que foi também verificado pela não geleificação do lisado de amebócitos de *Limulus*.

A efetividade da polimixina B sobre LPS apresentada no atual estudo está de acordo com os resultados de outros autores (RIFKIND<sup>94</sup>, 1967; PARVIAINEN et al.<sup>89</sup>, 2001; TANI et al.<sup>127</sup>, 2001), que utilizaram polimixina B no tratamento de sepsis por microrganismos Gram-negativos e de choque endotóxico e com Oliveira<sup>85</sup> (2002), que verificou a eficácia da polimixina B como medicação de demora por sete dias em neutralizar LPS nos canais radiculares. O efeito neutralizante da polimixina B na atividade do LPS foi observado primeiramente por Neter<sup>82</sup>, em 1956, citado por Bucklin et al.<sup>11</sup> (1995), quando o LPS foi incubado com polimixina B e a aglutinação de eritrócitos, normalmente induzida pelo LPS, foi inibida. Desde então, outros autores têm demonstrado que a polimixina B pode inibir a letalidade endotóxica em galinhas, ratos,

coelhos, cães e cavalos (RIFKIND<sup>94</sup>, 1967; BUCKLIN et al.<sup>11</sup>, 1995; PARVIAINEN et al.<sup>89</sup>, 2001; BARTON et al.<sup>7</sup>, 2004).

Rifkind & Palmer<sup>95</sup> (1966) e Rifkind<sup>94</sup> (1967) verificaram uma redução de letalidade endotóxica em embriões de galinhas e de ratos e também a neutralização da reação de Schwartzman em coelhos. Eles postularam um mecanismo de ação no qual a polimixina B, um antibiótico polipeptídico catiônico, liga-se covalentemente à carga eletronegativa do lipídio A da molécula de endotoxina. Essa ligação foi mais tarde confirmada *in vitro* por Morrison & Jacobs<sup>74</sup> (1976). A polimixina B tem a habilidade de se ligar com alta afinidade à porção de lipídio A, alterando, assim, a conformação tridimensional da molécula de LPS. Essa alteração conformacional possivelmente impede o complexo endotoxina-polimixina B de se ligar ao receptor CD14 nos monócitos, inibindo a liberação de mediadores inflamatórios como, por exemplo, TNF (BUCKLIN et al.<sup>11</sup>, 1995; EVANS et al.<sup>35</sup>, 1999).

Resultados interessantes da administração sistêmica da polimixina B também foram demonstrados no estudo de Hong et al.<sup>47</sup>(2004), onde verificaram que a polimixina B inibiu a progressão da lesão periapical induzida em ratos, reduzindo o tamanho da lesão em 76% a 80% em comparação ao grupo controle, onde foi administrado apenas solução salina. Com isso, estes autores demonstraram neste estudo a forte influência do LPS na indução da lesão periapical e a efetividade da administração sistêmica de polimixina B em minimizar seus efeitos. Na presente pesquisa, a polimixina B impediu a capacidade do LPS de ativar linfócitos B e também inibiu a geleificação do lisado de amebócito de *Limulus*, na primeira coleta, provavelmente devido à alteração conformacional da molécula de endotoxina ligada a polimixina B, que neutralizou seus efeitos tóxicos.

Os demais agentes irrigantes (hipoclorito de sódio 2,5% e 5% e clorexidina 2%) avaliados no presente estudo não apresentaram capacidade de neutralizar endotoxinas inoculadas nos canais radiculares,

o que foi verificado tanto na primeira coleta (imediate) como na segunda (após sete dias). Os resultados apresentados por estes grupos tanto no lisado de *Limulus* como na produção de anticorpos foram estatisticamente semelhantes aos obtidos pelo grupo controle positivo ( $p > 0,05$ ), demonstrando quantidade significativamente elevada de LPS em comparação aos grupos G4 (hidróxido de cálcio) e G5 (polimixina B) ( $p < 0,05$ ).

Com relação ao hipoclorito de sódio, que apresenta efetiva ação antimicrobiana sobre bactérias anaeróbias Gram-negativas (GEORGOPOLOU et al.<sup>39</sup>, 1993; YELSILSOY et al.<sup>142</sup>, 1995; SIQUEIRA JÚNIOR et al.<sup>107</sup>, 1998; VIANNA et al.<sup>134</sup>, 2004), no atual estudo, mesmo utilizando concentrações altas do produto (2,5% e 5,25%), não foi verificada nenhuma ação sobre LPS. Estes resultados concordam com os estudos de Buttler & Crawford<sup>12</sup> (1982), que demonstraram que NaOCl 0,58% e 2,7% não detoxificaram quantidades significativas de endotoxinas e apresentaram resultados inconclusivos na concentração 5,2%. Tanomaru et al.<sup>129</sup> (2003) também verificaram que a utilização do NaOCl 1,25% e 5% na irrigação de canais radiculados inoculados com LPS não reduziu reação inflamatória na região periapical de dentes de cães. Por outro lado, Haigh-Ponce et al.<sup>44</sup> (1999) demonstraram *in vitro* que a solução de hipoclorito de sódio 10% tem capacidade de inibir a ligação de endotoxinas em amostras de dentina previamente tratadas com este agente irrigante, provavelmente devido a sua capacidade de dissolver restos teciduais orgânicos que aderem à superfície de dentina em combinação com microrganismos, entretanto, estes autores não avaliaram a eficácia do NaOCl 10% em neutralizar endotoxinas.

A solução de clorexidina 2% também não foi eficaz em neutralizar LPS no canal radicular durante o preparo biomecânico. Estes resultados confirmam com os de Aibel & Stevens<sup>1</sup> (1999), que verificaram que o tratamento de LPS com clorexidina 1,2% por 40 minutos não inibiu sua capacidade de induzir produção de IL-6 por macrófagos. Buck et al.<sup>10</sup>

(2001) também verificaram, através da quantificação de ácidos graxos livres, que os irrigantes hipoclorito de sódio (2,625%) e clorexidina 0,12%, sozinhos ou associados, não foram efetivos contra LPS após contato por 30 min. Por outro lado, os autores constataram efetividade sobre LPS da mistura alcalina (pH 11 a 11,5) de clorexidina, etanol e hipoclorito de sódio como agente irrigante, quando em contato por 30 min, e do hidróxido de cálcio como medicação de demora por um, dois ou cinco dias, concluindo que substâncias químicas altamente alcalinas favorecem a hidrólise do lipídio A com liberação de ácidos graxos livres. Vale ressaltar que estes autores não avaliaram a ação dos irrigantes usando dentes como sistema-modelo e, sim, o contato direto do LPS com as soluções. Niwa et al.<sup>84</sup> (1969) demonstraram que o tratamento de endotoxina com meio alcalino altera suas propriedades físicas, químicas e biológicas e que a degradação alcalina de LPS foi acentuadamente acelerada quando álcool etílico foi usado em substituição a água em meio alcalino. Estes autores concluíram que as alterações que ocorrem durante a hidrólise alcalina alteram a conformação química do LPS que é essencial para endotoxicidade.

Analisando *in vivo* os efeitos de soluções irrigadoras sobre LPS, Tanomaru et al.<sup>129</sup> (2003) demonstraram que o uso da solução de clorexidina 2% como agente irrigante não diminuiu a capacidade da endotoxina de induzir reação inflamatória periapical em cães. Desta forma, os poucos trabalhos relatados na literatura que avaliam a eficácia de agentes irrigantes sobre LPS, utilizando metodologias diferentes, concordam que as soluções irrigadoras mais utilizadas na prática endodôntica, hipoclorito de sódio e clorexidina, não são efetivos sobre endotoxinas. Como estas substâncias apresentam propriedades que são muito importantes numa solução irrigadora, como ação antimicrobiana sobre bactérias comumente encontradas em infecções dos canais radiculares, capacidade de dissolver tecidos (hipoclorito de sódio), substantividade (clorexidina), torna-se interessante analisar associações

destes irrigantes com polimixina B ou água de cal, que demonstraram importante efetividade sobre LPS.

Na presente pesquisa, o grupo controle positivo foi fundamental para constatar que há redução na quantidade de endotoxina no canal radicular pelo processo mecânico de irrigação/aspiração durante a instrumentação. Byström & Sundqvist<sup>13</sup> (1981) verificaram que o preparo mecânico do conduto com solução salina reduz significativamente o número de microrganismos presentes, mas não a ponto de obter culturas negativas, o que foi observado no atual estudo com relação a endotoxina. Como foram inoculados inicialmente 40 UI de LPS no canal radicular, através do método semiquantitativo, pôde-se verificar quantidade de aproximadamente 2 a 8 UI/mL de LPS, tanto na primeira como na segunda coleta, pelo grupo que utilizou apenas água apirogênica como agente irrigante. Assim, após a instrumentação do canal ainda permanece quantidade suficiente de endotoxina capaz de ser detectada pelo lisado de *Limulus* e de estimular a produção de grande quantidade de anticorpos pelos linfócitos B, tornando-se importante não só um bom preparo mecânico do conduto, mas a utilização associada de substâncias capazes de neutralizar LPS. Na presente pesquisa, a utilização de soluções irrigadoras como hipoclorito de sódio e clorexidina não foi eficaz na neutralização de endotoxinas, enquanto que polimixina B e água de cal (hidróxido de cálcio 0,14%) apresentaram importante efetividade sobre LPS, reduzindo significativamente sua quantidade no canal radicular. Embora essa redução tenha sido significativa, a neutralização de endotoxinas no interior dos túbulos dentinários não foi total, de modo que se recomenda também a utilização de medicação de demora com hidróxido de cálcio para eliminar endotoxinas remanescentes nas camadas mais profundas dos túbulos dentinários, crateras de reabsorção, canais secundários ou acessórios, onde o agente irrigante não consegue atuar (BUCK et al.<sup>10</sup>, 2001; SILVA et al.<sup>104</sup>, 2002; NELSON-FILHO et al.<sup>81</sup>, 2002; OLIVEIRA<sup>85</sup>, 2002; TANOMARU et al.<sup>129</sup>, 2003).

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa, pôde-se concluir que:

- a) O hidróxido de cálcio e a polimixina B, como agentes irrigantes, reduziram significativamente a quantidade de endotoxina presente nos canais radiculares, apresentando importante efetividade sobre LPS;
- b) As soluções de hipoclorito de sódio (2,5% e 5,25%) e clorexidina (2%) não apresentaram capacidade de neutralizar endotoxinas;
- c) Apesar da redução significativa de endotoxina nos canais radiculares, as soluções de hidróxido de cálcio e polimixina B não conseguiram atuar em profundidade nos túbulos dentinários, sendo que a pequena quantidade de LPS restante ainda apresentou efeitos biológicos (estimulação celular), sugerindo que somente o preparo biomecânico com soluções efetivas não é suficiente para eliminar ou neutralizar todo LPS presente no sistema de canais radiculares.

## 8 REFERÊNCIAS\*

1. AIBEL, K.; STEVENS, R. Effect of chlorhexidine on IL-6 induction by LPS. *J Endod*, v.25, n.4, p.282, Apr. 1999. (Trabalho apresentado na 56ª Seção Anual da Associação Americana de Endodontistas).
2. AKISUE, E. **Análise *in vitro* da percolação apical em dentes obturados empregando-se o método de infiltração e quantificação do nível de endotoxina.** 2003. 98f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Concentração Endodontia) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
3. ALVES, J.; WALTON, R.; DRAKE, D. Coronal leakage: endotoxin penetration from mixed bacterial communities through obturated, post-prepared root canals. *J Endod*, v.24, n.9, p.587-91, Sept. 1998.
4. AYHAN, H. et al. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int Endod J*, v.32, p.99-102, 1999.
5. BARBOSA, C.A.M. et al. Evaluation of the bacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament: a clinical and laboratory study. *J Endod*, v.23, n.5, p.297-300, May 1997.
6. BARTHEL, C.R. et al. TNF- $\alpha$  release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endod J*, v.30, n.3, p.155-9, May 1997.
7. BARTON, M.H.; PARVIAINEN, A.; NORTON, N. Polymyxin B protects horses against induced endotoxaemia in vivo. *Equine Vet J*, v.36, n.5, p.397-401, July 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>. Acesso em: 29 setembro 2004. (Resumo).

---

\* Baseado em:  
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Informação e documentação:** referências, elaboração, NBR 6023. Rio de Janeiro, 2002. 23p.

8. BASRANI, B. et al. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.94, n.2, p.240-5, Aug. 2002.
9. BUCK, R.; ELEAZER, P.D.; STAAT, R.H. In vitro disinfection of dentinal tubules by various endodontic irrigants. **J Endod**, v.25, n.12, p.786-8, Dec. 1999.
10. BUCK, R.A. et al. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. **J Endod**, v.27, n.5, p.325-7, May 2001.
11. BUCKLIN, S.E. et al. Therapeutic efficacy of a polymyxin B-dextran 70 conjugate in experimental model of endotoxemia. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, n.7, p.1462-66, July 1995.
12. BUTTLER, T.K.; CRAWFORD, J.J. The detoxifying effect of varying concentrations of sodium hypochlorite on endotoxins. **J Endod**, v.8, n.2, p.59-66, Feb. 1982.
13. BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. **Scand J Dent Res**, v.89, p.321-8, 1981.
14. BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. **Oral Surg**, v.55, n.3, p.307-12, Mar. 1983.
15. BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. **Int Endod J**, v.18, p.35-40, 1985.
16. BYSTRÖM, A.; CLAESSESON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Endod Dent Traumatol**, v.1, n.5, p.170-5, 1985.
17. CALISKAN, M.K.; SEN, B.H. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using calcium hydroxide: a long-term study. **Endod Dent Traumatol**, v.12, p.215-21, 1996.
18. CHIA, J.K. et al. Lipopolysaccharide (LPS)-reactive monoclonal antibodies fail to inhibit LPS-induced tumor necrosis factor secretion by mouse-derived macrophages. **J Infect Dis**, v.159, n.5, p.872-80, May 1989.

19. CLAGETT, J.A.; ENGEL, D.; CHI, E. *In vitro* expression of immunoglobulin M and G subclasses by murine B lymphocytes in response to a polyclonal activator from *Actinomyces*. **Infect Immunol**, v.29, n.1, p.234-43, 1980 apud ITO, H. et al. Possible role of T cells in the establishment of IgG plasma cell-rich periodontal lesion-augmentation of IgG synthesis in the polyclonal B cell activation response by autoreactive T cells. **J Periodont Res**, v.23, p.39-45, 1988.
20. CORRIGAN, J.J.; BELL, B.M. Comparison between the polymyxins and gentamicin in preventing endotoxin-induced intravascular coagulation and leukopenia. **Infect Immun**, v.4, n.5, p.563-6, Nov. 1971.
21. CRAIG, W.A.; TURNER, J.H.; KUNIN, C.M. Prevention of the generalized Shwartzman reaction and endotoxin lethality by polymyxin B localized in tissues. **Infect Immun**, v.10, n.2, p.287-92, Aug. 1974.
22. CSAKO, G. et al. Physical and biological properties of U.S. standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. **Infect Immunol**, v.41, n.1, p.190-6, July 1983.
23. CVEK, M.; HOLLENDER, L.; NORD, C.E. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. **Odontol Revy**, v.27, p.93-108, 1976.
24. DAHLÉN, G.; BERGENHOLTZ, G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. **J Dent Res**, v.59, n.6, p.1033-40, June 1980.
25. DAHLÉN, G.; MAGNUSSON, B.C.; MÖLLER, A. Histological and histochemical study of the influence of lipopolysaccharide extracted from *Fusobacterium nucleatum* on the periapical tissues in the monkey *Macaca fascicularis*. **Archs Oral Biol**, v.26, p.591-8, 1981.
26. D'ARCANGELO, C.; VARVARA, G.; FAZIO, P.D. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. **J Endod**, v.25, n.5, p.351-3, May 1999.
27. DARROW, D.H.; KEITHLEY, E.M. Reduction of endotoxin-induced inflammation of the middle ear by polymyxin B. **Laryngoscope**, v.106, n.8, p.1028-33, Aug. 1996.
28. DELANY, G.M. et al. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. **Oral Surg**, v.53, n.5, p.518-23, May 1982.

29. DWYER, G.T.; TORABINEJAD, M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat. **J Endod**, v.7, n.1, p.31-35, Jan. 1981.
30. ELIN, R.J.; WOLFF, S.M. Nonspecificity of the limulus amebocyte lysate test: positive reactions with polynucleotides and proteins. **J Infect Dis**, v.128, n.3, p.349-52, Sept. 1973.
31. ERCAN, E. et al. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. **J Endod**, v.30, n.2, p.84-7, Feb. 2004.
32. ESTRELA, C.; FIGUEIREDO, J.A.P. **Endodontia: princípios biológicos e mecânicos**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. 819p.
33. ESTRELA, C. et al. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. **J Endod**, v.24, n.1, p.15-7, Jan. 1998.
34. ESTRELA, C. et al. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. **Int Endod J**, v.34, n.5, p.341-5, July 2001.
35. EVANS, M.E.; FEOLA, D.J.; RAPP, R.P. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant Gram-negative bacteria. **Ann Pharmacother**, v.33, n.9, p.960-7, Sept. 1999.
36. FARDAL, O.; TURNBULL, R.S. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. **J Am Dent Assoc**, v.112, p.863-7, June 1986.
37. FERRAZ, C.C.R. et al. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. **J Endod**, v.27, n.7, p.452-5, July 2001.
38. GALANOS, C. et al. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid a express identical endotoxic activities. **Eur J Biochem**, v.148, n.1, p.1-5, Apr. 1985.
39. GEORGOPOLOU, M.; KONTAKIOTIS, E.; NAKOU, M. In vitro evaluation of the effectiveness of calcium hydroxide and paramonochlorophenol on anaerobic bacteria from the root canal. **Endod Dent Traumatol**, v.9, n.6, p.249-53, 1993.

40. GIACOMETTI, A. et al. Therapeutic efficacy of intraperitoneal polymyxin B and polymyxin-like peptides alone or combined with levofloxacin in rat models of septic shock. **J Antimicrob Chemother**, v.49, n.1, p.193-6, 2002.
41. GOUCH, M.; HANCOCK, R.E.W.; KELLY, N.H. Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. **Infect Immun**, v.64, n.12, p.4922-7, Dec. 1996.
42. GUDMUNDSSON, S.; CRAIG, W.A. Role of antibiotics in endotoxin shock. In: PROCTOR R.A. **Handbook of endotoxin (Clinical aspects of endotoxin shock)**, Amsterdam: Elsevier Science, 1986, v.4, p.238-63 apud EVANS, M.E.; FEOLA, D.J.; RAPP, R.P. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant Gram-negative bacteria. **Ann Pharmacother**, v.33, n.9, p.960-7, Sept. 1999.
43. HAENNI, S. et al. Chemical and antimicrobial properties of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. **Int Endod J**, v.36, p.100-5, 2003.
44. HAIGHT-PONCE, E.; ENDO, H.; HORIUCHI, H. Endotoxin activity measured by limulus assay. **Endod Dent Traumatol**, v.15, n.3, p.109-12, June 1999.
45. HARPER, N. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) specific for antibodies to TNP-LPS detects alterations in serum immunoglobulins and isotype switching in C57BL/6 and DBA/2 mice exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. **Toxicology**, v.92, n.1-3, p.155-67, Sept. 1994. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>. Acesso em: 10 maio 2003. (Resumo).
46. HELING, I.; CHANDLER, N.P. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. **Int Endod J**, v.31, p.8-14, 1998.
47. HONG, C.Y. et al. The role of lipopolysaccharide in infections bone resorption of periapical lesion. **J Oral Pathol Med**, v.33, n.3, p.162-9, Mar. 2004.
48. HORIBA, N. et al. A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. **J Endod**, v.16, n.7, p.331-4, July 1990.

49. HORIBA, N. et al. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.71, n.4, p.492-95, Apr. 1991.
50. HÜLSMANN, M.; HAHN, W. Complications during root canal irrigation – literature review and case reports. **Int Endod J**, v.33, p.186-93, 2000.
51. ITO, H et al. Possible role of T cells in the establishment og IgG plasma cell-rich periodontal lesion: augmentation of IgG synthesis in the polyclonal B cell activation response by autoreactive T cells. **J Periodontol Res**, v.23, n.1, p.39-45, Jan. 1988.
52. KAKEHASHI, S. et al. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.20, n.3, p.340-9, Sept. 1965.
53. KHABBAZ, M.G.; ANASTASIADIS, P.L.; SYKARAS, S.N. Determination of endotoxins in caries: association with pulpal pain. **Int Endod J**, v.33, n.2, p.132-7, Mar. 2000.
54. KHABBAZ, M.G.; ANASTASIADIS, P.L.; SYKARAS, S.N. Determination of endotoxins in the vital pulpi of human carious teeth: association with pulpal pain. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.91, n.5, p.587-93, May 2001.
55. KIRIKAE, T.; NAKANO, M.; MORRISON, D.C. Antibiotic-induced endotoxin release from bacteria and its clinical significance. **Microbiol Immunol**, v.41, n.4, p.285-94, 1997.
56. KURUVILLA, J.R.; KAMATH, M.P. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. **J Endod**, v.24, n.7, p.472-6, July 1998.
57. JANEWAY, C.A. et al. **Imunologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. Trad. D. C. Machado et al. 4.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. 634p.
58. JEANSONNE, M.J.; WHITE, R.R. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. **J Endod**, v.20, n.6, p.276-8, June 1994.
59. JIANG, J. et al. Calcium hydroxide reduces lipopolysaccharide-stimulated osteoclast formation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.95, n.3, p.348-54, Nov. 2003.

60. LAGHIOS, C.D.; CUTLER, C.W.; GUTMANN, J.L. *In vitro* evidence that lipopolysaccharide of an oral pathogen leaks from root-end filled teeth. **Int Endod J**, v.33, p.333-9, 2000.
61. LEE, L.W.; LAN, W.H.; WANG, G.Y. A evaluation of chlorhexidine as an endosonic irrigan. **J Formos Med Assoc**, v.89, n.6, p.491-7, June 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>. Acesso em: 15 setembro 2003. (Resumo).
62. LEONARDO, M.R.; LEAL, J.M. **Endodontia: tratamento de canais radiculares**. 3.ed. São Paulo: Panamericana, 1998. 908p.
63. LEONARDO, M.R. et al. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. **J Endod**, v.19, n.7, p.348-52, July 1993.
64. LEONARDO, M.R. et al. Histopathological observations of periapical repair in teeth with radiolucent areas submitted to two different methods of root canal treatment. **J Endod**, v.21, n.3, p.137-41, Mar. 1995.
65. LEONARDO, M.R. et al. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as root canal irrigating solution. **J Endod**, v.25, n.3, p.167-71, Mar. 1999.
66. LEONARDO, M.R. et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. **J Endod**, v.27, n.12, p.717-9, Dec. 2001.
67. LEVIN, J.; BANG, F.B. Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. **Thromb Diath Haemorrh**, v.31, n.1, p.186-97, 1968.
68. LINDEMANN, R.A.; ECONOMOU, J.S.; ROTHERMEL, H. Production of interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. **J Dent Res**, v.67, n.8, p.1131-5, Aug. 1988.
69. MATSUSHITA, K. et al. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. **J Endod**, v.25, n.12, p.795-9, Dec. 1999.
70. MATTISON, G.D. et al. The effect of *Eikenella corrodens* endotoxin on periapical bone. **J Endod**, v.13, n.12, p.559-65, Dec. 1987.

71. MENEZES, M.M. et al. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. **Int Endod J**, v.37, n.5, p.311-9, May 2004.
72. MILLAR, S.J. et al. Modulation of bone metabolism by two chemically distinct lipopolysaccharide fractions from *Bacteroides gingivalis*. **Infect Immunol**, v.51, n.1, p.302-6, Jan. 1986.
73. MOORE, R.A.; BATES, N.C.; HANCOCK, R.E.W. Interaction of polycationic antibiotics with *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide and lipid A studied by using dansyl-polymyxin. **Antimicrob Agents Chemother**, v.29, n.3, p.496-500, Mar. 1986.
74. MORRISON, D.C.; JACOBS, D.M. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. **Immunochemistry**, v.13, n.10, p.813-8, Oct. 1976.
75. MORSE, D.R. Endodontic microbiology in the 1970s. **Int Endod J**, v.14, p.69-79, May 1981.
76. MURAKAMI, Y. et al. A possible mechanism of maxillofacial abscess formation: involvement of *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide via the expression of inflammatory cytokines. **Oral Microbiol Immunol**, v.16, p.321-5, 2001.
77. MURRAY, P.R. et al. **Medical microbiology**. 2.ed. St. Louis: C.V. Mosby, 1994 apud SIQUEIRA JUNIOR, J.F. et al. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, *in vitro*. **Int Endod J**, v.30, p.279-82, 1997.
78. NAIR, P.N.R. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. **Periodontology 2000**, v.13, p.121-48, Feb. 1997.
79. NAKANO, M.; ASOU, H.; YAMAMOTO, I. Stimulation of phagocytic activity in the reticuloendothelial systems of mice by lipid A complexed with homologous or heterologous proteins. **Infect Immunity**, v.11, n.3, p.592-4, Mar. 1975.
80. NANDAN, R.; BROWN, D.R. An improved *in vitro* pyrogen test to detect picograms of endotoxin contamination in intravenous fluids using *Limulus* amoebocyte lysate. **J Lab Clin Med**, v.89, n.4, p.910-8, Apr. 1977 apud SIGMA CHEMICAL COMPANY. E-Toxate. **Technical Bulletin**, Saint Louis, n.210, p.1-4, Apr. 2001.

81. NELSON-FILHO, P. et al. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod*, v.28, n.10, p.694-6, Oct. 2002.
82. NETER, E. Bacterial hemagglutination and hemolysis. *Bacteriol Rev*, v.20, p.166-88, 1956 apud BUCKLIN, S.E. et al. Therapeutic efficacy of a polymyxin B-dextran 70 conjugate in experimental model of endotoxemia. *Antimicrob Agents Chemother*, v.39, n.7, p.1462-66, July 1995.
83. NISSAN, R. et al. Ability of bacterial endotoxin to difuse through human dentin. *J Endod*, v.21, n.2, p.62-4, Feb. 1995.
84. NIWA, M. et al. Alteration of physical, chemical and biological properties of endotoxin by treatment with mild alkali. *J Bacteriol*, v.97, n.3, p.1069-77, Mar. 1969.
85. OLIVEIRA, L.D. **Estudo *in vitro* da efetividade do hidróxido de cálcio e da polimixina B na eliminação das endotoxinas presentes nos canais radiculares.** 2002. 109f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2002.
86. OLIVEIRA, L.D. et al. Avaliação *in vitro* da capacidade de difusão da endotoxina pelos túbulos dentinários. *Pesq Odontol Bras*, v.17, supl.2, p.173, 2003. (Trabalho apresentado à 20ª Reunião SBPqO – Resumo Pb113).
87. OLSEN, M.H. et al. The effects of calcium hydroxide inhibition on LPS induced release IL-1 $\beta$  from human monocytes in whole blood. *J Endod*, v.25, n.4, p.289, Apr. 1999.
88. ÖNÇAG, Ö. et al. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J*, v.36, p.423-32, 2003.
89. PARVIAINEN, A.K.; BARTON, M.H.; NORTON, N.N. Evaluation of polymyxin B in an ex vivo model of endotoxemia in horses. *Am J Vet Res*, v.62, n.1, p.72-6, Jan. 2001.
90. PETSCH, D.; ANSPACH, F.B. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol*, v.76, n.2-3, p.97-119, Jan. 2000.

91. PITTS, D.L.; WILLIAMS, B.L.; MORTON JUNIOR, T.H. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. **J Endod**, v.8, n.1, p.10-8, Jan. 1982.
92. PREBECK, S. et al. The Gram-negative bacterium *Chlamydia trachomatis* L (2) stimulates tumor necrosis factor secretion by innate immune cell independently of its endotoxin. **Microbes Infect**, v.5, n.6, p.463-70, 2003.
93. RIETSCHEL, E.T. et al. The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. **Immunobiology**, v.187, n.3/5, p.169-90, Apr. 1993.
94. RIFKIND, D. Prevention by polymyxin B of endotoxin lethality in mice. **J Bacteriol**, v.93, n.4, p.1463-4, Apr. 1967.
95. RIFKIND, D.; PALMER, J.D. neutralization of endotoxin toxicity in chick embryos by antibiotics. **J Bacteriol**, v.92, n.4, p.815-9, Oct. 1966.
96. RHODES, B.A. KAMANETZ, G.S; WAGNER, H.N. The use of Limulus testing to reduce the incidence of adverse reactions to cisternographic agents. **Neurology**, v.24, n.9, p.810-2, Sept. 1974 apud SIGMA CHEMICAL COMPANY. E-Toxate. **Technical Bulletin**, Sant Louis, n.210, p.1-4, Apr. 2001.
97. ROSSI, V.P.S. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* da clorexidina, hipoclorito de sódio e associações. **Pesq Odontol Bras**, v.16; supl., p.65, 2002. (Trabalho apresentado à 19<sup>o</sup> Reunião SBPqO – Resumo lb035).
98. SAFAVI, K.E.; NICHOLS, F.C. Effects of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. **J Endod**, v.19, n.2, p.76-8, Feb. 1993.
99. SAFAVI, K.E.; NICHOLS, F.C. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. **J Endod**, v.20, n.3, p.127-9, Mar. 1994.
100. SAFAVI, K.E.; NICHOLS, F.C. Effects of a bacterial cell wall fragment on monocyte inflammatory function. **J Endod**, v.26, n.3, p.153-5, Mar. 2000.
101. SCHEIN, B.; SCHILDER, H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. **J Endod**, v.1, n.1, p.19-21, Jan. 1975.
102. SCHILDER, H. Cleaning and shaping the root canal. **Dent Clin North Am**, v.18, n.2, p.269-96, Apr. 1974.

103. SIGMA CHEMICAL COMPANY. E-Toxate. **Technical Bulletin**, Sant Louis, n.210, p.1-4, Apr. 2001.
104. SILVA, L.A.B. et al. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. **J Endod**, v.28, n.2, p.94-8, Feb. 2002.
105. SIQUEIRA JUNIOR, J.F.; UZEDA, M. Desinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. **J Endod**, v.22, n.12, p.p.674-6, Dec. 1996.
106. SIQUEIRA JUNIOR, J.F. et al. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, *in vitro*. **Int Endod J**, v.30, p.279-82, 1997.
107. SIQUEIRA JUNIOR, J.F. et al. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. **J Endod**, v.24, n.6, p.414-6, June 1998.
108. SIQUEIRA JUNIOR, J.F. et al. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. **J Endod**, v.26, n.6, p.331-4, June 2000.
109. SIQUEIRA JUNIOR, J.F. et al. Efficacy of instrumentation technique and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. **J Endod**, v.28, n.3, p.181-4, Mar. 2002.
110. SJÖGREN, U. et al. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. **Int Endod J**, v.24, n.3, p.119-25, May 1991.
111. SNYDER, S.L. et al. Radioprotective properties of detoxified lipid A from *Salmonella minnesota* R595. **Radiat Res**, v.107, n.1, p.107-14, July 1986.
112. SOSROSENO, W. et al. Nitric oxide production by a murine macrophage cell line (RAW264.7) stimulated with lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Oral Microbiol Immunol**, v.17, n.2, p.72-8, Apr. 2002.

113. SOUZA, J.I.L. **Análise *in vitro* da eficácia da impermeabilização da dentina radicular com verniz tipo copal, em dentes obturados com os cimentos N-Rickert e sealer-26 e preparados para retentor intra-radicular, empregando o método de infiltração e quantificação do nível de endotoxina.** 2000. 75f. Tese (Doutorado em Odontologia, Área de Concentração em Endodontia) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
114. SPANGBERG, L.; ENGSTROM, B.; LANGELAND, K. Biologic effects of dental materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.36, n.6, Dec. 1973.
115. STASHENKO, P.; TELES, R.; D'SOUZA, R. Periapical inflammatory responses and their modulation. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.9, n.4, p.498-521, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>. Acesso em: 15 Set. 2003. (Resumo).
116. STASHENKO, P. et al. Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v.18, n.7, p.548-54, Aug. 1991.
117. STASHENKO, P. et al. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. **J Periodontol**, v.62, n.8, p.504-9, Aug. 1991.
118. STOKES, D.C. et al. Polymyxin B prevent lipopolysaccharide induced release of tumor necrosis factor- $\alpha$  from alveolar macrophages. **J Infect Dis**, v.160, n.1, p.52-7, July 1989.
119. STORM, D.R.; ROSENTHAL, K.S.; SWANSON, P.E. Polymyxin and related peptide antibiotics. **Ann Rev Biochem**, v.46, p.723-63, 1977. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>. Acesso em: 16 setembro 2003. (Resumo).
120. SUNDQVIST, G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.78, n.4, p.522-30, Oct. 1994.
121. SUNDQVIST, G.; JOHANSSON, E.; SJÖGREN, U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. **J Endod**, v.15, n.1, p.13-9, Jan. 1989.

122. TAI, J.Y. et al. Studies on Limulus ameocyte lysate II. Purification of the coagulogen and the mechanism of clotting. **J Biol Chem**, v.252, n.14, p.4773-6, July 1977.
123. TAKADA, H. et al. Immunobiological activities of a porin fraction isolated from *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953. **Infect Immun**, v.56, n.4, p.855-63, Apr 1988.
124. TAN, H., HU, T.; XU, Y. Effects of diferent disinfectatnts on levels of endotoxin in canals of chronic periapical periodontitis. **Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v.19, n.4, p.222-4, Aug. 2001.  
Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>. Acesso em: 01 setembro 2004.  
(Resumo).
125. TANG, H. M.; TORABINEJAD, M.; KETTERING, J.D. Leakage evaluation of root end filling materials using endotoxin. **J Endod**, v. 28, n.1, p.5-7, Jan. 2002.
126. TANI-ISHII, N. et al. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. **Oral Microbiol Immunol**, v.9, n.2, p.129-35, Apr. 1994.
127. TANI, T. et al. Correlation between plasma endotoxin, plasma cytokines and plasminogen activator inhibitor-1 in septic patients. **World J Surg**, v.25, n.2, p.660-8, May 2001.
128. TANOMARU FILHO, M. et al. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. **Int Endod J**, v.35, p.735-9, 2002.
129. TANOMARU, J.M. et al. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. **Int Endod J**, v.36, n.11, p.733-9, Nov 2003.
130. THÉ, S. D.; MALTHA, J. C.; PLASSCHAERT, A. J. M. Reactions of guinea pig subcutaneous connective tissue following exposure to sodium hypochlorite. **Oral Surg**, v.49, n.5, p.460-6, May 1980.
131. TOMASULO, P.A. et al. Biological activities of tritiated endotoxins: correlation of the Limulus lysate assay with rabbit pyrogen and complement-activation assays for endotoxin. **J Lab Clin Med**, v.89, n.2, p.308-15, Feb. 1977.

132. TROPE, M. et al. Short vs Long-term calcium hydroxide treatment of established inflammatory root resorption in replanted dog teeth. **Endod Dent Traumatol**, v.11, n.3, p.124-8, June 1995.
133. VAHDATI, A. et al. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules *in vitro*. **Endod Dent Traumatol**, v.9, p.243-8, 1993.
134. VIANNA, M.E. et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and hypochlorite. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.97, n.1, p.79-84, Jan 2004.
135. WALKER, A. Definite and dependable therapy for pulpless teeth. **J Am Dent Assoc**, v.23, p.1418-24, 1936 apud SIQUEIRA JUNIOR, J.F. et al. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, *in vitro*. **Int Endod J**, v.30, p.279-82, 1997.
136. WANG, C.; STASHENKO, P. The role of interleukin-1 $\alpha$  in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. **Oral Microbiol Immunol**, v.8, n.1, p.50-6, Feb. 1993.
137. WEIGER, R.; ROSENDAHL, R.; LÖST, C. Influence of calcium hydroxide intracanal dressings on the prognosis of teeth with endodontically induced periapical lesions. **Int Endod J**, v.33, p.219-26, 2000.
138. WHITE, R.R.; LAYS, G.L.; JANER, L.R. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. **J Endod**, v.23, n.4, p.229-31, Apr. 1997.
139. WITTGOW JUNIOR, W.C.; SABISTON JUNIOR, C.B. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. **J Endod**, v.1, n.5, p.168-71, May 1975.
140. YAGI, S. et al. Enteric lipopolysaccharide raises plasma IL-6 levels in the hepatoportal vein during non-inflammatory stress in the rat. **Fukuoka Igaku Zasshi**, v.93, n.3, p.38-51, Mar. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>. Acesso em: 18 julho 2003. (Resumo).
141. YAMASAKI, M. et al. Endotoxin and Gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. **J Endod**, v.18, n.10, p.501-4, Oct. 1992.
142. YELSILSOY, C. et al. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. **J Endod**, v.21, n.10, p.513-5, Oct 1995.

143. YIN, N. et al. Synthesis of lipid A derivatives and their interactions with polymyxin B and Polymyxin B nonapeptide. **J Am Chem Soc**, v.125, n.9, p.2426-35, 2003.

## Anexo A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



### CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 034/2002-PH/CEP, sobre “Estudo *in vitro* da efetividade de agentes irrigantes na eliminação de endotoxinas presentes nos canais radiculares”, sob a responsabilidade de Luciane Dias de Oliveira, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 04 de junho de 2002.

Prof. Adj. Paulo Villela Saitos Júnior  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

OLIVEIRA, L.D. *In vitro* effects of irrigants on endotoxins in root canals. 2005. 100f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração: Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.

#### ABSTRACT

*The purpose was to evaluate the effects of sodium hypochlorite, chlorhexidine, calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. Ninety eight freshly extracted maxillary incisors were used in this study. The crowns of teeth were sectioned near the CEJ in order to standardize the root length to 14 mm. The specimens were sterilized with  $^{60}\text{Co}$  gamma irradiation and standardized suspension containing *Escherichia coli* endotoxin was inoculated into the 84 root canals. After 24 h, the root canals were instrumented to an apical size #80 file and were randomly assigned to seven groups (n=14), according to the irrigant used: G1) NaOCl 2,5%; G2) NaOCl 5,25%; G3) chlorhexidine; G4) calcium hydroxide; G5) polymyxin B; G6) positive control; G7) negative control. Two collections of the content of the canal root were accomplished to verify endotoxin detoxification, a soon after the instrumentation (collect immediate) and other after seven days (second collect). The detoxification of endotoxin was evaluated by *Limulus* lysate assay and antibody production in B-lymphocytes culture. The results obtained in the *Limulus* were submitted to the statistical analysis (Kuskall-Wallis and Dunn) and obtained in the production of antibodies were analyzed by ANOVA and test of Tukey (5%). In the collect immediate, the groups G1 (NaOCl 2,5%), G2 (NaOCl 5,25%) and G3 (chlorhexidine) didn't endotoxin detoxify, being statistically similar to G6 (positive control) ( $p>0,05$ ), while the groups G4 ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$  0,14%) e G5 (polymyxin B) demonstrated effectiveness on LPS, with resulted statistically similar to G7 (control negative) ( $p>0,05$ ) and different from the other groups ( $p < 0,05$ ). In the collect after seven days, presence of LPS was detected in the groups G4 and G5, being significantly smaller to the groups G1, G2 and G3. Like this, it could be concluded that only the solutions of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  and polymyxin B significantly reduced the amount of endotoxins in the root canals, and sodium hypochlorite and chlorhexidine did not present effects on LPS.*

**KEY WORDS:** Endotoxins; root canal irrigants; calcium hydroxide; polymyxin B.

Autorizo a reprodução xerográfica deste trabalho

São José dos Campos, 15 de Fevereiro de 2005

*Luciane Dias Oliveira*  
LUCIANE DIAS DE OLIVEIRA