

MARINHA DO BRASIL
ODONTOCLÍNICA CENTRAL DA MARINHA

CD Anna Beatriz Mourão Oliveira

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CAPACIDADE DE REDUÇÃO DE CARGA
MICROBIANA E NÍVEIS DE ENDOTOXINA DE CANAIS RADICULARES
CONTAMINADOS UTILIZANDO LIMAS ROTATÓRIAS RACE®**

Rio de Janeiro

2013

MARINHA DO BRASIL
ODONTOCLÍNICA CENTRAL DA MARINHA

CD Anna Beatriz Mourão Oliveira

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CAPACIDADE DE REDUÇÃO DE CARGA
MICROBIANA E NÍVEIS DE ENDOTOXINA DE CANAIS RADICULARES
CONTAMINADOS UTILIZANDO LIMAS ROTATÓRIAS RACE®**

Monografia apresentada à Odontoclínica Central da
Marinha, como requisito parcial para obtenção do
título de especialista em Endodontia.

Orientadora: CMG (CD) Helena Rosa Campos Rabang

Co-orientadores: Prof. Dr. Frederico Canato Martinho

Ariane Cássia Salustiano Marinho

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE

Oliveira, Anna Beatriz Mourão

Avaliação *in vitro* da capacidade de redução de carga microbiana e níveis de endotoxinas de canais radiculares contaminados utilizando limas rotatórias RaCe® / Anna Beatriz Mourão Oliveira ó Rio de Janeiro, 2013.

78 f. : 16 il.

Orientadora: CMG (CD) Helena Rosa Campos Rabang

Co-orientadores: Prof. Dr. Frederico Canato Martinho

Ariane Cássia Salustiano Marinho

Monografia (Especialização em Endodontia) ó Odontoclínica Central da Marinha.

1. Endodontia 2. Canal radicular 3. *Escherichia coli* 4. Endotoxinas 5. Instrumentação
I. Rabang, Helena Rosa Campos. II. Martinho, Frederico Canato. III. Marinho, Ariane Cássia Salustiano. IV. Odontoclínica Central da Marinha. V. Avaliação *in vitro* da capacidade de redução de carga microbiana e níveis de endotoxinas de canais radiculares contaminados utilizando limas rotatórias RaCe®.

FOLHA DE APROVAÇÃO

CD Anna Beatriz Mourão Oliveira

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CAPACIDADE DE REDUÇÃO DE CARGA MICROBIANA E NÍVEIS DE ENDOTOXINA DE CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS UTILIZANDO LIMAS ROTATÓRIAS RACE®

Aprovado em ____ de _____ de 2013.

Professor: _____

CC (CD) Livia Ferreira Soares

Professor: _____

1ºTen (CD-RM2) Camila Moraes Albuquerque

Orientadora: _____

CMG (CD) Helena Rosa Campos Rabang

Rio de Janeiro

2013

*A Deus, minha família e meu noivo,
que caminham sempre ao meu lado
onde quer que eu vá.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, sempre em primeiro lugar, por me permitir viver a cada dia novos desafios e me dar força e sabedoria para enfrentar e vencer cada um deles.

Aos meus pais **Renata** e **Glinaldo**, por nunca medirem esforços para a realização dos meus sonhos, a quem eu dedico todas as minhas conquistas. Sem vocês, eu nada seria, e em nenhum lugar chegaria. Minha base, meu tudo... Amo vocês!

Ao meu irmão **João Victor**, pelo apoio, o carinho e a amizade sempre. Entre tapas e beijos, a gente se ama!

Ao meu noivo **Marcelo**, por todo o amor, a torcida, o carinho, e principalmente pela compreensão e paciência ao longo do curso, sempre do meu lado me apoiando e me incentivando.

Aos meus **amigos e familiares**, que me apoiaram e me entenderam nos momentos de ausência e cansaço durante o curso.

À **Odontoclínica Central da Marinha (OCM)**, pela oportunidade de realização do Curso de Especialização em Endodontia, permitindo meu crescimento pessoal e profissional.

À **CMG (CD) Helena Rosa Campos Rabang**, minha orientadora, coordenadora do Curso de Especialização em Endodontia da OCM e Diretora da OCM, pelo incentivo e amizade, dividindo um pouco de seus conhecimentos durante as aulas e na orientação deste trabalho, e pela oportunidade de realização do curso na OCM e desta pesquisa em parceria com a FOP-UNICAMP.

Ao **Prof. Dr. Frederico Canato Martinho**, pela co-orientação, dividindo conhecimentos e me apoiando durante a realização da pesquisa.

À querida **Ariane Cássia Salustiano Marinho**, aluna do Mestrado em Endodontia da FOP-UNICAMP, pela co-orientação, pela hospitalidade em Piracicaba, pela amizade, pelo apoio, por toda a ajuda e a dedicação no trabalho, os risos pra descontrair no laboratório. Amei conhecer você e, sem a sua ajuda, este trabalho não teria se tornado realidade.

Aos instrutores do Curso de Especialização em Endodontia da OCM, **CC (CD) Maggioni**, **CC (CD) Saraiva**, **CF (CD) Diblasi** e **CF (CD) Vilhena**, pelos conhecimentos compartilhados, pela amizade e pela dedicação ao longo do curso, contribuindo para nosso crescimento profissional como especialistas.

Aos meus amigos do Curso de Especialização em Endodontia da OCM, **Alana, Bianca, Karla, Leonardo e Natália**, que dividiram comigo as experiências deste ano tão intenso de nossas vidas, construído com ôsangue, suor e lágrimas, mas também com muita amizade, muitos risos e muito carinho.

À **1ª Ten (CD) Juliana Cachapuz**, pela amizade e apoio, seja nos momentos em que estive conosco na clínica ou durante a realização do trabalho.

A todos os **professores** que estiveram conosco nas aulas teóricas e *hands-on* ao longo do curso, sempre tão solícitos e com tanto a nos acrescentar, fazendo parte deste nosso crescimento durante o ano.

À ex-aluna do Curso de Especialização em Endodontia da OCM **Larissa Costa**, pela atenção e contribuição no início deste trabalho.

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP)**, onde toda a parte experimental do trabalho foi realizada, o que me trouxe a experiência de poder trabalhar no laboratório e adquirir ainda mais conhecimentos, principalmente com a ajuda dos que lá me receberam tão bem.

À **Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, Professora de Endodontia da FOP-UNICAMP, pela oportunidade de estar na instituição e poder trabalhar no laboratório com seus alunos, dando o suporte para que eu pudesse realizar um trabalho deste nível.

À técnica da empresa Lonza, **Ana Regina Polay**, pela contribuição atenciosa e suporte técnico nesta pesquisa.

À representante da empresa Labordental, **Karla da Silva**, sempre simpática e solícita na comunicação com a empresa para a doação das limas RaCe® e na prestação de informações sobre as mesmas.

Aos meus **pacientes**, principal razão da minha profissão, por se submeterem aos meus cuidados, o que sempre me incentiva a querer melhorar e me aperfeiçoar para proporcionar a eles o melhor atendimento que eu puder realizar.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma deram a sua contribuição para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

*Nunca deixe que lhe digam
Que não vale a pena acreditar no sonho que se tem,
Ou que seus planos nunca vão dar certo,
Ou que você nunca vai ser alguém...*
(Renato Russo)

RESUMO

O tratamento endodôntico do sistema de canais radiculares visa eliminar microrganismos causadores da doença pulpar e perirradicular, e também suas endotoxinas, que são capazes de manter a resposta inflamatória e estão fortemente associadas à sintomatologia clínica. Os instrumentos rotatórios têm sido associados a um preparo mais rápido, seguro e eficaz, mas ainda se questiona sobre sua real capacidade de eliminar essas bactérias e seus subprodutos. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a contaminação por *Escherichia coli* e a presença de endotoxinas nos espécimes pesquisados, e avaliar, *in vitro*, a redução da carga microbiana e dos níveis de endotoxina de canais radiculares contaminados utilizando sequência de limas rotatórias do sistema RaCe[®] (FKG Dentaire, La Chaux-de-Fonds, Suíça). Foram utilizados 10 pré-molares inferiores permanentes humanos, com ápices fechados e raízes retas, que foram seccionados e tiveram padronização de suas raízes em 15 mm e de seus forames apicais com uma lima tipo K #20. Após remoção da *smear layer* e esterilização, as amostras foram colocadas em meio de cultura Luria Bertani (LB) *broth*, contaminadas com *Escherichia coli* (ATCC 25922), e mantidas em estufa a 37 °C por 21 dias, com trocas do meio a cada 2 dias. Após este período, as amostras foram retiradas do LB *broth*, e foram realizadas 2 coletas iniciais com cones de papel absorventes #20, uma microbiológica e outra de endotoxina. Os canais foram instrumentados com sequência de limas rotatórias RaCe[®] e irrigados com soro fisiológico 0,9% estéril, a cada troca de lima. Ao final, foram realizadas novas coletas microbiológicas e de endotoxinas. As coletas microbiológicas iniciais (e suas diluições) e finais foram plaqueadas em meio LB ágar e incubadas em estufa por 48 h para a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). As coletas de endotoxina foram diluídas, e as amostras quantificadas pelo método turbidimétrico Pyrogen-5000[®], que utiliza a reação de LAL. *Escherichia coli* foi detectada em 100% dos canais radiculares, com valores compreendidos entre 9×10^6 UFC/mL e $56,7 \times 10^7$ UFC/mL, representados pela média de $14,12 \times 10^7$ UFC/mL. Endotoxinas foram detectadas em 10/10 dos canais radiculares infectados com valores compreendidos entre 0,96 EU/mL e 2.790 EU/mL, representados pela média de 261,16 EU/mL. Estes resultados foram submetidos à análise estatística pelo teste Shapiro-Wilk e teste T ($p > 0,05$). A instrumentação utilizada foi capaz de reduzir o conteúdo microbiano ($14,12 \times 10^7$ UFC/mL X $1,84 \times 10^2$ UFC/mL) e endotóxico (261,16 EU/mL X 2,46 EU/mL) em todos os canais radiculares estudados, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Concluiu-se que a *Escherichia coli* e as endotoxinas estavam presentes em todas as amostras testadas; e o sistema RaCe[®] foi capaz de reduzir a carga microbiana e os níveis de endotoxina destas amostras com diferença estatisticamente significativa, mas não foi capaz de eliminá-los totalmente.

Palavras-chave: Endodontia. Canal radicular. *Escherichia coli*. Endotoxinas. Instrumentação.

ABSTRACT

The endodontic treatment of the root canal system aims to eliminate microorganisms that cause the pulp and periradicular disease, and also their endotoxins, which are capable of maintaining the inflammatory response and are strongly associated with clinical symptoms. The rotary instruments have been associated with a faster, safe and effective preparation, but still remains questionable its real ability to eliminate these bacteria and their byproducts. Thus, the aim of this study was to investigate the contamination by *Escherichia coli* and the presence of endotoxins in the samples researched, and evaluate, *in vitro*, the reduction of microbial load and endotoxin levels in contaminated root canals using a sequence of rotary files from system RaCe[®] (FKG Dentaire, La Chaux-de-Fonds, Switzerland). Ten permanent human premolars with closed apex and straight roots were used, which were sectioned and had the standardization of its roots in 15 mm and its apical foramen with a # 20 K file. After *smear layer* removal and sterilization, the samples were placed in Luria Bertani (LB) broth medium, contaminated with *Escherichia coli* (ATCC 25922), and maintained in incubator at 37 °C for 21 days, with changes of medium every 2 days. After this period, samples were removed from LB broth, and 2 initial samples were taken with absorbent paper cones # 20, a microbiologic one and other for endotoxin. The canals were instrumented with a sequence of RaCe[®] rotary files and irrigated with sterile saline solution 0.9%, at each change of file. At the end, there were new microbiological and endotoxin collects. The initials (and their dilutions) and finals microbiological samples were plated on LB agar medium and incubated for 48 h for counting of colony-forming units (CFU). The samples of endotoxin were diluted and quantified by the turbidimetric method Pyrogen-5000[®], which uses the reaction of LAL. *Escherichia coli* was detected in 100% of root canals, with values between 9×10^6 CFU/mL and 56.7×10^7 CFU/mL, represented by an average of 14.12×10^7 CFU/mL. Endotoxins were detected in 10/10 of the infected root canal with values between 0.96 EU/mL to 2790 EU/mL, represented by an average of 261.16 EU/mL. These results were statistically analyzed by the Shapiro-Wilk test and T-test ($p > 0.05$). The instrumentation used was capable of reducing the microbial (14.12×10^7 CFU/mL X 1.84×10^2 CFU/mL) and endotoxic content (261.16 EU/mL X 2.46 EU/mL) in all root canals studied, with statistically significant difference ($p < 0.05$). It was concluded that *Escherichia coli* and endotoxins were present in all the samples assessed; and system RaCe[®] was able to reduce the microbial load and endotoxin levels of these samples with statistically significant difference, but was not able to eliminate them completely.

Key-words: Endodontics. Root canal. *Escherichia coli*. Endotoxins. Instrumentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 ó	À esquerda, a célula bacteriana e algumas de suas organelas. No detalhe à direita, esquema que diferencia o envoltório celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	25
Figura 2 ó	A ó Bactéria Gram-negativa.....	29
	B ó Aspecto dos três envoltórios celulares.....	29
Figura 3 ó	Estrutura do LPS (endotoxina): a parte chamada Lípide A se liga à membrana bacteriana. Na sua parte central, há diferentes cadeias de açúcares e, no outro extremo, cadeias de polissacarídeos (Antígeno O).....	30
Figura 4 ó	Seleção das amostras.....	48
	A ó Aspecto frontal de espécime utilizado na pesquisa.....	48
	B ó Aspecto lateral de espécime utilizado na pesquisa.....	48
	C ó Pré-molares inferiores utilizados na pesquisa.....	48
Figura 5 ó	Preparo dos dentes.....	49
	A ó Limpeza mecânica das raízes.....	49
	B ó Secção da coroa com disco diamantado.....	49
	C ó Padronização do comprimento em 15 mm.....	49
	D ó Padronização do diâmetro do forame apical.....	49
Figura 6 ó	Amostras sob agitação constante para remoção da <i>smear layer</i>	50
Figura 7 ó	Contaminação dos espécimes com <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922).....	52
	A ó Espécimes no LB <i>broth</i> estéril.....	52
	B ó Visão aproximada dos espécimes no meio estéril.....	52
	C ó Cultura pura de <i>Escherichia coli</i> antes da inoculação.....	52
	D ó Coleta do microrganismo da placa para inoculação.....	52

	E ó Inoculação do microrganismo no meio para contaminação dos espécimes.....	52
	F ó Espécimes contaminados após 21 dias.....	52
Figura 8 ó	Coleta inicial.....	53
	A ó Espécime montado na plataforma metálica.....	53
	B ó Coleta inicial com cone de papel absorvente.....	53
Figura 9 ó	Instrumentação dos espécimes.....	56
	A ó Material para a instrumentação e coleta de bactérias e endotoxinas montado no interior da câmara de fluxo laminar.....	56
	B ó Momento da instrumentação dos espécimes.....	56
	C ó Visão aproximada da instrumentação.....	56
	D ó Irrigação com NaCl 0,9% estéril.....	56
	E ó Sequência de limas RaCe [®] utilizada.....	56
	F ó Imagem aproximada da lima RaCe [®] , mostrando o <i>design</i> da parte ativa..	56
Figura 10 ó	Plaqueamento e contagem de UFC.....	58
	A ó Inoculação da amostra em placa com LB ágar estéril.....	58
	B ó Distribuição da amostra pela placa.....	58
	C ó Exemplo de amostra inicial após período de incubação.....	58
	D ó Exemplo de amostra final após período de incubação.....	58
Figura 11 ó	Exemplo de curva padrão para quantificação de endotoxinas.....	60
Figura 12 ó	Distribuição das amostras na placa.....	62
Figura 13 ó	Ensaio cinético quantitativo para detecção de endotoxinas.....	64
	A ó Agitação das amostras em vórtex.....	64
	B ó Diluição das amostras de endotoxinas.....	64
	C ó Kit Pyrogen-5000 [®]	64
	D ó Água reagente de LAL.....	64
	E ó Leitura de placa pelo espectrofotômetro.....	64
	F ó Software WinKQCL [®]	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 ó	Estabelecimento das diluições da curva padrão nas concentrações 10 EU/mL, 1 EU/mL, 0,10 EU/mL e 0,01 EU/mL.....	60
Tabela 2 ó	Carga microbiana (UFC/mL) e níveis de endotoxina (EU/mL) de canais radiculares infectados antes (C1) e após (C2) o PQM com o sistema rotatório RaCe [®]	66
Tabela 3 ó	Redução microbiana e de endotoxinas de canais radiculares infectados após o PQM com o sistema rotatório RaCe [®]	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

atm	atmosfera
<i>broth</i>	caldo
°C	graus Celsius
CE1	coleta de endotoxinas inicial
CE2	coleta de endotoxinas final
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLX	Clorexidina
CM1	coleta microbiológica inicial
CM2	coleta microbiológica final
CO ₂	gás carbônico
<i>crown-down</i>	preparo coroa-ápice
dp	desvio padrão
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiaminotetracético)
et al.	e outros (abreviatura de <i>et alliö</i>)
EU/mL	unidade de endotoxina por mililitro
FDA	<i>Federal Dental Association</i>
FOP-UNICAMP	Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas
<i>germ-free</i>	livres de microrganismos
h	hora

IgM	imunoglobulina M
kGy	quilogray
LAL	Lisado de Amebócitos <i>Limulus</i>
LB	Luria Bertani
log	logaritmo
LPS	lipopolissacarídeo
mg	miligrama
min	minuto
μL	microlitro
mL	mililitro
μm	micrômetro
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
NaCl	soro fisiológico
N/cm	Newton por centímetro
NaOCl	hipoclorito de sódio
NiTi	liga de níquel-titânio
nm	nanômetro
n°	número
p	nível de significância
PQM	preparo químico-mecânico
PPC	controle positivo do produto
®	marca registrada

RaCe	<i>Reamer with alternating Cutting edges</i>
rpm	rotação por minuto
<i>smear layer</i>	lama dentinária
<i>step-back</i>	preparo ápice-coroa
UFC	unidade formadora de colônia
UFC/mL	unidade formadora de colônia por mililitro
x	vezes
X	<i>versus</i>
°	grau
=	igual a
+	mais
±	mais ou menos
Ö	menor ou igual a
<	menor que
#	número
%	porcentagem (por cento)

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	18
2- REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1- Infecção endodôntica primária.....	21
2.1.1- Histórico.....	21
2.1.2- Conceito.....	23
2.1.3- Microbiologia dos canais radiculares infectados primariamente.....	23
2.1.4- Viabilidade dos microrganismos nos túbulos dentinários.....	25
2.1.5- Contagem das unidades formadoras de colônia.....	26
2.2- Endotoxina.....	28
2.2.1- Descrição estrutural da endotoxina.....	29
2.2.2- Potencial inflamatório da endotoxina.....	30
2.2.3- Difusão pelos túbulos dentinários.....	31
2.2.4- Relação da endotoxina com sinais e sintomas clínicos.....	32
2.2.5- Outros estudos com a endotoxina.....	34
2.3- Método LAL de detecção da endotoxina.....	36
2.3.1- Método quantitativo cinético turbidimétrico.....	37
2.4- Eliminação da infecção endodôntica primária.....	38
2.5- Instrumentação rotatória com níquel-titânio.....	40
2.5.1- Descrição do sistema rotatório RaCe®.....	41
2.5.2- Estudos com o sistema rotatório RaCe®.....	42
3- PROPOSIÇÃO.....	44
4- MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1- Materiais.....	45
4.1.1- Dentes.....	45
4.1.2- Microrganismo.....	45
4.1.3- Meios de cultura.....	45
4.1.4- Teste de detecção e quantificação de endotoxinas.....	45
4.1.5- Substâncias químicas auxiliares utilizadas para remoção da <i>smear layer</i>	45
4.1.6- Solução irrigadora.....	46
4.1.7- Instrumentos e outros materiais.....	46

4.2- Métodos.....	47
4.2.1- Seleção das amostras.....	47
4.2.2- Preparo dos dentes.....	48
4.2.2.1- Limpeza mecânica dos dentes e padronização das raízes.....	48
4.2.2.2- Padronização do diâmetro do forame apical.....	49
4.2.2.3- Remoção da <i>smear layer</i>	50
4.2.2.4- Esterilização das amostras.....	50
4.2.3- Despirogenização dos espécimes e materiais utilizados para instrumentação....	51
4.2.4- Contaminação dos espécimes com <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922).....	51
4.2.5- Coletas endodônticas iniciais.....	53
4.2.5.1- Coleta microbiológica inicial (CM1).....	53
4.2.5.2- Coleta de endotoxinas inicial (CE1).....	54
4.2.6- Instrumentação dos espécimes com o sistema rotatório RaCe®.....	54
4.2.7- Coletas endodônticas finais.....	57
4.2.8- Processamento laboratorial das amostras.....	57
4.2.8.1- Amostras microbiológicas (CM1 e CM2).....	57
4.2.8.2- Amostras de endotoxinas (CE1 e CE2).....	58
4.2.8.2.1- Padronização da curva padrão de endotoxina.....	59
4.2.8.2.2- Padronização das diluições das amostras.....	61
4.2.8.2.3- <i>Layout</i> das microplacas para leitura.....	61
4.2.8.2.4- Cálculo da concentração de endotoxina.....	62
4.3- Análise estatística.....	65
5- RESULTADOS.....	66
5.1- Efeito do PQM na redução da carga microbiana e de endotoxinas dos canais radiculares infectados.....	67
6- DISCUSSÃO.....	68
6.1- Da importância do tema.....	68
6.2- Da metodologia.....	69
6.3- Dos resultados.....	71
7- CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	74
ANEXO.....	78

1- INTRODUÇÃO

Embora fatores químicos e físicos possam estar envolvidos, as bactérias são o principal agente etiológico das patologias pulpares e perirradiculares, exercendo papel de extrema relevância na indução e perpetuação de processos inflamatórios na polpa e no periápice. As agressões químicas e físicas podem induzir uma resposta inflamatória nestes tecidos, entretanto, uma agressão biológica tende a manter o processo patológico por mais tempo (ALVES et al., 2004).

Estudos têm demonstrado que estas infecções são polimicrobianas, com uma prevalência de bactérias anaeróbias estritas, principalmente Gram-negativas (VIANNA et al., 2007), que têm seu número aumentado graças a um conjunto de fatores como baixa tensão de oxigênio, resistência do hospedeiro e interações microbianas (PETERS; WESSELINK e VAN WINKELHOFF, 2002). As espécies cultiváveis mais frequentemente detectadas na infecção primária são Gram-negativas e pertencem aos gêneros *Tannerella*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter* e *Treponema* (MOHAMMADI, 2011).

Essa infecção mista e polimicrobiana está presente não apenas no interior do sistema de canais radiculares, como também em túbulos dentinários e em áreas de reabsorção radicular (HAAPASALO e ØRSTAVIK, 1987). Entretanto, não só as bactérias, mas também as moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana mais externa da parede celular das bactérias Gram-negativas são capazes de penetrar e se alojar nos túbulos dentinários (HORIBA et al., 1990; NISSAN et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2005).

Essas moléculas de LPS são as chamadas endotoxinas, que têm na sua porção Lípide A a sua parte mais tóxica, e são liberadas na forma de vesículas durante a multiplicação ou morte celular bacteriana, causando diversos efeitos biológicos relevantes, principalmente na patogênese das lesões periapicais (LEONARDO et al., 2004). Seus inúmeros efeitos inflamatórios incluem a indução de mediadores e citocinas, cuja ativação causa uma série de reações que são responsáveis por sintomas frequentemente associados a patologias de origem endodôntica (BUCK et al., 2001; SILVA et al., 2002).

Estudos têm sido conduzidos para a quantificação de endotoxinas no interior dos canais radiculares, fazendo relação entre sua presença e sinais e sintomas clínicos, tais como edema, exsudação e sintomatologia dolorosa (KHABBAZ; ANASTASIADIS e SYKARAS, 2001; SILVA et al., 2002; JACINTO et al., 2005; SCHEIN e SCHILDER, 2006).

O *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL), ou Lisado de Amebócitos *Limulus*, é o teste mais sensível e específico disponível para detecção de endotoxinas bacterianas associadas a bactérias Gram-negativas e tem sido utilizado para quantificar pequenas concentrações de endotoxinas em canais radiculares infectados (SCHEIN e SCHILDER, 2006; MARTINHO, 2007). Atualmente, existem quatro metodologias aprovadas pela *Federal Dental Association* (FDA) para detecção de endotoxinas, sendo uma delas o método quantitativo turbidimétrico Pyrogen-5000[®], em que a amostra é misturada ao reagente LAL reconstituído e é monitorada quanto ao aparecimento da turbidez (MARTINHO et al., 2010).

O principal objetivo do tratamento endodôntico é a eliminação de bactérias e seus subprodutos do sistema de canais radiculares. Para esse propósito, é realizada criteriosa limpeza do conteúdo séptico-necrótico através da instrumentação e irrigação do canal radicular (SCHILDER, 1974). Uma vez instituída a terapia endodôntica, através de um preparo químico-mecânico e obturação adequados, o profissional desequilibra a interação previamente estabelecida a favor do hospedeiro, possibilitando a reparação tecidual (ALVES et al., 2004).

Entretanto, na atualidade, o objetivo do tratamento de dentes decíduos e permanentes com polpa necrosada e lesões periapicais crônicas não é apenas a eliminação das bactérias, mas também a remoção de células mortas e inativação de endotoxinas, que podem permanecer e se difundir através da dentina e, desta forma, manter ou induzir o desenvolvimento de periapicopatias, mesmo que as bactérias sejam removidas (SILVA et al., 2004; VIANNA et al., 2007).

Sem dúvida, nos últimos anos, a fase do tratamento endodôntico que apresentou maiores transformações foi a o preparo do canal radicular. Desde a introdução da liga de níquel-titânio na Endodontia e o posterior desenvolvimento dos instrumentos rotatórios, várias pesquisas vêm demonstrando a superioridade e a rapidez na conclusão dos preparos realizados pela instrumentação mecanizada (SEMAAN et al., 2009) mas, sob o ponto de vista microbiológico, torna-se um desafio o alcance do equilíbrio entre a preservação anatômica do canal radicular e a descontaminação do terço apical (MICKEL et al., 2007).

O sistema rotatório RaCe[®], nome originado das iniciais de *Reamer with Alternating Cutting Edges* (alargador com arestas de corte alternadas) é composto por instrumentos rotatórios de níquel-titânio de diversos diâmetros e conicidades, possuindo excelente capacidade de corte, flexibilidade e segurança durante o preparo de canais curvos e/ou atresícos. O sistema possui um *design* diferenciado com algumas características específicas (como ângulos helicoidais alternados ó segmentos õretosõ e õtorcidosõ que evitam o

rosqueamento, acabamento eletroquímico da superfície, entre outros), e dá liberdade ao clínico de montar sua própria sequência com as limas que escolher trabalhar ou utilizar os *kits* montados pelo fabricante, como o *EasyRaCe* (para a maioria dos canais) e o *XtremeRaCe* (para canais mais complicados) (RODRIGUES et al., 2007; LOPES e SIQUEIRA JR., 2010; COHEN e HARGREAVES, 2011).

Estudos que avaliaram as limas RaCe[®] concluíram que os canais preparados com este sistema foram realizados de forma eficaz, segura, rápida, com pouca extrusão apical de debris e mantendo a sua curvatura original (LEONARDI, 2004; PAQUÉ; MUSCH e HÜLSMANN, 2005; ZARRABI; BIDAR e JAFARZADEH, 2006; MERRETT; BRYANT e DUMMER, 2006; ZAND et al., 2007; RODRIGUES et al., 2007). Entretanto, a maioria destes estudos tem maior foco na parte mecânica do sistema, e pouco falam sobre a parte microbiológica, de sua capacidade de redução do conteúdo microbiano e endotóxico, o que é fundamental para o sucesso da terapia.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* a capacidade de redução da carga microbiana e dos níveis de endotoxinas de canais radiculares contaminados utilizando a sequência de limas rotatórias RaCe[®], tendo em vista a influência destes fatores na obtenção do sucesso no tratamento endodôntico.

2- REVISÃO DA LITERATURA

Mais de 700 espécies ou filotipos bacterianos, dos quais mais de 50% ainda não foram cultivados, têm sido detectados na cavidade oral. A cavidade oral é formada por diversas superfícies, cada uma recoberta por um grande número de bactérias, o chamado biofilme bacteriano. Algumas destas bactérias têm sido relacionadas com doenças orais como a cárie e periodontite, que estão entre as infecções bacterianas mais comuns em humanos (AAS et al., 2005).

2.1- Infecção endodôntica primária

2.1.1- Histórico

A associação entre bactérias e a patologia perirradicular foi relatada pela primeira vez por Willoughby Dayton Miller, um Cirurgião Dentista norte-americano que trabalhava no laboratório de Robert Koch em Berlim, na Alemanha, em 1894, após a análise de material coletado de canais radiculares contendo polpas necrosadas. Naquela época, ele reconheceu que algumas bactérias de amostras de canais radiculares que ele tinha visto em seu microscópio não podiam ser cultivadas utilizando a tecnologia disponível. Muitas daquelas bactérias eram, provavelmente, anaeróbias. Através de bacterioscopia do esfregaço de material coletado de 250 canais radiculares infectados, o autor observou a presença dos três tipos morfológicos básicos de células bacterianas: cocos, bacilos e espirilos, constatando que as infecções endodônticas eram mistas e que, depois de transcorrido longo tempo de infecção, havia uma maior concentração bacteriana e uma maior diversidade de espécies do que em infecções iniciais (MILLER, 1894).

Isso ocorreu quase 200 anos após a primeira observação registrada de bactérias no canal radicular, quando, no século XVII, um holandês construtor amador de microscópios, Antony van Leeuwenhoek (1632-1723) relatou que os canais radiculares de um dente cariado estavam repletos de uma matéria amolecida e que não coisa toda parecia estar viva.

Entretanto, o papel dos então chamados ãanimalículosö de Leeuwenhoek na causa da doença perirradicular era desconhecido na época (DOBELL, 1932).

Aproximadamente 70 anos após o estudo clássico de Miller, KAKEHASHI; STANLEY e FITZGERALD (1965) confirmaram, definitivamente, o papel essencial desempenhado por bactérias na etiopatogenia das doenças pulpares e perirradiculares. Para tal, os autores expuseram ao meio bucal um total de 36 polpas de molares de ratos com 7 semanas de vida, sendo 15 convencionais e 21 "*germ-free*". Os autores verificaram que nos animais convencionais ocorreu o desenvolvimento de inflamação crônica culminando com necrose pulpar e lesões perirradiculares, enquanto que nos animais "*germ-free*" a resposta pulpar foi caracterizada pela presença mínima de inflamação e por deposição de dentina neoformada na área exposta isolando o tecido pulpar da cavidade oral. Assim, ficou demonstrada a importância da presença de microrganismos na instalação das infecções endodônticas.

SUNDQVIST (1976) realizou um estudo que também representou um marco na literatura endodôntica, tendo em vista o fato de que seus achados revolucionaram os conceitos até então vigentes. Este autor aplicou técnicas avançadas de cultura anaeróbica para a avaliação das bactérias presentes nos canais radiculares de dentes cujas polpas se tornaram necróticas após sofrerem trauma. Foram encontradas bactérias apenas nos canais radiculares dos dentes que exibiram evidência radiográfica de periodontite apical, confirmando a etiologia infecciosa da doença. Bactérias anaeróbias foram responsáveis por mais de 90% dos microrganismos isolados. O estudo também serviu para demonstrar que, na ausência de infecção, o tecido pulpar necrótico e o tecido estagnado dentro do canal radicular não podem, por si só, induzir e perpetuar lesões de periodontite apical.

MÖLLER et al. (1981), com o objetivo de analisar o papel exercido pelos microrganismos na etiopatogenia das lesões perirradiculares, induziram de forma asséptica e séptica, necrose em dentes de macacos. As análises clínica, radiográfica, microbiológica e histológica, após 6 a 7 meses, evidenciaram que, nos casos de polpas necrosadas não infectadas, os tecidos perirradiculares estavam desprovidos de inflamação e indícios de reparação, enquanto que nos dentes com polpa infectada, houve sempre o desenvolvimento de lesões perirradiculares.

2.1.2- Conceito

A infecção endodôntica intrarradicular é causada por microrganismos que colonizam o sistema de canais radiculares e pode ser subdividida em 3 categorias, de acordo com o momento em que estes microrganismos penetram neste sistema: infecção primária, causada quando há invasão e colonização bacteriana inicial do tecido pulpar necrótico (infecção inicial ou òvirgemö); infecção secundária, quando os microrganismos não estão presentes na infecção primária, mas foram introduzidos no canal radicular depois da intervenção profissional; e infecção persistente, quando os microrganismos já eram membros de uma infecção primária ou secundária e, de alguma forma, resistiram a procedimentos antimicrobianos intracanaís e conseguiram suportar períodos de privação de nutrientes em canais tratados (COHEN e HARGREAVES, 2011).

2.1.3- Microbiologia dos canais radiculares infectados primariamente

Dentre os muitos fatores que podem influenciar e serem associados ao crescimento e à colonização bacteriana no interior dos canais radiculares, a disponibilidade de nutrientes é um dos mais importantes. O tecido pulpar desintegrado e os fluidos teciduais constituem fontes essenciais de nutrientes nos canais (SUNDQVIST, 1992).

Outro tipo de associação relatado é o que ocorre entre bactérias específicas e características clínicas. Muitas são as espécies bacterianas capazes de colonizar os canais radiculares, e tem sido demonstrado que há uma correlação entre a presença de bactérias específicas e alguns sinais e sintomas clínicos. Conseqüentemente, a microflora encontrada em dentes assintomáticos é diferente daquela isolada de dentes sintomáticos. A presença de certos microrganismos, particularmente *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* e os chamados ôbacilos produtores de pigmento negroö (*Prevotella* e *Porphyromonas*) é frequentemente associada ao aumento da incidência de sintomatologia dolorosa, edema, exsudato purulento, e outros sinais e sintomas das infecções endodônticas (GOMES; LILLEY e DRUCKER, 1996).

Além da nutrição e das interações microbianas, o pH, a baixa tensão de oxigênio, a temperatura e a resistência do hospedeiro são fatores ecológicos importantes que tendem a

favorecer o crescimento de espécies anaeróbias no interior dos canais radiculares (PETERS; WESSELINK e VAN WINKELHOFF, 2002).

Os microrganismos Gram-negativos não somente possuem diferentes fatores de virulência e formam produtos e subprodutos que são tóxicos aos tecidos periapicais, mas também liberam endotoxinas de suas paredes celulares, que podem iniciar ou manter a resposta inflamatória e reabsorção óssea nestes tecidos (SILVA et al., 2004).

VIANNA et al., em 2007, ressaltaram que estudos têm demonstrado que a infecção endodôntica primária é polimicrobiana, com uma prevalência de bactérias anaeróbias estritas, incluindo espécies Gram-negativas dos gêneros *Fusobacterium*, *Porphyromonas* e *Prevotella*, e também espécies de bactérias Gram-positivas do gênero *Peptostreptococcus*.

Outras características das bactérias Gram-negativas justificam sua maior patogenicidade, capacidade de ampliação da inflamação e resistência maior frente ao exsudato e ao infiltrado inflamatório. Dentre elas, se destaca a existência de três camadas ou envoltórios em sua parte externa, diferente das Gram-positivas que apresentam apenas um envoltório correspondente, estruturalmente, à membrana mais interna das encontradas nas Gram-negativas. Em relação à composição dos três envoltórios celulares das Gram-negativas, o mais interno possui duas camadas fosfolipídicas; o segundo, intermediário, compõe-se de peptideoglicanas e o terceiro, mais externo, tem a camada interna de fosfolipídios e a externa composta por lipopolissacarídeos, altamente tóxicos (CONSOLARO, 2009).

Microrganismos e seus produtos estão indubitavelmente associados à indução e à perpetuação das doenças pulpares e perirradiculares. Enquanto a polpa se encontrar em estado de vitalidade, uma infecção não se instalará neste tecido. Todavia, se o tecido pulpar se tornar necrosado, microrganismos invadem e colonizam o sistema de canais radiculares (LOPES e SIQUEIRA JR., 2010).

Microrganismos participativos podem estar envolvidos nas etapas iniciais da invasão pulpar (geralmente através de lesões de cárie), o que culmina em inflamação e necrose posterior, ou podem ser microrganismos retardatários que aproveitaram a vantagem das condições ambientais no canal radicular após a necrose pulpar. As infecções primárias são caracterizadas por uma comunidade mista conspicuamente dominada por bactérias anaeróbias. O número de células bacterianas pode variar de 10^3 a 10^8 por canal radicular. Estudos moleculares revelaram uma média de 10 a 20 espécies/filotipos por canal infectado (COHEN e HARGREAVES, 2011).

Na **Figura 1** (página 25), pode ser observado desenho esquemático demonstrando a célula bacteriana e as diferenças nos envoltórios celulares das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

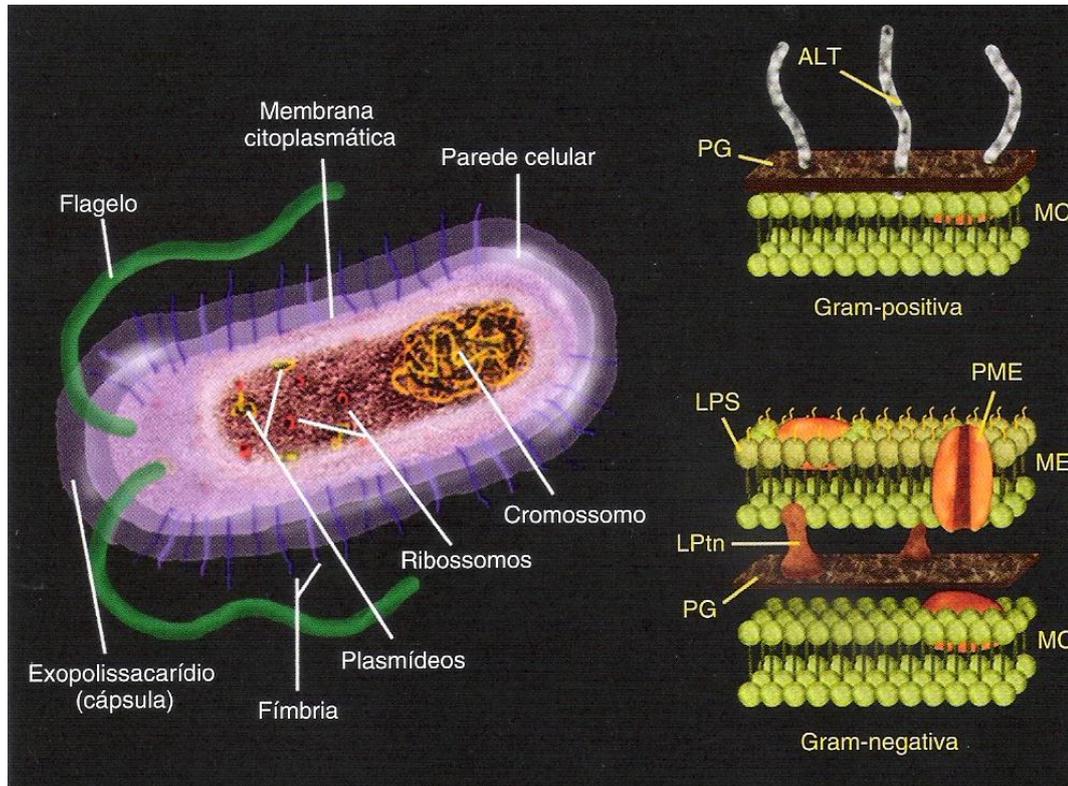


Figura 1 À esquerda, a célula bacteriana e algumas de suas organelas. No detalhe à direita, esquema que diferencia o envoltório celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Fonte: COHEN e HARGREAVES, 2011.

2.1.4- Viabilidade dos microrganismos nos túbulos dentinários

A infecção mista e polimicrobiana descrita anteriormente está presente não apenas no interior do sistema de canais radiculares como também em túbulos dentinários e em áreas de reabsorção radicular (HAAPASALO e ØRSTAVIK, 1987).

Uma penetração pouco profunda nestes túbulos é mais comum, observada em aproximadamente 300 μm em alguns dentes. Divisão celular pode ser frequentemente percebida em seu interior em exames *in situ* (SIQUEIRA; RÔÇAS e LOPES, 2002).

Relatou-se também que a infecção do túbulo dentinário pode ocorrer em cerca de 70 a 80% dos dentes que apresentam lesões de periodontite apical (MATSUO et al., 2003).

Estes dados indicaram que as bactérias podem obter nutrientes dentro dos túbulos, provavelmente a partir de processos odontoblásticos degradados, de colágeno desnaturado, de células bacterianas mortas durante o curso da infecção e de fluidos intracanaís que penetram nos túbulos por capilaridade. Os túbulos dentinários atravessam toda a largura da dentina e possuem uma conformação cônica, com o diâmetro maior localizado próximo à polpa (medindo em média 2,5 μm) e o menor diâmetro, localizado na periferia, próximo ao esmalte ou ao cimento (medindo em média 0,9 μm). O menor diâmetro do túbulo é compatível com o diâmetro celular da maioria das espécies bacterianas orais, que geralmente varia entre 0,2 a 0,7 μm (COHEN e HARGREAVES, 2011).

2.1.5- Contagem das unidades formadoras de colônia

FERREIRA (2003) investigou a microbiota dos canais radiculares de dentes de cães com reação periapical induzida, antes e após o preparo biomecânico e após diferentes curativos. Foram utilizados 40 dentes pré-molares de 5 cães adultos, sendo que 4 dentes do lado direito dos cães foram abertos e instrumentados com ampliação foraminal padronizada e mantidos abertos por 7 dias e, do lado esquerdo, 4 dentes foram abertos assepticamente sob isolamento absoluto e tiveram suas polpas removidas e os forames ampliados. Após isto, receberam endotoxina de *Escherichia coli* sorotipo 011-B4 (Sigma-Aldrich) na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Todos os dentes foram vedados com resina composta e então feitos controles clínicos e radiográficos após 2, 3 e 4 meses, para verificação da presença de reação periapical. Quando esta foi radiograficamente evidente (3 meses em média) os dentes foram submetidos ao tratamento endodôntico. Coletas microbiológicas foram feitas antes (1^a) e depois (2^a) da instrumentação com soro fisiológico e precedidas de desinfecção do campo sob isolamento absoluto. Foram inseridos curativos com clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio 10% em água destilada e extrato etanólico de própolis 10% em propilenoglicol, além do grupo controle sem curativo, nos diferentes dentes e em sistema de rodízio. Após 15 dias do curativo, estes foram removidos assepticamente e feita nova coleta (3^a). Os dentes foram selados com os canais vazios e dentro de 1 semana foi feita a 4^a e última coleta. As coletas foram processadas anaerobicamente para identificação dos microrganismos e feita a contagem visual das

unidades formadoras de colônias (UFC). Foi observado que o preparo biomecânico proporcionou boa redução no número de UFCs e a redução significativa de anaeróbios. Os 3 curativos utilizados permitiram redução microbiana de forma semelhante, havendo a reincidência de microrganismos após 1 semana de canal vazio. Os dentes contaminados apenas com endotoxina bacteriana mostraram uma quantidade menor de UFCs e número de espécies nas diversas coletas. A conclusão foi de que a instrumentação promoveu uma redução significativa de microrganismos, assim como o uso de medicamentos intracanaís. Entretanto, a manutenção do canal vazio após a medicação intracanal permite a recolonização do mesmo.

JACINTO et al. (2005) quantificaram a concentração de endotoxina em canais necróticos e investigaram a possível relação entre essa concentração e sinais e sintomas clínicos. As amostras foram coletadas de 50 canais com necessidade de tratamento endodôntico por necrose pulpar. Técnicas anaeróbicas para determinar o número de UFCs em cada amostra, e um teste quantitativo cromogênico LAL foi utilizado para mensurar a concentração de endotoxina em cada amostra. A presença de UFCs foi detectada por cultura em todas as amostras. Nas amostras de casos de dor espontânea, a média de UFC foi de $1,43 \times 10^6$, enquanto que nos casos assintomáticos foi de $9,1 \times 10^4$. Endotoxina estava presente em todas as amostras estudadas. A concentração média de endotoxina nas amostras de pacientes com dor espontânea foi de $18540,0 \text{ EUmL}^{-1}$, enquanto que nos casos assintomáticos foi de $12030,0 \text{ EUmL}^{-1}$. Casos assintomáticos geralmente têm menores níveis endotoxina (associação negativa), enquanto que uma associação positiva foi encontrada entre a endotoxina e casos sintomáticos (com dor espontânea, sensibilidade à percussão, dor à palpação, edema e/ou exsudato purulento). Este estudo demonstrou que a endotoxina está presente em altas concentrações nos canais de dentes sintomáticos, e houve uma correlação positiva entre a concentração de endotoxina nos canais e a presença de sinais e sintomas.

VIANNA et al. (2007) realizaram estudo a fim de determinar a quantidade de endotoxina e de bactérias cultiváveis em canais radiculares necróticos de humanos, antes (S1) e após a instrumentação utilizando clorexidina gel como substância química auxiliar (S2), e após 7 dias de medicação intracanal (S3), para avaliar os efeitos antimicrobiano e anti-endotóxico dos procedimentos endodônticos. Para tal, foram selecionados 24 dentes unirradiculares, instrumentados utilizando clorexidina gel 2% e 3 medicações intracanaís diferentes (pasta de hidróxido de cálcio; clorexidina gel 2%; hidróxido de cálcio + clorexidina gel 2%). Um método quantitativo cromogênico de LAL foi usado para mensurar a quantidade de endotoxina. Técnicas aeróbicas e anaeróbicas foram usadas para isolar e identificar as

bactérias, e para determinar a redução bacteriana pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Endotoxinas e bactérias estavam presentes em 100% das amostras iniciais, com concentração de endotoxina variando de 62,93 a 214,56 EU/mL, e UFC variando de 4×10^5 a $2,6 \times 10^6$. Após o PQM, foi encontrada uma média de redução de endotoxina de 44,4%. Por análise de cultura, 8 canais radiculares (33,3%) ainda estavam positivos, com uma média de redução bacteriana (UFC) de 99,96%. Após 7 dias de medicação intracanal, a concentração de endotoxina decaiu apenas 1,4% comparada com S2, e bactérias residuais foram encontradas por análise de cultura em 13 casos (54,1%). Não foi encontrada diferença significativa entre as diferentes medicações intracanaís. Os autores concluíram que valores relativamente altos de endotoxina ainda estavam presentes no canal radicular após a instrumentação, embora a maioria das bactérias tenha sido eliminada. Nenhuma melhora foi alcançada após 7 dias de medicação intracanal.

MARTINHO e GOMES (2008) conduziram um estudo clínico para quantificar endotoxinas e bactérias cultiváveis em dentes com polpa necrosada e periodontite apical antes e após o preparo químico-mecânico com hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5%, e investigar a possível correlação de ambas com a presença de sintomatologia clínica. Foram selecionados 24 canais radiculares de humanos, e as amostras foram coletadas antes (s1) e após a instrumentação (s2). Técnicas de cultura foram usadas para determinar as unidades formadoras de colônia, e para a quantificação de endotoxinas foi utilizado o teste de LAL. Endotoxina e bactérias foram detectadas em 100% das amostras iniciais (s1), com uma concentração média de 139 EU/mL e $2,64 \times 10^5$ UFC/mL, respectivamente. Os maiores níveis de endotoxina foram encontrados em dentes com sintomatologia ($p < 0,05$). Em s2, foi encontrada uma redução média de endotoxina de 59,99% e de carga microbiana de 99,78%. Os resultados indicaram que o preparo químico-mecânico com NaOCl 2,5% foi moderadamente eficaz contra as bactérias, mas menos efetivo contra as endotoxinas na infecção do canal radicular. Além disso, uma associação estatisticamente significativa foi encontrada entre altos níveis de bactérias/endotoxinas e sintomatologia clínica.

2.2- Endotoxina

As moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana mais externa da parede celular das bactérias Gram-negativas são comumente conhecidas e denominadas como

endotoxinas. Estas expressam significância microbiológica e imunológica, sendo um fator determinante de virulência nas espécies patogênicas, e são liberadas na forma de vesículas em decorrência de multiplicação ou morte celular bacteriana. Assim, exercem uma série de efeitos biológicos relevantes, que conduzem à reação inflamatória e à reabsorção dos tecidos mineralizados (LEONARDO et al., 2004).

Na **Figura 2 (página 29)**, podemos observar a presença do LPS no envoltório mais externo da membrana celular das bactérias Gram-negativas, bem como os demais envoltórios ricos em fosfolipídios.

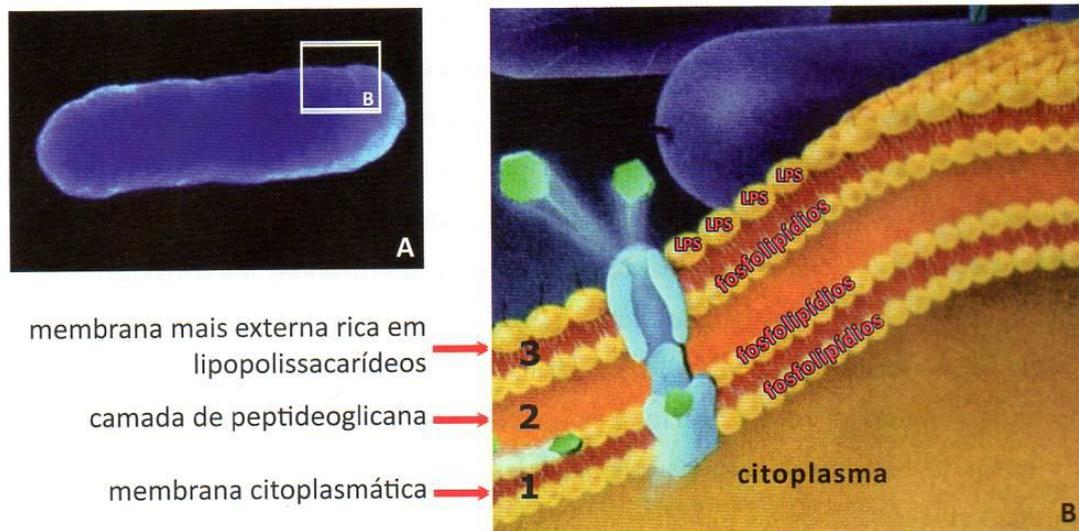


Figura 2 **A** é Bactéria Gram-negativa; **B** é Aspecto dos três envoltórios celulares.
Fonte: CONSOLARO, 2009.

2.2.1- Descrição estrutural da endotoxina

O LPS, ou endotoxina, é uma parte importante da membrana externa da parede celular das bactérias Gram-negativas. Sua estrutura é composta de polissacarídeos, antígeno O e do Lípide A. Os polissacarídeos são encontrados em cadeias laterais repetidas que se estendem para fora do organismo. Estas unidades repetidas são usadas para identificar as diferentes bactérias Gram-negativas. O Lípide A é efetivamente responsável pelas propriedades tóxicas que fazem com que qualquer infecção por Gram-negativos se transforme num problema médico ou potencialmente sério. Como as bactérias liberam estas endotoxinas principalmente

quando estão morrendo, matá-las pode aumentar a concentração desta substância tóxica (BLACK, 2002).

A porção denominada Lípide A exerce a maior parte das atividades endotóxicas e é chamada de princípio endotóxico do LPS, sua porção conservada. Essa molécula é responsável pelo desenvolvimento e/ou manutenção da sobrevivência bacteriana. O antígeno O, que é a porção mais variável do LPS, e a parte intermediária não são essenciais, permitindo alterações evolucionárias aos microrganismos, sem consequências catastróficas. Entretanto, na última década, novas evidências têm emergido com relação à diversidade e heterogeneidade dos componentes do LPS, assim como da porção estrutural denominada Lípide A, que até então era considerada estável a mudanças. Uma mudança em menor ou em maior proporção no Lípide A pode produzir efeitos diversos na modulação da resposta imune (DIXON e DARVEAU, 2005).

VIANNA (2006) apresentou esquema demonstrando os aspectos estruturais do LPS (endotoxina), como pode ser observado na **Figura 3 (página 30)**:

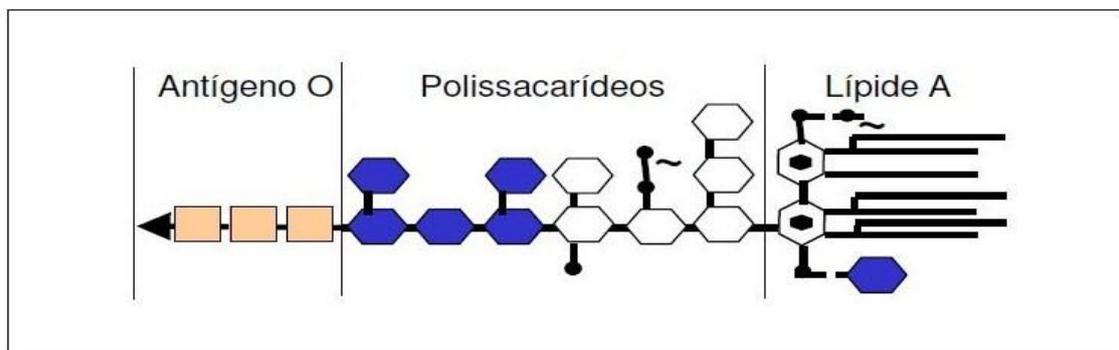


Figura 3 6 Estrutura do LPS (endotoxina): a parte chamada Lípide A se liga à membrana bacteriana. Na sua parte central, há diferentes cadeias de açúcares e, no outro extremo, cadeias de polissacarídeos (Antígeno O).

Fonte: VIANNA, 2006.

2.2.2- Potencial inflamatório da endotoxina

DAHLÉN e HOFSTAD (1977) extraíram LPS a partir de três cepas bacterianas Gram-negativas isoladas de canais radiculares infectados de macacos. Eles observaram que todas as preparações de LPS causaram inflamação quando injetadas via intracutânea na pele de

coelhos e indução de quimiotaxia de leucócitos em feridas feitas em ratos, indicando atividade endotóxica. Com base nestes resultados, pôde-se supor que o LPS desempenha um papel no desenvolvimento e na manutenção da inflamação crônica dos tecidos periapicais.

A molécula de LPS da bactéria Gram-negativa é um potente mediador inflamatório, que permanece ativo mesmo após a morte da célula bacteriana. Estas células Gram-negativas podem até mesmo ser fagocitadas por macrófagos e, em seguida, a endotoxina ser liberada com maior toxicidade. São inúmeros os efeitos inflamatórios da endotoxina. O LPS induz prostaglandinas, leucotrienos, fator de agregação plaquetária, sistema complemento 3a e 5a, interleucina-1, entre outros. A ativação destes mediadores causa aumento da permeabilidade vascular, marginação de neutrófilos nas células endoteliais, quimiotaxia de neutrófilos, liberação de collagenase, indução de febre, ativação de linfócitos e uma série de outros efeitos biológicos, incluindo reabsorção óssea e formação de granulomas. Reações como estas são responsáveis por sintomas frequentemente associados a patologias de origem endodôntica (BUCK et al., 2001).

Além disso, o LPS tem a capacidade de aderir irreversivelmente aos tecidos mineralizados (TANOMARU et al., 2003).

Fatores de virulência e produtos do metabolismo bacteriano são responsáveis pelo dano direto ao tecido pulpar, enquanto que componentes estruturais da célula bacteriana, como o lipopolissacarídeo, podem injuriar o tecido indiretamente, pela ativação da resposta imune (ALVES, 2004).

2.2.3- Difusão pelos túbulos dentinários

HORIBA et al. (1990) avaliaram o conteúdo endotóxico de amostras de dentina da superfície pulpar de canais radiculares infectados com periodontite apical. Trinta dentes extraídos de 27 pacientes foram seccionados até a obtenção de espécimes com 1 mm² de área total de dentina. Foi utilizado um método colorimétrico de detecção de endotoxina. Os autores concluíram que o conteúdo endotóxico foi significativamente maior na profundidade de até 300 µm desde a superfície pulpar. Este dado sugere que bactérias Gram-negativas podem estar distribuídas, principalmente, nesta mesma profundidade.

NISSAN et al. (1995) desenvolveram um dispositivo, *in vitro*, para avaliar a capacidade de difusão da endotoxina através da dentina. Cavidades foram preparadas em 5

terceiros molares a fim de produzir uma fenda que separasse a superfície oclusal da câmara pulpar por 0,5 mm de dentina interposta. A endotoxina foi introduzida nesta cavidade oclusal, e do efluente da câmara pulpar foram coletadas amostras a cada 30 min durante 5 h e às 24 h, utilizando o Lisado de Amebócitos *Limulus* (LAL). Em 4 espécimes, o aparecimento inicial da endotoxina no efluente variou de 15 min à 4 h 30 min. Em 2 espécimes, a concentração de endotoxina no efluente estabilizou-se em 4 h 30 min e 5 h, respectivamente, enquanto em outros 2 a concentração continuou a aumentar durante todo o experimento. Em 1 espécime não foi detectada endotoxina. Os resultados indicaram que a endotoxina é capaz de passar através de 0,5 mm de dentina.

OLIVEIRA et al. (2005) avaliaram, *in vitro*, a capacidade e o tempo necessário para a endotoxina se difundir pelos túbulos dentinários em direção ao cimento. Foram utilizados 30 dentes humanos unirradiculares, instrumentados até a lima tipo K #30 e impermeabilizados externamente com adesivo epóxi, deixando-se 10 mm de raiz exposta (terço médio). Os espécimes foram acondicionados em tubos plásticos e submetidos à radiação Gama-Cobalto 60. Após a radiação, os dentes foram divididos em 2 grupos (n = 15): G1 ó onde foi inoculada uma solução de endotoxina de *Escherichia coli* no canal radicular dos espécimes e 1 mL de água apirogênica foi colocado no interior dos tubos; G2 (controle negativo) ó onde foi inoculada água apirogênica nos canais radiculares e 1 mL de água apirogênica foi colocado em cada tubo. Após 30 min, 2 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h e 7 dias, a água do interior dos tubos foi removida e substituída por outra. A alíquota removida foi testada para se detectar presença de endotoxina através da produção de anticorpos (IgM) em cultura de linfócitos B, pois a endotoxina é um ativador policlonal destas células. Após a análise estatística (ANOVA e Tukey) dos resultados, foi verificado que a água removida dos tubos após 24 h, 48 h, 72 h e 7 dias induziu maior produção de anticorpos em relação a que foi removida nos demais períodos, com diferença significativa ($p < 0,05$). Assim, a endotoxina foi capaz de se difundir pelos túbulos dentinários em direção ao cimento, atingindo a região externa da raiz após 24 h.

2.2.4- Relação da endotoxina com sinais e sintomas clínicos

KHABBAZ; ANASTASIADIS e SYKARAS (2001) investigaram a presença de endotoxina em dentes cariados humanos sintomáticos ou não, com diagnóstico de pulpite reversível e irreversível, quantificaram a endotoxina presente nas amostras, e estudaram sua

associação com a pulpite aguda. Foram coletadas amostras de tecido pulpar de 28 dentes unirradiculares cariados (15 sintomáticos e 13 assintomáticos) e, para o grupo controle, 5 amostras de dentes não cariados. Durante a coleta, foi feito um esforço para se retirar uma quantidade semelhante de tecido pulpar de cada amostra (8 mg). Para extração da endotoxina, 3 mL de água fenólica foram adicionados a cada um dos tubos contendo tecido pulpar. Estes foram centrifugados por 50 min originando uma solução de 2 fases: fase superior formada pela endotoxina e fase inferior pelo fenol. A quantificação de endotoxina foi realizada pelo método quantitativo cromogênico LAL. Os resultados demonstraram que endotoxinas foram detectadas em todas as amostras de tecidos pulpares, sintomáticos ou não, dos dentes cariados; no entanto, não estavam presentes no grupo controle (composto por dentes hígidos). A concentração de endotoxinas no tecido pulpar de dentes sintomáticos foi significativamente mais alta do que em dentes assintomáticos.

SILVA et al. (2002) realizaram uma avaliação histopatológica dos tecidos apicais e periapicais de 60 dentes de cães, inoculados com endotoxina de *Escherichia coli* associada ou não ao hidróxido de cálcio. O Grupo 1 (n=20) foi inoculado com 0,1 mL de endotoxina e o Grupo 2 (n=20) foi inoculado com 0,1 mL endotoxina associada ao hidróxido de cálcio. Para o Controle Negativo (n=10), foi utilizado soro fisiológico estéril e, para o Controle Positivo (n=10), as raízes ficaram expostas à cavidade oral durante 5 dias consecutivos. A intensidade e tipo do infiltrado inflamatório, o espessamento do ligamento periodontal e a presença de reabsorção dos tecidos mineralizados (dentina, cimento e osso alveolar) foram analisados. O Grupo 1 apresentou infiltrado inflamatório moderado a intenso, com predomínio de neutrófilos próximo ao ápice e, mais distante do forame apical, a presença de neutrófilos e macrófagos, além de áreas de reabsorção do cimento e do osso alveolar ativas. Para o Grupo 2, 18 das 20 raízes apresentaram a região apical e periapical com características de normalidade. Áreas de reabsorção óssea foram observadas em apenas 2 casos. Para o Controle Negativo o osso alveolar, cimento e ligamento periodontal estavam normais. Para o Controle Positivo o cimento radicular apresentou-se irregular e com áreas de reabsorção, e um concentrado celular inflamatório próximo a abertura apical. O osso alveolar apresentou extensas áreas de reabsorção na maioria das amostras, e foram encontrados microrganismos em todas elas. Estes resultados levaram à conclusão de que o LPS bacteriano é capaz de induzir e desenvolver lesão periapical, em dentes de cães, sugerindo ainda que o hidróxido de cálcio é capaz de inibir a ação tóxica da endotoxina, *in vivo*, mesmo em altas concentrações.

TANOMARU et al. (2003) avaliaram o efeito do PQM com diferentes soluções irrigadoras e medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio, em 140 pré-molares de 7

cães, inoculados com LPS de *Escherichia coli* por 10 dias. Os dentes foram divididos em 7 grupos, de acordo com a solução irrigadora utilizada: NaOCl 1% (G1), NaOCl 2,5% (G2), NaOCl 5% (G3), digluconato de clorexidina 2% (G4), solução salina (G5), apenas o LPS (G6 ó controle positivo) e preenchimento com pasta Calen[®], após irrigação com soro fisiológico (G7 ó controle negativo). Após 60 dias, os animais foram sacrificados e os seguintes parâmetros foram avaliados: presença de infiltrado inflamatório, espessura do ligamento periodontal e desenvolvimento de reabsorção cementária e óssea. A avaliação histopatológica demonstrou que do G1 ao G6 houve maior infiltrado inflamatório, maior espessamento do ligamento periodontal e maiores áreas de reabsorção cementária e óssea quando comparados ao G7. Os autores concluíram que o preparo biomecânico associado às soluções irrigadoras testadas não inativou os efeitos da endotoxina; mas, o uso da medicação intracanal com hidróxido de cálcio parece inativar os efeitos da endotoxina *in vivo*.

SCHEIN e SCHILDER (2006) detectaram e quantificaram os níveis de endotoxina no fluido aspirado de 40 canais radiculares de dentes endodonticamente comprometidos, através do teste de LAL. Os grupos foram divididos segundo características clínicas (G1 ó polpa vital, assintomáticos; G2 ó polpa vital, sintomáticos; G3 ó dentes despolpados e assintomáticos; e G4 ó dentes despolpados e sintomáticos) e radiográficas (GA ó ausência de área radiolúcida periapical; e GB ó presença de área radiolúcida periapical). Os achados demonstraram que houve diferença estatisticamente significativa do G1 ao G4 e entre GA e GB, onde o G4 e o GB apresentaram a maior quantidade de endotoxina.

2.2.5- Outros estudos com a endotoxina

DAHLÉN e BERGENHOLTZ (1980) investigaram a atividade endotóxica do conteúdo de 13 canais radiculares com necrose pulpar utilizando o teste de LAL, e relacionaram essa atividade à contagem de bactérias viáveis isoladas. As amostras foram coletadas e submetidas ao teste para quantificação. Como conclusão, a atividade endotóxica das amostras foi correlacionada positivamente à presença e ao número de bactérias Gram-negativas no canal radicular.

GOMES; MARTINHO e VIANNA (2009) realizaram estudo clínico para avaliar a eficácia do PQM com NaOCl 2,5% e clorexidina (CLX) gel 2% em eliminar LPS bacteriano de dentes com polpa necrosada e periodontite apical. Foram selecionados dentes de 54

pacientes, e as amostras foram coletadas antes (s1) e após (s2) o PQM, que foi realizado em 20 min em todos os canais (G1 ó n= 27 ó NaOCl 2,5%; G2 ó n= 27 ó CLX gel 2%), com limas rotatórias GT[®] nos 2/3 cervicais, complementação com brocas de Gates-Glidden #5, 4, 3, 2 e, no terço apical, com limas tipo K manuais até #35 a 45. Foi utilizado o método LAL para quantificação de endotoxinas. Estas estavam presentes em 100% das amostras avaliadas, com um valor médio de 272 EU/mL (G1) e 152,46 EU/mL (G2). Como resultado do PQM, o conteúdo de LPS foi reduzido para um valor médio de 86 EU/mL (G1) e 85 EU/mL (G2). Maiores valores percentuais de redução de endotoxina foram encontrados em G1 (p < 0,05). Os autores concluíram que o NaOCl 2,5% e a CLX gel 2% não foram efetivos na eliminação de endoxina de canais infectados primariamente.

MARTINHO et al. (2010) investigaram a capacidade do PQM com NaOCl 2,5% e EDTA 17% em remover endotoxina de 21 canais radiculares com infecção primária e presença de periodontite apical utilizando para instrumentação o sistema rotatório Mtwo[®]. Amostras foram coletadas antes (s1) e após (s2) o PQM. O teste de LAL foi utilizado para a quantificação de endotoxinas. Os resultados indicaram a presença de endotoxinas em 100% dos canais avaliados (antes e após o PQM), e que o conteúdo endotóxico foi significativamente reduzido em s2 (98,06%) comparado a s1 (p < 0,05). A conclusão foi de que o PQM realizado com NaOCl 2,5% + EDTA 17% e as limas rotatórias Mtwo[®] foi efetivo na redução de endotoxinas de dentes infectados primariamente e com periodontite apical.

FROES (2011) avaliou, *ex vivo*, a redução do conteúdo endotóxico através de instrumentação automatizada com sistema rotatório ProTaper Universal[®], além de investigar o conteúdo residual de endotoxina nas paredes dos canais variando o diâmetro final das limas do mesmo sistema. Foram utilizados 12 pré-molares inferiores humanos extraídos, padronizados em 15 mm. LPS de *Escherichia coli* foi inoculado nos espécimes (n=10), com exceção do grupo controle (n=2) e, posteriormente, todos os dentes foram incubados por 24 h. Decorrido este período, os canais radiculares foram instrumentados através da sequência de limas do sistema ProTaper Universal[®] de acordo com o fabricante. Inicialmente (coleta inicial) e a cada troca de instrumento, cada canal foi inundado com água apirogênica e submetido a coletas por meio de cones de papel apirogênicos. Três sequências foram nomeadas de acordo com o diâmetro final utilizado no preparo: A (F1), B (F1 e F2) e C (F1, F2 e F3). O teste quantitativo cinético turbidimétrico Pyrogent-5000[®] foi utilizado para quantificação de endotoxinas. Este foi realizado em duplicata e os resultados foram planilhados e analisados através do teste não-paramétrico de Friedman. Os resultados demonstraram que todas as amostras coletadas acusaram a presença de endotoxina. Houve

diferença estatisticamente significativa na capacidade de redução endotóxica entre a coleta inicial e a lima S1, como também entre as limas F3, S2 e F1. A sequência C removeu um total maior do conteúdo endotóxico que as sequências B e A, havendo diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A conclusão foi de que a metodologia de inoculação de endotoxina empregada foi eficaz; as limas de modelagem apresentaram redução endotóxica maior do que as limas de acabamento; e que a sequência C proporcionou uma redução maior de LPS quando comparada à sequência B e à sequência A.

MAEKAWA et al. (2011) realizaram estudo com o objetivo de avaliar a eficácia de substâncias químicas auxiliares e medicações intracanaís sobre *Escherichia coli* e sua endotoxina nos canais radiculares. Para isto, 120 dentes unirradiculares humanos extraídos foram contaminados com uma suspensão desse microrganismo por 14 dias e divididos em 3 grupos, de acordo com a substância química auxiliar utilizada: G1) NaOCl 2,5%; G2) CLX gel 2%; G3) solução apirogênica. Em seguida, os grupos foram subdivididos de acordo com a medicação intracanal: A) pasta de hidróxido de cálcio (Calen[®]); B) polimixina B; C) pasta de hidróxido de cálcio + CLX gel 2%. Para o grupo controle (G4), foi utilizada solução salina apirogênica sem aplicação de medicação intracanal. As amostras foram coletadas dos canais radiculares imediatamente após o PQM, 7 dias após o PQM, após 14 dias de medicação intracanal e 7 dias após a remoção da medicação intracanal. Os seguintes aspectos foram avaliados em todas as amostras: a) atividade antimicrobiana; b) quantificação de endotoxinas pelo teste LAL. Os resultados foram analisados pelos testes de Dunn e Kruskal-Wallis em nível de significância 5%. O NaOCl 2,5% e a CLX foram capazes de eliminar *Escherichia coli* da luz do canal radicular e reduziram o conteúdo endotóxico comparados ao grupo controle. Os autores concluíram que o NaOCl 2,5% e a CLX foram efetivos na eliminação da *Escherichia coli*, e apenas as medicações intracanaís estudadas foram capazes de reduzir o nível de endotoxina presente nos canais, independentemente do irrigante utilizado.

2.3- Método LAL de detecção da endotoxina

O método de detecção de endotoxinas mais utilizado é o Teste de *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL), o Lisado de Amébócitos *Limulus*, derivado da hemolinfa do Caranguejo Ferradura (*Limulus polyphemus*) que, quando exposto a quantidades pequenas de

endotoxinas, aumenta sua opacidade bem como sua viscosidade, tornando-se um gel duro (SCHEIN e SCHILDER, 2006).

Ele é considerado o teste mais sensível e específico disponível para a detecção e medida de endotoxinas provenientes das bactérias Gram-negativas, e tem sido utilizado para quantificar pequenas concentrações de endotoxinas em canais radiculares infectados. Este teste baseia-se numa reação enzimática ativada pela presença de endotoxina, e que ocorre entre ela e um componente protéico do LAL, produzindo um gel opaco facilmente reconhecido. A formação do gel indica que existe uma quantidade de endotoxina na amostra que é igual ou superior que a sensibilidade do LAL utilizado (MARTINHO, 2007).

Por causa de sua extrema sensibilidade às endotoxinas, o teste de LAL é o mais amplamente utilizado para a análise do conteúdo endotóxico. Existem diversos métodos de detecção de endotoxinas que utilizam a chamada reação de *Limulus* pelo LAL: os testes *gel clot*, turbidimétrico e cromogênico. Os primeiros estudos usavam uma análise semi-quantitativa de endotoxina, determinada apenas pela evidência de geleificação (teste de LAL *gel clot*). Mais recentemente, têm sido utilizados métodos quantitativos como o cromogênico *endpoint* (teste QCL) e o cinético cromogênico (teste KQCL), ambos determinando os níveis de endotoxina pela intensidade da cor amarela, e o teste cinético turbidimétrico, que se baseia na reação pela turbidez. Embora o método cromogênico *endpoint* tenha uma limitação em relação à falta de sensibilidade (limite de detecção: 0,1-1 unidade de endotoxina/ml [EU/mL]), os métodos cinético cromogênico (limite de detecção: 0,005-50 EU/mL) e cinético turbidimétrico (limite de detecção: 0,01-100 EU/mL) apresentam uma maior precisão. Por outro lado, os testes cinéticos possuem um problema com a duração do experimento (mais de 60 min contra 16 min no teste cromogênico *endpoint*) (MARTINHO et al., 2011).

2.3.1- Método quantitativo cinético turbidimétrico

Pyrogen-5000[®] (Lonza Group, Walkersville-MD, EUA) é um ensaio cinético quantitativo para detecção de endotoxina de bactéria Gram-negativa. Uma amostra é misturada com o reagente LAL reconstituído, colocada em um fotômetro e monitorada automaticamente até o aparecimento de turbidez. A reação ocorre na presença de endotoxina (LAL ativado). Esta, por sua vez, ativa uma pró-enzima (coagulase) que transforma coagulogênio em coagulina, conferindo turbidez à amostra. A amostra é então misturada ao

reagente de LAL reconstituído, colocada em um fotômetro (leitor de microplacas BIOTEK ELX 808, Lonza Group Ltd., Walkersville, EUA) e monitorada automaticamente pelo *software* WinKQCL[®] 3.0 (Lonza Group Ltd., Walkersville, EUA), até o aparecimento de turbidez. O intervalo necessário para a ocorrência da turbidez (tempo de reação) é inversamente proporcional à quantidade de endotoxina. Na presença de uma grande quantidade de endotoxina, a reação ocorre rapidamente; na presença de uma quantidade pequena de endotoxina, o tempo de reação é maior. A concentração de endotoxina nas amostras desconhecidas é calculada tomando como base uma curva padrão. A sua ampla sensibilidade de detecção (0,01-100 EU/mL) requer pequenas quantidades de diluição das amostras, o que otimiza o tempo laboratorial. A curva padrão é um parâmetro para o cálculo da quantidade de endotoxinas em amostras de canais radiculares. Uma curva padrão foi criada por meio de uso de uma concentração conhecida (100 EU/mL), onde suas diluições alcançam as concentrações finais de: 0,01, 0,1, 1, 10 EU/mL, de acordo com as instruções do fabricante (MARTINHO et al., 2010).

2.4- Eliminação da infecção endodôntica primária

Para se alcançar o sucesso na prática endodôntica, o sistema de canais radiculares deve ser limpo e modelado ó limpo de seus remanescentes orgânicos e modelado para receber uma obturação hermética tridimensional em todo o espaço do canal. Assim, durante o preparo do canal radicular, busca-se a remoção de tecido dentinário e pulpar de maneira a modelar o espaço endodôntico para que, ao final da instrumentação, este possua um formato cônico, com diâmetro diminuído gradativamente no sentido coroa-ápice, respeitando sua anatomia original, bem como o formato e a posição do forame apical (SCHILDER, 1974).

No canal radicular, a limitação de substrato e um acúmulo de produtos metabólicos e inibidores do crescimento dão origem a uma comunidade diversificada com uma variedade de interações bacterianas. O tratamento endodôntico interfere drasticamente neste sistema. A anaerobiose é quebrada quando o canal é aberto e o tratamento biomecânico elimina as bactérias, bem como priva o canal de nutrientes e interfere nas interações bacterianas (SUNDQVIST, 1992).

Entretanto, o preparo biomecânico do canal radicular apenas reduz parcialmente a microbiota endodôntica, mas não elimina as bactérias de todo o sistema e não age sobre o

LPS. Assim, o uso de uma medicação intracanal é considerado necessário por alguns autores (TANOMARU et al., 2003).

Atualmente, o objetivo do tratamento endodôntico de dentes decíduos e permanentes com polpa necrosada e lesões periapicais crônicas não é apenas a eliminação das bactérias, mas também a remoção de células mortas e inativação de endotoxinas, especialmente a inativação de sua parte mais tóxica, o Lípide A (SILVA et al., 2004).

O preparo biomecânico, independente da técnica ou do tipo de irrigação utilizados, proporciona uma redução significativa da microbiota, mas apenas no canal principal da raiz. Microrganismos remanescentes e aqueles situados em locais inacessíveis pelos instrumentos podem reinfetar o canal radicular após o preparo biomecânico e manter a lesão periapical após a obturação do canal radicular (LEONARDO et al., 2004).

AYDIN et al. (2007), ao realizarem estudo sobre a redução bacteriana pela instrumentação dos canais, destacaram trabalhos documentados clinicamente sobre a importância da eliminação bacteriana do canal radicular: dentes sem microrganismos detectáveis no momento da obturação cicatrizam em maiores proporções do que aqueles com cultura positiva.

Os microrganismos estão localizados em uma posição privilegiada e estratégica no interior do canal radicular contendo tecido necrosado. Células e moléculas de defesa não têm acesso à polpa necrosada e, portanto, não são capazes de eliminar os microrganismos nessa localização. Embora a fonte original da infecção no interior do canal não seja debelada, o hospedeiro consegue estabelecer um equilíbrio. Quando o canal radicular é tratado convenientemente, o profissional desequilibra em favor do hospedeiro, e a reparação é então iniciada (LOPES e SIQUEIRA JR., 2010).

Esses microrganismos encontrados na cavidade pulpar e na porção coronal do canal radicular podem ser prontamente mortos por irrigantes no início dos procedimentos; no entanto, bactérias em áreas menos acessíveis do canal (canais secundários, acessórios, deltas apicais, lacunas de reabsorção, túbulos dentinários) ainda podem evocar a periodontite apical. Estas bactérias poderão ser erradicadas somente após o preparo do canal radicular (COHEN e HARGREAVES, 2011).

2.5- Instrumentação rotatória com níquel-titânio

MICKEL et al., em 2007, destacaram estudos que têm demonstrado que o aumento do diâmetro apical é necessário para que haja uma penetração dos irrigantes mais próxima do terço apical (com o diâmetro mínimo de uma lima #30), e que este maior diâmetro apical também tem sido relacionado com uma maior redução microbiana no terço apical, propiciando uma desinfecção efetiva durante o preparo químico-mecânico do sistema de canais radiculares, crucial para o sucesso do tratamento. Assim, torna-se um desafio o alcance do equilíbrio entre a preservação anatômica do canal radicular e a descontaminação do terço apical.

SEMAAN et al., ao realizarem uma vasta revisão da literatura sobre a evolução dos sistemas rotatórios, em 2009, destacaram autores que afirmaram que, nos últimos anos, a fase que apresentou maiores transformações na Endodontia foi a do preparo do canal radicular, tendo em vista a gradativa substituição do preparo manual pela automatização das técnicas de modelagem. A instrumentação rotatória ou a mecanização da etapa do preparo do canal radicular, como tem sido denominada na atualidade, passa por um processo de adoção inevitável por parte dos especialistas e está em constante evolução. A cada dia, novos motores e instrumentos são introduzidos no mercado e novos profissionais adeptos são conquistados, uma vez que a instrumentação rotatória promove maior rapidez no preparo do canal radicular e menor estresse para o profissional e seus pacientes durante a realização da terapia endodôntica. A liga de níquel-titânio (NiTi) foi desenvolvida por Buehler, um investigador do Programa Espacial do Laboratório de Artilharia Naval em Silver Springs, Maryland ó EUA. Ela foi introduzida na Endodontia e tem sido utilizada por apresentar propriedades únicas de efeito memória de forma e superelasticidade. Além disto, foram descritos uma grande resistência e um baixo módulo de elasticidade dessa liga quando comparada ao aço inoxidável, sendo essa uma vantagem no uso de instrumentos endodônticos para o preparo de canais curvos. Desde a introdução da liga de níquel-titânio na Endodontia e o posterior desenvolvimento dos instrumentos rotatórios, várias pesquisas vêm demonstrando a superioridade e a rapidez na conclusão dos preparos biomecânicos realizados pela instrumentação mecanizada. Diversos trabalhos científicos buscaram analisar a eficiência dos referidos instrumentos no preparo do canal radicular, no que diz respeito à limpeza promovida nas paredes dentinárias e à forma final obtida na modelagem.

O preparo do canal radicular com emprego de instrumentos rotatórios tornou sua modelagem muito mais simples, segura e eficaz, quando comparada à instrumentação manual. Entretanto, não se sabe ao certo se esta diferença na qualidade de tratamento se dá também sob o ponto de vista microbiológico, principalmente quando da ampliação do canal até instrumentos de maior diâmetro (NAKAMURA, 2010).

2.5.1- Descrição do sistema rotatório RaCe[®]

Os instrumentos endodônticos do sistema RaCe[®] são fabricados pela FKG Dentaire (La Chaux-de-Fonds, Suíça), e têm seu nome originado das iniciais de *Reamer with alternating Cutting edges* (alargador com lâminas de corte alternadas), o que descreve apenas um dos aspectos do *design* diferenciado destes instrumentos. Como principais características deste sistema, podemos citar: A) ponta de segurança arredondada inativa (desliza pelas paredes do canal, assegurando um guia perfeito que permite manter a trajetória original, sem o risco de transportar os canais ou criar falsas vias; o ângulo da ponta é de 40° e há curva de transição); B) lâminas de corte alternadas (um novo e alternativo desenho selecionado com uma parte ativa que alterna segmentos retos e o passo longo e o torcidos e o passo curto; estas áreas de corte alternadas previnem o efeito de rosqueamento e o travamento do instrumento em rotação, proporcionando melhor controle do operador); C) diferentes conicidades (os *tapers* variam de .02 a .10); D) instrumentos para preparo cervical (possui 5 instrumentos Pré-RaCe[®], tendo estes lâmina ativa de 9 a 10 mm, enquanto nos instrumentos RaCe[®] o comprimento mínimo da parte de trabalho é de 16 mm); E) tratamento eletroquímico superficial (acabamento que torna a superfície do instrumento mais lisa e suave, melhorando a eficácia de corte, facilitando a limpeza e aumentando a vida útil do instrumento); F) disco de segurança SafetyMemoDisc (uma solução interessante para auxiliar no controle de uso de cada instrumento e na prevenção da fadiga do metal: cada lima tem um *stop* que lembra uma roseta, cada uma com oito pétalas; dependendo da complexidade do caso é simples, médio ou difícil e é removido um determinado número de pétalas após o uso e, finda as pétalas do instrumento, este deve ser descartado) (RODRIGUES et al., 2007).

LOPES e SIQUEIRA JR. (2010) acrescentaram, ainda, que esses instrumentos são fabricados por usinagem de um fio metálico de níquel-titânio, e que possuem ângulo de corte positivo (com secção transversal triangular para a maioria dos instrumentos e quadrangular

para os instrumentos nº 15 e 20 com conicidade .02 ó eficiência de corte e facilidade de penetração) e ausência de guia radial. Eles foram projetados para serem acionados por dispositivos mecânicos com giro contínuo à direita, mas, em razão da forma da seção reta transversal de sua haste de corte helicoidal, podem também ser acionados por dispositivos mecânicos com giro alternado ou oscilatório.

Segundo o fabricante, os instrumentos RaCe[®] podem ser adquiridos separadamente em seus diferentes diâmetros (#15 a 60), conicidades (.02, .04, .06 e .10) e comprimentos (19, 21, 25 e 31 mm), dando liberdade ao clínico de montar sua própria sequência de trabalho, ou dentro de *kits* montados pela própria empresa (por exemplo, BioRace, EasyRace, XtremeRace, ScoutRace, iRace), cada um com suas indicações e com determinados instrumentos formando uma sequência. Ainda de acordo com as instruções do fabricante, não se deve realizar pressão em direção apical durante o uso destes instrumentos, e cada um deve trabalhar em rotação dentro do canal em movimentos lentos e amplos de vai-vém por no máximo 4-5 s, pincelando contra suas paredes. É recomendada a exploração inicial e instrumentação manual até a lima K #15 antes de penetrar com o instrumento rotatório no canal. A velocidade recomendada é de 500 a 600 rpm, com torque médio de 1 N/cm (FKG DENTAIRE, 2011).

2.5.2- Estudos com o sistema rotatório RaCe[®]

LEONARDI (2004) analisou, comparativamente, a ação e desvios proporcionados pela instrumentação manual com limas Flexofile[®] e com dois sistemas rotatórios de níquel-titânio, o sistema K3[®] e o sistema RaCe[®], sobre as paredes de canais radiculares curvos simulados em blocos de resina. Foram utilizados 60 blocos de resina acrílica contendo, em seu interior, um canal radicular simulado com curvatura entre 40° e 50°, e com corante vermelho na superfície de suas paredes. Foram utilizadas as técnicas manual e ultra-sônica de irrigação. O autor concluiu que os melhores resultados foram obtidos com as duas técnicas de instrumentação rotatória associadas à irrigação manual.

PAQUÉ; MUSCH e HÜLSMANN (2005) compararam o preparo final produzido pelos sistemas rotatórios ProTaper[®] e RaCe[®] em 50 molares inferiores humanos com curvatura entre 20° e 40°. Todos os canais foram preparados até um diâmetro apical #30 em ambos os sistemas. Os resultados demonstraram que ambos respeitaram a curvatura original

do canal radicular e por isto foram considerados seguros para a instrumentação de canais com curvatura moderada, mas nenhum deles foi capaz de remover completamente a *smear layer*.

ZARRABI; BIDAR e JAFARZADEH (2006), em estudo *in vitro*, instrumentaram 100 pré-molares unirradiculares, comparando a quantidade de debris extruídos pelo forame apical após o preparo do canal através da técnica manual *step-back* e com o uso de três sistemas rotatórios (Profile[®], RaCe[®] e FlexMaster[®]). Os autores concluíram que o sistema RaCe[®] levou a uma menor extrusão de debris quando comparado à técnica manual e ao sistema FlexMaster[®], apresentando o menor peso médio de debris extruídos dentre todos os grupos.

MERRETT; BRYANT e DUMMER (2006) utilizaram 80 canais simulados com quatro formas diferentes (combinando o início da curvatura posicionado a 8 ou 12 mm da entrada do canal com um grau de curvatura de 20° ou 40°) para comparar a capacidade de modelagem das limas rotatórias de níquel-titânio RaCe[®] e FlexMaster[®]. Um programa de computador foi utilizado para armazenar e comparar as imagens pré e pós-operatórias de cada canal. Os autores concluíram que ambos os sistemas prepararam os canais rapidamente, com pouca alteração no comprimento de trabalho. A modelagem final dos canais foi considerada aceitável com poucas aberrações. Os instrumentos FlexMaster[®] obtiveram um maior desgaste excessivo de resina do canal simulado na parte externa da curvatura, o que foi relacionado à sua maior rigidez.

ZAND et al. (2007) realizaram um estudo para comparar a eficácia dos instrumentos manuais tipo K NiTiflex[®] e dos instrumentos rotatórios FlexMaster[®] e RaCe[®] no preparo de 75 dentes unirradiculares com mínima curvatura (< 5°). Os canais foram preparados utilizando a técnica *crown-down*, até o diâmetro #40 e com irrigação de 5 mL de solução de NaOCl 0,5% após cada instrumento. Os autores concluíram que a utilização de nenhum dos três instrumentos resultou em canais completamente limpos após a instrumentação, mas que o uso das limas manuais tipo K NiTiflex[®] resultou em maior quantidade de *smear layer* no terço apical dos canais, em comparação com os instrumentos RaCe[®] e FlexMaster[®].

RODRIGUES et al. (2007) analisaram radiograficamente os tratamentos endodônticos de 5 molares, realizados por um mesmo operador de um curso de especialização com as limas RaCe[®], pelos seguintes fatores: dilatação dos canais, manutenção da trajetória, desvio apical e manutenção do comprimento de trabalho, além de fraturas ou deformação de instrumentos. O sistema mostrou bons resultados em relação a todos os quesitos. Os autores concluíram que todos os canais instrumentados com o sistema RaCe[®] resultaram num tratamento endodôntico adequado tanto clínica quanto radiograficamente, tendo sido obtida eficiência e facilidade no preparo.

3- PROPOSIÇÃO

O presente estudo, *in vitro*, teve como objetivos:

1. Investigar a contaminação pelo microrganismo *Escherichia coli* nas amostras coletadas, através de plaqueamento e contagem das unidades formadoras de colônia;
2. Investigar a presença de endotoxinas nas amostras coletadas, através do método de quantificação cinético turbidimétrico Pyrogen-5000[®]; e
3. Avaliar a redução da carga microbiana e do conteúdo endotóxico através de instrumentação automatizada, utilizando sequência clínica do sistema rotatório RaCe[®].

4- MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP)-SP (parecer nº 186/09) (**Anexo ó página 78**).

4.1- Materiais

4.1.1- Dentes

- Foram selecionados 10 pré-molares inferiores permanentes humanos.

4.1.2- Microrganismo

- *Escherichia coli* (ATCC 25922).

4.1.3- Meios de cultura

- Luria Bertani (LB) *broth* (Oxoid Unipath Ltd., Basingstoke, Inglaterra).
- Luria Bertani (LB) ágar (Oxoid Unipath Ltd., Basingstoke, Inglaterra).

4.1.4- Teste de detecção e quantificação de endotoxinas

- Pyrogen-5000[®] (Lonza Group Ltd., Walkersville-MD, EUA).

4.1.5- Substâncias químicas auxiliares utilizadas para remoção da *smear layer*

- NaOCl 5,25% (hipoclorito de sódio) (Proderma Farmácia de Manipulação, Piracicaba-SP, Brasil);

- EDTA 17% (*Ethylenediaminetetracetic acid* ó ácido etilenodiaminotetracético) (Proderma Farmácia de Manipulação, Piracicaba-SP, Brasil);

4.1.6- Solução irrigadora

- NaCl 0,9% (soro fisiológico) estéril (Global Médica VR, Volta Redonda-RJ, Brasil).

4.1.7- Instrumentos e outros materiais

- Agitador-Aquecedor (Fanem Ltda., São Paulo-SP, Brasil);
- Agitador tipo Vórtex (VORTEX MA 162, Marconi Equipamentos para Laboratórios Ltda., Piracicaba-SP, Brasil);
- Água destilada (Asfer Indústria Química Ltda., São Caetano do Sul-SP, Brasil);
- Água para reagente LAL (Lonza Group Ltd., Walkersville-MD, EUA);
- Agulha hipodérmica BD 20 x 5,5 (Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda., São Paulo-SP, Brasil);
- Autoclave 4300 (Cristófoli Ltda., Campo Mourão-PR, Brasil);
- Câmara de fluxo laminar (Pachane Equipamentos para Laboratórios Ltda., Piracicaba-SP, Brasil);
- Cânula de aspiração metálica (Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico Ltda., São Paulo-SP, Brasil);
- Cones de papel #15 e 20 estéreis (Dentsply Ind. Com. Ltda., Petrópolis-RJ, Brasil);
- Cureta periodontal tipo McCall nº 13/14 (Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico Ltda., São Paulo-SP, Brasil);
- Disco diamantado dupla-face de 22 mm (KG Sorensen Ind. Com. Ltda., Barueri-SP, Brasil);
- Espectrofotômetro (FEMTO 432, Marconi Equipamentos para Laboratórios Ltda., Piracicaba-SP, Brasil);
- Estufa microbiológica (Fanem Ltda., São Paulo-SP, Brasil);
- Leitor de microplacas (Lonza Group Ltd., Walkersville-MD, EUA);
- Limas rotatórias RaCe[®] (FKG Dentaire, La Chaux-de-Fonds, Suíça);
- Limas tipo K 21 mm #10, 15 e 20 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça);

- Luvas de procedimento descartáveis (Descarpack Descartáveis do Brasil, São Paulo-SP, Brasil);
- Micro-motor e peça reta (KaVo[®], Santa Catarina, Brasil);
- Microtubos plásticos estéreis de 1,5 mL do tipo *Eppendorf* (*Microtubes* MCT-150-C, 1.5 mL *Clear*, Axygen Scientific Inc., Union City-CA, EUA);
- Motor X-Smart (Dentsply Ind. Com. Ltda., Petrópolis-RJ, Brasil);
- Paquímetro digital (Digimess Instrumentos de Precisão Ltda., São Paulo-SP, Brasil);
- Pinça clínica para algodão (Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico Ltda., São Paulo-SP, Brasil);
- Pipetas graduadas (Axygen Scientific Inc., Union City-CA, EUA);
- Placas de culturas de células 96 poços (*Corning Cell Culture Cluster*, Corning Inc., Canton-NY, EUA);
- Ponteiras estéreis descartáveis diversas (Axygen Scientific Inc., Union City-CA, EUA);
- Régua milimetrada (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça);
- Seringa descartável estéril de 5 mL (Descarpack Descartáveis do Brasil, São Paulo-SP, Brasil);
- Torno mecânico (Freeman Tools, Ball Ground-GA, EUA);
- Tubos de ensaio de vidro com tampa rosqueável (Pró-Análise Química e Diagnóstica Ltda., Cotia-SP, Brasil);
- Tubos de vidro descartáveis estéreis e apirogênicos (Lonza Group Ltd., Walkersville-MD, EUA).

4.2- Métodos

4.2.1- Seleção das amostras

Foram selecionados 10 pré-molares inferiores permanentes humanos que apresentavam raízes retas, ápices com formação completa e canais únicos (**Figura 4 ó página**

48). A seleção dos dentes foi baseada nas dimensões e similaridade morfológica da raiz. Pré-molares com presença de dois canais radiculares ou birradiculares, comprovados através de radiografia, bem como a presença de istmos, trincas ou traços de fratura foram excluídos do estudo. Os dentes foram extraídos por indicação ortodôntica ou por problemas periodontais e obtidos através de doações feitas por Cirurgiões Dentistas das cidades de Indaiatuba-SP, São Carlos-SP, Santos-SP e Niterói-RJ, mediante Termo de Doação de Dentes estabelecido pelo CEP da FOP-UNICAMP.



Figura 4 Seleção das amostras: **A** é Aspecto frontal de espécime utilizado na pesquisa; **B** é Aspecto lateral de espécime utilizado na pesquisa; **C** é Pré-molares inferiores utilizados na pesquisa.

4.2.2- Preparo dos dentes

4.2.2.1- Limpeza mecânica dos dentes e padronização das raízes

Debris, cálculos e remanescentes de tecido mole presentes nos elementos dentais foram removidos com o auxílio de uma cureta periodontal. Posteriormente, os dentes foram armazenados em NaCl 0,9% estéril (Global Médica VR, Volta Redonda-RJ, Brasil). As raízes foram padronizadas no comprimento de 15 mm com o auxílio de um paquímetro digital (Digimess Instrumentos de Precisão Ltda., São Paulo-SP, Brasil). Em seguida, a coroa dental foi seccionada com um disco diamantado dupla-face de 22 mm (KG Sorensen Ind. Com. Ltda., Barueri-SP, Brasil) adaptado a micro-motor e peça reta em baixa rotação (KaVo[®], Santa Catarina, Brasil), ao nível da junção amelo-cementária, e procedeu-se à verificação da

patência dos canais radiculares com lima tipo K #10 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) (Figura 5A a C ó página 49).

4.2.2.2- Padronização do diâmetro do forame apical

Para a padronização do diâmetro do forame apical, os espécimes foram fixados em torno mecânico (Freeman Tools, Ball Ground-GA, EUA) e, em seguida, os canais foram instrumentados progressivamente até a lima tipo K #20 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça), ultrapassando 1 mm do forame apical. A cada troca de lima, foi realizada a irrigação com 5 mL de NaCl 0,9% estéril com o auxílio de uma seringa descartável estéril de 5 mL (Descarpack, São Paulo-SP, Brasil) e agulha hipodérmica BD 20 x 5,5 (Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda., São Paulo-SP, Brasil). A fim de se evitar a desidratação, os dentes foram mantidos em gaze umedecida em soro fisiológico estéril durante toda instrumentação (Figura 5D ó página 49).

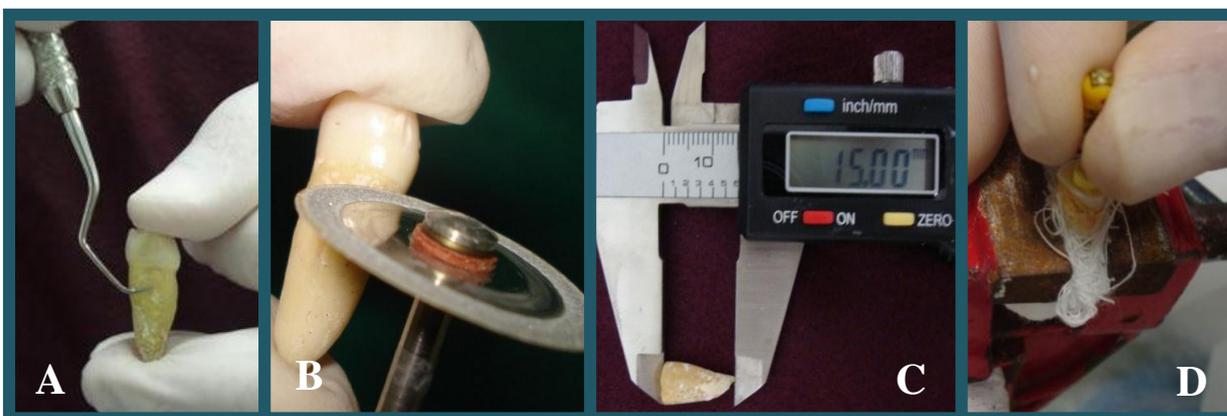


Figura 5 ó Preparo dos dentes: **A** ó Limpeza mecânica das raízes; **B** ó Secção da coroa com disco diamantado; **C** ó Padronização do comprimento em 15 mm; **D** ó Padronização do diâmetro do forame apical.

4.2.2.3- Remoção da *smear layer*

A *smear layer* formada durante a etapa de padronização do forame apical foi removida lavando-se os dentes em EDTA 17% por 10 min e em NaOCl 5,25% por mais 10 min sob agitação constante (Agitador-Aquecedor FANEM, São Paulo-SP, Brasil) (**Figura 6 ó página 50**). Submeteu-se as amostras a uma lavagem com água corrente por 1 h para a remoção dos possíveis resíduos de EDTA e NaOCl (BERBER, 2005). Após a remoção da *smear layer*, os canais foram secos com o auxílio de cones de papel #15 estéreis (Dentsply Ind. Com. Ltda., Petrópolis-RJ, Brasil).



Figura 6 ó Amostras sob agitação constante para remoção da *smear layer*.

4.2.2.4- Esterilização das amostras

Os dentes foram autoclavados por 30 min a 121 °C e a 1 atm, dispostos em frascos de vidro com tampas rosqueáveis semi-abertas (Pró-Análise Química e Diagnóstica Ltda., Cotia-SP, Brasil) contendo 5 mL de água destilada (Asfer Indústria Química Ltda., São Caetano do Sul-SP, Brasil).

4.2.3- Despirogenização dos espécimes e materiais utilizados para instrumentação

Todos os materiais utilizados no experimento foram esterilizados a 121 °C por 21 min em autoclave e encaminhados para a empresa EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiações, Cotia-SP, Brasil) para esterilização por radiação Gama-Cobalto (20 kGy por 6 h). Este processo de radiação degrada moléculas de LPS pré-existentes, tornando o material apirogênico, ou seja, livre de endotoxinas.

4.2.4- Contaminação dos espécimes com *Escherichia coli* (ATCC 25922)

Para a contaminação das raízes, foram utilizadas culturas puras de *Escherichia coli* (ATCC 25922) em caldo de LB *broth* (Oxoid Unipath Ltd., Basingstoke, Inglaterra). A *Escherichia coli* foi subcultivada em LB ágar (Oxoid Unipath Ltd., Basingstoke, Inglaterra) e incubada em estufa microbiológica (Fanem Ltda., São Paulo-SP, Brasil) a 37 °C em atmosfera de 10% de gás carbônico (CO₂), por 24 h. Decorrido o tempo de incubação, as colônias isoladas foram transportadas para tubos de vidro com tampa rosqueável contendo 5,0 mL de LB *broth*, respeitando o padrão de concentração 2,0 da Escala McFarland (6,0 x 10⁸ bactérias/mL), com absorvância de 800 nm através do espectrofotômetro (FEMTO 432, Marconi, Piracicaba-SP, Brasil).

Na câmara de fluxo laminar (Pachane Equipamentos para Laboratórios Ltda., Piracicaba-SP, Brasil), após a agitação mecânica em vórtex (VORTEX MA 162, Marconi Equipamentos para Laboratórios Ltda., Piracicaba, SP) dos tubos contendo as raízes e o inóculo bacteriano com concentração adequada, 5,0 mL de LB *broth* estéril foi substituído por 5,0 mL da suspensão de *Escherichia coli*. Posteriormente, o frasco foi vedado e incubado em estufa microbiológica a 37 °C por 21 dias, com trocas de 2,0 mL do meio LB contaminado por 2,0 mL de LB estéril a cada 2 dias para se evitar a saturação deste meio (GOMES; MARTINHO e VIANNA, 2009).

O crescimento bacteriano verificou-se pela presença de turbidez do meio. A pureza das culturas foi confirmada através da morfologia das colônias plaqueadas em LB ágar e teste de catalase positivo (**Figura 7 ó página 52**).

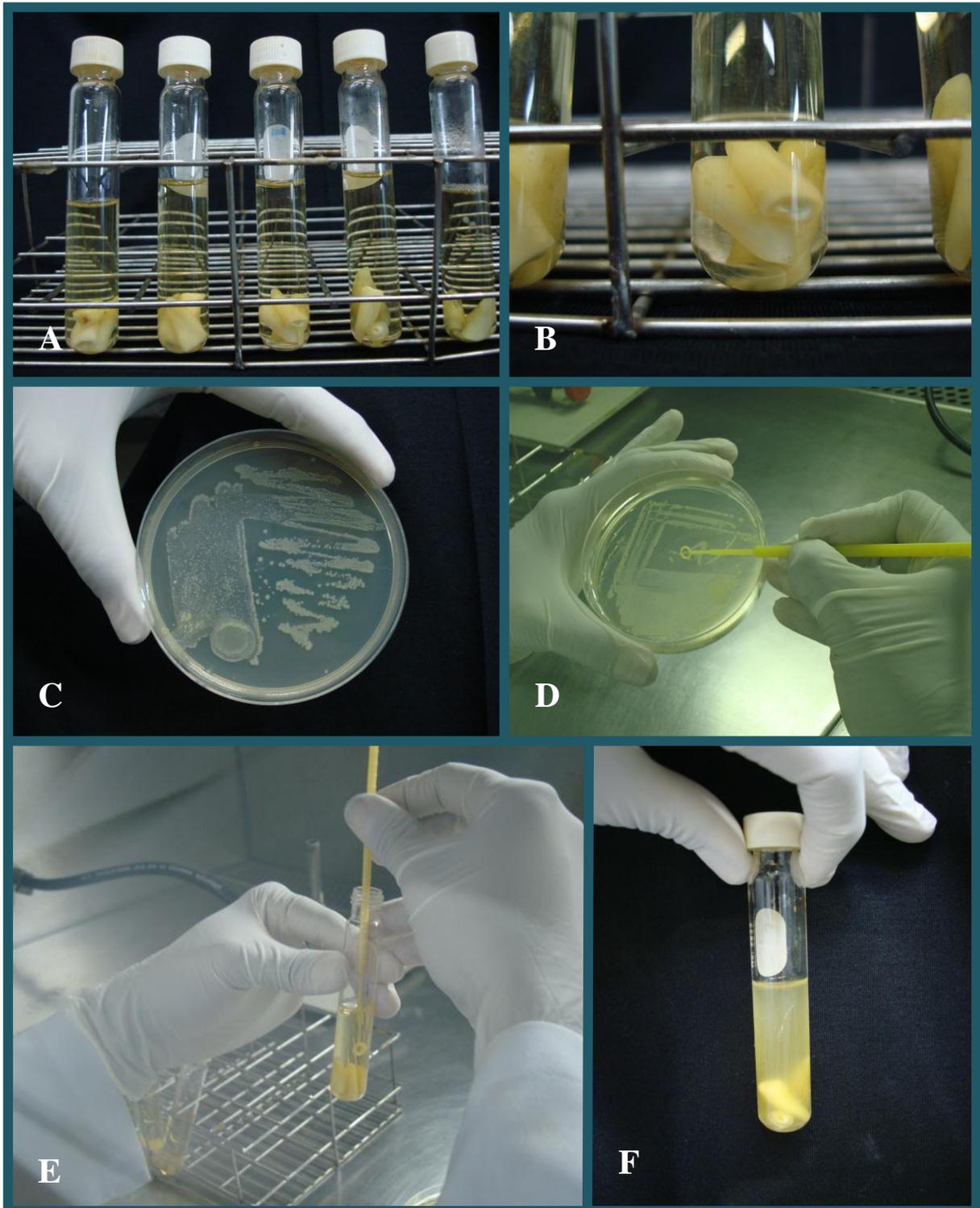


Figura 7 ó Contaminação dos espécimes com *Escherichia coli* (ATCC 25922): **A** ó Espécimes no LB *broth* estéril; **B** ó Visão aproximada dos espécimes no meio estéril; **C** ó Cultura pura de *Escherichia coli* antes da inoculação; **D** ó Coleta do microrganismo da placa para inoculação; **E** ó Inoculação do microrganismo no meio para contaminação dos espécimes; **F** ó Espécimes contaminados após 21 dias.

4.2.5- Coletas endodônticas iniciais

Após a contaminação e o período de incubação, as raízes foram removidas do meio de cultura com o auxílio de uma pinça clínica (Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico Ltda., São Paulo-SP, Brasil), e colocadas em uma plataforma metálica estéril que foi levada para o interior da câmara de fluxo laminar. Em seguida, cada raiz foi irrigada com 1,0 mL do NaCl estéril e, a seguir, foram coletadas as amostras iniciais microbiológicas (CM1) e de endotoxinas (CE1) de cada canal radicular contaminado (**Figura 8 ó página 53**).

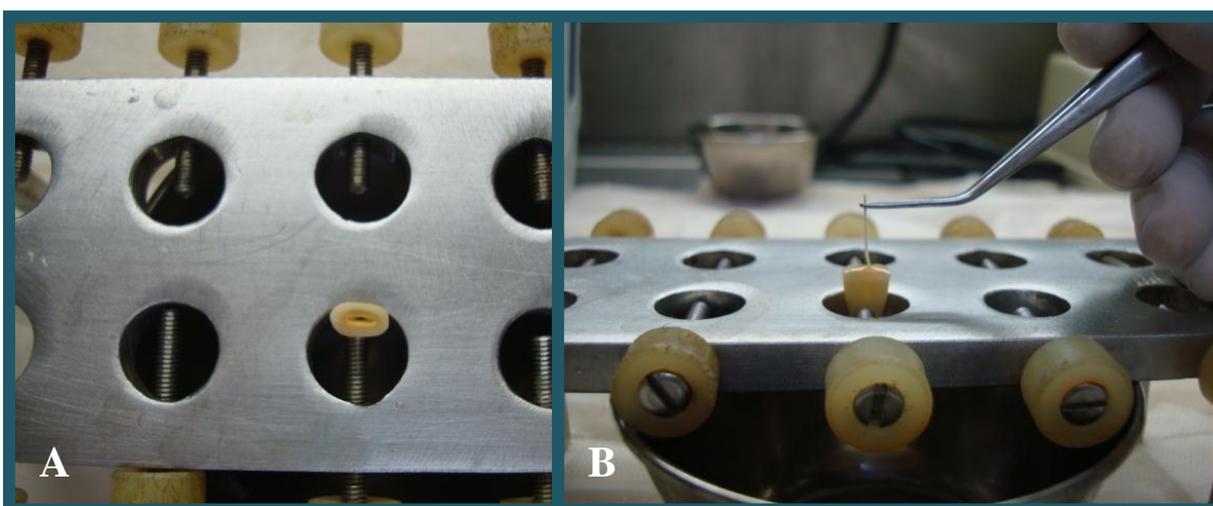


Figura 8 ó Coleta inicial: **A ó** Espécime montado na plataforma metálica; **B ó** Coleta inicial com cone de papel absorvente.

4.2.5.1- Coleta microbiológica inicial (CM1)

Para a coleta microbiológica inicial (CM1), um cone de papel absorvente estéril e apirogênico #20 (Dentsply Ind. Com. Ltda., Petrópolis-RJ, Brasil) foi introduzido em toda a extensão do canal radicular, permanecendo nesta posição por 1 min. Imediatamente após, este mesmo cone, ao ser retirado do canal, foi introduzido em microtubos plásticos estéreis de 1,5 mL do tipo *Eppendorf* (*Microtubes* MCT-150-C, 1.5 mL *Clear*, Axygen Inc., Union City-CA, EUA) contendo 1,0 mL de LB *broth*.

4.2.5.2- Coleta de endotoxinas inicial (CE1)

Foi realizada a coleta inicial para investigação dos níveis de endotoxina (CE1) utilizando um cone de papel estéril e apirogênico #20, sendo este introduzido em toda a extensão do canal radicular e permanecendo em posição por 1 min. Em seguida, o cone foi transferido para tubos de vidro apirogênicos. As amostras, devidamente identificadas, foram armazenadas a -20 °C, como recomendado pelo fabricante.

4.2.6- Instrumentação dos espécimes com o sistema rotatório RaCe®

Após as coletas iniciais, os espécimes permaneceram dispostos na plataforma metálica no interior da câmara de fluxo laminar para a instrumentação dos canais radiculares com o sistema de limas rotatórias RaCe® (FKG Dentaire, La Chaux-de-Fonds, Suíça).

Para a utilização das limas em rotação, foi utilizado o motor X-Smart (Dentsply Ind. Com. Ltda., Petrópolis-RJ, Brasil), com giro contínuo à direita, torque de 1 N/cm e velocidade de 600 rpm. A cinemática empregada foi a recomendada pelo fabricante, com movimentos suaves de entrada e saída do canal por 3 ou 4 vezes, até atingir o comprimento desejado, sem forçar apicalmente e com leve pincelamento contra as paredes do canal.

Embora a sequência de limas utilizada tenha sido a mesma para todos os espécimes, foi utilizado um conjunto de limas para cada um deles. Este cuidado foi tomado a fim de se evitar a contaminação por microrganismos ou endotoxinas de um para o outro, interferindo nos resultados do trabalho. Entretanto, a sequência utilizada foi a mesma para todos os espécimes.

Inicialmente, foram utilizadas as limas RaCe® #40.10 (diâmetro de ponta #45, conicidade 0,10 mm) e #35.08 (diâmetro de ponta #35, conicidade 0,08 mm) para o preparo dos terços cervical e médio, sendo a primeira até a metade do comprimento do canal radicular e a segunda até 2/3 deste mesmo comprimento, o que foi determinado com o auxílio de uma régua endodôntica milimetrada (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça). Em seguida, as limas #25.04, #25.06, #30.02, #35.02 e #40.02 foram utilizadas, sequencialmente, no comprimento total do canal.

Os procedimentos de irrigação empregados durante todo o PQM foram realizados com NaCl 0,9% estéril a cada troca de instrumento, com o auxílio de seringa descartável estéril de 5 mL (Descarpack Descartáveis do Brasil, São Paulo-SP, Brasil) e agulha hipodérmica BD 20 x 5,5 (Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda., São Paulo-SP, Brasil) pré-curvada, introduzida até o terço médio do canal radicular. A aspiração do conteúdo dos canais radiculares foi realizada por meio de cânula de aspiração metálica (Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico Ltda., São Paulo-SP, Brasil), e a manutenção da patência com uma lima tipo K #20. Todo este material foi de uso individual para cada espécime, a fim de evitar a contaminação (**Figura 9 ó página 56**).

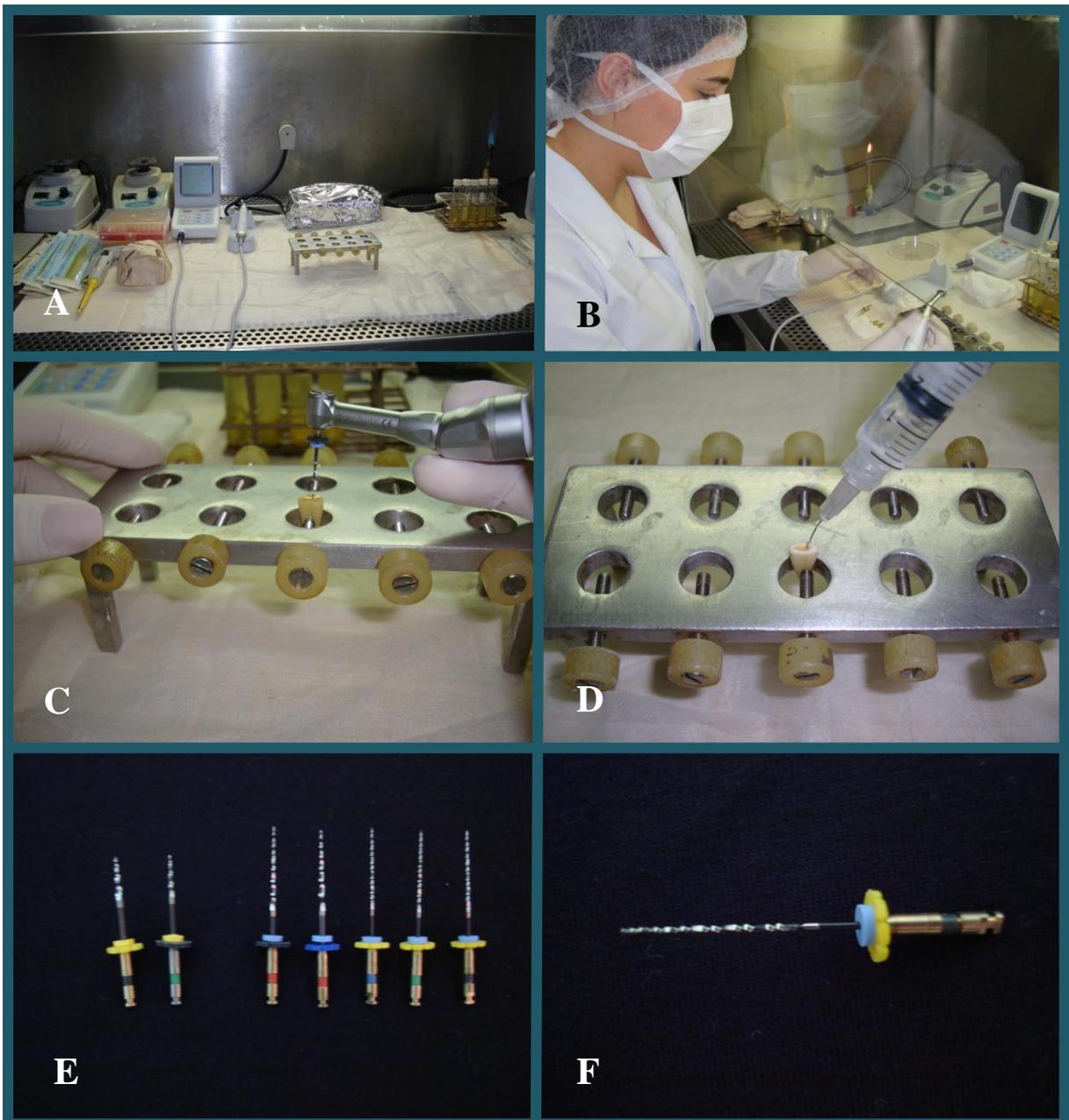


Figura 9 **ó** **A** **ó** Material para a instrumentação e coleta de bactérias e endotoxinas montado no interior da câmara de fluxo laminar; **B** **ó** Momento da instrumentação dos espécimes; **C** **ó** Visão aproximada da instrumentação; **D** **ó** Irrigação com NaCl 0,9% estéril; **E** **ó** Sequência de limas RaCe[®] utilizada; **F** **ó** Imagem aproximada da lima RaCe[®], mostrando o *design* da parte ativa.

4.2.7- Coletas endodônticas finais

Após o uso do último instrumento rotatório, os canais foram irrigados com 5 mL de NaCl estéril. Em seguida, foi realizada nova coleta endodôntica para a investigação da carga microbiana e dos níveis de endotoxina.

Para as coletas finais, tanto microbiológica (CM2) quanto de endotoxinas (CE2), foi introduzido um cone de papel absorvente #20 no comprimento real do dente para cada uma delas, permanecendo cada um em posição por 1 min, individualmente. Imediatamente após, cada um dos cones foi transferido separadamente para um tubo do tipo *Eppendorff* (CM2) e um tubo de vidro apirogênico (CE2), respectivamente.

As amostras da CE2, devidamente identificadas, foram armazenadas a -20 °C, como recomendado pelo fabricante, enquanto as amostras da CM2 foram processadas logo em seguida, assim como as da CM1.

4.2.8- Processamento laboratorial das amostras

4.2.8.1- Amostras microbiológicas (CM1 e CM2)

As amostras CM1 e CM2 de cada espécime foram agitadas em vórtex por 1 min, e apenas as amostras CM1 diluídas em série 1/10 e 1/100 em LB *broth* estéril, com o auxílio de uma pipeta devidamente calibrada (Axygen Scientific Inc., Union City-CA, EUA) e de ponteira universal com filtro (Axygen Scientific Inc., Union City-CA, EUA). Foram plaqueados em triplicatas 25 L da amostra CM2 e da diluição 10^{-2} de CM1 em LB ágar, e incubados em estufa de CO₂ a 37 °C por 48 h. Após este período de incubação, as colônias de microrganismos presentes nas placas foram contadas, determinando-se a quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC).

Para a obtenção das UFC/mL, foi necessário multiplicar por 4.000 vezes o número de UFC obtidas na contagem das placas. Ou seja, como foi utilizada na contagem apenas a diluição a 10^{-2} , o valor a ser multiplicado correspondendo a essa diluição é 100. A alíquota plaqueada foi de 25 L, ou seja, 40 vezes menor que 1,0 mL. Assim, se a quantidade de UFC

foi 100, multiplicou-se 100 por 4.000, o que resultou numa contagem final de 400.000, ou seja, $4,0 \times 10^5$ UFC/mL. A pureza das culturas foi confirmada através da morfologia das colônias e teste de catalase positivo (**Figura 10 ó página 58**).

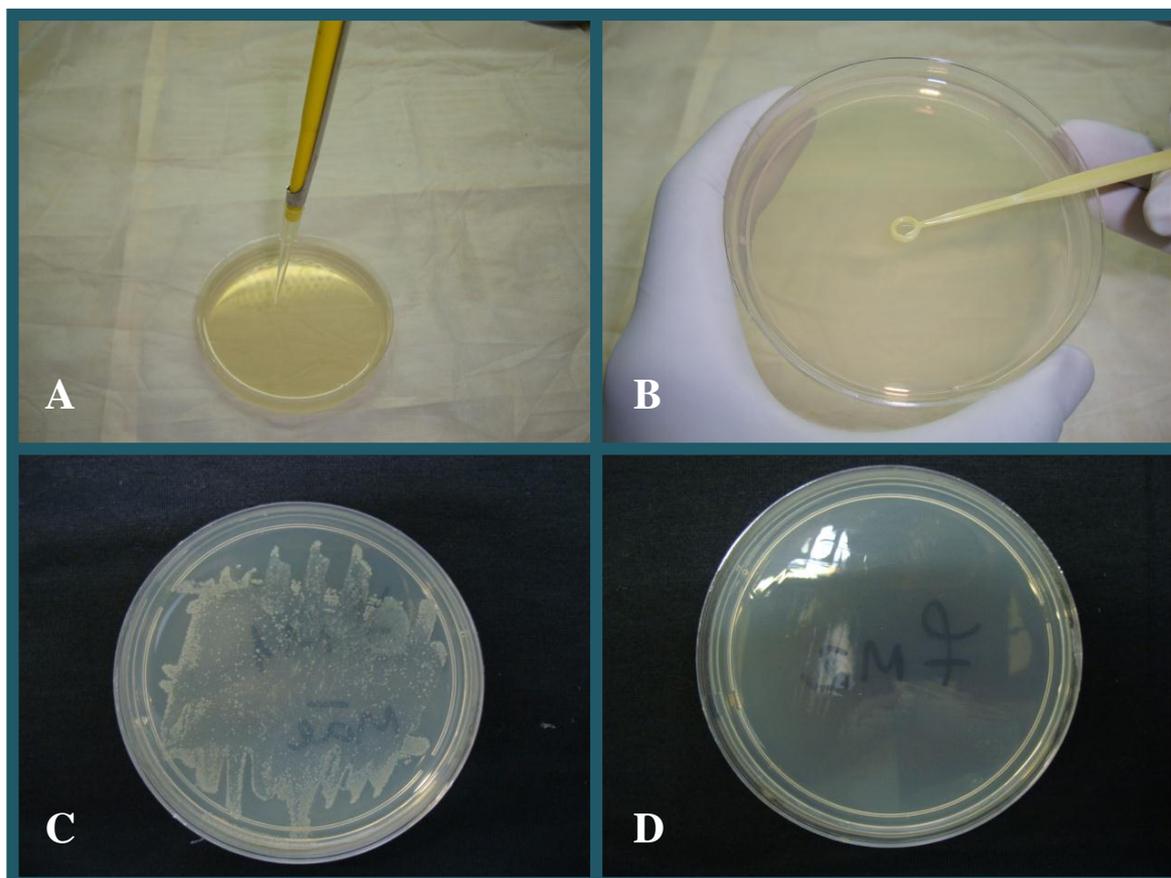


Figura 10 ó Plaqueamento e contagem de UFC: **A ó** Inoculação da amostra em placa com LB ágar estéril; **B ó** Distribuição da amostra pela placa; **C ó** Exemplo de amostra inicial após período de incubação; **D ó** Exemplo de amostra final após período de incubação.

4.2.8.2- Amostras de endotoxinas (CE1 e CE2)

Para a investigação e quantificação de endotoxinas presentes nas amostras, foi utilizado o método turbidimétrico Pyrogen-5000[®] (Lonza Group Ltd., Walkersville-MD, EUA), que utiliza a reação de LAL. Por meio deste, foi realizado um ensaio cinético quantitativo no qual a amostra foi colocada em contato com o reagente LAL reconstituído e, em seguida, incubada em um leitor de microplacas (Lonza Group Ltd., Walkersville-MD,

EUA) e monitorada automaticamente através de um *software* específico até o surgimento de turvação.

O *kit* Pyrogen-5000[®] apresenta: 1) Pyrogen-5000[®] LAL Reagente; 2) Endotoxina de *Escherichia coli* 055:B5; 3) Tampão de reconstituição Pyrogen-5000[®]. De acordo com o fabricante, o tempo necessário para a ocorrência da turvação (tempo de reação) é inversamente proporcional à quantidade de endotoxina presente na amostra.

4.2.8.2.1- Padronização da curva padrão de endotoxina

O estabelecimento da curva padrão com concentrações conhecidas de endotoxina é necessário para determinar a sua concentração em quantidades desconhecidas. A curva padrão é importante para ajudar a calcular a menor e a maior concentração de endotoxina presentes na amostra, assim como os picos obtidos dentro da curva. Como um parâmetro para este cálculo, a curva padrão foi obtida a partir da reconstituição do liofilizado de endotoxina de *Escherichia coli* oferecida pelo *kit* numa concentração conhecida de 100 EU/mL, onde suas diluições alcançam as concentrações finais de 10, 1, 0,1 e 0,01 EU/mL, de acordo com as instruções do fabricante. As diluições realizadas para a obtenção desta curva padrão foram realizadas, como pode ser observado na **Tabela 1 (página 60)**, da seguinte forma:

1. Foi adicionado 0,1 mL de 100 EU/mL da endotoxina fornecida pela empresa em 0,9 mL de água para reagente LAL (Lonza Group Ltd., Walkersville-MD, EUA), resultando numa concentração de 10 EU/mL de endotoxina, em um tubo de vidro estéril e apirogênico, também fornecido pelo fabricante. Essa solução foi vigorosamente agitada em vórtex por pelo menos 1 min antes do procedimento;

2. Da mesma forma, foi transferido 0,1 mL da solução de endotoxina 10 EU/mL para 0,9 mL de água para reagente LAL, resultando numa concentração de 1 EU/mL. A solução foi vigorosamente agitada em vórtex por pelo menos 1 min antes do início do procedimento;

3. Dando prosseguimento, 0,1 mL da solução de endotoxina 1 EU/mL foi diluído em 0,9 mL de água para reagente LAL, resultando numa concentração de 0,10 EU/mL. Esta solução foi vigorosamente agitada em vórtex por pelo menos 1 min antes do procedimento;

4. Por fim, foi transferido 0,1 mL da solução de endotoxina 0,10 EU/mL para 0,9 mL de água para reagente LAL, resultando numa solução com concentração de 0,01 EU/mL, que também foi vigorosamente agitada em vórtex por pelo menos 1 min antes do procedimento.

Tabela 1 ó Estabelecimento das diluições da curva padrão nas concentrações 10 EU/mL, 1 EU/mL, 0,10 EU/mL e 0,01 EU/mL.

Concentração de endotoxina (EU/mL)	Volume de água reagente LAL	Volume de solução de endotoxina adicionado à água para reagente LAL
10	0,9 mL	0,1 mL de 100 EU/mL solução
1	0,9 mL	0,1 mL de 10 EU/mL solução
0,10	0,9 mL	0,1 mL de 1 EU/mL solução
0,01	0,9 mL	0,1 mL de 0,10 EU/mL solução

Na **Figura 11 (página 60)**, pode ser observado um exemplo de curva padrão com concentrações conhecidas de endotoxina, utilizado como base para a quantificação de concentrações desconhecidas da mesma endotoxina.

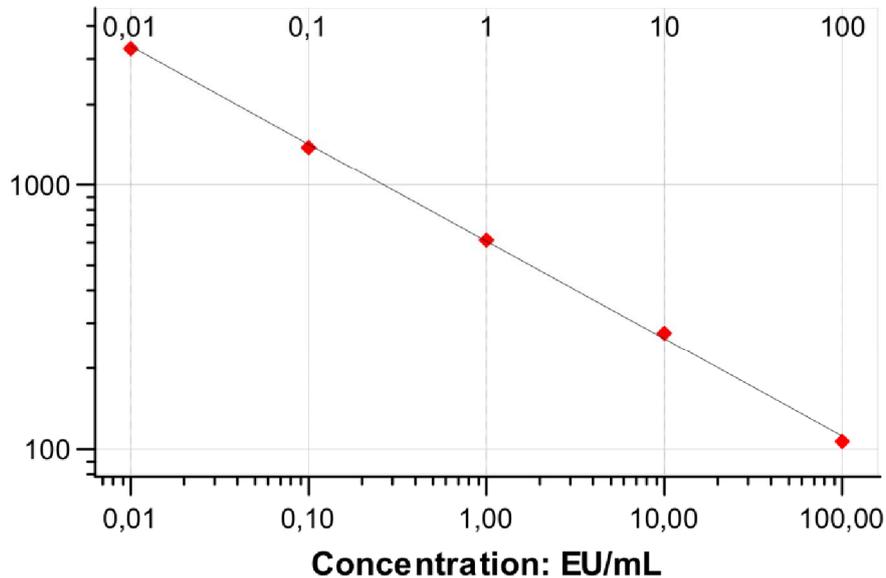


Figura 11 ó Exemplo de curva padrão para quantificação de endotoxinas.

4.2.8.2.2- Padronização das diluições das amostras

Os frascos de vidro contendo as amostras CE1 e CE2 oriundas dos espécimes utilizados no experimento foram colocados em banho-maria (37 °C) por 30 min. Estas amostras foram reconstituídas em 1 mL de água reagente de LAL e, em seguida, extraídas sob agitação mecânica em vórtex por 1 min.

O teste de LAL pode ser influenciado por muitos fatores. Fatores de inibição da detecção de endotoxina devem ser evitados e, para isto, foi adicionada uma quantidade conhecida de endotoxina (0,1 EU/mL) em cada amostra, procedimento este que é denominado *õspikeö*. Em seguida, os testes foram realizados em duplicata, sendo da mesma amostra 2 poços contendo 100 µL da amostra-mãe ou suas diluições e 2 poços contendo 100 µL da amostra + 0,1 EU/mL de endotoxina (*õspikeö*).

Para comprovar que não houve qualquer tipo de interferência (inibição ou desenvolvimento) da amostra com o reagente de LAL, a concentração de endotoxina recuperada dos poços contaminados, calculada pelo *software*, deveria estar entre 50 e 200%, valor este denominado controle positivo do produto (PPC). A amostra-mãe e sua diluição 10^{-2} foram as que apresentaram maiores números dentro do padrão do PPC, então a diluição 10^{-2} foi selecionada para a realização dos testes de todas as amostras através do método turbidimétrico.

4.2.8.2.3- Layout das microplacas para leitura

Para a quantificação da endotoxina presente nas amostras, foram utilizadas placas de cultura de células apirogênicas (96 poços ó 12 colunas e 8 fileiras) (*Corning Cell Culture Cluster*, Corning Inc., Canton-NY, EUA). Inicialmente, 100 µL do *õblankö* (água de LAL) foram inoculados em duplicata na placa. Em seguida, 100 µL de cada ponto da curva padrão nas diferentes concentrações (100 EU/mL, 10 EU/mL, 1 EU/mL, 0,10 EU/mL e 0,01 EU/mL) foram distribuídos em duplicata em outros poços. Logo após, 100 µL das amostras e seus respectivos controles (PPC), ambos em duplicata, foram inoculados com reagente de LAL. Para cada poço do controle positivo foram adicionados 10 µL de 0,1 EU/mL de endotoxina de *Escherichia coli* (*õspikeö*).

Cada placa de cultura de células com as amostras de endotoxina foi posicionada no leitor de microplacas com o *software* WinKQCL[®] (Lonza Group Ltd., Walkersville-MD, EUA) programado para 340 nm, 37 °C e 100 leituras, e 100 µL do reagente de LAL foram adicionados em todos os poços. Assim, a leitura foi iniciada, levando aproximadamente 60 min para o término do teste. Na **Figura 12 (página 62)**, pode ser observado um esquema com a distribuição das amostras na placa como foi descrita.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2	D1	D1	AC									
3	D2	D2	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
4	D3	D3	AC									
5	D4	D4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
6	D5	D5	AC									
7	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
8	AC											

Figura 12 6 Distribuição das amostras na placa (B = *blank*; D1 = 0,01 EU/mL; D2 = 0,10 EU/mL; D3 = 1 EU/mL; D4 = 10 EU/mL; D5 = 100 EU/mL; A = amostra; AC = amostra controle [amostras contaminadas com concentração conhecida de endotoxina ó *spike procedure*]).

4.2.8.2.4- Cálculo da concentração de endotoxina

De forma contínua, durante todo o ensaio, o leitor de microplacas, através do *software* WinKQCL[®], foi monitorado na absorvância de 340 nm de cada orifício da microplaca. Usando a leitura de absorvância inicial de cada orifício como seu próprio branco, o leitor determinou o tempo necessário para que a absorvância aumentasse a 0,03 unidades. Este tempo é denominado tempo de reação. O *software* executou automaticamente uma correlação

linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente (**Figura 13 ó página 64**).

Para chegar à concentração inicial foi utilizado o método do cálculo de regressão linear da média de absorbância da curva padrão (as concentrações *õspikeö* foram deduzidas). Os cálculos foram realizados por planilha do Excel (Microsoft Office Excel, versão 2003, EUA), onde:

r = eficiência da curva padrão

x = concentração da endotoxina

y = média dos valores da absorbância

N = números de curvas padrões utilizadas

X = somatório da concentração de endotoxina da curva padrão em EU/mL

$\hat{U} y$ = somatório dos valores da média de absorbância

$\hat{U} xy$ = somatório da concentração de endotoxina da curva padrão em EU/mL e somatório dos valores de absorbância

$$S_x = \text{desvio padrão de } x = \sqrt{\frac{N\hat{U}_x^2}{N - (N-1)}}$$

$$S_y = \text{desvio padrão de } y = \sqrt{\frac{N\hat{U}_y^2 - (\hat{U}_y)^2}{N - (N-1)}}$$

$$\text{slope} = \frac{S_y}{S_x} \cdot r$$

$$Y = \text{intercepto} = \hat{U}/N - (\hat{U}_x/N \cdot \text{slope})$$

$$r = \frac{N\hat{U}_{xy} - (\hat{U}_x)(\hat{U}_y)}{N(N-1)S_xS_y}$$

$$\text{CONCENTRAÇÃO DE ENDOTOXINA} = \frac{\text{absorbance} - y - \text{intercepto}}{\text{slope}}$$

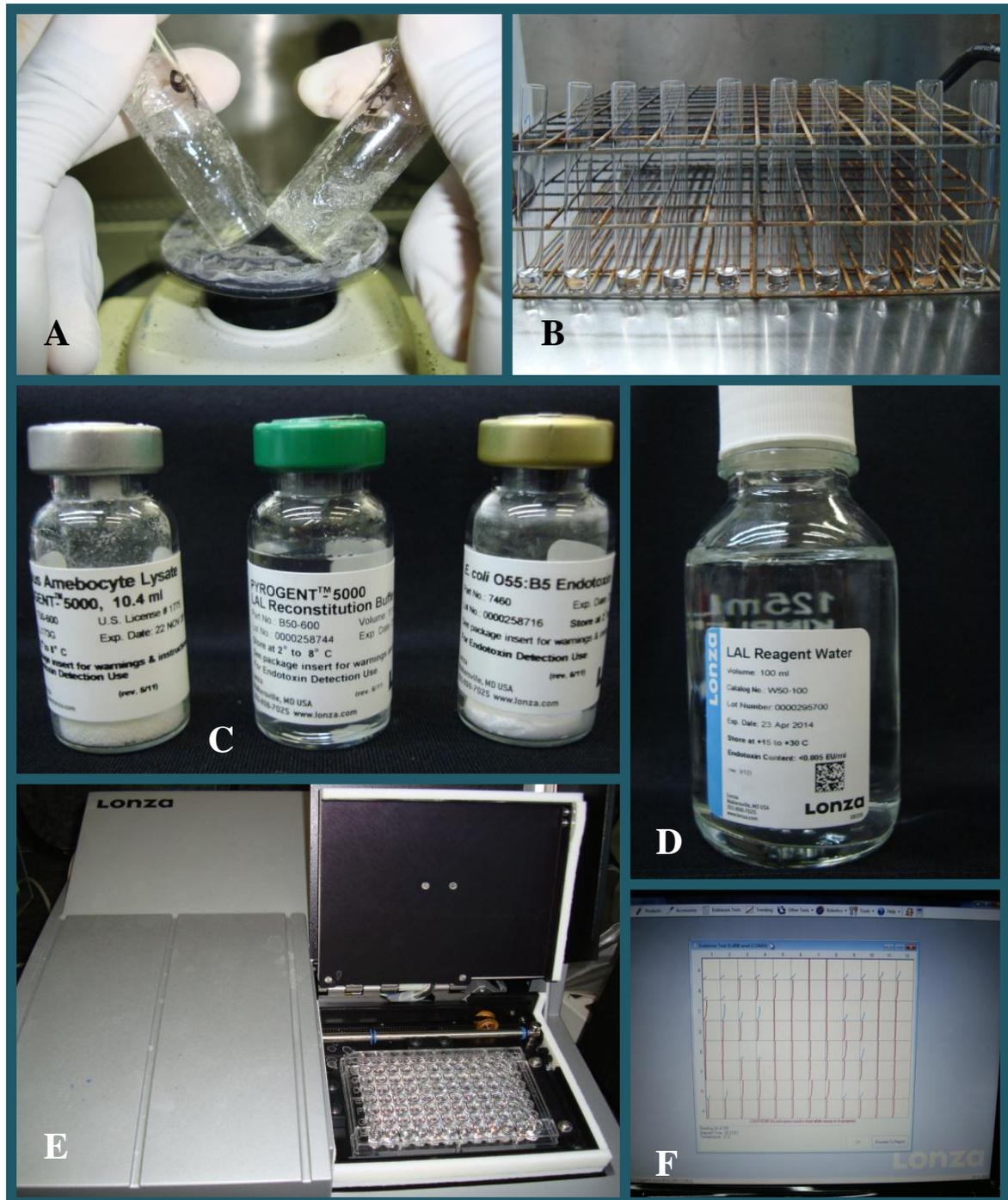


Figura 13 ó Ensaio cinético quantitativo para detecção de endotoxinas: **A** ó Agitação das amostras em vórtex; **B** ó Diluição das amostras de endotoxinas; **C** ó Kit Pyrogen-5000[®]; **D** ó Água reagente de LAL; **E** ó Leitura de placa pelo espectrofotômetro; **F** ó Software WinKQCL[®].

4.3- Análise estatística

Os dados referentes ao tratamento das 10 amostras de dentes, que foram instrumentados pela sequência de limas RaCe[®] avaliando-se a carga microbiana e a quantidade de endotoxinas que a instrumentação foi capaz de remover, foram compilados em uma planilha para análise.

Para a análise estatística, foi feita a verificação da normalidade dos dados pelo teste Shapiro-Wilk. Como os dados apresentaram distribuição normal, foi aplicado o teste T para amostras dependentes com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Foi necessário fazer uma transformação dos dados para \log_{10} da quantidade de endotoxina. Os testes foram realizados pelo programa SAS *Software* versão 9.1 (The SAS Institute, Cary-NC, EUA).

5- RESULTADOS

Após a análise dos dados, e como estes apresentaram distribuição normal, foram determinadas a média e o desvio padrão das unidades formadoras de colônia e da concentração de endotoxina iniciais presentes nos canais radiculares.

A presença de *Escherichia coli* foi detectada em 100% dos canais radiculares infectados com valores compreendidos entre 9×10^6 UFC/mL e $56,7 \times 10^7$ UFC/mL, representados pela média de $14,12 \times 10^7$ UFC/mL.

Endotoxinas foram detectadas em 10/10 dos canais radiculares infectados com valores compreendidos entre 0,96 EU/mL e 2.790 EU/mL, representados pela média de 261,16 EU/mL. A **Tabela 2 (página 66)** apresenta a carga microbiana (UFC/mL) e os níveis de endotoxina (EU/mL) dos canais radiculares infectados antes (C1) e após (C2) o PQM com o sistema rotatório RaCe®.

Tabela 2 ó Carga microbiana (UFC/mL) e níveis de endotoxina (EU/mL) de canais radiculares infectados antes (C1) e após (C2) o PQM com o sistema rotatório RaCe®.

Amostra	Carga Microbiana (UFC/mL)			Níveis de Endotoxina (EU/mL)		
	Antes PQM (C1)	Após PQM (C2)	% Redução	Antes PQM (C1)	Após PQM (C2)	% Redução
1	$29,04 \times 10^7$	$1,6 \times 10^2$	99,9	11,7	0,12	98,9
2	$8,64 \times 10^7$	6×10^1	99,9	632	0,10	99,9
3	$17,8 \times 10^7$	$4,6 \times 10^2$	99,9	888	0,36	99,9
4	$12,92 \times 10^7$	$1,4 \times 10^2$	99,9	857	0,27	99,9
5	$7,12 \times 10^7$	$6,6 \times 10^2$	99,9	188	0,37	99,8
6	$55,56 \times 10^7$	3×10^2	99,9	27,6	0,44	98,4
7	9×10^6	0	99,9	0,96	0,32	66,6
8	$3,8 \times 10^7$	6×10^1	100	2,080	19,7	99
9	$56,7 \times 10^7$	6×10^1	99,9	2.790	0,62	99,9
10	$4,96 \times 10^7$	0	100	1.520	2,36	99,8

5.1- Efeito do PQM na redução da carga microbiana e de endotoxinas dos canais radiculares infectados

Elevada carga microbiana e de endotoxinas foi encontrada nos canais radiculares na coleta inicial. Entretanto, o PQM foi capaz de reduzir o conteúdo microbiano ($14,12 \times 10^7$ UFC/mL X $1,84 \times 10^2$ UFC/mL) e endotóxico ($261,16$ EU/mL X $2,46$ EU/mL) em todos os canais radiculares estudados, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Tabela 3 ó página 67).

Tabela 3 ó Redução microbiana e de endotoxinas de canais radiculares infectados após o PQM com o sistema rotatório RaCe[®].

Grupos	Etapas da terapia endodôntica			
	Inicial Média (\pm dp)	Após PQM Média (\pm dp)	% Redução C1-C2	Valor de p
Carga microbiana (UFC/mL)	$14,12 \times 10^7 \pm 16 \times 10^7$ a*	$1,84 \times 10^2 \pm 2,12 \times 10^2$ b*	100	p = 0,0131
Níveis de LPS (EU/mL)	$261,16 \pm 357,2$ a*	$2,46 \pm 5,77$ b*	99,9	p = 0,0294

* Letras minúsculas distintas na linha significam diferença estatística pelo teste T amostras dependentes.

6- DISCUSSÃO

6.1- Da importância do tema

A cavidade oral é colonizada por diversas espécies bacterianas, algumas delas relacionadas com doenças orais como a cárie e a periodontite (AAS et al., 2005). Embora hoje este conhecimento já esteja consolidado no meio científico, a relação causal entre os microrganismos e a etiopatogenia das doenças pulpares e perirradiculares levou mais de um século para ser comprovada (MILLER, 1894; DOBELL, 1932; KAKEHASHI; STANLEY e FITZGERALD, 1965; SUNDQVIST, 1976; MÖLLER et al., 1981).

Atualmente, as bactérias com maior prevalência na infecção endodôntica são conhecidas (VIANNA, 2006; VIANNA et al., 2007; MOHAMMADI, 2011), e sabe-se inclusive da existência de interações bacterianas e de sua associação com sinais e sintomas clínicos (GOMES; LILLEY e DRUCKER, 1996).

Diversos fatores ecológicos influenciam no crescimento e na colonização bacteriana no interior dos canais radiculares infectados, principalmente por bactérias Gram-negativas (SUNDQVIST, 1992; PETERS; WESSELINK e VAN WINKELHOFF, 2002), e favorecem sua patogenicidade (CONSOLARO, 2009).

Além do canal principal, os microrganismos também se alojam nos túbulos dentinários e em áreas de reabsorção, podendo perpetuar a infecção se não forem eliminados (HAAPASALO e ØRSTAVIK, 1987; SIQUEIRA; RÔÇAS e LOPES, 2002; MATSUO et al., 2003; COHEN e HARGREAVES, 2011), principalmente se tiverem acesso a substrato.

O mesmo também ocorre com a endotoxina das bactérias Gram-negativas, que possui alta capacidade de difusão através dos túbulos dentinários (HORIBA et al., 1990; NISSAN et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2005). Ela é uma molécula de LPS presente na membrana mais externa dessas bactérias, e concentra na porção Lípide A a maior parte de sua toxicidade (BLACK, 2002; LEONARDO et al., 2004; DIXON e DARVEAU, 2005).

Tem sido dada grande importância às pesquisas com endotoxina, graças ao seu papel altamente tóxico e agressivo aos tecidos, com alto potencial inflamatório (BUCK et al., 2001). Este potencial tem sido amplamente estudado (DAHLÉN e HOFSTAD, 1977; ALVES, 2004), e fortemente correlacionado com sinais e sintomas clínicos presentes nas infecções

endodônticas (KHABBAZ; ANASTASIADIS e SYKARAS, 2001; SILVA et al., 2002; TANOMARU et al., 2003; JACINTO et al., 2005; SCHEIN e SCHILDER, 2006).

O tratamento endodôntico de canais radiculares infectados consiste, essencialmente, na eliminação da infecção existente e na prevenção da reinfecção futura (LOPES e SIQUEIRA JR., 2010), permitindo a cicatrização dos tecidos perirradiculares (AYDIN et al., 2007). Com este propósito, deve ser realizada criteriosa limpeza do conteúdo séptico-necrótico através da instrumentação e irrigação do canal radicular (SCHILDER, 1974).

Na atualidade, deve-se buscar não somente a eliminação dos microrganismos patogênicos, mas também a inativação de suas endotoxinas, que aderem irreversivelmente aos tecidos mineralizados (TANOMARU et al., 2003), podendo iniciar ou manter a resposta inflamatória e a reabsorção óssea nos tecidos periapicais (SILVA et al., 2004).

Medicamentos têm sido alvo de pesquisas no intuito de inativar as endotoxinas (FERREIRA, 2003; MAEKAWA et al., 2011), que não são completamente removidas, assim como os próprios microrganismos, pelos métodos de PQM até agora estudados (MICKEL et al., 2007; NAKAMURA, 2010).

Com a evolução tecnológica acerca dos instrumentos rotatórios de níquel-titânio e o surgimento de novos sistemas no mercado a todo o momento (SEMAAN et al., 2009), torna-se necessário avaliar a real capacidade destes sistemas, não só sobre o ponto de vista da limpeza e da modelagem, mas também sobre sua capacidade de remoção mecânica de microrganismos e endotoxinas, o que refletirá diretamente no sucesso do tratamento.

6.2- Da metodologia

No presente estudo, com o objetivo de melhor representar a complexidade anatômica do sistema de canais radiculares e diferentes orientações dos túbulos dentinários, foram utilizados dentes humanos extraídos. Foram selecionados apenas pré-molares inferiores com o intuito de padronizar as possíveis variações morfológicas entre diferentes grupos dentais.

De acordo com BERBER (2005), foi realizada instrumentação manual com lima tipo K #20 para padronizar o diâmetro do forame apical, e foram utilizados NaOCl 5,25% e EDTA 17% para remoção de possíveis restos orgânicos da polpa e abertura dos túbulos dentinários, permitindo adequada penetração e contaminação pelo microrganismo inoculado.

Foi utilizada para contaminação a bactéria *Escherichia coli* (ATCC 25922), já

consagrada na literatura por seu uso em estudos anteriores como modelo de laboratório (SILVA et al., 2002; TANOMARU et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005; MAEKAWA et al., 2011). Apesar de não ser comumente encontrada nos canais radiculares, seu LPS apresenta a estrutura básica do componente lipídico, que representa o centro ativo responsável pela toxicidade do LPS (MAEKAWA et al., 2011), além do baixo custo, sendo encontrada com facilidade para aquisição e uso experimental.

O período de incubação dos espécimes por 21 dias foi previamente preconizado por GOMES; MARTINHO e VIANNA, em 2009. Estes autores afirmam que, neste período, essa bactéria se difunde através da dentina, penetrando no interior de túbulos dentinários.

Para a realização do PQM dos espécimes, o sistema rotatório RaCe[®] foi escolhido por apresentar boa capacidade de corte, atribuída à secção transversal triangular e ao ângulo de corte positivo do instrumento, e pelo *design* diferenciado de sua parte ativa (RODRIGUES et al., 2007; FKG DENTAIRE, 2011), além de ter sido considerado um sistema ainda pouco estudado comparativamente aos demais. Algumas pesquisas na literatura avaliaram o comportamento do sistema rotatório RaCe[®] na instrumentação dos canais radiculares, pelos seguintes aspectos: capacidade de modelagem (LEONARDI, 2004; PAQUÉ; MUSCH e HÜLSMANN, 2005; MERRETT; BRYANT e DUMMER, 2006), capacidade de limpeza (ZAND et al., 2007), extrusão apical de debris (ZARRABI; BIDAR e JAFARZADEH, 2006), dilatação dos canais, manutenção da trajetória, desvio apical e manutenção do comprimento de trabalho, além de fraturas ou deformação de instrumentos (RODRIGUES et al., 2007). Porém, nenhum estudo até o momento avaliou este sistema no que diz respeito à remoção de microrganismos e endotoxinas.

Para cada canal radicular foi utilizado um novo *kit* de instrumentos, de forma a preservar a lâmina de corte da lima e também para que a carga de bactérias e endotoxinas presente na lima não fosse transferida de um espécime para outro.

A técnica de contagem de UFC tem sido amplamente utilizada no meio científico para determinar a quantidade de bactérias viáveis presentes em amostras (FERREIRA, 2003; JACINTO et al., 2005; VIANNA et al., 2007; MARTINHO e GOMES, 2008), e foi utilizada também neste estudo para quantificar *Escherichia coli* nas amostras iniciais e finais.

O método LAL tem sido amplamente utilizado em Endodontia para investigar e quantificar endotoxina em infecções do sistema de canais radiculares, *in vitro* ou *in vivo* (DAHLÉN e BERGENHOLTZ, 1980; NISSAN et al., 1995; KHABBAZ; ANASTASIADIS e SYKARAS, 2001; JACINTO et al., 2005; SCHEIN e SCHILDER, 2006; MARTINHO, 2007; VIANNA et al., 2007; MARTINHO e GOMES, 2008; GOMES; MARTINHO e

VIANNA, 2009; MARTINHO et al., 2010; FROES, 2011). MARTINHO et al. (2011), ao comparar diferentes métodos de quantificação de endotoxinas, constataram melhor reprodutibilidade e precisão do método cinético turbidimétrico (Pyrogent-5000®) quando comparado aos demais, sendo este o método escolhido no presente estudo.

6.3- Dos resultados

Não há registros na literatura de estudos anteriores a este que apresentem a específica metodologia empregada no mesmo. Alguns trabalhos foram similares, como os que testaram a redução da carga bacteriana e do conteúdo endotóxico pelo uso de diferentes substâncias irrigadoras como clorexidina e hipoclorito de sódio (TANOMARU et al., 2003; VIANNA et al., 2007; MARTINHO e GOMES, 2008; GOMES; MARTINHO e VIANNA, 2009; MARTINHO et al., 2010; NAKAMURA, 2010; MAEKAWA et al., 2011). Outros testaram a inativação das endotoxinas por diferentes medicações intracanais (FERREIRA, 2003; TANOMARU et al., 2003; VIANNA et al., 2007; MAEKAWA et al., 2011). Outros, ainda, testaram sistemas rotatórios diferentes do testado no presente estudo quanto à redução do conteúdo endotóxico de canais radiculares (MARTINHO et al., 2010; FROES, 2011).

Assim, outros estudos avaliaram o sistema RaCe® (LEONARDI, 2004; PAQUÉ; MUSCH e HÜLSMANN, 2005; ZARRABI; BIDAR e JAFARZADEH, 2006; MERRET; BRYANT e DUMMER, 2006; ZAND et al., 2007; RODRIGUES et al., 2007), mas sob outros aspectos que não a redução de carga microbiana e endotóxica. Entretanto, os bons resultados destes estudos quanto ao desempenho mecânico desse sistema despertaram o interesse para a avaliação de seu desempenho quanto aos aspectos microbiológicos.

O presente estudo encontrou diferença estatisticamente significativa entre as amostras microbiológicas e de endotoxinas coletadas antes e após o PQM com o sistema rotatório RaCe® e NaCl 0,9%. É provável que se uma substância antimicrobiana tivesse sido utilizada, a carga microbiana teria sido menor ainda. Apesar disto, as endotoxinas não são facilmente inativadas pelas substâncias comumente utilizadas no tratamento endodôntico e, como já foi afirmado, aderem irreversivelmente aos tecidos mineralizados (TANOMARU et al., 2003). O fato de simplesmente ômatarö os microrganismos com essas substâncias e não removê-los do canal radicular pode tornar a situação ainda pior, visto que as moléculas de LPS são liberadas principalmente após a morte bacteriana (BLACK, 2002). Por isto, este estudo analisou apenas

a remoção mecânica das bactérias e endotoxinas pela instrumentação, visto que essa ainda é a maneira mais segura para sua eliminação.

Sendo assim, diante dos resultados aqui encontrados e dos aspectos observados pelo que registra a literatura até o presente momento, fica patente que o ideal seria a completa eliminação de microrganismos e endotoxinas o que, na realidade, não nos é possível com os recursos do PQM existentes (inclusive sistemas rotatórios). A busca por técnicas de instrumentação e por substâncias químicas auxiliares ou mesmo medicamentos que possam proporcionar a total eliminação destes fatores deletérios ao organismo, possibilitando o sucesso na terapia endodôntica, ainda deve continuar.

Embora o sistema RaCe[®] tenha demonstrado capacidade de eliminação microbiana e endotóxica, assim como outros sistemas já testados, esforços devem ser empreendidos no sentido de cuidar de forma atenciosa de todos os passos na condução do tratamento, inclusive na fase de obturação endodôntica e blindagem da coroa do elemento tratado, de forma a não permitir que substratos sejam inseridos no sistema de canais radiculares, viabilizando microrganismos, principalmente Gram-negativos e suas endotoxinas, que permaneceram naquele espaço e têm potencial de perpetuar a doença perirradicular.

7- CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada neste trabalho e com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. Todas as amostras coletadas apresentavam *Escherichia coli*;
2. Todas as amostras coletadas acusaram a presença de endotoxinas; e
3. A sequência de limas rotatórias RaCe[®] utilizada foi capaz de reduzir a carga microbiana e o conteúdo endotóxico dos espécimes testados, com diferença estatisticamente significativa, porém a total eliminação dos microrganismos e endotoxinas não foi possível.

REFERÊNCIAS

- 1- AAS, J.A. et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 11, p. 5721-5732, Nov. 2005.
- 2- ALVES, F.R.F. Compreendendo a etiologia microbiana das infecções endodônticas. **Rev Biociên**, v. 10, n. 1-2, p. 67-71, Jan./Jun. 2004.
- 3- AYDIN, C. et al. Bacterial reduction by extensive *versus* conservative root canal instrumentation *in vitro*. **Acta Odontol Scand**, v. 65, n. 3, p. 167-170, Jun. 2007.
- 4- BERBER, V.B. **Verificação da redução de *Enterococcus faecalis* no canal radicular e nos túbulos dentinários utilizando diferentes substâncias químicas auxiliares e técnicas de instrumentação: estudo *in vitro***. 2005. 114p. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica ó Área de Endodontia) ó Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba. Orientador: Profª Drª Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
- 5- BLACK, J.G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 829p.
- 6- BUCK, R.A. et al. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. **J Endod**, v. 27, n. 5, p. 325-327, Mai. 2001.
- 7- COHEN, S.; HARGREAVES, K.M. **Caminhos da Polpa**. 10 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 928p.
- 8- CONSOLARO, A. **Inflamação e reparo: um sílabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas**. Maringá: Dental Press, 2009. 352p.
- 9- DAHLÉN, G.; HOFSTAD, T. Endotoxic activities of lipopolysaccharides of microorganisms isolated from an infected root canal in *Macaca cynomolgus*. **Scand J Dent Res**, v. 85, n. 4, p. 272-278, Mai. 1977.
- 10- DAHLÉN, G.; BERGENHOLTZ, G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. **J Dent Res**, v. 59, n. 6, p. 1033-1040, Jun. 1980.
- 11- DIXON, D.R.; DARVEAU, R.P. Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid A structure. **J Dent Res**, v. 84, n. 7, p. 584-595, Jul. 2005.
- 12- DOBELL, C. Antony van Leeuwenhoek and his òlittle animalsö. **Staples Press Ltd**, 1932. In: COHEN, S.; HARGREAVES, K.M. **Caminhos da Polpa**. 10 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 928p.
- 13- FERREIRA, F.B.A. **Avaliação antimicrobiana do tratamento endodôntico em dentes de cães submetidos à contaminação oral e à aplicação de endotoxina bacteriana**. 2003. 209p. Tese (Doutorado em Odontologia ó Área de Endodontia) ó Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru. Orientador: Profª Drª Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
- 14- FKG DENTAIRE. **Instruções de uso das limas RaCe®**. São Paulo: Labordental, 2011.
- 15- FROES, F.G.B. **Estudo *ex vivo* da capacidade de eliminação de endotoxinas do interior de canais radiculares pela sequência de limas ProTaper Universal**. 2011. 76p. Monografia (Especialização em Endodontia) ó Odontoclínica Central da Marinha, Rio de Janeiro. Orientador: Profª Drª Helena Rosa Campos Rabang.
- 16- GOMES, B.P.F.A.; LILLEY, J.D.; DRUCKER, D.B. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. **Int Endod J**, v. 29, p. 69-75, Mar. 1996.

- 17- GOMES, B.P.F.A.; MARTINHO, F.C.; VIANNA, M.E. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. **J Endod**, v. 35, n.10, p. 1350-1352, Out. 2009.
- 18- HAAPASALO, M.; ØRSTAVIK, D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. **J Dent Res**, v. 66, n. 8, p. 1375-1379, Ago. 1987.
- 19- 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. 331-334, Jul. 1990.
- 20- JACINTO, R.C. et al. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. **J Med Microbiol**, v. 54, p. 777-783, Ago. 2005.
- 21- KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R.; FITZGERALD, R.J. 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. 340-349, Set. 1965.
- 22- KHABBAZ, M.G.; ANASTASIADIS, P.L.; SYKARAS, S.N. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 91, n. 5, p. 587-593, Mai. 2001.
- 23- LEONARDI, D.P. **Avaliação da instrumentação rotatória com limas de níquel e titânio, K3 e RaCe, em canais radiculares curvos simulados**. 2004. 131p. Dissertação (Mestrado em Odontologia ó Área de Concentração: Endodontia) ó Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista óJúlio de Mesquita Filho, Araraquara. Orientador: Prof. Dr. Roberto Miranda Esberard.
- 24- LEONARDO, M.R. et al. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. **J Appl Oral Sci**, v. 12, n. 2, p. 93-98, Jun. 2004.
- 25- LOPES, H.P.; SIQUEIRA JR., J.F. **Endodontia: Biologia e Técnica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 980p.
- 26- MAEKAWA, L.E. et al. *In vitro* evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on *Escherichia coli* and its endotoxin in root canals. **J Appl Oral Sci**, v. 19, n. 2, p. 106-112, Abr. 2011.
- 27- MARTINHO, F.C. **Análise microbiológica, quantificação de endotoxinas de dentes com infecções endodônticas primárias e suscetibilidade antimicrobiana**. 2007. 214p. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica ó Área de Concentração: Endodontia) ó Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba. Orientador: Prof^ª Dr^ª Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
- 28- MARTINHO, F.C.; GOMES, B.P.F.A. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. **J Endod**, v. 34, n. 3, p. 268-272, Mar. 2008.
- 29- MARTINHO, F.C. et al. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. **J Endod**, v. 36, n. 11, p. 1766-1769, Nov. 2010.
- 30- MARTINHO, F.C. et al. Comparison of endotoxin levels in previous studies on primary endodontic infections. **J Endod**, v. 37, n. 2, p. 163-167, Fev. 2011.
- 31- MATSUO, T. et al. An immunohistological study of the localization of bacteria invading root pulpal walls of teeth with periapical lesions. **J Endod**, v. 29, n. 3, p. 194-200, Mar. 2003.
- 32- MERRETT, S.J.; BRYANT, S.T.; DUMMER, P.M.H. Comparison of the shaping ability of RaCe and FlexMaster rotary nickel-titanium systems in simulated canals. **J Endod**, v. 32, n. 10, p. 960-962, Out. 2006.
- 33- MICKEL, A.K. et al. The role of apical size determination and enlargement in the reduction of intracanal bacteria. **J Endod**, v. 33, n. 1, p. 21-23, Jan. 2007.

- 34- MILLER, W.D. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. **Dent Cosmos**, v. 36, p. 505-528, 1894. In: SIQUEIRA JR., J.F. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 94, n. 3, p. 281-293, Set. 2002.
- 35- MOHAMMADI, Z. Endotoxin in endodontic infections: a review. **J Calif Dent Assoc**, v. 39, n. 3, p. 152-161, Mar. 2011.
- 36- MÖLLER, A.J.L. et al. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **Scand J Dent Res**, v. 89, n. 6, p. 475-484, Dez. 1981.
- 37- NAKAMURA, V.C. **Desinfecção de canais radiculares preparados por diferentes técnicas de instrumentação e regimes de irrigação**. 2010. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas ó Área de Concentração: Endodontia) ó Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo. Orientador: Prof. Dr. Giulio Gavini.
- 38- NISSAN, R. et al. Ability of bacterial endotoxin to diffuse through human dentin. **J Endod**, v. 21, n. 2, p. 62-64, Fev. 1995.
- 39- OLIVEIRA, L.D. et al. Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules. **Braz Oral Res**, v. 19, n. 1, p. 5-10, Jan./Mar. 2005.
- 40- PAQUÉ, F.; MUSCH, U.; HÜLSMANN, M. Comparison of root canal preparation using RaCe and ProTaper rotary Ni-Ti instruments. **Int Endod J**, v. 38, n. 1, p. 8-16, Jan. 2005.
- 41- PETERS, L.B.; WESSELINK, P.R.; VAN WINKELHOFF, A.J. Combinations of bacterial species in endodontic infections. **Int Endod J**, v. 35, p. 698-702, Ago. 2002.
- 42- RODRIGUES, V.C. et al. Avaliação clínica do desempenho do sistema rotatório RaCe®. **Salusvita**, v. 26, n. 2, p. 137-148, 2007.
- 43- SCHEIN, B.; SCHILDER, H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. **J Endod**, v. 32, n. 4, p. 293-295, Abr. 2006.
- 44- SCHILDER, H. Cleaning and shaping the root canal. **Dent Clin North Am**, v. 18, n. 2, p. 269-296, Abr. 1974.
- 45- SEMAAN, F.S. et al. Endodontia mecanizada: a evolução dos sistemas rotatórios contínuos. **RSBO**, v. 6, n. 3, p. 297-309, 2009.
- 46- SILVA, L.A.B. et al. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin *in vivo*. **J Endod**, v. 28, n. 2, p. 94-98, Fev. 2002.
- 47- SILVA, L.A.B. et al. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. **Braz Dent J**, v. 15, n. 2, p. 109-114, 2004.
- 48- SIQUEIRA JR., J.F.; RÔÇAS, I.N.; LOPES, H.P. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 93, n. 2, p. 174-178, Fev. 2002.
- 49- SUNDQVIST, G. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps, 1976. In: COHEN, S.; HARGREAVES, K.M. **Caminhos da Polpa**. 10 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 928p.
- 50- SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. **J Endod**, v. 18, n. 9, p. 427-430, Set. 1992.
- 51- TANOMARU, J.M.G. et al. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. **Int Endod J**, v. 36, n. 11, p. 733-739, Nov. 2003.
- 52- VIANNA, M.E. **Microbiologia e tratamento das infecções endodônticas**. 2006. 240p. Tese (Doutorado em Clínica Odontológica ó Área de Endodontia) ó Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba. Orientador: Profª Drª Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
- 53- VIANNA, M.E. et al. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. **Oral Microbiol Immunol**, v. 22, p. 411-418, Dez. 2007.

- 54- ZAND, V.; et al. A comparative SEM investigation of the smear layer following preparation of root canals using nickel titanium rotary and hand instruments. **J Oral Sci**, v. 49, n. 1, p. 47-52, Mar. 2007.
- 55- ZARRABI, M.H.; BIDAR, M.; JAFARZADEH, H. An *in vitro* comparative study of apically extruded debris resulting from conventional and three rotary (Profile, Race, FlexMaster) instrumentation techniques. **J Oral Sci**, v. 48, n. 2, p. 85-88, Jun. 2006.



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Investigação in vitro da distribuição de endotoxinas na parede dentinária de canais radiculares e sua eliminação por instrumentos rotatórios e manuais**", protocolo nº 186/2009, dos pesquisadores Ariane Cássia Salustiano Marinho, Anna Beatriz Mourão Oliveira, Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Fabiana Gama Benevides Froes e Frederico Canato Martinho, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 18/09/2012.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Distribution of endotoxin in root canal walls and its removal by rotary and manual instruments**", register number 186/2009, of Ariane Cássia Salustiano Marinho, Anna Beatriz Mourão Oliveira, Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Fabiana Gama Benevides Froes and Frederico Canato Martinho, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 09/18/2012.


Profa. Dra. Lívia Maria Andaló Tenuta
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP



Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP