

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

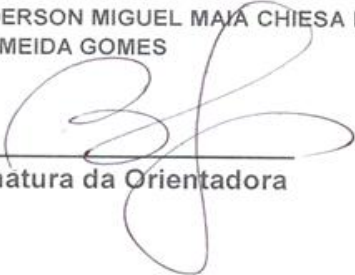
WANDERSON MIGUEL MAIA CHIESA

EFICÁCIA DE DOIS MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO DE
LIMAS ENDODÔNTICAS CONTAMINADAS *IN VIVO*, NA
ELIMINAÇÃO DE DNA BACTERIANO, ENDOTOXINAS E
NA ESTIMULAÇÃO DE MACRÓFAGOS PARA A
PRODUÇÃO DE IL 1- β

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE
PIRACICABA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM
CLÍNICA ODONTOLÓGICA NA ÁREA DE
ENDODONTIA

Orientadora: Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO
WANDERSON MIGUEL MAIA CHIESA E ORIENTADO PELA PROFA DRA BRENDA PAULA FIGUEIREDO
DE ALMEIDA GOMES


Assinatura da Orientadora

PIRACICABA, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

C434e Chiesa, Wanderson Miguel Maia, 1963-
Eficácia de dois métodos de esterilização de limas
endodônticas contaminadas in vivo, na eliminação de DNA
bacteriano, endotoxinas e na estimulação de macrófagos para a
produção de IL 1- β / Wanderson Miguel Maia Chiesa. --
Piracicaba, SP : [s.n.], 2011.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. 2. Contaminação. 3. Infecção. 4.
Lipopolissacarídeos. 5. Reação em cadeia da polimerase. I.
Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Effect of two sterilization methods of in vivo contaminated
endodontic files, in the elimination of bacterial DNA, endotoxins and in the
macrophages stimulation for IL1- β production

Palavras-chave em Inglês:

Endodontics
Contamination
Infection
Lipopolysaccharides
Polymerase chain reaction

Área de concentração: Endodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes [Orientador]
Wantuil Rodrigues Araújo Filho
Ricardo Affonso Bernardes
Caio Cezar Randi Ferraz
Danilo Mathias Zanello Guerisoli

Data da defesa: 17-06-2011

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 17 de Junho de 2011, considerou o candidato WANDERSON MIGUEL MAIA CHIESA aprovado.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke.

Profa. Dra. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Wantuil Rodrigues Araujo Filho".

Prof. Dr. WANTUIL RODRIGUES ARAUJO FILHO

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Ricardo Affonso Bernardes".

Prof. Dr. RICARDO AFFONSO BERNARDES

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Caio Cesar Randi Ferraz".

Prof. Dr. CAIO CEZAR RANDI FERRAZ

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Danilo Mathias Zanello Guerisoli".

Prof. Dr. DANILO MATHIAS ZANELLO GUERISOLI

Dedico este trabalho à minha esposa CLÁUDIA CRISTINA CABRAL CHIESA

Aos meus pais WALTER CHIESA e NEREIDE MAIA CHIESA

À minha filha BIANCA ESTHER CABRAL CHIESA

E ao meu filho ÍTALO BRUNO CABRAL CHIESA

Por todo amor

Todo carinho

Toda compreensão

E todo respeito

Aos ideais e idéias

Deste marido

Filho

e

Pai.

Obrigado!

Agradeço a **DEUS**, em nome do **MESTRE JESUS**,
por nos proporcionar, em todos os momentos,
inúmeras oportunidades de aprendizado para nossa
própria felicidade,
restando-nos somente enxergá-las e aproveitá-las como tal.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, **PROFESSORA DOUTORA BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES,**

Não só por sua competência

Não só por sua atenção e zelo

Não só por sua grande simplicidade em orientar e transmitir seus profundos conhecimentos

Não só por - além de pesquisadora admirável - ser exemplo de mãe e esposa, atributos que tanto respeito nas mulheres e que os reconheci na Sra, ao ter a honra de ser aproximado de seu esposo Paulo e filha Rebecca

Não só por entender as minhas deficiências e esforçar-se para me ajudar o mais possível

Por cada uma dessas qualidades e por todas elas que a fazem pessoa tão Especial

Agradeço e rogo a Deus que a mantenha com vigor e saúde por infindáveis anos

No esplendor e na plenitude de todas suas atividades

Que realiza com tanto empenho e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual de Campinas** e à **Universidade do Estado do Amazonas**, nas pessoas de seus Magníficos Reitores, **Professor Doutor Fernando Ferreira Costa** e **Professor Doutor José Aldemir de Oliveira**, cujo empreendimento dos Programas de Mestrado e Doutorado Interinstitucionais proporcionou tão extraordinária oportunidade aos docentes e pesquisadores da Região Amazônica;

Ao **Professor Doutor Jacks Jorge Júnior**, Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas e ao **Professor Doutor Cleinaldo de Almeida Costa**, Diretor da Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas;

À **Professora Doutora Altair Antoninha Del Bel Cury**, Coordenadora Acadêmica do Programa de Doutorado Interinstitucional em Clínica Odontológica

pela Instituição Promotora – Unicamp e ao **Professor Doutor José Antônio Nunes de Mello**, Coordenador Acadêmico do Programa de Doutorado Interinstitucional em Clínica Odontológica pela Instituição Receptora – UEA;

À **Professora Doutora Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia** Coordenadora dos Programas de Pós-graduação da FOP/Unicamp e ao **Professor Doutor Márcio de Moraes**, Coordenador do Curso de Pós-graduação em Clínica Odontológica da FOP/Unicamp;

Ao **Professor Doutor Alexandre Augusto Zaia**, responsável pela Área de Endodontia da FOP/Unicamp;

Aos professores da Área de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, **Professor Doutor Alexandre Augusto Zaia**, **Professora Doutora Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, **Professor Doutor Caio César Randi Ferraz**, **Professor Doutor Francisco José de Souza-Filho** e **Professor**

Doutor José Flávio Affonso de Almeida, mais que pela transmissão e facilitação de conhecimentos, reconheço e agradeço todas as manifestações de amizade e apreço;

Ao **Professor Doutor Rogério de Castilho Jacinto**, pelas várias oportunidades em que nos esclareceu e orientou em procedimentos, durante a fase de pesquisa laboratorial;

À **Professora Doutora Ezilmara Leonor Rolim de Sousa, Professora Doutora Adriana de Jesus Soares e Professora Doutora Ericka Tavares Pinheiro** por suas importantíssimas e relevantes considerações e sugestões apresentadas na fase de qualificação desta Tese;

Aos colegas da pós-graduação: **Ana Carolina Machado Rocha Lima, Antonio Batista, Carlos Roberto Berger, Danna Mota Moreira, Fernanda Graziela Corrêa Signoretti, Francisco Montagner, Giselle Priscilla Cruz Abi**

Rached, Juliana Nascimento, Marcos Roberto dos Santos Frozonin, Neylla Teixeira Sena, Ricardo Ferreira, Thais Arcossi, Vanessa Bellocchio Berber pela ajuda nos momentos de necessidade, companheirismo, respeito mútuo e consideração;

Em especial ao amigo e colega **Frederico Canato Martinho**, com meu reconhecimento por sua grande capacidade profissional e competência, aliadas ao seu notório entusiasmo em colaborar com o desenvolvimento deste estudo. Sem sua ajuda, companheiro, dificilmente eu poderia ter atingido os objetivos pretendidos. Que Deus continue a abençoá-lo abundantemente;

Aos colegas do MINTER/DINTER: **Adelsilene Veras, Ana Lúcia Diefenbach, Ana Paula Coelho Vieira, Alexandra Pieri, Andrea Melo Moutinho da Costa, Brigitte Nichthausen, Carlos Eduardo da Silva Nossa Tuma, Cláudia Andréa Corrêa Garcia Simões, Cláudia Kelly de Oliveira Diniz, Cristiane Maria Brasil Leal, Danielson Guedes Pontes, Francisco Pantoja Braga, Joaquim Alberto da Silva, Joelson Rodrigues Brum, Jonas Alves de Oliveira, Kathllen Rebelo de Souza, Lauramaris Regis Aranha, Lia Mizobe Ono, Lígia Regina**

Mota de Vasconcelos, Maria Eliana Cruz de Almeida, Maria Margarida Sousa Athayde, Marcelo Vinicius de Oliveira, Mauro Luiz Travessa de Barros, Naelka Sarmiento, Maria de Fátima Ribeiro Rodrigues, Olavo das Neves Júnior, Paulo Augusto Alves da Silva Filho, Rachid Pinto Zacarias Filho, Rosana Elisabete Agostinho dos Santos, Sybilla Torres Dias, Tânia Cristina Chicre Alcântara, Vilma da Silva Melo e Wladimir Franco de Sá Barbosa, com os quais tive a oportunidade de ladear esforços na concretização desta empreitada;

Às colegas **Ariane Cássia Salustiano Marinho, Thais Mageste Duque** e **Thaís Sturion Bellato** por sua prestimosa ajuda na fase experimental desta tese;

Às prezadas colaboradoras nas atividades da FOP: **Ana Cristina do Amaral Godoy, Daiane Liborio Machado Scutton, Geovania Caldas Almeida e Wanderly Lima de Almeida**;

Ao **Exército Brasileiro**, na pessoa de seu Comandante, **General-de-Exército Enzo Martins Peri**, pela oportunidade dada e confiança depositada para que eu desenvolvesse as atividades do doutorado.

Aos sucessivos Diretores do então denominado Hospital Geral de Manaus, hoje Hospital Militar de Área de Manaus, **Coronel Médico Derli da Silva Gouvêa**, **Tenente-Coronel Médico Temístocles Moura Café (in memoriam)**, **Tenente-Coronel Médico Juvenal Donizete Ozelim** e ao Diretor do Hospital Militar de Área de Campo Grande, **Tenente-Coronel Médico Ronaldo Smolentzov**, que souberam - enquanto meus Chefes durante o Curso - compreender as peculiaridades de um Programa de Doutorado e me apoiaram durante a sua realização;

Ao **Coronel Dentista do Exército Brasileiro, Professor Livre-Docente Hélio Pereira Lopes** e ao **Coronel Dentista do Exército Brasileiro, Professor Doutor Wantuil Rodrigues Araújo Filho** pelo exemplo e estímulo sempre presentes que em muito me ajudaram a chegar até aqui e pela amizade concretizada ao longo de tantos anos;

Ao Subdiretor do Hospital Militar de Área de Campo Grande, **Tenente-Coronel Médico José Edacyr Simm**, fraterno amigo, que me remonta aos ensinamentos bíblicos do “*quanto é bom e suave que os irmãos vivam em união*”;

À **Capitão-de-Mar-e-Guerra (CD), Professora Doutora Helena Rosa Campos Rabang**, pela amizade e pelos tantos conselhos pertinentes, desde o início do curso;

À **Professora Doutora Mônica Stroppa Ferreira Nozawa**, Pró-Reitora Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Nilton Lins, no Amazonas, sou-lhe muito grato por toda sua ajuda, compreensão e apoio, para que eu pudesse continuar a cumprir com meus compromissos junto ao Curso de Especialização dessa Instituição;

Ao **Professor Doutor Clóvis Monteiro Bramante**, que me honra com sua amizade e estima, pelo incentivo no prosseguimento de minhas atividades de professor e pesquisador;

Ao **Professor Doutor Ricardo Affonso Bernardes**, querido amigo e colaborador em diversas oportunidades;

Ao **Professor Doutor Joni Augusto Cirelle** e ao **Professor Doutor Fábio Renato Manzolli Leite**, pelo cuidadoso delineamento e análises relativas às culturas de macrófagos utilizados nesta tese;

Ao **Professor Doutor Danilo Mathias Zanello Guerisoli**, ao **Professor Doutor Marco Antônio Húngaro Duarte** e ao **Professor Doutor Wilson Castro Silva**, por se colocarem à disposição para auxiliar nas análises experimentais deste estudo;

Aos prezados amigos professores que estiveram em algum momento ao nosso lado nos Cursos de Especialização do Centro Universitário Nilton Lins e na Associação Brasileira de Cirurgiões-Dentistas, Seção Amazonas: **Ayra Collaço Veras, Cláudia Dias Abinader, Doutora Fabiola Mendonça da Silva Chui, Gustavo Mestieri de Macedo, Lidiane Rodrigues Argôlo, Luciana Machado de Abreu, Márcia Marinho de Oliveira Sardinha e Shirlene de Souza Malveira**, por dividirem comigo muito de nossos sonhos, desejos e tarefas de trabalho;

Ao grande e inseparável amigo **Professor Norbi Rodrigues Correia**, exemplo de dedicação e simplicidade, e a quem tanto devo, agradeço por sua dedicação, lealdade e amizade: nos momentos de dificuldade é que conhecemos os verdadeiros amigos;

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)** pelo suporte financeiro;

À minha querida esposa **Cláudia Cristina Cabral Chiesa**, por toda a ajuda em tantos e tantos momentos de elaboração desta Tese;

Aos meus amados filhos **Ítalo Bruno Cabral Chiesa** e **Bianca Esther Cabral Chiesa** pela meticulosa ajuda na revisão deste texto;

Ao meu estimado irmão, **Tenente-Coronel Marcelo Maia Chiesa**, por todo seu empenho e ajuda, como militar, irmão e amigo;

Ao grande amigo, **Reginaldo Gil de Toledo**, tornando-se para mim como um verdadeiro irmão, agradeço por sua estima e consideração, bem como por seu apoio incondicional, desde o período em que vivi em Piracicaba;

Enfim, ***A todos que de uma forma ou de outra participaram na concretização desta empreitada***; tenham a certeza de que até os antagonismos e dificuldades interpostos foram bem-vindos, pois, afinal,

Veni, vidi, vici, graças a Deus!

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”

Frase atribuída a LEONARDO DA VINCI

RESUMO

Conteúdos dos canais radiculares podem ficar aderidos às limas endodônticas durante o preparo químico-mecânico, tais como endotoxinas, com grande potencial de desencadear resposta inflamatória. Instrumentos endodônticos são frequentemente reutilizados, existindo preocupação sobre a neutralização daqueles conteúdos pelos métodos de esterilização empregados em consultórios odontológicos. Os objetivos deste estudo foram: avaliar os efeitos de esterilização por estufa de calor seco ou autoclave, na detecção de DNA bacteriano e níveis de endotoxinas de limas endodônticas contaminadas *in vivo*, verificando correlações entre as espécies detectadas; investigar a produção de IL-1 β por macrófagos murinos estimulados *in vitro* por amostras coletadas de hastes metálicas contaminadas de limas endodônticas e esterilizadas por estufa de calor seco ou autoclave. Oitenta limas endodônticas manuais número 15 de aço inoxidável ficaram estéreis e apirogênicas, após esterilização pelo calor seco a 200°C/4h. Vinte limas tiveram seus cabos removidos e as hastes metálicas destinadas ao Grupo I (Controle negativo), em frascos apirogênicos. Vinte pacientes apresentando necrose da polpa dental, lesão periapical e sem dor espontânea foram incluídos nesta pesquisa. Cavidades de acesso foram assepticamente preparadas e três limas apirogênicas sucessivamente introduzidas e removidas até o comprimento de trabalho de cada canal. Depois do uso, os cabos foram removidos, as hastes metálicas inseridas em frascos estéreis e apirogênicos e os outros grupos foram divididos (n=20): Grupo II (Controle positivo) - amostras sem esterilização; Group III - esterilização pela estufa de calor seco (170°C/1h); Grupo IV - amostras autoclavadas. A técnica PCR (16S rDNA) foi usada para detectar DNA bacteriano, um teste turbidimétrico do Lisado dos Amebócitos de *Limulus* (LAL) foi usado para mensurar os níveis de endotoxinas e o método ELISA calculou as quantidades de IL-1 β liberadas por macrófagos murinos estimulados pelos conteúdos das limas contaminadas e esterilizadas. *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas endodontalis* e *Treponema socranskii* foram as bactérias-alvo mais frequentemente detectadas, a partir das amostras

contaminadas e não esterilizadas. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Prevotella tanneriae* não foram identificadas. Correlação positiva estatisticamente significativa ($p < 0.05$) foi encontrada entre *Porphyromonas endodontalis* e *Treponema denticola*, e desta com *Treponema socranskii*. Depois de esterilização pela estufa de calor seco ou autoclave, o método PCR não detectou bactérias. O teste turbidimétrico indicou a mediana de 1,070 UE/mL, 0,875 UE/mL e 0,251 EU/mL, no grupo sem esterilização, esterilizado pela estufa de calor seco e autoclavado, respectivamente. Macrófagos estimulados pelas amostras das limas contaminadas e autoclavadas liberaram IL-1 β (mediana de 55,39 pg/mL). Conclusão: DNA bacteriano não foi detectado depois da esterilização pela estufa de calor seco ou autoclave, mas estes métodos não foram capazes de eliminar endotoxinas de limas endodônticas contaminadas e não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os dois métodos de esterilização empregados ($p > 0.05$). Correlações positivas significantes foram detectadas entre micro-organismos colhidos de limas endodônticas contaminadas. Amostras autoclavadas estimularam a liberação de IL-1 β por macrófagos, mas não foram detectados níveis mensuráveis desta citocina depois da estimulação pelas amostras esterilizadas por calor seco.

PALAVRAS-CHAVES: Endodontia, Contaminação, Infecção, Lipopolissacarídeos, Reação em Cadeia de Polimerase.

ABSTRACT

Contents from root canal can be attached on endodontic files during chemomechanical preparation, such as endotoxin, with great potential to trigger inflammation. Endodontic instruments are often reused, and there is a concern about the neutralization of those contents by sterilization methods employed in dental offices. The objectives of this study were: to evaluate the effect of sterilization by dry heat oven or autoclave, in the bacterial DNA detection and endotoxin levels from *in vivo* contaminated endodontic files, verifying correlations between detected species; to investigate IL-1 β production by murine macrophage stimulated *in vitro* by samples from contaminated metal shafts of endodontic files and sterilized by dry heat oven or autoclave. Eighty size 15 stainless steel hand files were sterile and apyrogenic, after dry heat sterilization at 200°C/4h. Twenty files had their handles cut off and metal shafts destined to the Group I (Negative control), in apyrogenic vials. Twenty patients presenting dental pulp necrosis, periapical lesion and without spontaneous pain were included in this research. Access cavities were aseptically prepared and three apyrogenic files were successively introduced and removed at the working length of each canal. After use, handles were cut off, metal shafts inserted in apyrogenic vials and the other groups were divided (n=20): Group II (Positive control) - samples with no sterilization; Group III - sterilization by dry heat oven (170°C/1h); Group IV- autoclaved samples. PCR technique (16S rDNA) was used to detect bacterial DNA, Limulus Amebocyte Lysate (LAL) turbidimetric test measured endotoxin levels and ELISA method calculated amounts of IL-1 β released by murine macrophage stimulated by contents from the contaminated and sterilized files. *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas endodontalis* and *Treponema socranskii* were the most frequently detected target bacteria, from contaminated and non sterilized samples. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tanerella forsythia* and *Prevotella tanneriae* were not identified. Statistically significant positive correlation ($p < 0.05$) was found between *Porphyromonas endodontalis* and *Treponema denticola*, and between *Treponema*

denticola and *Treponema socranskii*. After sterilization by dry heat oven or autoclave, PCR method detected no bacteria. Turbidimetric test indicated median of 1.070 EU/mL, 0.875 EU/mL and 0.251 EU/mL, in the group without sterilization, sterilized by dry heat oven and autoclaved, respectively. Macrophage stimulated by samples from contaminated and autoclaved files released IL-1 β (median of 55.39 pg/mL). Conclusion: no bacterial DNA was detected (PCR technique - 16S rDNA) after sterilization by dry heat oven or autoclave, but these methods were not able to eliminate endotoxin from contaminated endodontic files and no statistically significant differences were found between the two methods of sterilization employed ($p>0.05$). Significant positive correlations were detected between microorganisms collected from contaminated endodontic files. Autoclaved samples stimulated IL- 1 β releasing by macrophage, but no measurable levels of this cytokine were detected after stimulation by dry heat sterilized samples.

KEYWORDS: Endodontics, Contamination, Infection, Lipopolysaccharides, Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Visualização do produto da PCR.....	56
Figura 2	Preparação de lisado do amebócito do caranguejo-ferradura, o <i>Limulus polyphemus</i>	58
Figura 3	Quantificação de endotoxinas sobre as hastes das limas endodônticas.....	63
Figura 4	Cultura de células e expressão de RNAm de IL- 1 β	69
Figura 5	Quantificação de IL-1 β após métodos de esterilização.....	73
Figura 6	Visualização do gel de agarose a 1% e detecção da presença de bandas do primer universal.....	77
Figura 7	Gráfico do percentual de endotoxinas em função do método de esterilização.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Primers utilizados e ciclos para a identificação de espécies bacterianas específicas e parâmetros empregados.....	54
Tabela 2	Primers utilizados e ciclos para reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).....	68
Tabela 3	Aspectos clínicos e radiográficos dos 20 canais radiculares analisados.....	76
Tabela 4	Detecção de bactérias pelo método PCR simples.....	79
Tabela 5	Quantificação de endotoxinas presentes sobre as limas endodônticas (UE/mL) provenientes dos 20 canais radiculares.....	81
Tabela 6	Quantificação (em pg/mL) de IL-1 β liberada por macrófagos, após estímulo dos conteúdos presentes sobre as limas endodônticas esterilizadas por autoclave ou estufa.....	84
Tabela 7	Bactérias, quantificação de endotoxinas (UE/mL) e IL-1 β (em pg/mL).....	85
Tabela 8	Métodos de descontaminação de material endodôntico referidos na literatura consultada.....	131
Tabela 9	Métodos de monitoramento de processos de esterilização encontrados na literatura consultada.....	134
Tabela 10	Reagentes para reação de PCR.....	139
Tabela 11	Diluições para curva-padrão de endotoxinas.....	147

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Atm	-	Atmosfera
BP	-	Par de bases (base pairs)
BPPN	-	Bacilos produtores de pigmento negro
FDA	-	Food and Drug Administration
LAL	-	Lisado dos Amebócitos de Limulus
LPS	-	Lipolissacarídeo
NiTi	-	Níquel-Titânio
RR	-	Risk ratio
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)
pg/ml	-	Picograma por mililitro
Psi	-	Libra por polegada quadrada (pounds per square inch)
IL-1 β	-	Interleucina-1 beta
TNF- α	-	Fator de Necrose Tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor alpha)
UE/ml	-	Unidade de endotoxinas por mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1	Microbiota da cavidade bucal e canal radicular.....	5
2.1.1	<u>Métodos moleculares para detecção de micro-organismos.....</u>	8
2.2	Endotoxinas.....	16
2.3	Citocinas Inflamatórias.....	23
2.4	Controle de infecção e descontaminação de instrumentos endodônticos.....	27
3	PROPOSIÇÃO.....	43
4	MATERIAL E MÉTODO.....	45
4.1	Seleção dos indivíduos.....	45
4.2	Procedimentos clínicos empregados prévios à coleta.....	46
4.3	Coleta de material com emprego de limas endodônticas.....	47
4.4	Procedimentos endodônticos.....	49

4.5	Identificação microbiana através do método PCR simples.....	50
4.5.1	<u>Extração do DNA bacteriano.....</u>	51
4.5.2	<u>Reação de PCR.....</u>	52
4.6	Quantificação de Endotoxinas.....	57
4.6.1	<u>Estabelecimento de curva-padrão.....</u>	59
4.6.2	<u>Controle de inibição/estimulação do teste.....</u>	60
4.6.3	<u>Cálculo da concentração de endotoxinas.....</u>	61
4.7	Resposta de macrófagos aos conteúdos endodônticos.....	63
4.7.1	<u>Cultura de células.....</u>	64
4.7.2	<u>Estimulação celular.....</u>	65
4.7.3	<u>Expressão de RNA mensageiro de IL-1β.....</u>	66
4.7.3.1	<i>Extração de RNA total, transcrição reversa e PCR.....</i>	66
4.7.4	<u>Expressão da citocina IL-1β.....</u>	70

4.7.4.1	<i>Teste imunoenzimático (ELISA) - Técnica sanduíche</i>	70
4.7.4.2	<i>Procedimento laboratorial</i>	71
4.7.4.3	<i>Padronização de curva-padrão</i>	72
4.7.4.4	<i>Mensuração dos níveis totais IL-1β liberada no meio de cultura</i>	72
4.8	Análise estatística	74
5.	RESULTADOS	75
5.1	Características Clínicas	75
5.2	Análises Microbiológicas	77
5.2.1	<u>Detecção de micro-organismos Gram-negativos pelo método PCR simples</u>	77
5.2.2	<u>Correlação entre micro-organismos</u>	80
5.3	Endotoxinas	80
5.3.1	<u>Quantificação de endotoxinas presentes sobre as limas</u>	80
5.3.2	<u>Citocina inflamatória IL-1β</u>	83
6	DISCUSSÃO	87
6.1	Características clínicas	87

6.2	Análises Microbiológicas.....	89
6.2.1	<u>Detecção de micro-organismos Gram-negativos pelo método PCR simples.....</u>	89
6.2.2	<u>Correlação entre micro-organismos.....</u>	95
6.3	Endotoxina.....	96
6.3.1	<u>Quantificação de endotoxinas presentes sobre as limas.....</u>	96
6.3.2	<u>Expressão da citocina IL-1β</u>	102
7	CONCLUSÕES.....	105
	REFERÊNCIAS.....	107
	APÊNDICE I.....	131
	APÊNDICE II.....	135
	APÊNDICE III.....	137
	APÊNDICE IV.....	153
	ANEXO I.....	163

1 INTRODUÇÃO

No passado, a Odontologia se apresentava com um modelo preponderantemente cirúrgico e restaurador, desenvolvendo-se muitas vezes com posturas calcadas em ações descompromissadas com os riscos reais de transmissão de infecção (Rabello *et al.*, 2001).

Contudo - e notadamente nas últimas três décadas - verificou-se a emergência de doenças cada vez mais graves e com possibilidade de transmissão via tratamento odontológico, tais como AIDS, vários tipos de hepatite, tuberculose multirresistente, pneumonia asiática, doença de Creutzfeldt-Jakob e outras, impondo aos cirurgiões-dentistas uma mudança nos paradigmas então vigentes, revendo e aprimorando os protocolos anteriormente empregados (Constant *et al.*, 2004; Lipscomb *et al.*, 2006; Bourvis *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2007).

No intuito de se reutilizar os instrumentos odontológicos em outro paciente, há a necessidade de adoção de protocolos rígidos de controle de infecção e limpeza. Isto deve ser encarado como um verdadeiro desafio, porque a Odontologia contemporânea se depara com o aumento global da incidência de doenças infectocontagiosas das mais variadas etiologias e para as quais, muitas vezes, não se conhece totalmente as características de contágio (Villaseñor *et al.*, 1992; Pileggi-Vinha & Pécora, 1994; Parashos *et al.*, 2004).

Durante o tratamento endodôntico, todo um arsenal, composto por instrumentos manuais ou movidos a motor, é frequentemente empregado, com o objetivo de remover tecidos duros e moles do interior da cavidade pulpar, modelando e limpando os canais radiculares, enquanto que o uso de substâncias irrigadoras age como importante coadjuvante no saneamento do sistema de canais (Letters *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2009).

Em relação às limas endodônticas, alguns estudos apontam que estas se encontram sujas com frequência, mesmo antes de sua primeira utilização clínica. Já foi possível evidenciar desde cavacos metálicos até fragmentos de plástico sobre as suas hastes helicoidais em instrumentos novos, implicando na necessidade de criteriosa limpeza prévia a seu emprego (Murgel *et al.*, 1990; Chiesa, 2003; Parashos *et al.*, 2004; Perakaki *et al.*, 2007; Van Eldik *et al.*, 2004a, Van Eldik *et al.*, 2004b; Assaf *et al.*, 2008).

Após realizar o preparo dos canais radiculares, os instrumentos endodônticos ficam impregnados de produtos orgânicos e inorgânicos provenientes dos canais, além dos micro-organismos ali existentes, os quais são excisados durante a instrumentação (Perakaki *et al.*, 2007).

A despeito de suas características metalúrgicas ou morfológicas, tem sido demonstrado que as espiras dos instrumentos endodônticos tendem a reter alguma quantidade de sujidade de difícil remoção, sejam eles manuais ou movidos a motor, de níquel-titânio ou de aço inoxidável (Murgel *et al.*, 1990; Chiesa, 2003; Parashos *et al.*, 2004; Perakaki *et al.*, 2007; Van Eldik *et al.*, 2004b; Assaf *et al.*, 2008).

Assim, é importante paradigma que a manutenção da cadeia asséptica seja fundamental para o sucesso do tratamento endodôntico realizado e a sujidade aderida às limas pode interferir no resultado final do tratamento. Por isso, tem-se enfatizado a necessidade de adequada limpeza em todo material que será esterilizado, a fim de se evitar a infecção cruzada e mesmo a contaminação acidental do profissional e de sua equipe (Chiesa, 2003).

Instrumentos endodônticos são frequentemente reutilizados, existindo uma preocupação se os métodos de esterilização frequentemente empregados em consultório odontológicos são capazes também de neutralizar conteúdos endodônticos que possam ficar retidos sobre as limas e que tenham algum potencial patogênico ao serem inoculados em outro paciente (Boyd *et al.*, 1994;

Carmo, 1996; Burkhart & Crawford, 1997; Johnson *et al.*, 1997; Chiesa, 2003, Parashos *et al.*, 2004; Van Eldik *et al.*, 2004a; Van Eldik *et al.*, 2004b; Aasim *et al.*, 2006; Bourvis *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007; Assaf *et al.*, 2008; Morrison & Conrod, 2009; Venkatasubramanian *et al.*, 2010).

No caso de canais necróticos, o tratamento endodôntico deve ser conduzido levando-se em conta que a cavidade pulpar a ser tratada está fortemente povoada de uma grande diversidade de micro-organismos, sendo que o controle da infecção ali existente constitui-se um dos principais objetivos a serem cumpridos, a fim de determinar o sucesso da terapia a ser instituída (Gomes *et al.*, 2005).

A identificação da microbiota existente no sistema de canais radiculares e região perirradicular pode ser realizada, basicamente, por métodos de cultivo e identificação por testes laboratoriais ou, mais recentemente, por métodos moleculares, os quais se utilizam de sequências de ácidos nucleicos (Vianna, 2006).

A partir do advento dos métodos moleculares, tem sido possível detectar a presença de espécies provenientes de infecções endodônticas de difícil ou impossível cultivo e até de células microbianas inviáveis (Siqueira Jr. *et al.*, 2001a, Siqueira Jr. *et al.*, 2001b; Siqueira Jr. & Rôças, 2004a; Gomes *et al.*, 2006a, Gomes *et al.*, 2006b).

As endotoxinas bacterianas são definidas como lipopolissacarídeos (LPS) associados à membrana externa de bactérias Gram- negativas (Luderitz *et al.*, 1981; Rietschel & Brade, 1992), constituindo-se na mais significativa fonte de pirogênio para a indústria farmacêutica, sendo uma substância estável ao calor, resistente à dessecação e altamente aderente a materiais inorgânicos. Podem desencadear reação inflamatória sistêmica, tendo como fontes potenciais a superfície do solo, a microbiota gastrointestinal e o sistema de água (Lourenço *et al.*, 2005).

As lesões periapicais ocorrem após o processo de necrose pulpar, como resultado de agressão frequentemente induzida por infecção bacteriana, a qual produz reação inflamatória, inicialmente na polpa dentária, para depois chegar à região periapical. Ali chegando, os micro-organismos, seus subprodutos e os tecidos pulpares alterados agem, trazendo como resposta do organismo a presença de numerosas células inflamatórias, que junto com outras células do tecido conjuntivo liberam vários mediadores que buscam impedir a progressão da infecção, resultando em uma característica marcante que é a reabsorção óssea perirradicular (Fouad & Acosta, 2001).

A reabsorção óssea é mediada por citocinas liberadas pelas células do hospedeiro, tais como IL1- β , IL-1 α e TNF- α (Ataoğlu *et al.*, 2002).

Estudos têm demonstrado a presença de endotoxinas em altas concentrações em canais radiculares com polpas necrosadas (Hashioka *et al.*, 1992), já havendo sido assinalada alguma correlação entre a sua concentração e a presença de sinais e sintomas (Horiba *et al.*, 1991; Barthel *et al.*, 1997; Jacinto *et al.*, 2005, Martinho, 2011), enquanto que Silva *et al.* (2007) demonstraram a inativação de endotoxina previamente depositada em limas, em um estudo conduzido *in vitro*.

Diante disto, julgou-se oportuno avaliar dois métodos de esterilização em limas endodônticas contaminadas *in vivo*, na eliminação de DNA bacteriano e na inativação de endotoxinas, bem como mensurar a produção de uma citocina pró-inflamatória (IL1- β) por macrófagos, quando estes foram estimulados pelos conteúdos provenientes dessas limas após sua esterilização.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microbiota da cavidade bucal e canal radicular

Uma grande parte das bactérias vivendo no planeta Terra não pode ser cultivada. Pesquisas em muitos ecossistemas terrestres e aquáticos indicam que mais de 99% dos micro-organismos são resistentes à cultura em laboratório. No corpo humano, incluindo a cavidade bucal, tem sido demonstrada a numerosa quantidade de espécies não cultiváveis (Siqueira Jr. & Rôças, 2003d).

Nos últimos anos, os conhecimentos sobre a microbiota da cavidade bucal têm se multiplicado exponencialmente, considerando-se que a cavidade bucal é o nicho ecológico de maior biodiversidade conhecida até agora (Perea, 2004).

Cerca de 700 espécies bacterianas ou filotipos já foram detectadas na cavidade bucal, sendo que mais de 50% desses micro-organismos são considerados não cultiváveis (Rolph *et al.*, 2001; Munson *et al.*, 2002; Aas *et al.*, 2005; Gomes & Montagner, 2010). Os micro-organismos ali presentes costumam ser encontrados prevalentemente em biofilmes, constituídos por comunidades com múltiplas espécies que, em seus estágios iniciais de desenvolvimento, agrupam-se em diferentes tipos de interações ecológicas, principalmente como comensais (Perea, 2004; Chalmers *et al.*, 2007).

Chen *et al.* (2010) afirmam que o genoma microbiano da cavidade bucal é o que mais tem sido estudado em relação aos seres humanos, possuindo cerca de 53% de espécies sem nomenclatura definida, com grande percentual de micro-organismos não cultiváveis.

Meurman (2010) atesta que tradicionalmente tem sido possível associar os micro-organismos presentes na cavidade bucal ao desenvolvimento de quadros inflamatórios sistêmicos e infecções focais, sendo particularmente enfatizada a relação de afecções sistêmicas com as doenças ligadas aos dentes e tecidos periodontais, também existindo a possibilidade de sua correlação com o surgimento de tumores malignos, uma vez que são frequentes os achados clínicos de pacientes com câncer de boca e uma pobre higiene bucal.

Segundo Diaz *et al.* (2006), a colonização microbiana das superfícies dentárias é um processo repetido e seletivo, com certas espécies predominando em determinado momento no biofilme. Para estes autores, a caracterização da microbiota inicial seria o primeiro passo no entendimento das interações entre os membros das comunidades que modelarão o desenvolvimento dos biofilmes dentários subsequentes, sendo que a comunidade bacteriana da placa dental inicial de cada indivíduo é única em termos de sua diversidade e composição.

A despeito da grande variedade de espécies bacterianas já isoladas de canais radiculares infectados, já foram descritos seis filotipos dentre os 11 identificados na boca: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* e *Bacteroides* (Munson *et al.*, 2002; Gomes & Montagner, 2010).

As bactérias e seus produtos costumam ser considerados como os agentes etiológicos primários da necrose pulpar e das lesões periapicais (Gomes *et al.*, 2002).

As infecções endodônticas primárias são definidas como constituídas de comunidades de característica polimicrobiana, podendo-se ou não constatar a existência de sintomatologia clínica do hospedeiro, verificando-se preponderância de micro-organismos anaeróbios estritos, Gram-positivos ou Gram-negativos (Oliveira *et al.*, 2000; Siqueira Jr. *et al.*, 2004; Jacinto, 2007).

Sabe-se que os diferentes arranjos microbianos levam a associações de determinados grupos que podem atuar sinergicamente para deflagrar respostas sintomáticas e sinais clínicos específicos (Gomes *et al.*, 1994a; 1994b).

Assim, desde o clássico trabalho realizado por Sundqvist (1976), o qual pôde evidenciar a prevalência em mais de 90% de bactérias anaeróbias estritas em dentes traumatizados portadores de lesões periapicais detectadas radiograficamente, tem sido seguidamente demonstrado o importante papel desempenhado pelos micro-organismos na ocorrência de patologias pulpares e periapicais, bem como no surgimento de possíveis falhas em tratamentos endodônticos (Gomes *et al.*, 1996).

Estudos examinaram a associação de bactérias com sinais e sintomas de origem endodôntica, utilizando, principalmente, técnicas de cultura e identificação bacteriana através de métodos bioquímicos tradicionais (Sundqvist, 1976; Griffée *et al.*, 1980; Yoshida *et al.*, 1987; Haapasalo, 1989; Hashioka *et al.*, 1992; Gomes *et al.*, 1994a, 1994b, 1996, 2005), mas também a partir do surgimento dos métodos moleculares (Baumgartner *et al.*, 2003; Foschi *et al.*, 2005; Dahlén, 2009), havendo também indicativos que bactérias localizadas em infecções pulpares podem ser potencialmente causadoras de doenças sistêmicas, tais como as endocardites (Bates *et al.*, 1998), ratificando a necessidade de um efetivo controle microbiano durante todas as etapas do preparo químico-mecânico e obturação do sistema de canais.

Um dos principais agentes colonizadores dos canais radiculares são os Bacilos produtores de Pigmento Negro (BPPN), micro-organismos Gram-negativos anteriormente conhecidos como *Bacteroides melaninogenicus* e que foram posteriormente reclassificados nos gêneros *Prevotella* e *Porphyromonas*, sendo que estas espécies têm sido frequentemente detectadas em infecções primárias, lesões perirradiculares (Stubbs *et al.*, 1999; Makkar *et al.*, 1999; Siqueira Jr. *et al.*, 2001c; Rôças *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2005; Lopes & Siqueira Jr., 2010) e em

casos abscedados (Baumgartner *et al.*, 2004; Riggio *et al.*, 2007; Montagner, 2010) podendo-se inclusive estabelecer associações entre grupos microbianos específicos (Dymock *et al.*, 1996; Baumgartner *et al.*, 1999) e relacioná-los a sinais e sintomas tais como dor espontânea, dor prévia, dor à palpação, dor à percussão ou edema (Jacinto, 2002; Gomes *et al.*, 2004; Foschi *et al.*, 2005).

As espiroquetas bucais estão incluídas no gênero *Treponema*, tendo sido relacionadas a várias doenças da cavidade bucal e também a infecções endodônticas (Jung *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2001) com poucas espécies desse gênero passíveis de cultivo, sendo necessário o emprego de métodos moleculares para relacioná-las às infecções endodônticas primárias e lesões perirradiculares (Siqueira Jr. *et al.*, 2001a; Lopes & Siqueira Jr., 2010).

2.1.1 Métodos moleculares para detecção de micro-organismos

A identificação de micro-organismos pode ser realizada, basicamente, por dois métodos: de colheita, isolamento e identificação por intermédio de testes bioquímicos ou por métodos de técnicas moleculares, utilizando-se sequências de ácidos nucleicos para detecção (Vianna, 2006, Lopes & Siqueira Jr., 2010; Gomes & Montagner; 2010).

Classicamente, a identificação de micro-organismos por cultura abrange o seu isolamento, crescimento em ambiente adequado quanto à nutrição e suporte gasoso, com subsequente identificação laboratorial, empregando-se os conhecimentos da morfologia microbiana e valendo-se de testes bioquímicos (Jacinto, 2002; Vianna, 2006; Gomes & Montagner, 2010). Contudo, a dificuldade para se obter culturas positivas de determinados tipos de micro-organismos endodônticos decorre de múltiplos fatores, sem os quais fica prejudicada a

possibilidade de cultivo, tais como: necessidade da adoção de um protocolo adequado para a coleta no ambiente clínico em que se vai trabalhar; seleção apropriada de meio para isolamento primário e transporte, a fim de assegurar exemplares viáveis; determinação e controle do sistema de incubação e atmosférico; critérios de identificação das características fenotípicas das espécies analisadas; e, sobretudo capacidade de interpretação dos resultados obtidos (Lopes & Siqueira Jr., 2004).

O método PCR hoje pode ser considerado como uma técnica universal, que permite a identificação de micro-organismos a partir de amostras de DNA ou de RNA (Sabeti *et al.*, 2003; Perea, 2004; Siqueira Jr. & Rôças, 2004; Gomes & Montagner, 2010), sendo capaz de gerar de milhões a bilhões de cópias de uma molécula de DNA em uma a duas horas, multiplicando exponencialmente o DNA presente em uma amostra (Lopes & Siqueira Jr., 2004; Spolidorio & Spolidorio, 2005). O método foi desenvolvido por Kary Mullis, em 1983, resultando em ser agraciado com o Prêmio Nobel de Química em 1993 (Rôças, 2004; Gomes & Montagner, 2010).

O princípio da técnica de PCR é simples e baseia-se em ciclos de síntese de DNA, onde cada ciclo é constituído por 3 passos: 1) desnaturação das pontes de hidrogênio da dupla fita de DNA, separando-a; 2) anelamento dos primers e 3) extensão dos primers (Rezende *et al.*, 2002).

Estas etapas permitem uma amplificação exponencial de uma sequência específica de nucleotídeos correspondentes às espécies alvos e que são artificialmente desenhadas (primers), por intermédio de processos bioquímicos realizados *in vitro*, que ocorrem em termocicladores, os quais permitem períodos predeterminados de temperatura, criando uma quantidade de DNA que possa ser detectada (Montagner, 2010). Cada nucleotídeo de uma molécula de DNA é composto por uma base hidrogenada (timina, adenina, citosina

ou guanina) e um açúcar (desoxirribose) ligado a um grupamento fosfato (Lopes & Siqueira Jr., 2004).

A desnaturação das pontes de hidrogênio que mantém as duas cadeias de polinucleotídeos unidas leva à consequente obtenção de duas fitas de DNA separadas. Então, para os procedimentos de execução da técnica de identificação microbiana, são usadas sequências específicas de oligonucleotídeos para uma espécie microbiana (geralmente compostas por 18 a 17 nucleotídeos), conhecidas como primers. Desta forma, a partir do conhecimento da região 16S do rDNA, sequências de nucleotídeos são idealizadas e, em seguida, desenhadas em regiões genômicas conservadas dentro de uma espécie bacteriana. Assim, o primer obtido será específico para determinado micro-organismo. A fita de DNA retirada de uma amostra e separada por processo termo-químico é chamada template (em tradução literal: padrão; modelo). Se houver a correspondência esperada entre a fita separada de DNA e o primer adicionado, o template e o primer se unirão, na sequência de nucleotídeos correspondentes (adenina à timina e citosina à guanina), etapa denominada de hibridização (Rôças, 2004) ou mais comumente referida na literatura como anelamento dos primers (Rôças *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2005). A partir daí, uma enzima polimerase termoestável (geralmente a Taq DNA polimerase, assim chamada por ser proveniente da bactéria termófila *Thermus aquaticus*) atuará, catalisando a sequência de desoxirribonucleotídeos fosfatados, estendendo assim a nova molécula de DNA que neste momento está surgindo. As etapas acima descritas são repetidas durante vários ciclos, sendo que, a cada ciclo, dobra a quantidade de DNA sintetizada no ciclo anterior, resultando na obtenção de milhões ou bilhões de cópias de uma mesma molécula de DNA. Após a amplificação do DNA da espécie microbiana-alvo, os produtos dessa amplificação são submetidos à eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, o qual é corado pelo brometo de etídeo, disposto sobre transiluminador de ultravioleta e fotografado. A presença de uma espécie é determinada pela observação de bandas de comprimento específico

(em bp), comparativamente a um marcador de peso molecular (“ladder”), depositado no primeiro poço do gel, conferindo-se o tamanho aproximado do fragmento amplificado. O resultado é dado pelo surgimento de uma banda (que equivale a uma linha fluorescente) na mesma altura que o marcador de peso molecular conhecido (Rôças, 2004; Spolidorio & Spolidorio, 2005; Gomes & Montagner, 2010).

O método PCR empregado é capaz de detectar o mínimo de 1 a 50 células microbianas, ainda que fastidiosas, não cultiváveis, ou mesmo que a espécie estudada não esteja viável (morta) na amostra coletada (Molander *et al.*, 2002; Siqueira Jr. & Rôças, 2003d; Chan *et al.*, 2004; Rôças, 2004; Perea, 2004; Young *et al.*, 2007; Gomes & Montagner, 2010).

Na Endodontia, os métodos moleculares têm sido empregados para investigar a microbiota associada com canais radiculares infectados, ampliando o conhecimento acerca das periapicopatias. Siqueira Jr. & Rôças (2003d) e Young *et al.* (2007) enfatizam o fato de serem os métodos moleculares altamente sensíveis, específicos e precisos, possibilitando a detecção de espécies bacterianas de difícil cultivo, ou até mesmo aquelas consideradas impossíveis de serem cultivadas, bem como cepas bacterianas cultiváveis apresentando comportamento fenotípico convergente ou divergente.

A literatura demonstra uma variedade de técnicas moleculares de identificação de micro-organismos a partir do conteúdo genético microbiano: tais como PCR simples, hibridização “dot-blot”, “hibridização DNA-DNA “checkerboard”, “Nested PCR” e “Multiplex PCR”, dentre outras, (Abou-Rass & Bogen, 1998; Baumgartner *et al.*, 1999; Bogen & Slots, 1999; Makkar *et al.*, 1999; Vafaie *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2000; Siqueira Jr. *et al.*, 2001a; Siqueira Jr. *et al.*, 2001b; Siqueira Jr. & Rôças, 2004a; Siqueira & Rôças, 2004b; Gomes *et al.*, 2006a; Gomes *et al.*, 2006b) existindo também métodos que têm a possibilidade quantitativa, a exemplo do PCR em Tempo Real (*Real-Time*

Quantitative PCR), e outros com a possibilidade do estudo de comunidades bacterianas complexas, tal como a eletroforese em gel com gradiente de desnaturação e polimorfismo do comprimento do fragmento terminal de restrição (Rôças *et al.*, 2004b; Gomes & Montagner, 2010).

Sabe-se que, embora um grande número de micro-organismos já tenha sido isolado de canais radiculares, a diversidade de bactérias e fungos presentes nas infecções endodônticas tem sido subestimada, tanto nas infecções primárias, quanto no caso de fracassos dos tratamentos endodônticos instituídos, podendo-se detectar bactérias, fungos, vírus e até espécies do domínio *Archaea* em canais (Sabeti *et al.*, 2003; Siqueira Jr. *et al.*, 2003e; Siqueira Jr. & Rôças, 2003d; Siqueira Jr. & Rôças, 2005; Vianna *et al.*, 2006).

Assim, tem-se verificado que as técnicas moleculares têm contribuído para a detecção de várias espécies nas últimas décadas, aumentando a diversidade de micro-organismos considerados como sendo parte da microbiota típica dos canais e possibilitando uma diversidade de novos estudos a partir dessa tecnologia (Siqueira Jr. & Rôças, 2003a; Siqueira Jr. & Rôças, 2004a; Siqueira Jr. & Rôças, 2003e; Rôças, 2004; Vianna, 2006).

Desta forma, as técnicas moleculares para identificação de micro-organismos aparecem como sendo uma alternativa viável e segura, sendo também um método mais sensível e específico que a cultura (Siqueira Jr & Rôças, 2003b; Perea, 2004; Vianna *et al.*, 2006; Pinheiro *et al.*, 2006). Estas técnicas baseiam-se na detecção de genoma especificamente encontrado em determinadas regiões do DNA ou do RNA do micro-organismo pesquisado, e que permite atestar a sua presença, caso esta região genômica específica possa ser identificada no material analisado (Perea, 2004; Montagner, 2010).

A literatura demonstra que os métodos moleculares tornaram possível detectar micro-organismos que hoje são considerados como importantes patógenos endodônticos, tais como *Treponema denticola*, *Filifactor alocis*, *Dialister*

pneumosintes, *Tanerella forsythia*, *Treponema malthophilum*, *Treponema socranskii* e *Prevotella tanneriae*, dentre outros, os quais não havia sido possível identificar por procedimentos de cultivo (Xia *et al.*, 2000; Lopes & Siqueira Jr., 2004; Siqueira Jr. *et al.*, 2004).

Por exemplo, Baumgartner *et al.* (2003) usaram o método “Nested PCR” para identificação de *Treponema vincentii*, *T. pectinovorum*, *T. medium*, *T. amylovorum*, *T. denticola*, *T. malthophilum*, e *T. socranskii*, em canais infectados assintomáticos ou em aspirados de secreções serosas ou purulentas e encontraram associação significativa entre as espécies e *T. malthophilum* e *T. socranskii* e também entre *T. malthophilum* e *T. denticola*, enquanto Rôças *et al.* (2003), no intuito de investigar a prevalência de 4 espécies de treponema em infecções endodônticas primárias, usaram o mesmo teste para analisar amostras de 32 canais infectados, sendo que 22 casos apresentavam lesões perirradiculares crônicas e 10 casos foram diagnosticados com periodontite apical aguda. Foram detectados resultados positivos em todos os casos pesquisados, encontrando-se *T. denticola* em 78,1% dos casos, *T. socranskii* em 40,6%, *T. vincentii* em 15,6% e *T. pectinovorum* em 9,4%. Ao menos uma das quatro espécies de treponema foi descoberta em 84,4% dos casos examinados. Os autores consideraram que estes micro-organismos deveriam ser incluídos no rol dos patógenos endodônticos.

Por outro lado, Rôças & Siqueira Jr. (2005b) extraíram o DNA genômico bacteriano de amostras coletadas em canais necróticos e investigaram a presença das espécies *Treponema parvum* e *Treponema putidum* em infecções endodônticas primárias usando o método “Nested PCR 16S rRNA”. A espécie *T. parvum* foi detectada em 52% dos casos associados com periodontite apical crônica, 20% das periodontites apicais agudas e em nenhum caso de abscesso. Enquanto isso, apenas em um caso de periodontite apical aguda *T. putidum* pôde ser detectada.

Os métodos moleculares para detecção de micro-organismos podem ser empregados tanto para o caso de infecções endodônticas primárias, para as situações de insucesso no tratamento endodôntico inicial (Fouad *et al.*, 2005, Cook *et al.*, 2007; Blome *et al.*, 2008), quanto para coletas de secreções a partir de fístulas, com o objetivo de detectar bactérias-alvo, submetendo os resultados a análises estatísticas relacionadas à associação entre micro-organismos e/ou destes junto a sinais e sintomas clínicos e aspectos radiográficos (Rôças & Siqueira Jr., 2005c; Gomes *et al.*, 2006a; Sassone, 2007; Vianna *et al.*, 2007).

Também podem ser empregados métodos moleculares para investigar a frequência de espécies bacterianas, antes e após preparo químico-mecânico, como realizado por Rôças & Siqueira Jr. (2010), os quais utilizaram a combinação de dois métodos: “transcriptase PCR” e “reverse capture checkerboard”. Foram realizadas coletas de canais infectados de 15 dentes com periodontite apical antes do tratamento, após o preparo químico-mecânico utilizando o hipoclorito de sódio como solução irrigadora e após a medicação entre sessões com pasta à base de hidróxido de cálcio. A identificação bacteriana pelo método PCR foi feita inicialmente com base no DNA presente, enquanto que os níveis detectáveis de RNA do ribossoma bacteriano foram utilizados como indicadores de viabilidade das espécies, após cada fase do tratamento. Esses níveis de RNA foram encontrados em 60% dos casos após o preparo químico-mecânico e 53% após a medicação intracanal. Os autores concluíram que esta abordagem combinada de métodos moleculares revelou que a diversidade bacteriana total foi acentuadamente reduzida pelos procedimentos endodônticos realizados.

Em relação às bactérias constituintes do gênero *Dialister*, estas têm sido frequentemente detectadas em infecções endodônticas em casos sintomáticos ou assintomáticos, sobretudo a partir do advento dos métodos moleculares (Munson *et al.*, 2002; Siqueira Jr. & Rôças, 2003c; Siqueira Jr. & Rôças, 2004c, Rôças & Siqueira Jr., 2005a; Sakamoto *et al.*, 2006; Rôças *et al.*, 2006; Rôças & Siqueira Jr., 2006), incluindo-se os casos de abscessos

endodônticos agudos (Rôças & Siqueira Jr., 2002; Rôças *et al.*, 2006; Siqueira Jr. & Rôças, 2009).

Tem sido também possível detectar a espécie *Tanerella forsythia* com relativa frequência, a partir de amostras de DNA pesquisadas, tanto em casos sintomáticos quanto assintomáticos (Gatti *et al.*, 2000; Siqueira Jr. & Rôças, 2003b; Vianna *et al.*, 2005; Sassone *et al.*, 2007), encontrando-se este micro-organismo em associações estatisticamente positivas a outras espécies microbianas (Jung *et al.*, 2001).

Quanto à espécie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, sabe-se que esta é reconhecida por estar ligada ao desenvolvimento de peridodontopatias, a exemplo de algumas periodontites marginais, particularmente nos casos de periodontite juvenil, sendo raramente detectada em canais infectados (Rôças *et al.*, 2002; Blome *et al.*, 2008; Dahlén, 2009; Lopes & Siqueira Jr., 2010).

As comunidades microbianas detectadas nos canais radiculares e nos abscessos periapicais agudos tem sido descritas como heterogêneas em sua composição, estrutura e diversidade de espécies (Montagner, 2010), podendo inclusive variar entre pacientes de diversas regiões geográficas da Terra, conforme demonstraram Baumgartner *et al.*, (2004), que detectaram a presença de micro-organismos com diferenças significantes, provenientes de abscessos de origem endodôntica de pacientes da cidade de Portland, no Estado americano de Oregon e da cidade do Rio de Janeiro, no Brasil, para as espécies *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella tanneriae*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*. Contudo não houve diferenças entre os grupos considerados para *Porphyromonas endodontalis*, *Fusobacterium necrophorum* e *Enterococcus faecalis*.

2.2 Endotoxinas

Richard Pfeiffer, discípulo de Robert Koch, parece ter sido o primeiro a observar a produção de uma substância altamente pirogênica, termoestável produzida pelo *Vibrio cholera*, a qual denominou endotoxina. O termo endotoxina mais tarde se revelou como nomenclatura imprópria, uma vez que as endotoxinas são, na verdade, estruturas provenientes da superfície de determinadas bactérias, e não do seu interior (Siqueira Jr. & Rôças, 2007; Cohen & Hearn, 2007).

As endotoxinas bacterianas são classicamente definidas como sendo os lipopolissacarídeos da superfície da membrana de bactérias Gram-negativas, podendo ser liberadas a partir de bactérias vivas durante o processo de divisão celular em menor quantidade e principalmente como fragmentos de bactérias mortas (Rietschel & Brade, 1992), capazes de produzir efeitos clínicos importantes, tais como febre, alterações hematológicas incluindo a leucocitose, hiperglicemia, diminuição da resistência às infecções e perturbações circulatórias, pois quando introduzidas na circulação sanguínea estas se ligam às lipoproteínas plasmáticas reduzindo a sua atividade biológica, induzindo a coagulação e afetando a função hepática, além do sistema endócrino e nervoso (Lipscomb *et al.*, 2006).

Wexler & Oppenheim (1979) afirmaram ter sido possível identificar a presença de lipopolissacarídeos de resposta idêntica às endotoxinas na superfície da bactéria Gram-positiva *Listeria monocytogenes*. Esses autores isolaram os componentes bacterianos preparados por extração com fenol, e constataram o padrão notadamente semelhante à composição química das endotoxinas de bactérias Gram-negativas, para os diversos testes realizados, a exemplo da resposta pirogênica em coelhos, produzindo sinais típicos e resposta positiva no teste LAL por gelificação. Contudo, esses achados não foram suportados pelas análises realizadas em estudo subsequente realizado por Maitra *et al.*, (1986), os

quais não conseguiram detectar níveis mensuráveis de endotoxinas nessa bactéria, por um método LAL empregado, ou mesmo pela tentativa de detecção de ácidos graxos beta-hidróxi, um marcador químico em potencial para endotoxinas, já que estes ácidos graxos compõem o lipídio A constituinte do LPS.

Por outro lado, Hurley (1995) questiona, por diversas razões, o fato de que a liberação de endotoxinas seja dependente da lise celular, explicando que outros estudos demonstram que a liberação de endotoxinas ocorre espontaneamente e sem morte ou divisão celular. Este processo de liberação pode ser acentuado por vários fatores do meio ambiente e ação de antibióticos, não sendo limitada a antibióticos que afetem diretamente a parede celular, tais como os beta-lactâmicos, exemplificando com o clorafenicol, um inibidor da síntese de proteínas, o qual incrementa a liberação de LPS, provavelmente como uma consequência dos efeitos deste nos mecanismos que controlam a produção de LPS. Desta forma, o autor defende que um conceito mais útil para entender a liberação de endotoxina, seja a partir dos estudos que compreendam as condições em que ocorre a sua disponibilidade, processo que não é necessariamente dependente da lise celular.

Nair (2004) lembra que os efeitos das endotoxinas ocorrem devido à sua interação com as células endoteliais e pela ativação de células de defesa tais como macrófagos em produzir vários mediadores moleculares, a exemplo do TNF- α e interleucinas. Entretanto, este autor enfatiza que nem só as endotoxinas podem induzir as células de mamíferos a produzir citocinas. Algumas proteínas, certos carboidratos, e lipídios de origem bacteriana são agora considerados como uma nova classe de modulinas que também induzem a formação de citocinas e resposta patológica do hospedeiro.

Embora existam outros tipos de pirogênios exógenos de diversas constituições químicas, incluindo bactérias, fungos, vírus e até substâncias químicas não microbianas, as endotoxinas são consideradas como o mais

presente e importante pirogênio exógeno, o qual, após cair na corrente sanguínea, tem a capacidade de ativar o complemento, induzir coagulação, além de afetar o sistema neuroendócrino e a função hepática, além da característica elevação de temperatura quando injetados sob condições específicas (Fukumori, 2008).

A mensuração dos níveis de pirogênio existente em produtos farmacêuticos são um indicativo crucial no controle de qualidade desses produtos. Particularmente em todos os injetáveis, bem como os acessórios para transfusão, infusão, incluindo aí todos os tipos de agulhas e seringas implantáveis ou descartáveis empregados em terapia parenteral, deve-se oferecer segurança ao paciente, sob o aspecto de contaminantes pirogênicos, considerando-se que a periculosidade é maior quando se trata de injetável de uso exclusivo por via intravenosa, sendo pior ainda quando se trata de produto com inoculação intratecal, em que a endotoxina chega a ser mil vezes mais potente que na via intravenosa (Fukumori, 2008).

Afirma-se que o LPS é constituído genericamente de alguns elementos peculiares: o lipídio A, ao qual se atribui como sendo o principal componente tóxico da molécula, e o que menos varia dentre as diferentes espécies bacterianas; o cerne ou núcleo, que também não costuma exibir variações e ao qual igualmente se atribui papel antigênico importante e o Antígeno O, cadeia de tamanho variável nos LPS, cujo potencial antigênico tem sido também evidenciado (Luderitz *et al.*, 1981; Hurley, 1995).

A presença de inflamação e sintomatologia dolorosa das infecções de origem endodôntica tem sido demonstrada estar diretamente ligada com os componentes celulares das bactérias Gram-negativas, dentre estes as endotoxinas e outros componentes da parede celular (Farber & Seltzer, 1988; Horiba *et al.*, 1991; Jacinto *et al.*, 2005; Martinho, 2007; Martinho & Gomes, 2008; Martinho, 2011).

Khabbaz *et al.* (2001) investigaram a presença de endotoxinas nas polpas vitais de dentes humanos sintomáticos ou assintomáticos, quantificando-as e visando correlacioná-las com a dor pulpar aguda. Os autores consideraram como importante a presença de endotoxina nos tecidos periapicais de dentes com lesão cáriosa, indicando seu papel nas doenças pulpares humanas e observando quantidade maior de endotoxina nas polpas com sintomatologia dolorosa.

No que diz respeito especificamente às endotoxinas, acredita-se que a presença destas em canais necróticos contribui para o aumento de substâncias vasoativas e neurotransmissoras nas terminações nervosas das áreas de lesão, potencializando a resposta dolorosa e perpetuando lesões periapicais (Farber & Seltzer, 1988; Seltzer & Farber, 1994).

Embora os termos LPS e endotoxinas apareçam algumas vezes utilizados como sinônimos, a denominação LPS parece ser mais adequada à endotoxina depois de purificada, quando os extratos bacterianos são separados de outros contaminantes, principalmente proteínas, enquanto endotoxina refere-se mais propriamente aos complexos macromoleculares de LPS, proteínas e fosfolípidos (Siqueira Jr. & Rôças, 2007, Fukumori 2008).

As endotoxinas são consideradas como substâncias muito estáveis e por isso os processos usuais de esterilização são ineficazes para a sua destruição (Machado, 2003; Lipscomb *et al.*, 2006). Para degradá-las quimicamente, devem ser usados ácidos ou bases fortes, ou um processo de pirólise, sendo conhecidos diferentes protocolos pelo calor: 180 °C por 3 horas (Lipscomb *et al.*, 2006; Miyamoto *et al.*, 2009), 200 °C por 4 horas (Jacinto *et al.*, 2005; Martinho & Gomes, 2008; Gomes *et al.*, 2009; Martinho, 2011), ou de acordo com o manual da Cambrex/Lonza a 250°C por 30 minutos.

Outros processos que levam à inativação de endotoxinas são a radiação ionizante e tratamento com o antibiótico polimixina B (Fukumori, 2008).

Machado (2003) afirma que a contaminação por endotoxinas em produtos para injeção parenteral é um problema para a indústria farmacêutica, pela dificuldade da remoção dessas moléculas de alta toxicidade. O autor estudou as membranas porosas de quitosana para a despirogenização de soluções de soro fisiológico e de IgG e concluiu que a membrana de quitosana tem potencial para uso como matriz de adsorção visando a remoção de endotoxinas de soluções, embora na presença de proteína, no processo proposto em seu estudo, não se tenha alcançado valores que pudessem permitir uma injeção parenteral daquelas substâncias.

Silva *et al.* (2002) realizaram um estudo *in vivo* em cães onde procuraram avaliar, histopatológica e radiograficamente, os tecidos perirradiculares submetidos a endotoxinas bacterianas de *Escherichia coli*, comprovando a possibilidade de neutralização do LPS, quando o hidróxido de cálcio foi ali introduzido. Os resultados deste experimento apresentaram que, mesmo depois de 30 dias e na ausência de bactérias, as endotoxinas presentes nos canais radiculares puderam induzir lesões periapicais detectáveis radiograficamente, sendo estas acompanhadas de intenso infiltrado inflamatório na análise histológica, havendo um largo incremento da espessura do ligamento periodontal e presença de reabsorção do cimento e do osso alveolar adjacente. Este achado pôde ser considerado comparável ao encontrado por Dahlén *et al.* (1981) que relataram que a injeção de endotoxinas provenientes de *Fusobacterium nucleatum* em canais radiculares de macacos produziram resultados semelhantes 3 a 7 meses após inoculados, enquanto Ito *et al.* (1996) estudaram as endotoxinas de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* e *E. coli*, em relação ao aparecimento de células causadoras de lise óssea, empregando duas culturas de células medulares. Estes autores verificaram o aumento de células clásticas em quantidade semelhante para todas as endotoxinas analisadas.

Sabe-se que o forte efeito biológico das endotoxinas pode ocorrer mesmo em concentrações muito baixas (1 ng/kg de peso corporal) e que sua ação não acontece diretamente sobre as células e órgãos, e sim pela ativação do sistema imune do indivíduo afetado (Machado, 2003; Lipscomb *et al.*, 2006).

As altas concentrações de endotoxinas ou um aumento da sensibilidade às mesmas acarretam alterações na resposta imunológica que acabam por ser prejudiciais para o doente (Ueno *et al.*, 2001).

As principais fontes de contaminação para endotoxinas são a água e o vapor de água, presentes durante o processo de esterilização, sendo também considerados como eventuais fontes de contaminação os equipamentos e mãos dos operadores (Madsen *et al.*, 2009).

Considerando que a febre é uma das respostas mais frequentemente estudadas, as endotoxinas bacterianas são vulgarmente designadas por pirogênicos. O grau de toxicidade das endotoxinas bacterianas guarda relação com a resposta do indivíduo contaminado por atuar em suas células e resposta humoral, o que explica o aparecimento em alguns casos de febre, neutrofilia, proliferação de colágeno, liberação de aminoácidos, produção de interleucina-2 e de anticorpos (Hurley, 1995; Machado, 2003; Miyamoto *et al.*, 2009).

Miyamoto *et al.*, (2009) atentam para o fato de que existe a necessidade de despirogenização de preparações parenterais e produtos médicos que serão inoculados em pacientes e que, devido à sua forte resistência ao calor, a despirogenização de produtos torna-se mais difícil que sua esterilização. Os autores propuseram um método de despirogenização a 130°C por 60 min ou a 140°C por 30 min, na presença uma alta taxa de saturação de vapor úmido, denominado “soft hydrothermal processing“. Consideraram este método adequado para tornar livres de endotoxinas alguns dispositivos médicos que não podem ser submetidos a altas temperaturas pelo calor seco.

As endotoxinas, assim como outros fragmentos oriundos de bactérias têm sido apontadas como responsáveis por uma gama de respostas fisiopatológicas causadas por sua presença no organismo do hospedeiro, visando à sua eliminação, ao mesmo tempo em que é deflagrado um estímulo para que o reparo de lesões aos tecidos ocorra. Contudo, quando presentes em altas concentrações, ou em reações de hipersensibilidade às endotoxinas, as respostas do sistema imune do hospedeiro poderão levá-lo ao choque (Hurley, 1995; Nair, 2004; Fukumori, 2008).

Dentre as respostas deflagradas pela presença de endotoxinas, encontra-se a indução da produção de interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF), duas citocinas constituintes da resposta imune, além do que já foi demonstrado uma relação do maior consumo de uma proteína do sistema complemento (proteína C3) com o aumento da concentração de endotoxinas administradas, provenientes de *Porphyromonas endodontalis*, *Veillonella parvula* e *Fusobacterium nucleatum* (Horiba *et al.*, 1992), constatando-se que as endotoxinas deflagram respostas junto aos mecanismos de defesa humorais e celulares. Dentre os vários efeitos biológicos da IL-1 destacam-se a febre, neutrofilia, estímulo aos fibroblastos levando à proliferação de colágeno, liberação de aminoácidos dos músculos, produção de interleucina-2 com consequente ação em linfócitos T e produção de anticorpos, por ação nos linfócitos B (Ataoğlu *et al.*, 2002).

Em medicina, não se encontra um meio de detecção plasmática de endotoxinas. Busca-se então caracterizar o quadro indiretamente, por intermédio dos sinais e sintomas clínicos e da detecção de micro-organismos Gram-negativos como o mais forte indicativo da endotoxemia. Por outro lado, os pesquisadores buscam a presença de endotoxinas sobre fármacos e dispositivos médicos, atendendo às normas de biossegurança de seus países podendo-se utilizar alguns tipos de ensaio para sua detecção, sendo bastante enfatizados os métodos que o fazem a partir de um Lisado dos Amebócitos de *Limulus*, o LAL (Fukumori, 2008).

O princípio biológico do teste do LAL foi observado no *Limulus polyphemus*, vulgo caranguejo-ferradura, quando o sangue entra em contacto com as bactérias Gram-negativas, ocorrendo a coagulação dos amebócitos (Bates *et al.*, 1998).

O ensaio que se utiliza do LAL pode ser realizado por análise qualitativa ou por métodos quantitativos. A análise qualitativa é conhecida por gelificação, considerada como sendo a mais usual e mais simples, por consistir na indução da formação de um gel. Os métodos quantitativos são: a) turbidimetria, que é o desenvolvimento de uma turvação por libertação de um substrato endógeno; e b) colorimetria, que consiste no desenvolvimento de uma coloração por libertação de um complexo peptídico cromogênico sintético (Fukumori, 2008).

Gomes *et al.* (2009) conduziram um estudo clínico e compararam a eficácia da preparação químico-mecânica realizada com auxílio de hipoclorito de sódio a 2,5% ou com clorexidina gel a 2%, na eliminação de endotoxinas, em dentes portadores de necrose pulpar e periodontite perirradicular. Os autores utilizaram 54 canais, divididos aleatoriamente em dois grupos que receberam tratamento com uma das substâncias químicas. A análise das endotoxinas presentes foi realizada antes e depois da instrumentação. Os resultados demonstraram que as endotoxinas estavam presentes em 100% dos casos antes da instrumentação, tendo maiores valores percentuais de redução de forma significativa no grupo onde se empregou o hipoclorito de sódio.

2.3 Citocinas Inflamatórias

O papel das endotoxinas como desencadeador ou inibidor da liberação de substâncias químicas no organismo do hospedeiro tem sido alvo de diversos estudos, havendo ênfase nos trabalhos relacionados às citocinas, proteínas

biologicamente ativas que possuem diversas funções endócrinas e metabólicas (Safieh-Garabedian *et al.*, 2002).

Tokuda *et al.* (2001) observaram, em cultura de células pulpares, que a produção de IL-6, uma citocina que participa nos mecanismos de resposta imune e hematopoiese, é estimulada pelo LPS da *Prevotella intermedia*.

Barthel *et al.* (1997) propuseram-se a verificar se o potencial tóxico de LPS de *Escherichia coli* poderia ser reduzido ou eliminado pelo hidróxido de cálcio. Assim, variadas concentrações de LPS de *E. coli* foram empregadas isoladamente ou associadas a 25 mg de Ca(OH)₂, e a capacidade de monócitos aderentes de sangue periférico de doadores masculinos produzirem TNF- α foi mensurada por um teste ELISA. A análise estatística indicou que o Ca(OH)₂ foi capaz de eliminar a capacidade de estímulo do LPS testado na produção de TNF- α em monócitos de sangue periférico.

Fouad & Acosta (2001) estudaram a progressão das lesões periapicais e a expressão das citocinas IL-1 α , TNF- α , IL-4, IL-6 e IL-11 na modulação da formação óssea em camundongos normais, comparativamente com um grupo em que os camundongos possuíam uma alteração cromossômica conhecida, que lhes conferiu resposta diminuída ao estímulo do LPS. As polpas dos primeiros molares dos espécimes de ambos os grupos foram expostas e inoculadas com micro-organismos frequentemente encontrados na bocas de camundongos, por 2, 4, 6 ou 8 semanas. Depois da eutanásia, a avaliação histológica foi realizada. Foram realizadas análises quantitativas da área das lesões e contagens da coloração imuno-histoquímica. Não houve diferenças estatisticamente significantes na progressão das lesões periapicais entre os grupos. A coloração imuno-histoquímica revelou não haver diferenças totais entre as duas espécies nos níveis de expressão das citocinas. A expressão de citocinas IL-11 não mudou a partir dos níveis controles em camundongos normais, mas foi correlacionada com a expressão de IL-6 e IL-4 nos camundongos de resposta diminuída aos estímulos

com LPS. Os autores concluíram que a possibilidade de resposta ao estímulo com LPS pode não ser significativa na patogênese de lesões periapicais e na expressão de citocinas dentro das lesões, quando essas lesões são induzidas por microbiota bucal inespecífica.

Ueno *et al.* (2001), no intuito de conhecerem o papel das prostaglandinas e dos receptores de prostaglandinas na percepção da dor, compararam a resposta de cobaias deficientes de determinados receptores de prostaglandinas, após terem sido submetidas ou não a uma pré-exposição ao LPS. Os resultados indicaram que existem receptores de prostaglandinas específicos que são influenciados pela pré-exposição ao LPS, corroborando estudos anteriores que demonstraram haver influência positiva do LPS no mecanismo da recepção dolorosa de natureza inflamatória.

Por outro lado, Pelt *et al.* (2002) ao estudarem os efeitos das endotoxinas extraídas da espécie *Prevotella intermedia* na formação óssea e a liberação de mediadores osteolíticos em culturas de osteoblastos de cobaias *in vitro*, verificaram não só o estímulo dessas endotoxinas na produção de IL-6 em osteoblastos, mas também seu papel inibidor na síntese da fosfatase alcalina, ajudando a explicar o envolvimento das endotoxinas não só com a lise óssea, mas também com a sua formação, enquanto Ko & Lim (2002) constataram a estimulação de polimorfonucleados neutrófilos quando em contato com endotoxinas de *P. endodontalis* e de *E. coli*.

Ataoglu *et al.* (2002) buscaram determinar os níveis de IL-1 β and TNF- α em exsudatos periapicais e avaliar sua relação com achados clínicos e radiográficos. Para tal, exsudatos periapicais foram coletados de 35 canais de dentes unirradiculares, usando pontas de papel absorvente. Os níveis de IL-1 β and TNF- α foram determinados por testes de absorbância. O material coletado foi dividido em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de sinais clínicos, tais como edema, fístula, dor à palpação e/ou percussão e secreção purulenta

detectável nos canais. Também foram formados dois grupos, em relação ao tamanho da lesão periapical detectada radiograficamente. A concentração média de IL-1 β foi cerca de 12 vezes maior que a de TNF- α e não houve correlação entre essas citocinas. Os níveis de IL-1 β em canais com maiores áreas radiolúcidas (longo eixo \geq 1 cm) foram significativamente maiores que as lesões de menor tamanho. Houve uma tendência de níveis mais elevados de IL-1 β nos grupos com sintomatologia clínica, mas sem diferenças significantes ($P > 0.05$). Os autores concluíram que níveis de exsudato, para ambas as citocinas estudadas, não refletiram o estado de doença periapical.

Para Coil *et al.* (2004) a doença pulpar está intimamente associada com a resposta do sistema imune do hospedeiro aos produtos bacterianos. Os autores afirmam que as patologias clínicas são mediadas em parte pela produção de citocinas pirogênicas, especialmente a interleucina IL-1, TNF- α , e IL-6 e que o metil-mercaptano (CH₃SH) – que é um composto sulfúrico volátil produzido por bactérias Gram-negativas, tem sido apontado contribuir para a produção de IL-1 por células mononucleares humanas. Neste estudo, foi investigada a produção de IL-1, TNF- α , e IL-6 por fibroblastos pulparenses humanos, quando estimulados por vários períodos de tempo por LPS, com ou sem a presença de CH₃SH. Foi encontrado que o LPS e CH₃SH não tiveram efeito na produção de TNF- α . Entretanto, o LPS estimulou a produção de IL-6 e sua produção foi aumentada quando CH₃SH estava presente, concluindo-se que CH₃SH desempenha papel de ativação e modulação da resposta imune e produção de IL-6.

2.4 Controle de infecção e descontaminação de instrumentos endodônticos

Em meados do Século XIX, Ignaz Philipp Semmelweis, em um renomado hospital de Viena, pôde relacionar a alta prevalência de mortes por infecção puerperal ao fato de serem utilizados instrumentos que eram mal limpos e mãos de profissionais que não eram sequer lavadas (Lopes & Siqueira Jr., 2010).

Hoje é indiscutível que os instrumentos odontológicos reutilizáveis devem ter a sua esterilização precedida de uma adequada limpeza, a fim de melhorar a possibilidade de que o método empregado assegure sua apropriada descontaminação. Assim, desde meados do século passado, Oliet (1956) já enfatizava a necessidade de se reduzir o número de micro-organismos da superfície dos instrumentos endodônticos usados àquela época, os quais ainda eram fabricados em liga de aço carbono, apregoando sua limpeza mecânica antes que a esterilização fosse realizada, com vistas a assegurar uma melhora no meio de esterilização a ser empregado.

Há uma série de cuidados indispensáveis a serem tomados para o arranjo do consultório de Endodontia, seja no que diz respeito à obediência aos princípios de ergonomia, quanto no tange à preocupação com a higiene e a limpeza, envolvendo a aplicação de barreiras, esterilização, desinfecção e acondicionamento do arsenal endodôntico (Ferreira, 1995; Guandalini, 1999) tudo isso para se chegar ao objetivo prioritário, que é a promoção da saúde humana (Paiva & Antoniazzi, 1988).

Vale lembrar a superioridade dos instrumentos de aço inoxidável na sua resistência aos métodos de esterilização repetida e contínua, em relação àqueles fabricados com ligas de aço carbono, conforme alertou Younis (1977), embora

também os instrumentos de aço inoxidável venham a ter redução na sua resistência ao torque, conforme bem demonstrou o trabalho de Mitchell *et al.* (1983), após submeterem esses instrumentos a esterilização pela autoclave.

Um protocolo rígido de limpeza, desinfecção e esterilização dos instrumentos considerados reutilizáveis deve ser adotado, a fim de minimizar os riscos da chamada infecção cruzada, que expõe o paciente a contágio de doenças letais, tais como a hepatite e AIDS, cuja investigação epidemiológica pode levar à constatação de terem sido adquiridas, por exemplo, durante tratamento dentário (Villaseñor *et al.*, 1992; Pileggi-Vinha & Pécora, 1994; Chiesa, 2003).

É ainda maior o risco de transmissão de doenças, quando se emprega os materiais pérfuro-cortantes, a exemplo de agulhas, brocas e limas, as quais poderão atravessar a pele ou mucosa, transmitindo micro-organismos patogênicos (Kuritani *et al.*, 1993) e toda pessoa atendida deve ser considerada como potencialmente infectada, por isso o protocolo de limpeza não admite exceções (Reams *et al.*, 1995).

Os métodos de esterilização atualmente empregados em consultórios odontológicos incluem a imersão em substâncias químicas, emprego do calor seco (estufa), do calor úmido por vapor d'água (autoclave) ou ainda por autoclave de calor químico sob pressão (Stach *et al.*, 1995).

Em relação ao tipo de esterilização ao qual devam ser submetidos os instrumentos odontológicos, Curson (1966) ressaltava e considerava recomendável e de bastante praticidade o uso do calor seco ou úmido para esse fim, sendo que Palenick & Golden (1994) não encontraram diferenças no uso desses métodos em instrumentos previamente contaminados com sangue. Johnson *et al.* (1997) também não encontraram influência da deposição de sujidades na esterilização de limas endodônticas, após estas terem sido empregadas na instrumentação de dentes bovinos contaminados com o *Bacillus stearothermophilus*. Contudo, estes resultados são conflitantes com o encontrado

por Morrison & Conrod (2009). Neste trabalho, todas as limas e brocas estudadas tinham sido previamente limpas, empacotadas e esterilizadas em diversos consultórios odontológicos, tendo então sido removidas de seus invólucros e incubadas a 37°C por 72 h. Os autores verificaram esterilização em 100% das amostras de limas e brocas novas, mas o mesmo não ocorreu com os instrumentos usados, onde os índices de contaminação foram de 15% para as brocas e 58% para as limas já utilizadas em pacientes.

Neal *et al.* (1983) avaliaram o efeito da esterilização e de irrigantes na capacidade de corte de limas endodônticas de aço inoxidável. O calor seco e o uso de esterilização pelo sal não trouxeram efeito, enquanto a esterilização pela autoclave causou redução na eficiência de corte. Quanto aos irrigantes, o hipoclorito de sódio, e o EDTA associado ao peróxido de ureia causaram diminuição na capacidade de corte, enquanto não houve efeito mensurável das limas submetidas à solução salina.

O método de esterilização pela autoclave, sempre que aplicável, parece ser o preferido pelos cirurgiões-dentistas (Boyd *et al.*, 1994; Letters *et al.*, 2005), embora o calor a seco tenha sido muito utilizado em consultórios odontológicos até o final do século passado, quando Medeiros *et al.* (1990) discutiram sobre o emprego da autoclave e da estufa, chamando a atenção para a perda de corte dos instrumentos esterilizados pelo calor.

Segundo documento elaborado para Serviços Odontológicos, distribuído pela Agência Nacional de vigilância Sanitária (Brasil, 2006), a esterilização que deve ser empregada como rotina em consultórios deve ser a realizada pela autoclave, ficando as estufas (calor seco) indicadas somente para alguns tipos de brocas e alicates ortodônticos. Estas indicações se justificam pelo fato de o processo de esterilização pelo calor seco exigir longo período de tempo e altas temperaturas, podendo ocorrer falhas no processo de esterilização, além do fato de que as estufas utilizadas atualmente nos serviços odontológicos não são

automatizados, impedindo registros confiáveis dos parâmetros físicos do processo, aceitando a interrupção do ciclo de esterilização antes do seu término.

Fahid & Taintor (1984) afirmaram que o emprego de uma gaze umedecida em álcool isopropílico melhorava a possibilidade de desinfecção de limas tipo K proporcionada pelo aparelho conhecido no Brasil como esterilizador de bolinhas, quando comparado com o uso de uma gaze seca. As limas testadas haviam sido previamente inoculadas com uma cultura mista de bactérias e a desinfecção com álcool influenciou positivamente a redução de micro-organismos na sua superfície.

Zettlemoyer *et al.* (1989) realizaram a comparação entre brocas Gates-Glidden de aço de carbono com as de aço inoxidável, antes e depois de esterilização em autoclave, esterilizador com sal aquecido, calor seco, ou em contato com 2% de glutaraldeído alcalino. A eficiência no corte e a prevalência de fratura naquelas condições foram avaliadas. As brocas Gates-Glidden de aço inoxidável resistiram à separação e mantiveram sua eficiência de corte estatisticamente melhor que as brocas Gates-Glidden de aço de carbono de mesmo calibre, depois da esterilização pelos métodos que se utilizam do calor. O glutaraldeído não fez efeito em qualquer um dos tipos de broca.

Desde a década de 80, os aparelhos ultrassônicos de limpeza foram bastante difundidos para emprego antes de a esterilização ser utilizada (Burkhart & Crawford, 1997). Eames *et al.* (1982) narram o aparecimento de uma grande quantidade de produtos comerciais, desde o seu surgimento, enquanto Spolyar *et al.* (1986) buscaram defender as vantagens e benefícios desses aparelhos, o quais, de fato podem ser considerados como importante equipamento para limpar instrumentos com eficiência e segurança, preparando-os adequadamente para sua posterior esterilização (Burkhart & Crawford, 1997).

Os aparelhos ultrassônicos de limpeza aproveitam-se do efeito cavitação, que é a formação de bolhas no meio líquido onde a onda ultrassônica

se propaga, o que permite a limpeza dos instrumentos mais efetivamente que pelo simples método da escovação (Guandalini *et al.*, 1999). Estes aparelhos são compostos basicamente por um gerador de ondas ultrassônicas, um tanque de aço inoxidável e um transdutor, que transforma a energia elétrica em ondas ultrassônicas. (Walmsley & Williams, 1991; Bentley, 1994).

Gureckis *et al.* (1991) analisaram o resultado da repetição do processo de esterilização na eficiência de corte de brocas diamantadas. Os métodos empregados foram: o uso de um agente químico, a esporicidina; a autoclavagem; estufa e vapor químico. Todas as brocas foram submetidas a banhos ultrassônicos antes dos ciclos de esterilização. Foram observadas perdas de partículas de diamantes das superfícies estudadas, as quais, porém não influenciaram na efetividade de seu poder de corte.

Bettner *et al.* (1998) demonstraram que o aquecimento a 60° C da solução colocada no aparelho ultrassônico de limpeza pode resultar em atividade antimicrobiana, enquanto Cafruny *et al.* (1995) verificaram a melhora com o uso de limpeza ultrassônica de instrumentos odontológicos e peças de mão contaminados por sangue ou por um vírus de cobaias, bem como na diminuição dos níveis de contaminação viral, embora não tenha sido capaz de eliminar completamente o sangue ou vírus depositados.

Este achado tem relação com o encontrado por Murgel *et al.* (1990) e Popovic *et al.* (2010), que demonstraram que nenhum dos métodos mais frequentemente indicados para a limpeza de instrumentos consegue livrar completamente as limas endodônticas de resíduos. Murgel *et al.* (1990) evidenciaram que o banho ultrassônico e o método da gaze com álcool foram similares no grau de limpeza obtido, sendo significativamente melhores que o método que empregou esponja com álcool, o qual apresentou os piores resultados, enquanto que Popovic *et al.* (2010) encontraram o valor médio de contaminação biológica de 34% no grupo em que os instrumentos foram

escovados manualmente e imersos em álcool, 25% no grupo em que desinfetantes comercialmente disponíveis foram utilizados e 5% no grupo em que os instrumentos foram limpos em cubas ultrassônicas.

Zmener & Spielberg (1995) utilizaram a microscopia eletrônica de varredura para analisarem limas endodônticas novas ou usadas e também puderam ver que nenhum dos instrumentos depois de utilizados fica livre de sujidades, mesmo tendo sido submetidos a um protocolo de limpeza com banho ultrassônico.

Perakaki *et al.* (2007), constataram que a limpeza ultrassônica foi superior à lavadora de desinfecção na remoção de sujidade sobre instrumentos endodônticos, embora a análise microscópica tenha demonstrado que nenhum desses métodos foi capaz de proporcionar instrumentos completamente limpos.

Assim também concluíram Sanchez & Macdonald (1995), que atestaram que o mais efetivo método de limpeza testado em instrumentais odontológicos incluiu o pré-ensaboamento seguido por limpeza em ultrassom, sem que nenhum procedimento pudesse erradicar totalmente a presença de sangue.

Carmo (1996) realizou um estudo onde empregou a microscopia eletrônica de varredura para avaliar a limpeza de limas endodônticas manuais de aço inoxidável e NiTi, após banho ultrassônico ou escovação manual. O autor constatou que o grupo em que associou esses dois métodos foi mais efetivo na remoção dos debris das limas, mas nenhum dos métodos as livrou completamente de sujidade.

A sua vez, Chiesa (2003) empregou a associação do banho ultrassônico à escovação manual e analisou, sob microscopia eletrônica de varredura, a sujidade da superfície de limas de NiTi movidas a motor da marca Profile®, após haverem trabalhado *in vitro* por 3 ou por 9 minutos em molares extraídos. O autor verificou que somente os instrumentos nunca utilizados

apresentaram-se completamente livres de sujeira, não sendo possível limpar completamente os instrumentos uma vez utilizados, e não observou diferença significativa na quantidade total de sujeira encontrada entre os grupos, exceto a seção observada mais distante da ponta do instrumento, onde o grupo de 9 minutos apresentou-se significativamente mais sujo.

Por outro lado, o estudo dirigido por Parashos *et al.* (2004) conseguiram obter 100% de limas rotatórias limpas, depois que foi utilizado um protocolo onde os instrumentos foram submetidos a 10 movimentos vigorosos de escovação com esponja umedecida com solução de clorexidina a 0,2%, pré-ensaboamento em solução de limpeza enzimática por 30 minutos, 15 minutos de banho ultrassônico na mesma solução e lavagem por 20 segundos em água corrente. Os autores concluíram que tais resultados não podem suportar a recomendação de que as limas endodônticas devam ser utilizadas como instrumentos descartáveis, baseado na inabilidade de se limpar limas entre usos.

Neste mesmo ano, foi apresentado um estudo sobre a transmissão da tuberculose multirresistente, alertando para sua relação com a pandemia HIV/AIDS e a possibilidade de contaminação em serviços de saúde. Os autores consideram que a contaminação em serviços de atendimentos a pacientes possa ser evitada com a melhora das condições de internamento e isolamento de casos suspeitos, reduzindo a formação e propagação de partículas infectantes (Constant *et al.*, 2004).

Existem sujidades provenientes do processo de fabricação que podem ser encontrados aderidos à parte ativa dos instrumentos, como, por exemplo, partículas do seu cabo plástico ou fragmentos metálicos resultantes da sua torção ou usinagem, levando à necessidade de que os instrumentos endodônticos sejam limpos mesmo antes de seu primeiro uso (Lester & Mitchell, 1990).

Van Eldik *et al.* (2004a) avaliaram a eficácia de dois procedimentos para reduzir a quantidade de bactérias sobre a superfície de limas endodônticas,

verificando o efeito da presença de resíduos biológicos na esterilização subsequente das limas. Foram examinadas limas manuais de aço tipo H e limas rotatórias de níquel-titânio dos sistemas Profile® e GT®, logo após sua remoção da embalagem ou depois da instrumentação em canais radiculares experimentalmente contaminados com bactérias previamente conhecidas. Nenhuma bactéria foi detectada das limas retiradas diretamente de suas embalagens. O calor úmido foi capaz de eliminar todas as bactérias presentes nos grupos onde bactérias foram inoculadas, independente de ter sido utilizado previamente o banho ultrassônico ou um aparelho de desinfecção térmica.

Van Eldik *et al.* (2004b) relatam que tem sido proposto mais recentemente que os instrumentos endodônticos sejam empregados como materiais descartáveis, devido à sua grande dificuldade de limpeza para uma nova utilização. Estes autores propuseram-se a quantificar as sujidades existentes sobre a superfície de limas manuais tipo H e limas rotatórias de NiTi do Sistema Profile®, observadas sob microscopia eletrônica de varredura, logo após sua retirada da embalagem, depois de serem empregadas em canais de dentes extraídos *in vivo* ou quando submetidas posteriormente à sua utilização a dois diferentes aparelhos de limpeza. Os autores concluíram que a limpeza ultrassônica teve alto índice de efetividade na remoção de sujidades (99,33%), a despeito do tipo de instrumento avaliado, quando uma solução de limpeza foi adicionada.

Hurt & Rossman (1996), avaliaram métodos diferentes de esterilização de limas endodônticas manuais de aço inoxidável, após inoculação de *Bacillus stearothermophilus* na superfície das mesmas. Os métodos de esterilização testados foram a imersão em glutaraldeído por 12 horas, autoclavagem ou a imersão em esterilizador pelo sal a 218°C. Somente a autoclave resultou em instrumentos estéreis.

Rabello *et al.* (2001) tiveram como objetivo verificar os riscos de contaminação, a partir da presença de bactérias em instrumentais e superfícies do ambiente clínico odontológico em consultórios particulares no município do Rio de Janeiro. O material foi coletado pela Vigilância Sanitária de 49 consultórios odontológicos particulares, em diferentes bairros. A avaliação bioquímica e morfológica constatou a contaminação microbiana de instrumentais e superfícies que haviam sido supostamente considerados apropriados para uso em pacientes. Foi concluído que há fragilidade nas medidas de proteção e falhas na cadeia asséptica nos serviços pesquisados, constituindo-se em risco potencial à saúde dos pacientes e profissionais.

Letters *et al.* (2005) distribuíram questionários a 25 cirurgiões-dentistas clínicos em Glasgow, na Escócia, colhendo informações a respeito de procedimentos de limpeza e reutilização de limas endodônticas, bem como coletaram 10 limas que haviam sido utilizadas, limpas e esterilizadas por aqueles profissionais. Os instrumentos foram examinados sob microscopia óptica, buscando-se identificar sujidades, além de serem submetidos a um teste específico para detecção de sangue nas limas. Dezenove dos 25 entrevistados afirmaram usar limas de aço inoxidável e nenhum deles costumava usar limas endodônticas como material descartável. Noventa e dois por cento responderam que descartavam suas limas somente quando estavam curvadas ou danificadas. O método de descontaminação mais frequentemente referido foi a limpeza manual seguida de autoclavagem. O segundo método mais empregado foi a limpeza manual acompanhada de limpeza ultrassônica e posterior autoclavagem. Das 250 limas analisadas, 75% apresentaram algum grau de contaminação visível e 7% tiveram resultado positivo para teste de sangue. As limas contaminadas com sangue estavam significativamente mais sujas quando examinadas visualmente.

Aasim *et al.* (2006) verificaram o efeito da pré-embebição de limas em uma solução enzimática, bem como a variação do tempo de lavagem em aparelho ultrassônico na limpeza de limas endodônticas. Os resultados demonstraram não

haver melhora da limpeza ultrassônica quando feita a pré-imersão das limas na solução enzimática e o tempo considerado ótimo de limpeza ultrassônica ficou entre 5 e 10 minutos.

Nos anos 90, a emergência na Inglaterra da variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (vDCJ), manifestação humana da encefalopatia espongiforme bovina e popularmente conhecida como doença da vaca louca, aumentou as preocupações dos riscos relacionados com inadequada limpeza e esterilização de instrumentos odontológicos antes de sua reutilização em pacientes, uma vez que essa doença se propaga por proteínas transmissíveis protease e termorresistentes (Walker *et al.*, 2007).

Embora autores como Walmsley & Williams (1991) afirmassem que as limas endodônticas deveriam ser submetidas ao método de banho ultrassônico antes do procedimento de reesterilização, considerando-as como acessórios reutilizáveis em procedimentos clínicos, mais recentemente tem-se defendido que estes instrumentos sejam considerados como materiais descartáveis, muito embora a transmissão da vDCJ por via odontológica seja considerada de baixo risco (Morrison & Conrod, 2009).

Lipscomb *et al.* (2006) alertam para o fato de que uma limpeza deficiente de instrumentos cirúrgicos pode resultar em um perigoso vetor de transmissão de infecção hospitalar. Os autores procuraram verificar se métodos de descontaminação adicionais necessitavam ser inseridos nos serviços hospitalares do Reino Unido, a fim de reduzir o risco de doenças nosocomiais, dentre elas as endotoxemias. Para isto, jogos de instrumentos cirúrgicos foram obtidos de nove hospitais não identificados do serviço britânico, e a pesquisa envolveu análises de microscopia óptica e técnica de fluorescência com marcadores específicos para detectar níveis de contaminação microbiana e protéica, enquanto que a detecção de endotoxinas foi monitorada com auxílio de um agente à base de Polimixina B. Os resultados demonstraram que nenhum dos

260 instrumentos examinados apresentou sinais de colonização bacteriana ou contaminação com endotoxinas. Entretanto, mais que 60% dos instrumentos apresentaram um alto grau de sujeidade de teor protéico.

Bourvis *et al.* (2007) relataram um risco em potencial de transmissão da doença de Creutzfeldt-Jakob ser transmitida por intermédio da reutilização de instrumentos endodônticos inadequadamente descontaminados de príons. Os autores consideraram plausível essa possibilidade, recomendando um grande rigor na descontaminação dos instrumentos endodônticos em relação aos príons ou seu emprego como material descartável.

Assaf *et al.* (2008) testaram a eficácia de um aparelho, destinado à lavagem e desinfecção, na limpeza de limas endodônticas. Os autores selecionaram 192 limas novas de aço inoxidável que foram então usadas na instrumentação de canais de dentes extraídos. Um jogo de limas de 1ª série (tamanho 15 a 40) foi usado em cada canal. As limas foram então divididas em três grupos: o primeiro grupo, com 30 limas, foi considerado como controle, e não foram submetidas ao aparelho de lavagem e desinfecção. O segundo e terceiro grupos (n=81) foram submetidos ao processamento no aparelho, variando-se a forma de seu acondicionamento. A análise sob microscopia eletrônica de varredura demonstrou que o aparelho de lavagem e desinfecção conseguiu limas endodônticas com melhor limpeza que as do grupo controle, embora nenhum dos 162 instrumentos testados tenha ficado livre de sujidades. Além disso, as limas acondicionadas em cestas tiveram melhor limpeza que as do grupo acondicionado em um dispositivo feito para sustentar as limas.

A documentação proveniente do Centro para Controle e Prevenção de doenças dos Estados Unidos da América (CDC) atesta que concentrações de endotoxinas bacterianas menores que 1 UE/mL já foram detectadas em mangueiras de equipos odontológicos e que não existem padrões que definam os níveis aceitáveis de endotoxinas em água potável nos Estados Unidos. Contudo o

máximo nível permitido pela Farmacopeia daquele país (USP) em água estéril para irrigação é de somente 0,25 UE/mL. Segundo aquele documento, ainda não foram realizados estudos em locais onde se presta assistência à saúde bucal, para investigar as consequências de exposições agudas ou crônicas aos aerossóis contaminados com endotoxinas. Contudo em outros ambientes, tais como indústrias e locais com piscinas cobertas, as endotoxinas têm sido associadas com quadros de exacerbação de asma e início de quadros pulmonares por hipersensibilidade (Centers for Disease Control and Prevention, 2003).

Windeler & Walter (1975) discutiram a segurança do emprego dos esterilizadores de bolinhas de vidro como método eficaz de esterilização, afirmando que seu uso estava gerando controvérsias na literatura àquela época, em relação à sua efetividade. Os autores contaminaram limas endodônticas com esporos de *Bacillus subtilis* e puderam verificar que não houve crescimento em meio de cultura, após as limas terem sido imersas no esterilizador de bolinhas por 60 segundos a 218° C.

Dayoub & Devine (1976) declararam que um método frequente de descontaminação empregava o sal aquecido a 218 ° C para transferir calor aos instrumentos endodônticos e até mesmo inviabilizar formas bacterianas esporuladas menos resistentes. Os autores afirmaram que se fazia necessária a imersão de instrumentos em sal aquecido por 20 segundos, de modo a assegurar a morte de esporos do *Bacillus subtilis niger* usados neste estudo experimental.

Adrian & Gross (1979) demonstraram a esterilidade de lâminas de bisturi que haviam sido previamente contaminadas com esporos bacterianos e depois foram submetidas à esterilização pelo laser de dióxido de carbono, atestando a validade deste método.

Hooks *et al.* (1980) testaram a esterilização do laser CO₂ em alargadores contaminados com esporos microbianos, e checando-os depois de

exposição ao feixe de laser em relação à sua viabilidade sob cultura. Os autores referiram 100% de esterilização dos instrumentos testados.

Engelhardt *et al.* (1984) utilizaram 4 esterilizadores de bolinhas de vidro coletadas de diferentes consultórios odontológicos. Para a realização dos testes, os esterilizadores receberam bolinhas de vidro e depois sal comum como meio de transmissão de calor aos instrumentos. A fim de realizar os testes microbiológicos, alargadores de 25 mm previamente contaminados foram empregados. Os resultados apontaram que o emprego de sal levou a melhores resultados que o uso de bolinhas de vidro.

Iverson *et al.* (1985) testaram o efeito de diferentes métodos de esterilização (calor seco, autoclave, esterilizador de bolinhas e esterilização com solução germicida) na resistência à fratura de limas endodônticas, medindo-se o grau de rotação e o torque necessários para a fratura. Após dez ciclos de esterilização, verificou-se não ter ocorrido efeito na resistência ao torque dos instrumentos Burns Unifile, não havendo também influência no grau de rotação para as limas Burns Unifile e K-Flex. Entretanto, o calor seco e esterilização a frio aumentaram ligeiramente a resistência ao torque da limas K-Flex quando comparadas com as limas não esterilizadas do grupo controle e com outros métodos de esterilização.

Palenik *et al.* (1986) verificaram falhas de esterilização em 106 consultórios de Endodontia, para os quais foram enviados monitores biológicos - contendo *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis (globigii)* - instruções para seu uso, bem como um questionário a ser respondido. Os resultados do teste indicaram 15,1% de insucesso de esterilização. Somente 68,2% dos consultórios cujo resultado inicial foi positivo e que receberam novos monitores, responderam devolvendo o resultado do segundo monitor biológico enviado. No entanto, todos que responderam obtiveram resposta negativa após realizarem seu segundo teste. As estufas de calor seco demonstraram significativamente mais

falhas que os demais métodos de esterilização testados (autoclave de vapor d'água, esterilizador de vapor químico e óxido de etileno).

Rueggeberg & Powers (1988) verificaram a ocorrência de fratura em extirpa-nervos, após serem submetidos ao calor do esterilizador de bolinhas de vidro, concluindo que o calor nas condições daquele estudo (duas exposições de 15 segundos a 238° C) afetou a suscetibilidade desses instrumentos à fratura por torção e flexão.

Morrison *et al.* (1989) avaliaram os efeitos da autoclavagem e uso em limas endodônticas número 25. As limas foram usadas em um, cinco e dez molares. Os grupos controle determinaram o efeito da esterilização isoladamente sobre o poder de corte de limas sem utilização. Foi possível determinar que houve diferenças estatisticamente significantes entre limas empregadas em um único molar e aquelas usadas em cinco ou dez molares. A diferença na capacidade de corte entre o segundo e o terceiro grupo experimental não foi significativa, indicando que a maior parte de decréscimo do poder de corte ocorreu entre um e cinco molares. Não houve diferença significativa entre os grupos controle, indicando que não houve decréscimo na eficiência de corte, quando analisada isoladamente e a avaliação sob microscopia eletrônica de varredura foi coerente com o que foi apontado pelas análises estatísticas realizadas.

Luper *et al.* (1991) analisaram os efeitos de diferentes métodos de esterilização (autoclave, calor seco ou esterilizador de bolinhas de vidro) na fadiga de espaçadores digitais, constatando que somente os espaçadores de tamanho "A" autoclavados 8 vezes tiveram diminuição significativa no número de ciclos necessários à fratura, quando comparado a um grupo controle.

O laser CO₂ pode também ser empregado sobre estrutura dentária sadia ou cariada, com o mesmo propósito de obter a esterilização na região da aplicação, além de possibilitar a vaporização de tecido cariado, selamento de cicatrículas e fissuras e a estimulação da dentinogênese (Fortes & Villela, 2000).

Hilt *et al.* (2000) testaram a hipótese de que múltiplas esterilizações de limas endodônticas de aço inoxidável ou níquel-titânio levariam a um contínuo decréscimo da resistência à fratura daquelas limas. Os instrumentos foram submetidos a ciclos de esterilização em autoclaves rápidas Statim ou em sob esterilização em vapor químico. Não houve resultados que indicassem que o número de esterilizações ou o tipo de autoclavagem afetasse as propriedades torsionais das limas testadas.

Schäfer (2002) analisou o efeito de repetidas esterilizações por autoclave na eficiência de corte de limas endodônticas de NiTi, constatando uma significativa perda de corte em relação a instrumentos não esterilizados. O autor afirma que existe uma linha de pesquisadores que defende o emprego de limas endodônticas de aço inoxidável ou de NiTi como instrumentos descartáveis, em função de seu desgaste acentuado após sua utilização em paredes dentinárias, tornando-se impossível assegurar sua eficiência de corte após o primeiro uso.

Venkatasubramanian *et al.* (2010) submeteram limas endodônticas à contaminação experimental com *Bacillus stearothermophilus* e então checaram sua esterilidade após o emprego da autoclave, esterilização com laser de dióxido de carbono, esterilização química com glutaraldeído, ou empregando o esterilizador de bolinhas. Somente os métodos da autoclave e laser de dióxido de carbono proporcionaram limas estéreis. Os grupos submetidos ao esterilizador de bolinhas e glutaraldeído permaneceram contaminados em 90 e 80% das limas, respectivamente.

O Apêndice I apresenta o resumo dos estudos consultados que utilizaram métodos de esterilização, indicando as principais características de cada método, quando detalhadas pelos autores.

O monitoramento do método de esterilização pode ser realizado por um indicador, químico, físico, ou biológico (Estrela, 2004), conforme apresentado no Apêndice II.

Na literatura consultada, não foram encontrados estudos que mensurassem níveis de endotoxinas sobre limas endodônticas esterilizadas após sua contaminação *in vivo*. Também não foram encontrados trabalhos onde os conteúdos endodônticos colhidos de limas contaminadas e depois esterilizadas fossem utilizados na estimulação de macrófagos. Estes aspectos nortearam o delineamento da presente tese.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Avaliar o efeito da esterilização por estufa ou autoclave, na detecção de DNA bacteriano (método molecular PCR16S rDNA) e endotoxinas (método LAL turbidimétrico) de amostras provenientes da superfície das hastes metálicas de limas endododônticas contaminadas *in vivo*;

2. Detectar micro-organismos Gram-negativos pelo método molecular PCR (16S rDNA) colhidos da superfície das hastes metálicas de limas endodônticas contaminadas utilizadas em canais radiculares com infecções endodônticas primárias e lesão periapical, verificando a possibilidade de correlação entre as espécies encontradas;

3. Investigar a produção de IL-1 β por macrófagos murinos cultivados *in vitro*, frente ao material colhido da superfície das hastes metálicas de limas endodônticas contaminadas *in vivo* e submetidas à esterilização por estufa ou autoclave.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Seleção dos indivíduos

Foram selecionados 20 pacientes voluntários que compareceram à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo-Brasil, maiores de 18 anos, de ambos os gêneros, independentemente do seu tamanho, etnia, classe ou grupos sociais.

Os pacientes assinaram um termo de consentimento aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP (Anexo I).

Todos os pacientes selecionados possuíam dentes indicados para realização do tratamento endodôntico devido à necrose pulpar, onde foi detectada a presença de lesão periapical. Clinicamente, em todos os casos a cavidade pulpar não estava exposta ao meio bucal, podendo haver dentre os elementos selecionados a existência de dentes cariados ou portadores de restaurações definitivas ou provisórias, com ou sem a presença concomitante de cáries, sendo que em um único caso a coroa estava hígida. Em todos os casos os pacientes selecionados não referiram dor espontânea, sendo porém admitidos pacientes com resposta positiva às manobras de percussão vertical e/ou palpação apical. Em casos de dentes multirradiculares, as amostras foram coletadas do canal mais amplo associado à lesão periapical, ou aquele canal cuja raiz apresentasse a maior lesão ou a maior exsudação, assegurando o exame microbiológico em um único ambiente ecológico, conforme já descrito por Jacinto *et al.* (2005).

A fim de não interferir com a microbiota dos canais, os pacientes deste estudo não haviam sido submetidos a antibioticoterapia nos últimos 3 meses e sua sondagem periodontal foi menor que 3 mm.

Para a avaliação do estado perirradicular e pulpar do dente foram realizados os testes de percussão, palpação e teste pelo frio.

4.2 Procedimentos clínicos empregados prévios à coleta

Os procedimentos clínicos utilizados antes da coleta já foram descritos em outros estudos (Jacinto, 2002; Vianna, 2006; Jacinto; 2007; Martinho, 2007).

Antes da intervenção endodôntica, o paciente realizou bochecho com solução de clorexidina a 0,12% durante 1 minuto, sendo realizada anestesia local do elemento dentário do dente a ser manipulado, o qual recebeu polimento coronário com pedra-pomes e taça de borracha, sendo em seguida submetido a isolamento absoluto, complementado com vedamento da interface coroa/lençol com cianocrilato (Super Bonder; Loctite, São Paulo, Brasil), a fim de prevenir a infiltração de saliva.

O método usado para antissepsia do campo operatório foi procedido conforme protocolo da Área de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba em procedimentos de coleta microbiana de canais radiculares (Martinho & Gomes, 2008; Gomes *et al.*, 2009; Martinho, 2011). A antissepsia do campo operatório foi realizada com swabs estéreis umedecidos inicialmente com H₂O₂ a 30 % (v/v), e depois com NaOCl a 2,5%, cada qual sendo utilizado durante 30 s, sendo subsequentemente neutralizado com solução estéril de tiosulfato de sódio a 5 % (Möller, 1966). A esterilidade do campo operatório foi checada por coletas com swabs estéreis, esfregando-os sobre coroa dental antes

e após a cirurgia de acesso e submetidas a cultura em agar-sangue aeróbica e anaerobicamente.

As cirurgias de acesso foram realizadas por etapas operatórias. Inicialmente, a água proveniente do equipo foi cessada, sendo a irrigação realizada manualmente com solução salina estéril e apirogênica. As brocas de alta rotação utilizadas no experimento estavam estéreis e apirogênicas (esterilizadas através de calor seco, em estufa por um período de tempo de 4 horas a 200°C), sendo empregadas na fase de remoção de restaurações e tecido cariado e substituídas por novas brocas igualmente estéreis e livres de endotoxinas na fase de confecção da cavidade de acesso. Após o acesso à cavidade pulpar, nova desinfecção da região coronária foi realizada, sendo a região coronária checada uma vez mais quanto à sua esterilidade em condições de aerobiose e anaerobiose, como citado anteriormente.

4.3 Coleta de material com emprego de limas endodônticas

Foram utilizadas 80 limas endodônticas de aço inoxidável de nº 15 (Flexicut CC+, VDW GmbH, Munique, Alemanha), para serem divididas em quatro grupos (n=20). Inicialmente, cada lima foi introduzida em um frasco de vidro, sendo este selado em sua boca com papel alumínio. Este conjunto foi previamente tornado estéril e apirogênico pelo emprego do calor seco, utilizando-se estufa para esterilização e secagem (Olidex CZ, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), submetendo-o a 200° C por 4 h. Então, 20 limas foram separadas para constituir o Grupo Controle negativo, tendo seus cabos removidos, seccionando-se com um alicate apirogênico as hastes metálicas na altura do intermediário junto ao cabo e dispensando-as nos frascos apirogênicos acima descritos e novamente selando-os com o papel alumínio apirogênico.

A seguir, três limas apirogênicas foram sucessivamente introduzidas com movimento de exploração ou cateterismo em cada canal necrótico e portador de lesão periapical *in vivo*, até chegar ao seu limite apical, o que foi determinado radiograficamente (comprimento radiográfico menos 1 mm). Foram realizados movimentos delicados de rotação alternada, até que se observou clinicamente que a parte ativa da lima estava coberta por debris provenientes do canal. Após o emprego das limas, estas também tiveram seus cabos removidos e as hastes metálicas remanescentes acondicionadas em frascos apirogênicos, de modo idêntico ao acima descrito. As hastes das limas assim contaminadas foram divididas em três grupos (n=20):

- Grupo II (controle positivo): sem nenhuma esterilização posterior ao seu emprego nos canais.
- Grupo III: submetidas à esterilização pelo calor seco, utilizando-se a mesma estufa anteriormente empregada, porém agora com o emprego de calor a 170° C por 1 h.
- Grupo IV: esterilização das hastes das limas contaminadas por meio de autoclave (Cristófoli H 3000, Cristófoli, Campo Mourão, Paraná, Brasil). Inicialmente, a quantidade de 300 mL de água destilada foi depositada no piso da câmara da autoclave. Em seguida, os frascos com as limas foram destapados e colocados no interior da autoclave, sendo esta fechada e o ciclo de esterilização realizado (entre 126 a 130 °C e 1,5 a 1,9 kgf/cm² por 16 min, segundo informa o fabricante), respeitando-se as instruções do manual e a sinalização eletrônica emitida pela autoclave. Após o bipe de fim do ciclo de esterilização, a porta da autoclave foi mantida entreaberta, realizando-se secagem do material por 30 min. Depois de autoclavados, os frascos tiveram suas tampas novamente seladas com papel alumínio apirogênico.

Após seu resfriamento à temperatura ambiente, todos os frascos contendo as limas foram submetidos a congelamento a menos 80°C, até o momento de serem realizadas as fases subsequentes.

Para a realização dos testes, os frascos foram descongelados à temperatura ambiente e colocados em banho-maria a 37°C por 15 minutos. A seguir, 1 mL de água de LAL proveniente do kit de quantificação de endotoxinas foi adicionado a cada frasco contendo as hastes metálicas dos instrumentos. Em seguida, os frascos foram submetidos ao agitador de tubos vortex por 60 segundos.

Aliquotas do conteúdo dos frascos foram utilizadas para realização das análises: 400 µL para quantificar endotoxinas e 300 µL para realização do método PCR 16S (rDNA). Para os grupos submetidos à esterilização pela autoclave ou estufa, uma terceira alíquota de 120 µL foi destinada a estimular macrófagos em meio de cultura, a fim de se mensurar a quantidade de IL-1 β liberada.

4.4 Procedimentos endodônticos

Uma vez realizadas as coletas necessárias ao presente estudo, o preparo dos canais radiculares foi realizado com auxílio das limas endodônticas rotatórias de níquel-titânio (MTwo, Munique, Alemanha), acionadas por motor elétrico (VDW Gold, Munique, Alemanha), o qual possibilitou a confirmação da odontometria eletronicamente, bem como o emprego do torque e da velocidade sugeridas pelo próprio aparelho para cada calibre de instrumento empregado. O preparo químico-mecânico foi realizado com auxílio da irrigação com hipoclorito de sódio a 2,5% (Drogal farmácia de manipulação, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Ao final da instrumentação, o canal preparado foi irrigado com 5 mL de soro

fisiológico e seco com cones de papel absorvente estéreis (Dentsply, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil). Em seguida, o canal foi novamente inundado com solução de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) a 17 %, sendo essa manobra repetida a cada minuto durante um total de 3 minutos (Teixeira *et al.*, 2005), buscando-se a remoção da smear layer. Finalmente, o canal foi novamente irrigado com 5 mL de hipoclorito de sódio a 2,5%, seguido de irrigação com 5mL de soro fisiológico.

Depois, os canais radiculares foram secos com cones de papéis estéreis e obturados com cones de guta-percha e cimento endodôntico de Grossman (Endofill, Dentsply, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil).

O procedimento restaurador de todos os dentes realizou-se através da colocação de 2 mm de Coltosol® na entrada dos canais, aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos em toda a cavidade, adesivo 3M Single Bond (3M Dental Products, St. Paul, Minneapolis, EUA) e aplicação em camadas de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St. Paul, Minneapolis, EUA).

4.5 Identificação microbiana através do método pcr simples

O método PCR (16s rDNA) foi usado para a análise da presença das espécies bacterianas a seguir listadas, cujas cepas bacterianas de referência foram adquiridas do American Type Culture Collection (ATCC), conforme se segue: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43718), *Dialister pneumosintes* (ATCC 33048), *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Prevotella nigrescens* (ATCC 33099), *Prevotella tanneriae* (ATCC 51259), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Tannerella forsythia* (ATCC 43037), *Treponema denticola* (ATCC 35405) e *Treponema socranskii* (35536).

4.5.1 Extração do DNA bacteriano

O DNA microbiano das amostras coletadas, bem como das cepas ATCC adquiridas foi extraído e purificado por intermédio dos diversos processos mecânicos e químicos estabelecidos no kit para extração “QIAamp DNA Mini kit” (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante e conforme anteriormente descrito (Martinho, 2011)

Alíquotas de 300 μ L das amostras foram coletadas e adicionadas a um eppendorf de 1,5 mL. Foram adicionados 180 μ L da solução tampão ATL e 20 μ L da solução de Proteinase K. Então, os tubos eppendorf foram agitados em vortex por 1 min e mantidos em banho-maria a 56°C por 2 horas, sendo depois adicionados 200 μ L do tampão AL, realizando-se nova agitação por 1 minuto e novamente colocados em banho maria (70°C/10 min).

A fim de remover impurezas e constituintes lipídicos, foram adicionados 200 μ L de etanol puro. A seguir, foi realizada uma filtração dos conteúdos do tubo, empregando-se colunas com filtros de sílica. As colunas foram então submetidas a uma centrifugação (8000 rpm/1min) e o conteúdo líquido no tubo de coleta da parte inferior da coluna foi removido.

Neste ponto do experimento, o DNA microbiano estava aderido ao filtro de sílica, necessitando de lavagem com 500 μ L da solução tampão de lavagem AW1 e nova centrifugação (8000 rpm/1min). O tampão de lavagem AW2 foi adicionado e nova centrifugação foi realizada (13000 rpm, 3 minutos).

Então, o microfiltro foi transferido para um eppendorf de 1,5 mL, com tampa. A eluição do DNA do microfiltro foi obtida por intermédio da adição de 100 μ L do tampão AE, aguardando-se 3 min e realizando-se nova centrifugação (8000 rpm/1 min), momento em que se obteve o DNA microbiano extraído e purificado. O DNA foi mantido a -20°C até a realização de nova etapa do processo.

A concentração de DNA (absorbância a 260 nm) foi determinada usando um espectrofotômetro (Nanodrop™ 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

4.5.2 Reação de PCR

Foram empregados primers espécie-específicos direcionados à região 16S do rDNA bacteriano. A sequência dos nucleotídeos foi obtida a partir de referências na literatura (Tabela 1).

Após a extração do DNA, a reação de PCR foi realizada em um aparelho termociclador (MyCycler, Bio-Rad, Hercules, California, EUA) em um volume total de 25 µl, contendo: 2,5 µl de solução tampão de PCR (10x “*Taq* buffer” - MBI Fermentas, Mundolsheim, France); 0,5 µl de uma mistura de dNTP (25 µM de cada deoxiribonucleotídeo fosfatado – dATP, dCTP, dGTP e dTTP - MBI Fermentas, Hanover, Maryland, EUA); 1,25 µl de 25 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂); 0,25 µl de primers universais (direto e reverso - 0.2 µM - Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA); 1,5 µl de amostra de DNA (1 µg/ 50 µl); 1,5 µl *Taq* DNA polymerase (1 unidade) - MBI Fermentas, Mundolsheim, Alsácia, França); 17,25 µl de água ultrapura livre de DNAase e RNAase.

Os primers específicos utilizados e os parâmetros empregados para a detecção das espécies bacterianas no termociclador estão descritos na Tabela 1.

As alíquotas do DNA bacteriano extraído a partir das cepas ATCC e alíquotas de água ultrapura foram empregadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

Depois que as etapas de multiplicação do DNA foram realizadas no termociclador, utilizou-se o método da eletroforese em gel de agarose a 1% (Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil), conforme rotineiro no emprego do método PCR, procurando-se detectar amplicons correspondentes às bactérias-alvo pesquisadas (Montagner, 2010; Gomes & Montagner, 2010). Ao gel de agarose foi acrescentado o brometo de etídio à concentração final de 0,5µg/ml de gel e uma solução tampão de Trisborato EDTA 10x diluído (pH 8,0) para prevenir a hidratação.

No primeiro poço do gel de agarose (à esquerda), foi adicionado um marcador com fragmentos em múltiplos de 100 bp, denominado Ladder (DNA Ladder, In Invitrogen, São Paulo, São Paulo, Brasil). Nos poços subsequentes foram aplicadas as amostras de DNA e o conjunto submetido a um campo elétrico de 60 V, gerado por uma fonte durante 40 min, possibilitando a eletroforese das amostras e do “Ladder”. O gel foi então observado sob luz ultravioleta em um transiluminador e fotografado pelo equipamento Image Master-VDS (Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra), sendo que a captura das imagens foi realizada através do programa LISCAP Image Capture, do mesmo fabricante. A Figura 1 apresenta as diversas fases do método PCR.

Os resultados foram dados pelo surgimento de uma banda na região de mesma altura que o Ladder, demonstrando amostra positiva para aquele determinado peso molecular.

Tabela 1 – Primers utilizados e ciclos para a identificação de espécies bacterianas específicas e parâmetros empregados.

Espécie-alvo	Pares do primer (5'- 3')	Comprimento (bp)	Ciclos	Referência
Universal (16s rDNA)	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	466	95°C/10 min + 40 ciclos de 95°C/10 s, 60 °C/10 s + 72°C/25 s.	Vianna <i>et al.</i> (2006)
<i>A.actinomycetemcomitans</i>	AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT	557	94°C/30 s + 36 ciclos de 95°C/30 s, 55°C por 1 min, 72°C/2 min + 72°C/10 min.	Siqueira Jr. <i>et al.</i> (2001)
<i>Dialister pneumosintes</i>	TTC TAA GCA TCG CAT GGT GC GAT TTC GCT TCT CTT TGT TG	1105	95°C/2min + 36 ciclos de 94°C/30s, 55°C/1 min, 72°C/2 min + 72°C/2 min.	Siqueira Jr. <i>et al.</i> (2004)
<i>P.endodontalis</i>	GCT GCA GCT CAA CTG TAG TC CCG CTT CAT GTC ACC ATG TC	672	95°C/2 min + 36 ciclos de 94°C/30 s, 58°C/1 min, 72°C por 2 min + 72°C/10 min.	Siqueira Jr. <i>et al.</i> (2001)
<i>P. intermedia</i>	TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T	575	95°C/2 min + 36 ciclos de 94°C/30 s, 58°C/1 min, 72°C /2 min + 72°C/10 min.	Siqueira Jr. <i>et al.</i> (2001)
<i>P. nigrescens</i>	ATG AAA CAA AGG TTT TCC GGT AAG CCC ACG TCT CTG TGG GCT GCG A	804	95°C/2 min + 36 ciclos de 94°C/30 s, 58°C/1 min, 72°C/2 min + 72°C/10 min.	Siqueira Jr. <i>et al.</i> (2001)
<i>Prevotella tannerae</i>	CTT AGC TTG CTA AGT ATG CCG CAG CTG ACT TAT ACT CCC G	550	Desnaturação a 95°C/2 min e 36 ciclos de 94°C/30 s, 55°C/1min, 72°C/2 min e final 72°C/ 10 min.	Xia <i>et al.</i> (2000)

Continua

Conclusão da Tabela 1 – Primers utilizados e ciclos para a identificação de espécies bacterianas específicas e parâmetros empregados.

Espécie-alvo	Pares do primer (5'- 3')	Comprimento	Ciclos	Referência
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	404	Desnaturação inicial a 95°C/2 min e 36 ciclos de 94°C/30 s, 60°C/1 min, 72°C/2 min e final 72°C /2 min.	Siqueira Jr. <i>et al.</i> (2001)
<i>Tannerella forsythia</i>	GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	641	Desnaturação inicial a 95°C/1 min e 36 ciclos de 95°C/30 s, 60°C/1 min, 72°C/1 min e final 72°C/2 min	Slots <i>et al.</i> (1995)
<i>Treponema denticola</i>	TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	316	Desnaturação inicial a 95°C/2 min e 36 ciclos de 94°C/30 s, 60°C/1 min, 72°C/2 min e final 72°C/10 min.	Siqueira Jr. <i>et al.</i> (2001)
<i>Treponema socranskii</i>	GAT CAC TGT ATA CGGAAG GTAGACA TAC ACT TAT TCC TCG GAC AG	288	Desnaturação inicial a 95°C/2 min e 36 ciclos de 94°C/30 s, 56°C/1 min, 72°C/2 min e final 72°C/10 min.	Siqueira Jr. & Rôças (2004)

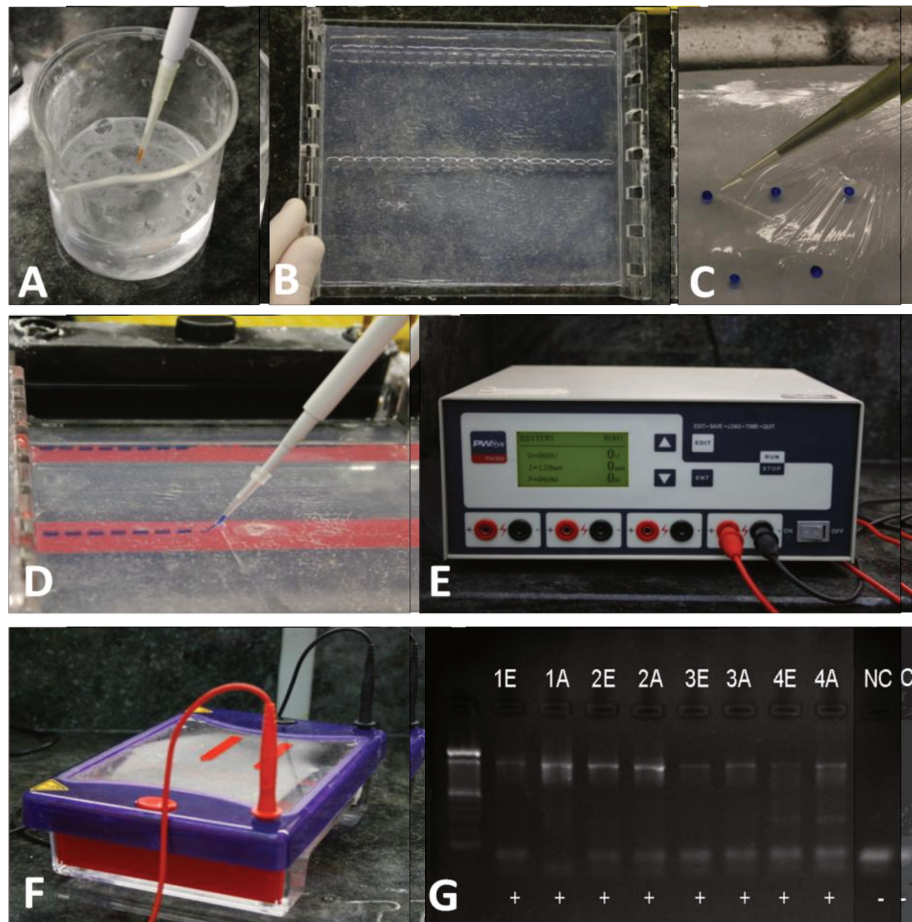


Figura 1 - Visualização do produto da PCR: A) Adição de Brometo de etídeo à agarose; B) Agarose solidificada; C) Mistura do produto de reação ao corante; D) Inserção das amostras nos poços do gel de agarose; E) Fonte de eletroforese; F) Cuba de eletroforese; G) Visualização do gel e detecção da presença (bandas) ou ausência da espécie microbiana em amostras de canais

Fontes: Montagner, 2010; Gomes & Montagner, 2010

4.6 Quantificação de Endotoxinas

A análise da quantificação das endotoxinas presentes sobre a superfície das limas foi feita através de teste turbidimétrico (Pyrogent - 5000; BioWhittaker, Inc, Walkersville, Maryland, EUA), que utiliza uma preparação de lisado do amebócito do caranguejo-ferradura, o *Limulus polyphemus*, sendo que os amebócitos são as células constituintes da hemolinfa azul desta espécie (Fukumori, 2008) (Figura 2).

Segundo orientações do manual do teste Pyrogent - 5000, o reagente Lisado dos Amebócitos de *Limulus* (LAL) é um extrato aquoso dos amebócitos, constituído de enzimas que reagem em presença de pequenas quantidades de endotoxina, e que compõe o kit turbidimétrico empregado neste estudo.

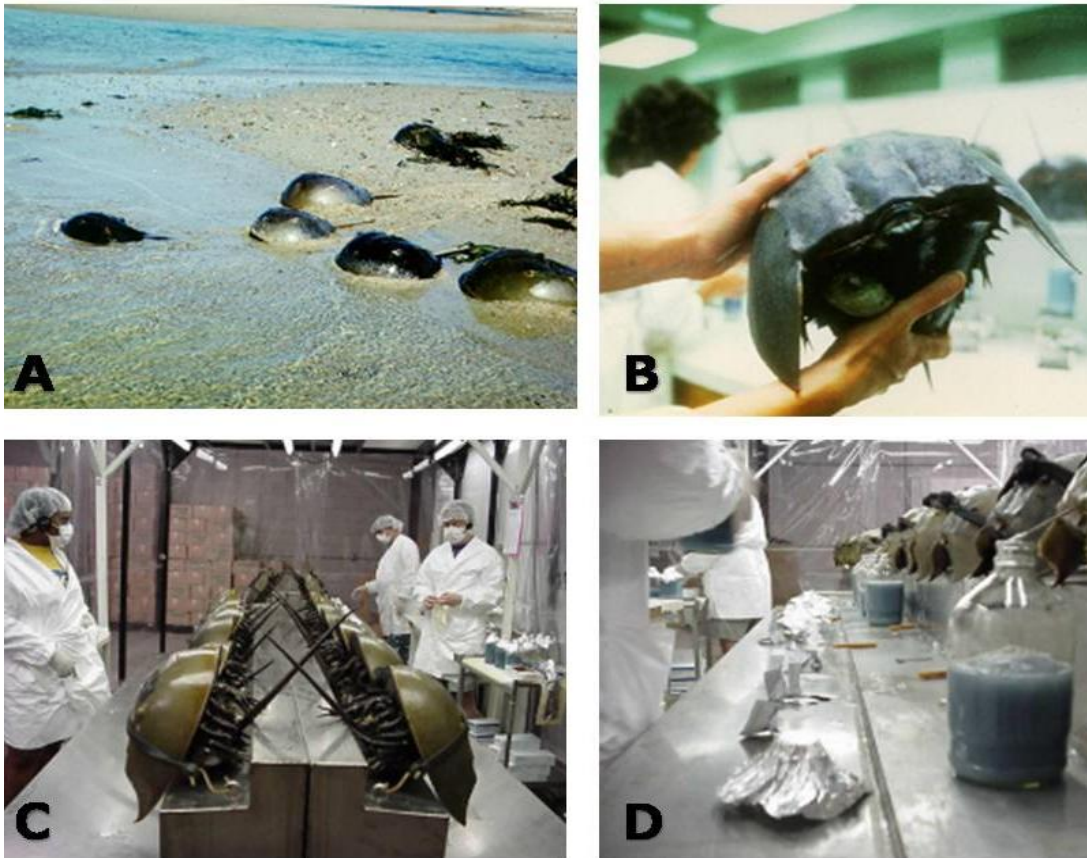


Figura 2 – Preparação de lisado do amebócito do caranguejo-ferradura, o *Limulus polyphemus*: A) *Limulus* em praia da costa leste dos Estados Unidos; B) *Limulus polyphemus*; C) Preparação para extração do sangue; D) Extração da hemolinfa.

Fonte: Fukumori, 2008

O LAL ativado converte o coagulogênio em coagulina que forma a turbidez da amostra.

Para que isto ocorra, cada alíquota de 100 μ L coletada para a qual se quer conhecer a quantidade de endotoxinas (UE/mL) é misturada com 100 μ L do reagente LAL reconstituído, colocada em um fotômetro e monitorada

automaticamente até o desenvolvimento de uma aparência de turvação, sendo feita sua leitura em combinação com um incubador fotométrico e um software apropriado, detectando-se fotometricamente a endotoxina, sendo possível assim realizar um ensaio por método quantitativo, cinético-turbidimétrico. O tempo necessário antes da aparição da turvação (tempo de reação) é inversamente proporcional à quantidade de endotoxinas presentes, isto é, na presença de uma grande quantidade de endotoxinas a reação ocorre mais rapidamente e na presença de uma quantidade pequena de endotoxinas o tempo de reação é maior. Assim, a concentração de endotoxinas em amostras desconhecidas pode ser calculada a partir de uma curva-padrão. O teste turbidimétrico Pyrogent - 5000 empregado possui sensibilidade de detecção de 0,01 UE/mL a 100 UE/mL.

Para a realização do teste turbidimétrico, todo o material utilizado que entrou em contato com as amostras estava apirogênico (livre de endotoxinas), sendo assim adquiridos de fábrica ou tornados apirogênicos em calor seco (estufa) a 200° C por 4 h.

4.6.1 Estabelecimento de curva-padrão

A fim de se estabelecer um parâmetro para o cálculo da concentração de endotoxinas presentes sobre as limas endodônticas, uma curva-padrão foi traçada, usando-se a endotoxina de *E. coli* em concentração conhecida que acompanha o teste (100 UE/mL). O estabelecimento de uma curva-padrão com quantidade de endotoxinas conhecidas é necessário para determinar a concentração de endotoxinas em amostras com quantidades desconhecidas. Quatro diluições da concentração conhecida de *E. coli* (100 UE/mL) foram realizadas, chegando-se às seguintes concentrações finais de endotoxinas: 10 UE/mL, 1 UE/mL, 0,10 UE/ml e 0,01 UE/mL, conforme as instruções do fabricante.

Estas concentrações de endotoxinas foram utilizadas na confecção da curva-padrão. Para isto, 100 µL de cada concentração foi submetida à espectrofotometria, como será detalhado a seguir.

O fabricante do kit turbimétrico disponibilizou o software WinKQCL® da Cambrex e um modelo polinomial (Powercurve®), onde os valores medidos no espectrofotômetro foram testados, verificando-se a eficiência da curva-padrão (r), cujo valor deve ser $\geq 0,98$ ($r \geq 0,98$). Ou seja, ao se usar o Powercurve®, gerou-se uma curva-padrão usando o \log_{10} dos valores do Tempo de Reação e suas correspondentes concentrações \log_{10} de endotoxina, definindo-se uma equação polinomial, parâmetro para a determinação das endotoxinas na amostra a ser analisada. Assim, todos os cálculos e geração da curva-padrão são feitos com o modelo polinomial Powercurve®, que requer o emprego do software WinKQCL®.

4.6.2 Controle de inibição/estimulação do teste

De acordo com as instruções do fabricante do kit do teste turbidimétrico empregado, pode ocorrer inibição ou estimulação indesejável no momento da realização do teste, quando substâncias presentes na amostra de teste interferem na reação LAL. A inibição resulta em um tempo de reação mais longo, indicando níveis mais baixos de endotoxinas do que realmente podem estar presentes na amostra testada, enquanto que a estimulação terá o efeito contrário, indicando níveis acima dos reais. A inexistência de inibição/estimulação do teste (produto) deve ser determinada para cada amostra específica, não diluída ou com uma diluição apropriada. Assim, um teste de inibição/desenvolvimento foi realizado para determinar qual nível de diluição da amostra analisada não provocou efeitos de inibição ou estimulação.

Para isto, seguiu-se a orientação do manual, onde cada alíquota da amostra a ser testada (ou uma diluição da amostra a ser testada) foi acompanhada por um controle positivo. O manual denomina este controle positivo de Controle Positivo do Produto (PPC). O PPC se obtém ao contaminar uma alíquota de 100 µL da amostra a ser testada com 10 µL de 0,1 UE/mL de endotoxina de *E. coli*, que acompanha o kit. Todos os testes foram realizados em duplicata.

A amostra não contaminada (amostra mãe) e quatro diluições da amostra mãe foram testadas (1:10; 1:100; 1:1000 e 1:10.000), tendo ao lado de cada uma das concentrações de endotoxina o seu respectivo PPC. O teste foi realizado como descrito a seguir. Para se verificar que não houve inibição ou estimulação indesejável, a endotoxina recuperada dos poços contaminados, calculada pelo software, teria de estar entre 50% a 200%.

O software empregado e disponibilizado pela assessoria técnica do fabricante calculou a quantidade de endotoxina presente nas amostras, comparativamente com a quantidade de endotoxina no PPC, conforme detalhado adiante. Ficou demonstrado que a diluição 10^{-1} estava indicada para a detecção dos níveis de endotoxinas.

4.6.3 Cálculo da concentração de endotoxinas

Os recipientes contendo as limas receberam 1 mL de água apirogênica e submetidas ao agitador de tubos tipo Vortex por 60 segundos.

Uma microplaca com 96 poços (12 colunas e 8 fileiras - Corning Costar, Cambridge, Maryland, EUA) foi pré-aquecida por pelo menos 10 minutos a 37° C e mantida nesta temperatura até o momento do teste. Então, 100 µl de um

controle negativo (“blank”) foram aplicados em duplicata aos poços da microplaca, o mesmo sendo feito com as concentrações previamente preparadas de quantidade de endotoxinas conhecidas (0,01, 0,1, 1 e 10 UE/ml) e também 100 µl das amostras na diluição 10^{-1} foram adicionadas, com seus respectivos grupos controles positivos (PPC).

Para calcular a concentração de endotoxinas, a absorvância de endotoxinas foi individualmente medida usando-se um fotômetro leitor de microplacas (Ultramark®; Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA) e um software específico WinKQCL® (BioWittaker, Cambrex Co, Walkersville, Maryland, EUA), monitorado na absorvância de 340nm de cada poço da microplaca, durante todo o ensaio.

De forma contínua durante todo o ensaio, o leitor de microplacas / software WinKQCL® monitorou a absorvância de 340nm de cada poço da microplaca. Usando a leitura de absorvância inicial de cada poço como seu próprio branco, o leitor determinou o tempo de reação necessário para que a absorvância aumentasse a 0,03 unidades. O software tem a capacidade de executar automaticamente uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxinas correspondente, determinando, a partir da curva-padrão, a concentração da amostra testada. (Figura 3).

Os resultados foram submetidos à análise estatística, com o intuito de levantar diferenças significantes entre os grupos amostrais.

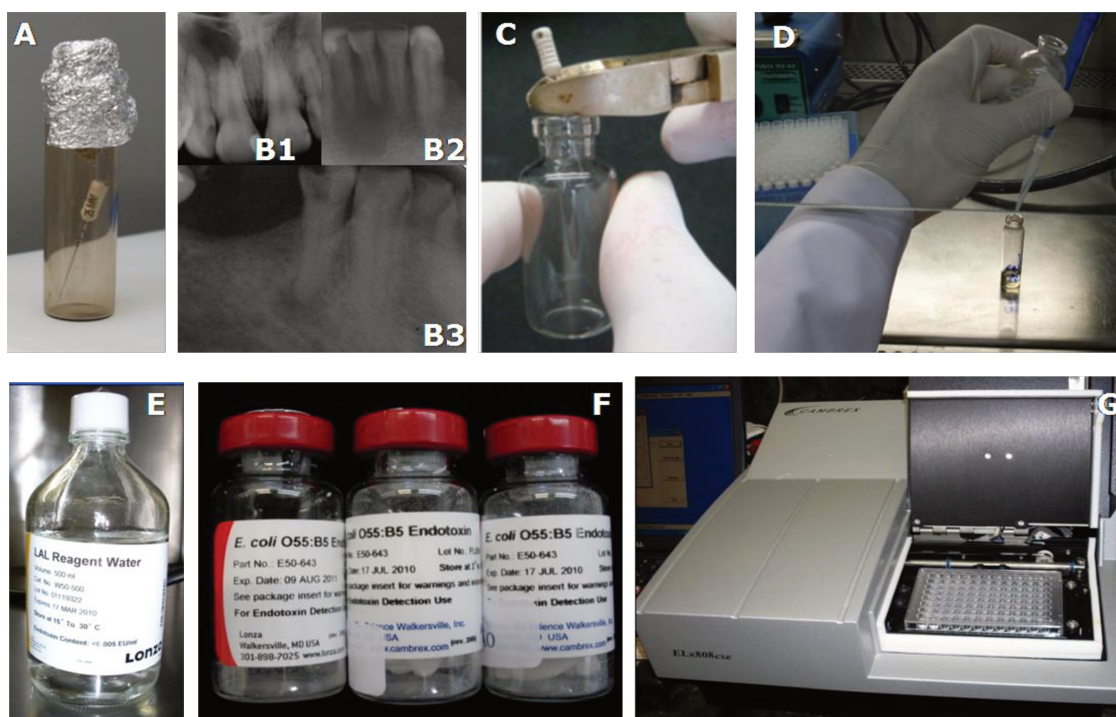


Figura 3 – Quantificação de endotoxinas sobre as hastes das limas endodônticas: A) Limas e recipiente apirogênicos; B1, B2 e B3) Exemplos de casos selecionados; C) Separação da haste da lima endodôntica com alicate apirogênico; D) Adição de água apirogênica ($< 0,005$ UE/mL) ao frasco contendo a haste da lima; E) Água Reagente LAL; F) Endotoxina de *E. coli* 055:B5; G) Leitor de microplacas Cambrex.

4.7 Resposta de macrófagos aos conteúdos endodônticos

No intuito de investigar o potencial inflamatório do conteúdo residual colhido da superfície de limas endodônticas contaminadas e após diferentes protocolos de esterilização, realizou-se um teste de citotoxicidade estimulando macrófagos e mensurando os níveis de IL1- β produzidos.

Com este propósito, as soluções com os conteúdos endodônticos das superfícies de vinte limas empregadas em canais e posteriormente esterilizadas em autoclave ou estufa (n=20) foram utilizadas. Após terem sido agitadas em vortex por 60 segundos, conforme descrito anteriormente, uma alíquota de 60µL foi aspirada de cada frasco e utilizada para estimulação celular, como descrito a seguir.

4.7.1. Cultura de células

Foi empregada uma linhagem de macrófagos murinos (RAW 264.7), provenientes do Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Os macrófagos foram cultivados em placas de cultura de poliestireno de 100 mm de diâmetro (Corning Costar, Cambridge, Maryland, EUA), mantidos em atmosfera umidificada a 37°C, 5% de CO₂, até 90% de confluência, cultivados em meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco, DMEM (GIBCO), suplementado com soro fetal bovino a 10% inativado pelo calor, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O meio de cultura foi trocado a cada quatro dias.

Em seguida, as células foram suspensas em solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Invitrogen, Carlsbad, CA) e foi verificado um quantitativo de 10⁴ macrófagos suspensos viáveis, com auxílio de uma câmara de Neubauer, também conhecida como câmara de contagem ou hemocitômetro (Vieira *et al.*, 2000), utilizando o teste de exclusão do azul de tripan.

4.7.2 Estimulação celular

Um total de 10^4 macrófagos viáveis foi colocado em cada poço da placa de poliestireno de 6 poços (CorningCostar, Cambridge, Maryland, EUA), acrescentando meio para cultura DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 100 UI/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina, até obter o volume final de 1000 μ L. As placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 48 horas. Previamente à estimulação com o conteúdo do canal, as células foram desinduzidas por 8h em meio de cultura (DMEM) contendo 0.3% de soro fetal bovino, com a finalidade de sincronizar o ciclo celular e reduzir a influência dos componentes do soro fetal nas células.

Em seguida, os macrófagos foram estimulados por 24 h com 60 μ L da alíquota proveniente dos frascos contendo as limas endodônticas autoclavadas ou esterilizadas pelo calor seco e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, a fim de se quantificar o total de IL-1 β liberada pelos macrófagos. Todos experimentos foram realizados em duplicata.

Após 24 h, os sobrenadantes foram coletados com ponteiras plásticas estéreis e armazenados em tubos plásticos estéreis de 1,5 mL, sendo estocados a -80°C até sua utilização para análise das quantidades de IL-1 β existentes.

A membrana citoplasmática dos macrófagos aderidos no fundo dos poços foi rompida quimicamente com o reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), empregando-se seu fluxo e refluxo com ponteira de 1000 μ L estéreis, conforme indica seu fabricante.

4.7.3 Expressão de RNA mensageiro de IL-1 β

Antes de verificar a os níveis da citocina IL-1 β após estimulação dos macrófagos por 24 horas com alíquotas dos frascos contendo as limas esterilizadas pelo calor seco ou autoclave, foi verificada a viabilidade dos macrófagos em expressar RNA-mensageiro (RNAm) para IL-1 β , conforme descrito a seguir.

4.7.3.1 *Extração de RNA total, transcrição reversa e PCR*

A extração do RNA total dos macrófagos foi realizada com emprego do reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), seguindo-se o protocolo do fornecedor.

A remoção dos macrófagos aderidos no fundo do poço da placa com fluxo e refluxo com ponteira de 1 mL do reagente Trizol® levou à homogeneização da amostra. A amostra homogenizada foi agitada por 5 minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação do complexo nucleoproteico, sendo o conteúdo do poço transferido para um eppendorf. A seguir, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio e o eppendorf agitado vigorosamente por 15 segundos. Após se aguardar 2 a 3 minutos, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C.

Neste momento a mistura ficou separada em uma camada inferior vermelho (fase fenol-clorofórmio), uma interfase e uma camada superior incolor aquosa, sendo que as instruções do fabricante do TRIzol® informam que o RNA encontra-se exclusivamente na fase aquosa formada. Esta fase aquosa foi

removida por pipetagem, após angular o eppendorf em 45° e transferida para novo eppendorf.

No novo eppendorf contendo a fase aquosa, foram adicionados 0,5 mL de isopropanol a 100%, mantendo-se à temperatura ambiente por 10 minutos. Após centrifugar o tubo eppendorf por 12.000 rpm por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado, lavando-se o conteúdo restante com 1 mL de etanol a 75%. O conteúdo foi agitado em vortex, e centrifugado a 7500 rpm por 5 min a 4°C e descartado o álcool, deixando-se o RNA secando por 5 a 10 minutos.

Após a secagem, foi acrescentada a quantidade de 20 µL de água livre de DNase e RNase e a solução incubada de 55 a 60°C por 10 a 15 minutos.

A quantidade e a pureza do RNA foram determinadas com o espectrofotômetro de luz UV (Biomate 3 - Thermo-Spectronic, Rochester, New York, EUA) por meio da avaliação das absorbâncias a 260/280 nm, respectivamente.

O DNA complementar (cDNA), que é o DNA sintetizado a partir de uma molécula de RNA mensageiro, foi sintetizado por transcrição reversa de 500 ng de RNA total, usando primers 2,5 µmol/L Oligo (dT)₁₂₋₁₈ e 1,25 U/µL da enzima transcriptase reversa Moloney MurineLeukemia Vírus na presença de 3 mmol/L de MgCl₂, 2 mmol/L dNTPs e 0,8 U/µL de inibidor de RNase, de acordo com o protocolo do fabricante (Improm II, Promega, Madison, Wiscosin, EUA).

Em seguida, uma reação de PCR no termociclador foi realizada, usando-se 2µL do produto da reação de transcrição reversa em um volume total de 20µL de mix da reação de PCR (GoTaqFlexi, Promega) na presença de 100pmol/µL do primer para IL1-β e 100pmol/µL do primer para o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), sendo 50pmol/µL do primer sense e 50pmol/µL do primer antisense. O GAPDH foi usado como controle endógeno no método PCR de transcrição reversa, por ser um gene constitutivo,

que é um gene expresso continuamente em todas as células de determinado organismo e cuja expressão não se altera. Os pares de primers empregados encontram-se apresentados na Tabela 2:

Tabela 2: Primers utilizados e ciclos para reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Gene	Pares do primer (5'- 3')	Ciclos	Amplicon (bp)
GADPH	CACCATGGAGAAGGCCGGGG GACGGACACATTGGGGTAG	95° C / 2 min + 25 ciclos de: 95° C/1 min, 52° C/1 min, 72° C/1 min e etapa final de 72° C/10 min, na presença de 1,5 mmol/L de MgCl ₂	418
IL - 1 β	GACCTGTTCTTTGAGGCTGA CGTTGCTTGCTCTCCTTGT	95° C/ 2 min + 35 ciclos de: 95° C/ 1min, 58° C/1 min, 72° C/ 2 min e etapa final de 72° C/ 7 min, na presença de 1,5 mmol/L de MgCl ₂	494

Em seguida, o produto da PCR foi submetido a eletroforese (1,5% w/v) em gel de agarose contendo brometo de etídeo (0,5 mg/mL). As bandas de DNA foram capturadas digitalmente com o dispositivo Image Quant 100 (GE Healthcare, Sunnyvale, CA, EUA) e o software ImageJ 1.32j (National Institute of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>; Bethesda, MD, EUA) analisou densitometricamente as imagens digitais obtidas das bandas. O software ImageJ 1.32j permite avaliar por densidade o valor de pixels em uma escala de cinzas (0 a 256), comparando se um gene está mais ou menos expresso em relação ao seu

controle. A densidade das bandas correspondentes ao RNAm de IL-1 β de cada amostra foi normalizada para a quantidade do gene GAPDH.

A figura 4 apresenta fases da cultura de células e da expressão de RNAm de IL- 1 β .



Figura 4 – Cultura de células e expressão de RNAm de IL- 1 β : A) Macrófagos (RAW 264.7); B) Meio DMEM suplementado com 100 UI/ mL de penicilina, 100 IU/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor; C) Incubadora D) Microplacas com 6 poços para cultura de células; E) Incubação em atmosfera umidificada a 37°C, 5% CO₂ até 90% de confluência; F-G) Macrófagos contados em câmara de Neubauer (total de 10⁴ macrófagos); H-I) Agitação e estimulação de células com 60 μ L de conteúdos das amostras das limas esterilizadas por estufa ou autoclave; J) Incubação em atmosfera a umidificada a 37°C, 5% de CO₂ por 24 h; K-L) Aspiração dos sobrenadantes; M) Primers forward e reverso para Expressão de RNAm de IL-1 β e GAPDH); N) Termociclador.

4.7.4 Expressão da citocina IL-1 β

A análise da quantidade da citocina inflamatória - IL-1 β liberada em meio de cultura foi realizada através do teste imunoenzimático (ELISA), utilizando kits Duoset (R & D systems, Mineapolis MN, EUA).

4.7.4.1 *Teste imunoenzimático (ELISA) - Técnica sanduíche*

No método empregado neste estudo, o anticorpo (AC) de um antígeno em particular é, inicialmente, adsorvido no poço da placa. Então, o antígeno é adicionado e se liga ao anticorpo. Em seguida, um segundo e diferente anticorpo ligado à enzima é adicionado (anticorpo biotinizado). Na sequência, é adicionado estreptavidina conjugada à peroxidase, onde a estreptavidina irá se ligar na biotina do AC secundário e a porção peroxidase ficará exposta para reagir com o substrato cromogênico. É então adicionado o substrato cromogênico [(solução A (H₂O₂) + Solução B (Tetrametilbenzodina – TMB)], no qual a H₂O₂ será quebrada pela peroxidase em H₂O + 1/2 O₂. Por sua vez, o O₂ irá agir sobre o TMB, deixando de incolor para azul. E finalmente é adicionada uma solução de parada “stop solution” (2N H₂SO₄), tornando a reação amarela, permitindo a mensuração da quantidade de antígeno presente na amostra, de acordo com a intensidade da cor amarela lida em espectrofotômetro, numa densidade óptica (DO) de 450 nm.

Do kit Duo-set empregado, foram utilizados para este estudo: 1) Anticorpos (AC) de captura: AC de cabra anti-IL-1 β de murino; 2) AC de detecção: AC de cabra anti-IL-1 β de murinobiotinizado; 3) Padrão recombinante de IL-1 β de murino; 4) estreptavidina conjugada com peroxidase (*Streptavidin-Horseradish-peroxidase*).

4.7.4.2 *Procedimento laboratorial*

O teste imunoenzimático ELISA foi realizado no Laboratório de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, São Paulo, Brasil (Figura 5).

Placas de microtitulação de 96 poços (Corning Star, Cambridge, Maryland, EUA) foram sensibilizadas com anticorpo de captura anti-IL-1 β de murino (100 μ L/ poço) de acordo com a recomendação do fabricante.

A seguir, as placas foram mantidas em temperatura ambiente por 12 horas, e foram em seguida lavadas três vezes com solução tampão de lavagem (PBS 0.05% de Tween 20) e bloqueados com 300 μ L de solução tampão de bloqueio (PBS com 1% de soro albumina bovina, BSA) por 1 hora em temperatura ambiente. Depois, as placas foram novamente lavadas por 3 vezes, com solução tampão de lavagem e incubadas com 100 μ L dos padrões de IL-1 β com concentrações conhecidas (curva-padrão) e 100 μ L dos sobrenadantes acima descritos durante 2 horas em temperatura ambiente. Este procedimento foi realizado em triplicata.

Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com solução tampão de lavagem e incubadas com 100 μ L de anticorpos de detecção anti-IL-1 β , marcados com biotina. As placas foram mantidas por 2 horas em temperatura ambiente e novamente lavadas. Após a lavagem, foi acrescentado 100 μ L de streptavidina em cada poço, sendo cobertas com papel alumínio para proteção da luz, durante 20 minutos.

Então, foi procedida nova lavagem, sendo a reação revelada com 100 μ L de solução constituída de substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio em cada poço, a seguir incubada por 20 minutos em temperatura ambiente,

novamente sob proteção do papel alumínio. Em seguida, foram adicionados 50 µL do reagente de parada “Stop solution” em cada poço – ácido sulfúrico 2N.

4.7.4.3 *Padronização de curva-padrão*

Para calcular a quantidade total de IL-1 β liberada, em resposta à estimulação dos conteúdos dos frascos contendo as limas endodônticas e depois esterilizada pela autoclave ou estufa, foi necessário o auxílio de uma curva-padrão com quantidades de citocinas inflamatórias previamente conhecidas.

Esta curva-padrão para IL-1 β foi estabelecida, a partir das seguintes diluições de uma solução concentrada de 4000 pg/mL desta proteína: 2000 pg/mL (picogramas/mL), 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL e 62,5 pg/mL.

4.7.4.4 *Mensuração dos níveis totais de IL-1 β liberada no meio de cultura*

O cálculo da concentração da citocina inflamatória IL-1 β nas amostragens autoclavadas ou esterilizadas pelo calor seco foi realizada, à partir da curva-padrão obtida. As quantidades de IL-1 β liberadas no meio de cultura após a estimulação de macrófagos com as soluções dos frascos contendo as limas endodônticas, foram mensuradas por um teste de imunoabsorbância enzimático (Duoset kit; R&D, Minneapolis, MN, EUA). Um meio de cultura de macrófagos não estimulados serviu como controle negativo. Aos poços da placa para o teste enzimático foram adicionadas a solução padrão e a solução de controle negativo, bem como as soluções provenientes dos frascos contendo as limas dos grupos de teste. Preliminarmente, todas essas soluções haviam sido revestidas com um anticorpo monoclonal específico.

Depois de leve agitação por 3 h à temperatura ambiente, anticorpo policlonal anti-IL-1 β , conjugado com peroxidase de rabanete, foi adicionado às soluções e encubado por 1 hora à temperatura ambiente. Uma solução substrato contendo peroxidase hidrogenada e cromógeno foi adicionada e permitido reagir por 20 minutos. Os níveis de citocinas foram avaliados por leitor de imunabsorbância a 450 nm e normalizados com uma abundância da solução padrão. Cada valor densitométrico foi expresso por media e desvio-padrão e foi obtido de três experimentos independentes.

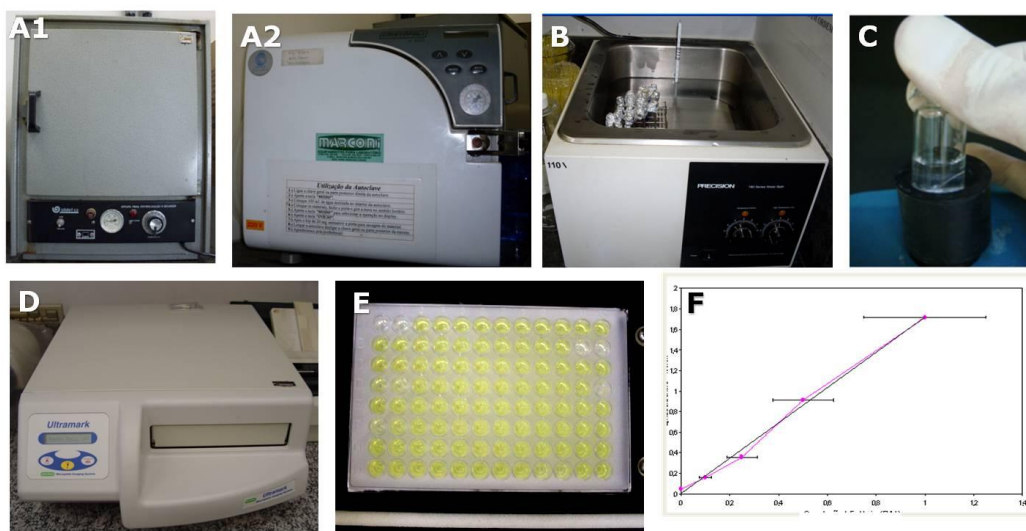


Figura 5 – Quantificação de IL-1 β após métodos de esterilização: A1) Estufa de calor seco; A2) Autoclave; B) Frascos contendo hastes metálicas das limas e alíquotas de água apirogênica em banho-maria; C) Agitação em Vortex; D) Leitor de ELISA; E) Controles e amostras após reações; F) Curva-padrão

4.8 Análise estatística

Os dados coletados foram tabulados e estatisticamente analisados, usando-se a versão 19.0 do Programa SPSS para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA).

O teste Qui-quadrado de Pearson ou Exato de Fisher ($p=0,05$), quando apropriados, foram utilizados para testar a hipótese nula de que não havia correlação entre espécies bacterianas. Nos casos em que a hipótese nula foi refutada, isto é, onde houve correlação entre os parâmetros analisados ($p < 0,05$), foi empregado complementarmente o teste de Odds ratio (ou Risk ratio, quando apropriado), a fim de verificar se a correlação encontrada foi positiva ou negativa. Considerou-se associação positiva quando o Odds ratio/Risk ratio foi maior ou igual a 2 e negativa quando menor que 0,5.

Para avaliar o efeito dos protocolos de esterilização empregados na diminuição da concentração de endotoxinas presentes, utilizou-se o Teste de Friedman, caso os resultados fossem significantes ($p<0,05$), o Teste Wilcoxon Signed Rank com ajustamento de Bonferroni seria necessário como teste *post-hoc*, examinando onde as diferenças teriam ocorrido.

5 RESULTADOS

5.1 Características Clínicas

Cumprindo o intento proposto para a metodologia deste estudo, os 20 casos coletados apresentaram características clínicas de dentes necróticos portadores de infecções endodônticas primárias e lesões periapicais detectadas radiograficamente. Os dentes empregados no presente estudo ficaram assim distribuídos: incisivos (4/20), caninos (1/20), pré-molares (8/20) e molares (7/20).

Maior detalhamento sobre os dados clínicos dos pacientes pode ser visualizado na Tabela 3.

Tabela 3 – Aspectos clínicos e radiográficos dos 20 canais radiculares analisados.

Paciente	Dente	Gênero	Dor				Edema	Lesão (mm)	Seco/ molhado	Exsudato	Mobilidade	Odor	Fistula	Restauração
			Espontânea	Prévia	Percussão	Palpação								
1	44	M	N	S	S	S	N	1,5	M	Cl	N	N	N	C
2	46	M	N	N	S	S	N	3	S	N	N	N	N	P
3	31	M	N	N	S	S	N	3	M	Cl	N	N	N	D
4	14	F	N	N	S	S	N	1,5	S	N	N	N	N	D
5	22	F	N	N	N	N	N	4	M	Cl	N	N	N	D
6	36	M	N	S	N	N	N	1,5	M	Cl	N	N	S	C
7	23	F	N	N	N	S	N	0,5	M	Pu	N	N	N	P
8	36	F	N	S	N	N	N	4	M	Cl	N	N	N	P
9	44	F	N	N	N	N	N	4	M	Cl	S	N	N	D
10	22	F	N	S	N	N	N	3	S	N	N	N	N	D
11	46	F	N	S	N	N	N	4	M	E	N	N	S	P
12	26	M	N	N	N	N	N	3	S	N	N	N	N	P
13	46	F	N	N	S	N	N	1,5	M	Pu	N	N	N	C
14	12	F	N	N	S	S	N	10	S	N	S	N	N	D
15	35	M	N	N	N	N	N	4	S	N	N	N	N	C
16	34	F	N	N	N	N	N	4,5	S	N	N	N	N	D
17	45	F	N	N	S	S	N	1,5	M	Cl	N	N	N	D
18	14	M	N	S	S	S	S	1	M	Cl	N	N	N	P
19	46	M	N	N	N	S	N	1,0	M	Cl	N	N	N	D
20	25	M	N	N	N	N	N	1,5	S	N	N	N	N	P

Legenda: C- cariado; Cl- claro; D- restauração definitiva; E- Escuro; H- Hígido; F- feminino; M- masculino; N- não; P- restauração provisória; Pu- purulento; S- sim.

5.2 Análises Microbiológicas

5.2.1 Detecção de micro-organismos Gram-negativos pelo método PCR simples

O método PCR simples empregado detectou micro-organismos, somente a partir das alíquotas colhidas das limas introduzidas nos canais que não sofreram qualquer método de esterilização. Nos grupos onde as limas foram autoclavadas ou esterilizadas pelo calor seco, não houve detecção de DNA bacteriano das amostras testadas (Figura 6).



Figura 6 – Visualização do gel de agarose a 1% e detecção da presença de bandas do primer universal: A) Sem esterilização; B) Após ciclo de autoclave; C) Após esterilização pelo calor seco

Assim, a partir dos conteúdos endodônticos colhidos das superfícies das limas endodônticas contaminadas e não esterilizadas, foi possível detectar o primer universal (porção 16S rDNA – inespecífico para uma determinada espécie bacteriana) em todos os 20 casos analisados, confirmando que a lima utilizada em canais necróticos continha micro-organismos em sua superfície em 100% dos casos clínicos pesquisados.

Os micro-organismos detectados sobre as limas contaminadas dos 20 casos analisados foram: *Prevotella nigrescens* (13 casos, equivalendo a 65%), *Porphyromonas endodontalis* e *Treponema socranskii* (ambos com 6 casos, sendo igual a 30%), *Treponema denticola* (3 casos, correspondendo a 15%) e *Dialister pneumosintes* e *Prevotella intermedia* (cada qual com 1 caso, igual a 5%).

Não foi possível detectar a presença dos seguintes micro-organismos, a partir dos conteúdos endodônticos da superfície das limas: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Prevotella tanneriae*.

Para os micro-organismos testados neste estudo, foi verificada a presença de uma única espécie em 10 casos (50%), ficando assim distribuída: *P. nigrescens* em nove casos (45%) e *P. endodontalis* em um único caso (5%).

Em outros sete dentes (35%), detectou-se a presença de mais de uma espécie bacteriana em um único canal, sendo que em um único caso foi possível detectar quatro espécies microbianas diferentes no mesmo canal (5%), seguidos de quatro outros casos com três espécies (20%), e mais dois casos com duas espécies isoladas (10%).

Em três casos analisados (15%), não foi possível identificar nenhum dos micro-organismos testados (Tabela 4).

Tabela 4 – Detecção de bactérias pelo método PCR simples.

ESPÉCIE	PACIENTE																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Primer universal (16 rDNA)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Prevotella intermedia</i>		+																		
<i>Prevotella nigrescens</i>	+		+		+			+	+	+	+	+			+		+	+	+	+
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>																				
<i>Porphyromonas gingivalis</i>																				
<i>Dialister pneumosintes</i>		+																		
<i>Tanerella forsythia</i>																				
<i>Prevotella tanneriae</i>																				
<i>Treponema denticola</i>					+								+	+						
<i>Porphyromonas endodontalis</i>					+		+				+	+	+	+						
<i>Treponema socranskii</i>		+			+						+		+	+						+

5.2.2 Correlação entre micro-organismos

A análise estatística realizada demonstrou haver correlação positiva entre as espécies *Porphyromonas endodontalis* e *Treponema denticola* ($p = 0,003$, $RR = 2,000$ e intervalo de confiança = $0,899 - 4,452$).

Também se verificou associação positiva entre *Treponema denticola* e *Treponema socranskii* ($p=0,003$, $RR=2,000$ e intervalo de confiança = $0,899 - 4,452$).

Nenhuma outra associação estatisticamente significativa foi verificada.

5.3 **Endotoxinas**

5.3.1 Quantificação de endotoxinas presentes sobre as limas

Nenhuma endotoxina foi quantificada nas amostras do Grupo controle negativo (Grupo I), submetidas ao protocolo de esterilização a 200°C por 4 horas.

As endotoxinas estavam presentes em 100% das limas inicialmente introduzidas nos canais ($n=20$), ou seja, foi possível detectar endotoxinas presentes em todas as 20 limas do Grupo controle positivo (Grupo II), cujos valores variaram de 0,03 a 15,70 UE/mL, obtendo-se a média de 2,68 UE/mL e mediana de 1,24 UE/mL.

Após a esterilização das limas em estufa a 170°C por 1 hora, foi possível detectar a presença de endotoxina em 19 das 20 amostras (95%), com média de concentração de endotoxinas de 1,56 UE/mL e mediana de 1,00 UE/mL e valores mensuráveis variando de 0,02 a 6,35 UE/mL nas amostras do Grupo III.

Depois de submetidas a um ciclo de autoclavagem, os resultados apresentaram valor não detectável (< 0,01 UE/mL) em uma única amostra, quantificando-se endotoxinas em 95% dos casos do Grupo IV. Os valores mensuráveis variaram de 0,01 a 3,31 UE/mL, cuja média encontrada foi de 0,51 UE/mL e mediana de 0,25 UE/mL (Tabela 5).

Tabela 5 – Quantificação de endotoxinas presentes sobre as limas endodônticas (UE/mL) provenientes dos 20 canais radiculares.

Amostra	Grupo			
	I - Controle negativo	II - Controle Positivo	III- Estufa	IV- Autoclave
1	< 0,01	0,36	0,42	0,06
2	< 0,01	15,70	0,19	0,44
3	< 0,01	0,22	0,02	0,28
4	< 0,01	0,03	< 0,01	0,03
5	< 0,01	4,12	2,17	0,25
6	< 0,01	3,01	0,06	0,18
7	< 0,01	2,29	1,68	0,44
8	< 0,01	1,74	3,27	0,58
9	< 0,01	9,67	1,65	3,31
10	< 0,01	0,09	0,40	0,06
11	< 0,01	5,72	3,16	1,18
12	< 0,01	0,78	0,88	0,68
13	< 0,01	1,76	0,06	0,08
14	< 0,01	1,40	6,35	1,59
15	< 0,01	4,66	1,12	0,25
16	< 0,01	0,56	1,19	0,59
17	< 0,01	0,28	0,06	0,01
18	< 0,01	0,07	6,13	0,09
19	< 0,01	1,07	2,26	0,15
20	< 0,01	0,123	0,11	< 0,01
Mínimo – máximo	< 0,01	0,03 - 15,70	< 0,01 – 6,35	< 0,01- 3,31
Média – desvio padrão	< 0,01	2,68 - 3,92	1,56 - 1,91	0,51 - 0,78
Mediana	< 0,01	1,24	1,00	0,25

Pôde-se observar que os valores das médias de endotoxinas presentes sobre as limas inicialmente, foram reduzidos após os corpos de prova terem sido submetidos à esterilização pela estufa ou pela autoclave. Em relação à média das quantidades de endotoxinas presentes inicialmente, o calor seco resultou em uma redução da mesma em 41,8%, enquanto que o calor úmido proporcionou

diminuição da média de endotoxinas da ordem de 81%. No gráfico abaixo, a média do Grupo positivo foi considerada como 100%, enquanto as médias dos demais Grupos foram apresentadas em percentuais relativos ao Grupo positivo (Figura 7):

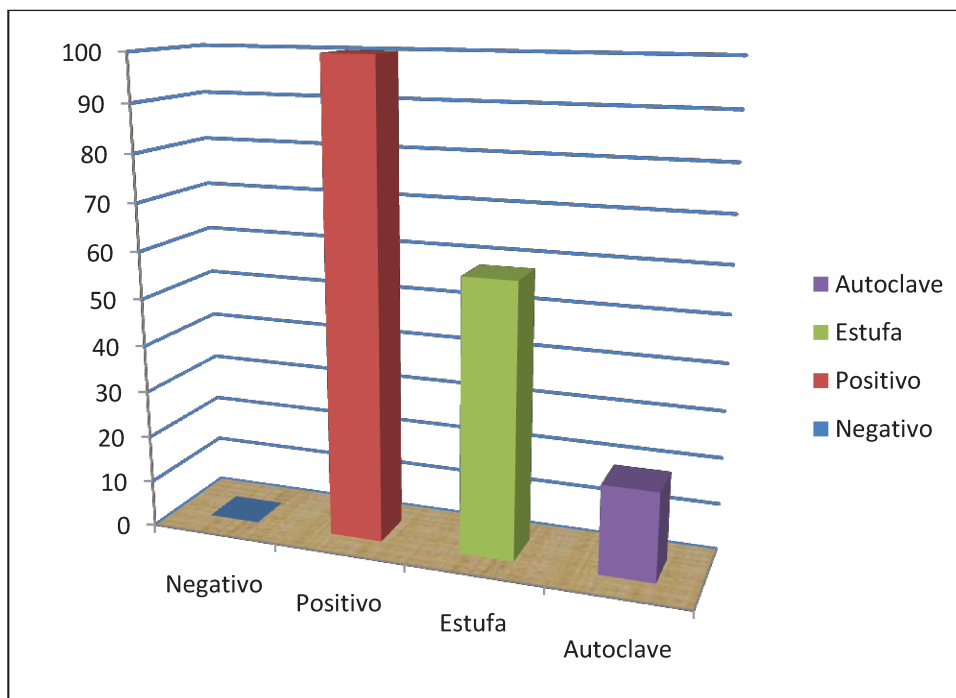


Figura 7 - Gráfico do percentual de endotoxinas em função do método de esterilização.

Embora os valores de endotoxinas encontrados nos Grupos II, III e IV tenham sido decrescentes, a análise estatística demonstrou que não houve redução significativa, quando foram comparadas as quantidades de endotoxinas do grupo positivo com os grupos onde foram empregadas a estufa ou autoclave.

Da mesma forma, a comparação entre os Grupos III e IV demonstrou que a concentração de endotoxinas presentes após as limas terem sido submetidas aos processos de esterilização pela estufa não foi estatisticamente diferente do Grupo onde se utilizou o método de esterilização pela autoclave ($p > 0,05$).

5.3.2 Citocina inflamatória IL-1 β

Somente foi possível mensurar IL-1 β no Grupo onde as hastes das limas foram submetidas à autoclave. Neste grupo, o valor mínimo medido foi de 34,82 pg/mL, o valor máximo foi de 418,73 pg/mL, a média obtida foi de 69,63 pg/mL e a mediana foi de 53,77 pg/mL.

Para o Grupo onde as hastes foram esterilizadas pelo calor seco, a resposta do teste resultou em uma resposta não detectável pelo método teste imunoenzimático empregado (ELISA – Técnica sanduíche).

As concentrações mensuradas em pg/mL de IL-1 β , liberadas por macrófagos após estimulação dos conteúdos endodônticos sobre as superfícies das limas, encontram-se apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Quantificação (em pg/mL) de IL-1 β liberada por macrófagos, após estímulo dos conteúdos presentes sobre as limas endodônticas esterilizadas por autoclave ou estufa

Amostra	Estufa	Autoclave
1	-	48,32
2	-	42,93
3	-	54,92
4	-	57,32
5	-	63,99
6	-	55,85
7	-	75,64
8	-	36,74
9	-	59,27
10	-	418,73
11	-	46,42
12	-	52,83
13	-	58,58
14	-	34,82
15	-	54,72
16	-	50,15
17	-	57,09
18	-	43,05
19	-	36,85
20	-	44,42
Valor mínimo	-	34,82
Valor máximo	-	418,73
Mediana	-	53,77
Média	-	69,63
Desvio padrão	-	82,78

A Tabela 7 apresenta o conjunto dos resultados obtidos, relativos ao micro-organismos detectados, níveis de endotoxinas e IL-1 β de cada amostra examinada:

Tabela 7 – Bactérias, quantificação de endotoxinas (UE/mL) e IL-1 β (em pg/mL)

Amostra	Bactérias			Endotoxina (UE/mL)			IL 1 – β (pg/mL)	
	Contaminada	Após		Contaminada	Após		Após	
		Estufa	Autoclave		Estufa	Autoclave	Estufa	Autoclave
1	- <i>P. nigrescens</i>	-	-	0,36	0,42	0,06	-	48,32
2	- <i>P. intermedia</i>			15,70	0,19	0,44	-	42,93
	- <i>D. pneumosintes</i>	-	-					
	- <i>T. socranskii</i>							
3	- <i>P. nigrescens</i>	-	-	0,22	0,02	0,28	-	54,92
4	-	-	-	0,03	< 0,01	0,03	-	57,32
5	- <i>P. nigrescens</i>			4,12	2,17	0,25	-	63,99
	- <i>T. denticola</i>							
	- <i>P. endodontalis</i>	-	-					
	- <i>T. socranskii</i>							
6	-	-	-	3,01	0,06	0,18	-	55,85
7	- <i>P. endodontalis</i>	-	-	2,29	1,68	0,44	-	75,64
8	- <i>P. nigrescens</i>	-	-	1,74	3,27	0,58	-	36,74
9	- <i>P. nigrescens</i>	-	-	9,67	1,65	3,31	-	59,27
10	- <i>P. nigrescens</i>	-	-	0,09	0,40	0,06	-	418,72
11	- <i>P. nigrescens</i>			5,72	3,16	1,18	-	46,42
	- <i>P. endodontalis</i>	-	-					
	- <i>T. socranskii</i>							
12	- <i>P. nigrescens</i>			0,78	0,88	0,68	-	52,83
	- <i>P. endodontalis</i>	-	-					
13	- <i>T. denticola</i>			1,76	0,06	0,08	-	58,58
	- <i>P. endodontalis</i>	-	-					
	- <i>T. socranskii</i>							
14	- <i>T. denticola</i>			1,40	6,35	1,59	-	34,82
	- <i>P. endodontalis</i>	-	-					
	- <i>T. socranskii</i>							
15	- <i>P. nigrescens</i>	-	-	4,66	1,12	0,25	-	70,87
16	-	-	-	0,56	1,19	0,59	-	54,72
17	- <i>P. nigrescens</i>	-	-	0,28	0,06	0,01	-	85,30
18	- <i>P. nigrescens</i>	-	-	0,07	6,13	0,09	-	57,09
19	- <i>P. nigrescens</i>	-	-	1,07	2,26	0,15	-	43,05
20	- <i>P. nigrescens</i>			0,12	0,11	< 0,01	-	36,85
	- <i>T. socranskii</i>	-	-					
Mín - Máx	-	-	-	0,03 - 15,7	<0,01	<0,01	-	34,82
					6,35	3,31		418,73
Média - DP	-	-	-	2,68	1,56	0,51	-	72,71
				3,92	1,91	0,78		82,47
Mediana	-	-	-	1,24	1,00	0,25	-	55,39

6 DISCUSSÃO

6.1 Características clínicas

A seleção dos pacientes foi realizada neste estudo, levando-se em conta aumentar as chances de coleta microbiológica e de endotoxinas aderidas às limas endodônticas. Desta forma, foram escolhidos dentes portadores de necrose pulpar e lesão periapical, sem evidências clínicas ou radiográficas de lesão periodontal, de modo análogo a outros autores (Siqueira Jr. & Rôças, 2003b; Vianna, 2006; Martinho, 2007), pois de fato, desde o clássico experimento conduzido por Sunqvist (1976), trabalhos subsequentes têm corroborado a predominância de micro-organismos anaeróbios estritos em necroses pulpares (Griffie *et al.*, 1980; Yoshida *et al.*, 1987; Hashioka *et al.*, 1992; Gomes *et al.*, 1994a, 1996, 2006b; Baumgartner *et al.*, 1999; Villanueva, 2002), sendo que os Gram-negativos foram as bactérias-alvo deste estudo. Nos critérios deste experimento, foram excluídos os pacientes portadores de dor espontânea, diminuindo as chances de se abordar pacientes com quadro de abscesso periapical agudo, aumentando a probabilidade de manipulação do paciente com maior conforto, sem as intercorrências frequentes nesses casos, em sentido contrário ao proposto por Montagner (2010), quando aquele autor buscara coletar quadros de abscessos pulpares agudos.

Todo o protocolo utilizado que antecedeu a realização das coletas e a cirurgia de acesso, indo desde o bochecho inicial com solução de clorexidina, anestesia, polimento coronário, isolamento absoluto, antisepsia do campo operatório, análises microbianas da coroa dental, até os cuidados para a abertura da cavidade pulpar, são fases de um processo de coleta já descrito por vários autores (Vianna, 2006; Martinho & Gomes; 2008; Montagner, 2010), assegurando

que todo o material colhido fosse do interior do canal radicular, excluindo-se as chances de contaminação microbiana e de endotoxinas do meio externo.

A escolha do instrumento endodôntico recaiu sobre uma lima nº 15 de aço inoxidável, devido à possibilidade de esta ter podido realizar a penetração em toda a extensão de canais em todos os casos selecionados, padronizando assim esta etapa do experimento. Foram utilizadas limas endodônticas nº 15 (Flexicut CC+, VDW, GmbH, Munique, Alemanha). Estes instrumentos são fabricados em aço inoxidável, por torção de uma haste metálica piramidal triangular, oferecidos comercialmente nos comprimentos de 21 e 25 mm, com números de 15 a 40, com haste de corte helicoidal de conicidade de 0,02 mm. A ponta desse instrumento costuma se apresentar com a figura de um cone circular, extremidade pontiaguda e com curva de transição na base da ponta (Lopes & Siqueira Jr., 2010).

Neste estudo, a introdução da lima endodôntica nos canais, teve o intuito de se verificar aspectos fundamentalmente ligados à biossegurança, submetendo posteriormente as hastes dos instrumentos aos processos de esterilização frequentemente empregados em consultórios odontológicos e reiteradamente referenciados na literatura, quais sejam: a esterilização pelo calor seco, realizada pela estufa, também conhecida como forno de Pasteur (Neal *et al.*, 1983; Iverson *et al.*, 1985; Zettlemoyer *et al.*, 1989; Luper *et al.*, 1991; Estrela, 2004); ou pela esterilização utilizando-se o calor úmido sob pressão (Neal *et al.*, 1983; Iverson *et al.*, 1985; Palenik *et al.*, 1986; Morrison *et al.*, 1989; Zettlemoyer *et al.*, 1989; Luper *et al.*, 1991; Bruce *et al.*, 2000; Hilt *et al.*, 2000; Schäfer, 2002; Estrela, 2004; Lopes & Siqueira Jr, 2010; Venkatasubramanian *et al.*, 2010).

Os conteúdos endodônticos coletados na superfície das limas foram também utilizados para a detecção de bactérias-alvo, verificando a possibilidade de se colher material genético para análise de PCR a partir dos conteúdos das limas contaminadas, antes ou após esterilização. Neste aspecto, verifica-se que coletas microbianas de canais têm sido realizadas frequentemente a partir de cones de

papel estéreis, na grande maioria da literatura pesquisada (Bogen & Slots, 1999; Baumgartner *et al.*, 1999; Vianna, 2006; Jacinto *et al.*, 2005, Jacinto, 2007; Martinho, 2007; Martinho & Gomes, 2008). Contudo, o emprego de limas endodônticas também tem sido citado como possibilidade alternativa para coleta de micro-organismos (Lopes & Siqueira Jr., 2004), utilizando-se limas isoladamente ou limas associadas aos cones de papel para este fim (Siqueira Jr. & Rôças, 2004e).

6.2 Análises Microbiológicas

6.2.1 Detecção de micro-organismos Gram-negativos pelo método PCR simples

Sabe-se que as centenas de espécies já detectadas em canais radiculares estão organizadas em ecossistemas de algumas poucas unidades de espécies por canal (Rolph *et al.*, 2001; Munson *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2004; Aas *et al.*, 2005; Gomes & Montagner, 2010), onde predominam os anaeróbios estritos. Isto pode resultar em um grande número de possibilidades matemáticas, ainda que se tenha em mente que fatores ligados às relações ecológicas tenham de ser levados em consideração, posto que determinada espécie pode impedir ou estimular o crescimento de outras (Gomes *et al.*, 1994a).

O método molecular foi escolhido para este estudo, em função de suas várias vantagens apontadas pela literatura: detecção tanto das espécies cultiváveis quanto das não cultiváveis; são testes extremamente específicos e sensíveis, possibilitando detecção de espécies com comportamentos fenotípicos similares ou divergentes; detecção de micro-organismos a partir da coleta e sem

cultivo em laboratório; rápido diagnóstico; sua independência em relação à viabilidade do micro-organismo coletado; podendo ser utilizados, mesmo em pacientes submetidos à antibioticoterapia (Siqueira Jr. & Rôças, 2003d; Rôças, 2004; Rôças *et al.*, 2004a; Perea, 2004; Young *et al.*, 2007; Gomes & Montagner, 2010).

Neste trabalho, a escolha recaiu sobre o método PCR simples, no intuito de se verificar algumas possibilidades de detecção de micro-organismos Gram-negativos e possíveis correlações entre as espécies encontradas, empregando-se a região 16S do rDNA (DNA ribossômico, que é a sequência de DNA que codifica o RNA ribossômico - rRNA). Isso decorre em função de ser esta a mais utilizada durante os procedimentos que irão determinar qual a sequência ideal de um primer para uma determinada espécie, pelo fato de que esta região é a mais conservada do genoma das espécies bacterianas, não sendo encontrada na molécula de DNA dos eucariontes (Rôças, 2004).

Neste experimento só foi possível detectar micro-organismos nas coletas realizadas das limas não esterilizadas (Controle positivo). A esterilização das limas, tanto pelo calor seco quanto pela autoclave impossibilitaram a detecção do primer universal em todas as amostras, possivelmente pela destruição do material genético microbiano presente, inviabilizando a existência de “templates”.

Provavelmente, a ausência de detecção de bactérias a partir das limas dos grupos contaminados e posteriormente esterilizados deveu-se ao desarranjo do DNA presente sobre a superfície das limas, após sua exposição ao calor seco ou úmido, nas condições deste experimento. No entanto, parece importante enfatizar que os métodos PCR não são considerados como métodos adequados para testar se amostras microbianas estão viáveis, justamente pelo fato de que estes métodos têm a possibilidade de detectar material genético, mesmo após a morte das células (Young *et al.*, 2007).

Contudo, o método PCR 16S rDNA aqui empregado foi capaz de detectar bactérias, a partir dos corpos de prova contaminados e que não sofreram esterilização posterior (Controle positivo), muito embora nenhum meio de transporte tenha sido usado, confirmando assim a grande sensibilidade desse método. O fato de não ter sido utilizado meio de transporte foi escolhido porque a intenção foi de reproduzir as condições em que uma lima endodôntica contaminada é tratada no consultório odontológico antes de sua esterilização, além de permitir a extração de alíquotas advindas da lima, tanto para detecção molecular microbiana, quanto para a análise das endotoxinas presentes. Além disso, uma vez coletadas, as hastes das limas foram imediatamente congeladas a -80° C, proporcionando condições de conservação do DNA bacteriano.

Neste trabalho, buscou-se investigar a presença da bactéria *Prevotella nigrescens* (13 de 21, igual a 61,9% dos casos) sobre a superfície das limas. Esta tem sido frequentemente detectada por métodos moleculares a partir de canais necróticos (Siqueira Jr. *et al.*, 2001a; Rôças *et al.*, 2002; Rôças & Siqueira Jr., 2002; Gomes *et al.*, 2005), e foi o micro-organismo de maior prevalência detectado neste estudo, condição semelhante ao experimento conduzido por Baumgartner *et al.* (1999). Contudo, verifica-se que Bogen & Slots (1999), ao analisarem 20 canais humanos necróticos, não puderam detectar esta espécie nos casos estudados.

Quanto à detecção de *Porphyromonas endodontalis*, detectada sobre as limas endodônticas a partir de seis casos neste experimento (28,57%), esta tem sido verificada com relativa frequência por diversos autores (Makkar *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2000; Rôças *et al.*, 2002; Rôças & Siqueira Jr., 2002; Siqueira Jr. *et al.*, 2004b; Gomes *et al.*, 2005; Rôças *et al.*, 2006), e foi coincidentemente encontrada como a de segunda maior prevalência nos trabalhos realizados por Siqueira Jr. *et al.*, 2004b e Rôças *et al.*, 2006, quando empregaram o método PCR, enquanto Gomes *et al.* (2005) só conseguiram detectar essa espécie por método molecular, não obtendo êxito em isolá-la por cultura.

O número de casos onde foi detectada a espécie *Porphyromonas endodontalis* sobre limas contaminadas foi igual a seis (28,57%), idêntico ao número de casos onde o micro-organismo *Treponema socranskii* foi identificado. Utilizando-se o método PCR e “dot-blot hybridization”, Jung *et al.* (2001) encontraram *T. socranskii* em 2,7% dos 75 dentes necróticos que avaliaram, enquanto Baumgartner *et al.* (2003) obtiveram a detecção desta espécie pelo método PCR, como sendo a de maior prevalência em 54 casos assintomáticos, enquanto Rôças *et al.* (2003) detectaram-na em em 40,6% dos casos que analisaram pelo método “Nested PCR”.

Ao contrário dos resultados deste estudo, que apontaram a existência de *Treponema denticola* em 3 casos, correspondendo a 14,29% da amostra analisada, Jung *et al.* (2001) não detectaram esta espécie em nenhum caso ainda que tivessem empregado dois métodos moleculares distintos: o “dot-blot hybridization” e PCR.

Os resultados deste estudo são condizentes com os obtidos por Siqueira Jr. *et al.* (2002), Rôças *et al.* (2002), Rôças & Siqueira Jr. (2002), Baumgartner *et al.* (2003), Siqueira Jr. *et al.* (2004), Vianna *et al.* (2005) e Foschi *et al.* (2005), que encontraram *T. denticola* em números significativos de casos utilizando PCR simples, bem como foi possível detectar esta bactéria em estudos que empregaram o método “Nested PCR”, a exemplo dos achados de Rôças *et al.* (2003) e Rôças *et al.* (2006), sendo que Gomes *et al.* (2006a) puderam observar sua presença mais frequentemente em dentes portadores de lesões endodônticas primárias, quando a comparou com casos de insucesso de tratamento endodôntico. Tais resultados parecem justificar a proposta desses autores, qual seja a de incluir a *T.denticola* entre os patógenos endodonticos putativos, sobretudo *nos* casos de infecções primárias.

Este estudo conseguiu detectar por PCR 16S rDNA a espécie *Dialister pneumosintes* em um caso clínico (4,76%), de modo análogo ao realizado por

Siqueira Jr. *et al.* (2004), que a encontrou somente em um dos casos que analisou (4%), empregando método molecular idêntico deste experimento, mas coletando material do terço apical de raízes com cones de papel, depois que os dentes foram extraídos. Este micro-organismo já foi associado a quadros infecciosos endodônticos, principalmente após o aparecimento dos métodos moleculares (Siqueira Jr. & Rôças, 2004c, Rôças & Siqueira Jr., 2005a; Sakamoto *et al.*, 2006; Rôças *et al.*, 2006; Rôças & Siqueira Jr., 2006).

No mesmo caso clínico onde *D. pneumosintes* foi detectado neste trabalho, também foram encontradas as espécies *P. intermedia* e *T. socranskii*, embora nenhuma associação significativa tenha sido estabelecida.

Por outro lado, a associação de *D. pneumosintes* a outros micro-organismos já foi detectada (Siqueira Jr. & Rôças, 2003c), que a encontrou em correlação com pelo menos duas outras espécies alvo, tendo sido positivamente associada com *T. denticola*, *P. endodontalis*, *F. nucleatum*, *P. micros*, *C. rectus*, *P. intermedia*, *T. pectinovorum* e *T. vincentii*, enquanto associações negativas foram observadas com as espécies *T. forsythia* (então denominada *B. forsythus*), *P. gingivalis* e *Actinomyces israelii*.

A espécie *D. pneumosintes* já foi encontrada em casos de abscessos agudos de origem endodôntica (Rôças & Siqueira Jr., 2002; Rôças *et al.*, 2006; Siqueira Jr. & Rôças, 2009), sendo detectado por Rôças & Siqueira Jr. (2002) em 12 de 18 casos de pus aspirado de canais, usando o método “nested PCR”, enquanto Munson *et al.* (2002) detectaram uma nova espécie do gênero *Dialister* em todos os cinco casos de abscessos agudos por eles estudados, empregando o método 16S rDNA.

Em relação à espécie *Prevotella intermedia*, também detectada neste trabalho em somente um caso clínico (4,76%), verifica-se a existência de estudos que não foram capazes de localizar esta bactéria pelo método PCR, a partir de coletas em canais necróticos (Bogen & Slots, 1999; Rôças *et al.*, 2002; Rôças &

Siqueira Jr., 2002; Gomes *et al.*, 2005), embora alguns autores tenham conseguido identificá-la (Baumgartner *et al.*, 1999; Siqueira Jr. & Rôças, 2003b; Baumgartner *et al.*, 2004), ainda que em somente um caso clínico (Foschi *et al.*, 2005).

O método PCR empregado não foi capaz de detectar a espécie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em nenhum dos casos coletados neste estudo, de modo semelhante ao relatado por Blome *et al.* (2008), que empregaram “Real time” PCR. De fato, embora este micro-organismo seja considerado como um dos mais importantes patógenos ligados às doenças periodontais, esta é uma espécie considerada rara em canais radiculares (Dahlén, 2009).

Porphyromonas gingivalis também não foi detectada em nenhum dos casos clínicos deste experimento. Bogen & Slots (1999) consideram-na como uma espécie infrequente em canais radiculares, embora outros autores a tenha localizado com expressiva prevalência por métodos moleculares (Jung *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2001; Rôças *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2007).

Não houve detecção da espécie *Tannerella forsythia* neste trabalho, bactéria de maior prevalência encontrada por Siqueira Jr. *et al.* (2000), em 28 casos, tendo sido também encontrada 65,2% dos casos analisados por Sassone *et al.* (2007).

Este estudo não localizou *Prevotella tannerae* em qualquer caso, enquanto esta bactéria foi detectada em 60% dos 118 casos do estudo conduzido por Xia *et al.* (2000).

Seguindo o raciocínio desenvolvido no início deste tópico, levando-se em conta o campo matemático da análise combinatória, há uma enorme quantidade de combinações de bactérias em um único canal, consideradas as centenas de espécies já identificadas e a pequena quantidade de micro-

organismos presentes em um só conduto, ainda que estas possibilidades não sejam meramente aleatórias, e sim fruto da interação dos micro-organismos em ecossistemas (Gomes *et al.*, 1994a, Gomes *et al.*, 1994b). Portanto, são inúmeras as possíveis combinações de micro-organismos existentes, o que pode explicar as diferenças entre as prevalências microbianas dos resultados encontrados neste estudo com os demais trabalhos consultados. Além disso, cabe uma vez mais lembrar a diferença no método na coleta, aqui realizada com as limas endodônticas e não com cones de papel.

6.2.2 Correlação entre micro-organismos

A verificação da correlação existente entre micro-organismos presentes em canais radiculares tem sido examinada por diversos autores (Gomes *et al.*, 1996; Jacinto, 2002; Jung *et al.*, 2000), já que se sabe que micro-organismos atuando em determinado ecossistema podem agir de modo associado, potencializando sua patogenicidade (Gomes *et al.*, 1994a).

A possibilidade de estabelecer correlações motivou a verificação desta possibilidade entre as bactérias detectadas neste estudo a partir da superfície das limas, conseguindo-se identificar associações entre *P. endodontalis* / *T. denticola* e *T. denticola* / *T. socranskii*.

Verifica-se que há trabalhos em que associações positivas puderam ser detectadas, tais como nos trabalhos de: Jung *et al.* (2000) – para *B. forsythus*/*P. gingivalis* e *Treponema sp.*/*P. gingivalis* - e Jung *et al.* (2001) – para *T. maltophilum*, *B. forsythus* e *P. gingivalis*, que pesquisaram alguns micro-organismos que também foram alvo deste estudo, sem que, contudo, as mesmas associações tenham sido identificadas. Oportuno observar o estudo de Rôças *et*

al. (2002), que observaram a associação entre as bactérias *B. forsythus* / *P. gingivalis*, *B. forsythus* / *P. endodontalis*, *P. endodontalis* / *P. gingivalis* e *B. forsythus* / *T. denticola*, sem referências a análises estatísticas.

6.3 Endotoxinas

6.3.1 Quantificação de endotoxinas presentes sobre as limas

Neste estudo, em que se procurou detectar as endotoxinas carreadas pelas limas endodônticas, a presença inicial de endotoxinas pôde ser detectada em 100% das 20 limas contaminadas e sem esterilização posterior, e também preponderantemente (95%) após os processos de esterilização, tanto pela autoclave, quanto pela estufa. O resultado na mensuração da quantidade de endotoxinas sobre a superfície das limas endodônticas introduzidas nos canais, confirmou a hipótese de que este subproduto bacteriano estaria presente em abundância nos casos clínicos selecionados, e que esta ficaria aderida à superfície dos instrumentos empregados.

Quando a análise estatística para avaliar a redução das endotoxinas após os processos de esterilização pela autoclave e estufa foi realizada, os resultados deste estudo demonstraram que os dois métodos de esterilização empregados não foram efetivos em reduzir a quantidade de endotoxinas sobre a superfície de limas contaminadas após seu uso em canais necróticos, pois não se pôde estabelecer diferença na redução pelos dois métodos, corroborando a já consagrada necessidade de que a inativação de endotoxinas deva ser feita realizada por intermédio de protocolos específicos para este fim (Jacinto *et al.*, 2005; Lipscomb *et al.*, 2006; Martinho & Gomes, 2008; Gomes *et al.*, 2009).

Esta observação parece clinicamente relevante porque demonstra a possibilidade de que endotoxinas possam ser carregadas de um canal radicular a outro e até mesmo entre pacientes quando limas contaminadas são reutilizadas, ainda que esterilizadas por estufa ou autoclave, principalmente se houver falha no seu processo de limpeza prévia à esterilização.

Miyamoto *et al.*, (2009) lembram que se faz necessário usar métodos que assegurem a despirogenização e esterilização de produtos que serão empregados em seres humanos. Existem protocolos conhecidos para inativar endotoxinas, de acordo com as normas das Farmacopeias Internacionais.

O procedimento para despirogenização das limas, brocas e recipientes empregados neste estudo envolveu a sua esterilização em calor seco, em estufa por um período de tempo de 4 horas a 200°C. Este protocolo é o empregado em diversos outros trabalhos semelhantes (Jacinto, 2002; Martinho, 2007).

No entanto, Lipscomb *et al.* (2006) não detectaram a presença de endotoxinas em nenhum dos 260 instrumentos que pesquisaram, os quais foram coletados anonimamente depois de esterilização convencional em serviços hospitalares britânicos, monitorando as endotoxinas usando um marcador “dansylated polymyxin B fluorochrome”. Da mesma forma, Silva *et al.* (2007) não conseguiram mensurar endotoxinas sobre limas previamente contaminadas com endotoxinas por imersão em uma solução com concentração conhecida de endotoxinas de *E. coli* (25 ng/ml, o correspondente a 125 EU/ml). O teste quantitativo empregado no estudo de Silva *et al.* (2007) foi o QCL® test, cuja faixa de detecção vai de 5×10^{-4} a 50 UE/ml. No estudo anteriormente realizado, Silva *et al.* (2007) avaliaram a presença de endotoxinas em limas endodônticas, fazendo-o depois de contaminação *in vitro* com uma quantidade previamente conhecida, e em seguida submetendo as limas à esterilização pelo calor seco ou úmido, ou ainda com imersão prévia em Ca(OH)_2 . Aqueles autores não encontraram níveis mensuráveis de endotoxinas, embora afirmando emprego de

teste com sensibilidade de 0,005 EU/mL, portanto superior ao teste turbidimétrico empregado neste estudo, de sensibilidade de 0,01 UE/mL. As diferenças de resultado podem ter ocorrido pelas condições experimentais deste trabalho, onde as endotoxinas foram coletadas *in vivo* e assim misturadas a outros conteúdos dos canais radiculares, o que pode ter interferido com a ação dos meios de esterilização empregados.

Para quantificar as endotoxinas neste estudo, foi empregado um método LAL turbidimétrico, ou seja, cuja leitura é baseada na turbidez das amostras após a reação. O teste LAL é considerado como uma maneira simples e objetiva de detectar a presença de endotoxinas, a partir de soluções aquosas. De acordo com o catálogo do fabricante do Pyrogen – 5000, este se trata de um ensaio quantitativo e cinético para a detecção de endotoxinas provenientes de bactérias Gram-negativas, onde uma amostra é misturada com o reagente reconstituído de LAL, colocada em espectrofotômetro de incubação, e monitorada automaticamente com auxílio de um software (WinKQCL) em relação à aparência de sua turbidez. Segundo o fabricante, o teste Pyrogen - 5000 é adequado para os laboratórios que precisam processar um grande número amostras, a partir de amostras de água, grandes volumes de líquido parenteral ou água proveniente de equipamentos médicos, possibilitando uma escala de sensibilidade de 0,01 a 100 UE/mL.

O método de esterilização pelo calor úmido sob pressão – autoclavagem – tem sido verificado há muitos anos como o preferentemente indicado (Palenik *et al.*, 1986).

Existe preocupação sobre as possíveis alterações sobre instrumentos odontológicos submetidos ao calor, notadamente sobre sua superfície cortante (Stach *et al.*, 1995) e os efeitos das técnicas de esterilização na tensão dos instrumentos endodônticos já foram testados por Younis (1977), que não detectaram alterações mensuráveis após as limas e alargadores terem sido submetidas a autoclavagem, calor seco ou esterilização pelo sal aquecido.

(Engelhardt *et al.*, 1984). No entanto, não foram encontrados trabalhos na literatura verificando possíveis alterações nos instrumentos após protocolos de despirogenização. Um estudo neste sentido pode ser realizado, a fim de verificar se há prejuízos mensuráveis à sua integridade, após serem submetidas à despirogenização pelo calor seco.

O calor seco tem sido mais recentemente recomendado somente para os casos em que a esterilização pelo calor úmido possa trazer danos ao material (por exemplo, para brocas e determinados instrumentos ortodônticos), por se tratar de um processo mais demorado, com necessidade de uma maior temperatura, que também acaba sendo não sendo possível de se empregar em outros tipos de instrumentos ou aparelhos (Centers for Disease Control and Prevention, 2003).

Os métodos de esterilização empregados neste trabalho (autoclave e estufa) foram escolhidos por serem classicamente aplicados em consultórios odontológicos em todo o mundo (Zettlemoyer *et al.*, 1989; Palenick & Golden, 1994; Stach *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1997). Além disso, havia a possibilidade de o ciclo de esterilização pela estufa poder levar à despirogenização, conforme trabalho publicado por Silva *et al.* (2007).

É verdade que a esterilização pela autoclave tem sido mais enfatizada nos últimos anos (Morrison & Conrod, 2009), em detrimento do emprego da estufa de calor seco, uma vez que esta tem o inconveniente de permitir uma interrupção indesejável do ciclo de esterilização, com uma perda considerável da margem de segurança. Por isso, a estufa tem sido recomendada internacionalmente em situações específicas, tais como para a esterilização de óleos na área médica e para alguns tipos de brocas e alicates ortodônticos na Odontologia (Brasil, 2006).

Ao ser realizada a revisão de literatura para este estudo sobre métodos de esterilização usados em limas endodônticas, encontrou-se a descrição de um aparelho conhecido como esterilizador de bolinhas de vidro, nos quais também se

pode usar o sal aquecido como substituto às bolinhas de vidro Engelhardt *et al.*, 1984). Verifica-se que esses aparelhos caíram em desuso em razão de sua ação esterilizadora não ser efetiva (Windeler & Walter; 1975; Dayoub & Devine, 1976; Fahid & Taintor, 1984; Venkatasubramanian *et al.*, 2010).

O Órgão americano de controle de fármacos e alimentos - FDA - recomenda que o nível máximo de endotoxinas em materiais médicos descartáveis seja de 0,5 EU/mL, e de 0,06 EU/ml para os que entram em contato com o fluido cerebroespinal (Fukumori 2008; Miyamoto *et al.*, 2009).

Neste experimento, as limas contaminadas não esterilizadas, esterilizadas pelo calor seco e autoclavadas, demonstraram valores máximos de 15,7, 6,35 e 3,31 EU/mL, respectivamente, valores em várias vezes superiores aos estabelecidos pelo FDA.

Este estudo detectou níveis detectáveis de endotoxinas nos grupos onde as limas foram introduzidas em canais radiculares portadores de infecções primárias. Este resultado é compatível com estudos de canais radiculares necróticos onde os níveis de endotoxinas foram medidos a partir de coletas feitas com cone de papel (Jacinto *et al.*, 2005; Martinho & Gomes, 2008; Gomes *et al.*, 2009).

Porém, analisando os níveis de endotoxinas mensurados das limas sucessivamente introduzidas em um mesmo canal, verifica-se não haver um padrão linear dos valores absolutos auferidos de cada canal pesquisado. É importante ressaltar que este experimento foi realizado a partir de coletas clínicas, onde a padronização para a coleta não se deu por tempo de introdução no canal (como é feito com cones de papel), mas sim pela inspeção visual da haste da lima contaminada. Esta decisão foi tomada por se priorizar neste experimento os aspectos ligados à esterilização dos instrumentos, e não propriamente por se ter a intenção de mensurar os níveis de endotoxinas dos canais. Assim, explica-se a possibilidade de um maior ou menor nível de endotoxinas ter sido coletado pela

lima em cada coleta e também em função das diferentes condições anatômicas e patológicas de cada canal, ainda que se tenha buscado padronizar o método da coleta.

Uma forma usual de tratamento de limas endodônticas antes de sua esterilização em consultórios odontológicos é a limpeza do instrumental com água, coadjuvada com substâncias químicas e auxílio de esponjas, escovas, gaze (Fahid & Taintor, 1984; Murgel *et al.*, 1990) e/ou algum tipo de aparelho de limpeza ou banho ultrassônico (Eames *et al.*, 1982; Palenik *et al.*, 1986; Spolyar *et al.*, 1986; Cafruny *et al.*, 1995; Carmo, 1996; Burkhart & Crawford, 1997; Bettner *et al.*, 1998; Chiesa, 2003; Assaf *et al.*, 2008; Centers for Disease Control and Prevention, 2003; Aasim *et al.*, 2006).

Neste experimento, propositadamente, nenhuma limpeza antes da esterilização foi realizada, no intuito de se obter o máximo de contaminação possível das limas e uma grande quantidade de sujidade sobre sua superfície metálica. A decisão de não se limpar as limas previamente foi tomada, a fim de se tentar padronizar ao máximo a quantidade de sujidade sobre a parte ativa dos instrumentos empregados. Contudo, vale ressaltar que este procedimento é diferente do que se preconiza para reutilização de limas, mas foi aqui empregado por se acreditar que tal fato possa ocorrer com relativa frequência na rotina de limpeza, esterilização e reutilização de instrumentos em serviços de saúde, já que foram encontrados alguns estudos onde foi verificada a permanência de sujidade sobre a superfície de instrumental médico ou odontológico reutilizado nos serviços pesquisados (Palenik *et al.*, 1986; Rabelo *et al.*, 2001; Letters *et al.*, 2005; Lipscomb, 2006; Morrison & Conrod; 2009).

Nos últimos anos, protocolos para limpeza e esterilização de instrumentos cirúrgicos e pérfuro-cortantes têm sido reavaliados (Lipscomb *et al.*, 2006). O Departamento de Saúde Britânico, por exemplo, recomendou que os cirurgiões-dentistas do Reino Unido utilizem limas e alargadores endodônticos como material de uso único e descartável. Isto decorre principalmente como

prevenção da transmissão da variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (Aasim *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 2007).

Os resultados deste trabalho sugerem que níveis expressivos de endotoxinas podem ser transmitidos de um paciente para outro, a partir de limas contaminadas que não tenham sido limpas, ainda que estas estejam esterilizadas. No entanto, um protocolo de despirogenização de limas poderia ser implementado de modo relativamente simples, eliminando este fator de contaminação.

6.3.2 Expressão da citocina IL-1 β

Após verificar a presença de endotoxinas mensuráveis nos grupos onde as limas contaminadas foram submetidas à esterilização pela autoclave ou estufa, os conteúdos endodônticos das superfícies das limas esterilizadas por esses dois métodos foram utilizados na estimulação de macrófagos murinos *in vitro*, verificando-se os níveis da citocina IL-1 β produzidos, buscando-se assim atestar a possibilidade do material colhido ser estímulo à resposta inflamatória das células de defesa do organismo, embora tenha sido esterilizado. Os resultados apontaram que somente os conteúdos provenientes das limas autoclavadas foram capazes de estimular a produção de IL-1 β em níveis mensuráveis.

Cabe aqui enfatizar que todo o conteúdo endodôntico extraído das limas endodônticas utilizadas e esterilizadas foi empregado neste experimento, e não apenas as endotoxinas ali presentes, o que impede inferir sobre o efeito exclusivo das endotoxinas na estimulação da produção de IL-1 β mensurada, já tendo sido lembrado que várias são as substâncias que podem ter estimulado essa resposta pelos macrófagos além das endotoxinas presentes, indo desde outras citocinas, passando pelos produtos de degradação da polpa dentária, até

proteínas, carboidratos ou lipídios de origem bacteriana, conforme enfatizado por Nair (2004).

Por outro lado, o teste realizado para a mensuração de IL-1 β somente foi capaz de detectar resposta celular no grupo onde os conteúdos endodônticos foram autoclavados, não havendo IL-1 β mensurável estimulada pelos conteúdos endodônticos esterilizados a seco por 170°C em uma hora. Uma possibilidade a ser levantada poderia ser de que o calor seco pudesse ter diminuído o potencial inflamatório do conteúdo presente, dentro das condições experimentais aqui apresentadas.

A conjugação dos dados com o preconizado em relação às endotoxinas demonstra que os níveis de endotoxinas detectados não são considerados seguros para os padrões de biossegurança internacionais (Fukumori, 2008).

Conquanto os métodos de esterilização empregados nas ciências da saúde estejam consagrados como eficazes na morte dos micro-organismos mesmo em suas formas esporuladas, os resultados deste experimento sugerem que expressivos níveis de conteúdos endodônticos com potencial inflamatório - mormente endotoxinas - podem ser transferidos de um paciente a outro, sendo inoculados por intermédio de limas endodônticas reutilizadas sem terem sido limpas, ainda que tenham sido esterilizadas.

Uma linha de pesquisa em busca de mais evidências nesse sentido pode ser levada a efeito, a fim de embasar as conclusões de ser ter a concreta necessidade da adoção de um protocolo de despirogenização, tais como os apontados neste estudo, os quais poderiam ser aplicados com relativa facilidade aos instrumentos endodônticos, na procura da eliminação deste fator de contaminação. Por outro lado, estudos futuros poderão se juntar aos demais questionamentos atualmente existentes quanto ao emprego de limas endodônticas como material de uso único, verificando-se a indicação de emprego de limas endodônticas estéreis e apirogênicas descartáveis.

7 CONCLUSÕES

Dentro das condições experimentais do presente estudo e com base nos seus resultados, pôde-se concluir que:

1. Não foi detectado DNA bacteriano (método PCR 16s rDNA), a partir das amostras submetidas aos métodos de esterilização pela autoclave ou estufa. DNA de Bactérias-alvo foi detectado somente a partir da superfície das hastes de limas endodônticas contaminadas *in vivo* e não esterilizadas. Por outro lado, os métodos de esterilização empregados não foram capazes de eliminar as endotoxinas presentes sobre as hastes de limas contaminadas, não havendo diferenças significativas entre os níveis de endotoxinas encontrados entre as amostras contaminadas sem esterilização, ou quando submetidas à estufa ou autoclave;

2. Dentre os micro-organismos alvo pesquisados, advindos da superfície das hastes de limas endodônticas contaminadas e não esterilizadas, a espécie bacteriana mais frequentemente detectada pelo método PCR (16S rDNA) foi *Prevotella nigrescences*, seguida de *Porphyromonas endodontalis* e *Treponema socranskii*, *Treponema denticola*, *Dialister pneumosintes* e *Prevotella intermedia*, sendo verificada correlação positiva entre as espécies *Porphyromonas endodontalis* e *Treponema denticola*, e desta última com *Treponema socranskii*;

3. Não houve produção de níveis mensuráveis de IL-1 β por macrófagos murinos, a partir das amostras da superfície das hastes metálicas de limas contaminadas *in vivo* e esterilizadas pela estufa, ao passo que as amostras das hastes contaminadas e autoclavadas estimularam os macrófagos a produzirem esta citocina.

REFERÊNCIAS*

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(1): 5721-32.
2. Aasim SA, Mellor AC, Qualtrough JE. The effect of pre-soaking and time in the ultrasonic cleaner on the cleanliness of sterilized endodontic files. *Int Endod J.* 2006; 39(2): 143-9.
3. Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J.* 1998; 31(1): 39-47.
4. Adrian JC, Gross A. A new method of sterilization: The carbon dioxide laser. *J Oral Pathol.* 1979; 8(1): 60-1.
5. Assaf M, Mellor AC, Qualtrough AJE. Cleaning endodontic files in a washer disinfectant. *Br Dent J.* 2008; 204(10): 1-4.
6. Ataoğlu T, Ungör M, Serpek B, Haliloğlu S, Ataoğlu H, Ari H. Interleukin-1- β and tumour necrosis factor- α levels in periapical exudates. *Int Endo J.* 2002; 35(2): 181-5.
7. Barthel CR, Levin LG, Reiser HM, Trope M. TNF- α release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endo J.* 1997; 30(3): 155-9.
8. Bates DW, Parsonnet J, Ketchum PA, Miller EB, Novitsky TJ, Sands K. Limulus Amebocyte Lysate Assay for Detection of Endotoxin in Patients with Sepsis Syndrome. *Clin Infect Dis.* 1998; 27(3): 582–91.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas nas normas do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

9. Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod.* 1999; 25(6): 413-5.
10. Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections. *J Endod.* 2003; 29 (12): 794-7.
11. Baumgartner JC, Siqueira Jr. JF, Xia T, Rôças IN. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using Polymerase Chain Reaction. *J Endod.* 2004; 30(3): 141-4.
12. Bentley EM. The value of ultrasonic cleaners in dental practice. *Br Dent J* 1994; 177(2): 53-6.
13. Bettner MD, Beiswanger MA, Miller CH, Palenik CJ. Effect of ultrasonic cleaning on microorganisms. *Am J Dent.* 1998; 11(4): 185-8.
14. Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23(5): 384–90.
15. Bogen G, Slots J. Black pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. *Int Endo J.* 1999; 32(3): 204-10.
16. Bourvis N, Boelle P-Y, Cesbron J-Y, Valleron A-J. Risk assessment of transmission of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease in endodontic practice in absence of adequate prion inactivation. *PLoS One.* 2007; 2(12): 1-7.
17. Boyd KS, Sonntag KD, Crawford JJ. Efficacy of sterilization of endodontic files after autoclaving in a synthetic sponge. *Int Endod J.* 1994; 27(6): 330-3.
18. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Serviços odontológicos: Prevenção e Controle de Riscos. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

19. Burkhart NW, Crawford J. Critical steps in instrument cleaning: removing debris after sonication. *J Am Dent Assoc.* 1997; 128(4): 456-63.
20. Carmo AMR. Estudo comparativo de diferentes métodos de limpeza de limas endodônticas sob microscopia eletrônica de varredura [tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1996.
21. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Infection Control in Dental Health-Care Settings. 2003: 52-3.
22. Chalmers NI, Palmer Jr RJ, Du-Thumm L, Sullivan R, Shi W, Kolenbrander PE. Use of quantum dot luminescent probes to achieve single-cell resolution of human oral bacteria in biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(2): 630-6.
23. Chan S, Mohammed N, Dobeck JM, White RR, Socransky SS, Skobe Z. Evaluation of the Whole Genome DNA-DNA hybridization technique to identify bacteria in histological sections of periradicular lesions. *J Endo.* 2004; 30(7): 518-22.
24. Chen T, Yu W-H, Izard J, Baranova OV, Lakshmanan A, Dewhirst FE. The human oral microbiome database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database* 2010; [acesso 2010 Sep 3]. Disponível em: <http://www.database.oxfordjournals.org/cgi/reprint/2010/0/baq013>.
25. Chiesa WMM. Análise quantitativa da sujidade de limas endodônticas de níquel-titânio movidas a motor, com variação do tempo de uso e após limpeza e esterilização: Estudo à luz da computação gráfica aplicada à microscopia eletrônica de varredura. [Dissertação]. Campinas: CPO SL Mandic; 2003.
26. Cohen S, Hargreaves KM. Caminhos da polpa. Rio de Janeiro: Elsevier, 9ª ed. 2007; 188: 552-90.

27. Constant CA, Ferreira PB, Valadas E, Antunes F. Tuberculose multirresistente. *Acta Med Port.* 2004; 17(2): 157-66.
28. Coil J, Tam E, Waterfield JD. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan. *J Endod.* 2004; 30(2): 88-91.
29. Cook J, Nandakumar R, Fouad AF. Molecular and culture-based comparison of the effects of antimicrobial agents on bacterial survival in infected dentinal tubules. *J Endod.* 2007; 33(6): 690–2.
30. Curson I. Endodontic techniques. VI. Root canal instruments and their sterilisation. *Br Dent J.* 1966; 121(6): 289-94.
31. Dahlén G, Magnusson BC, Moller A. Histological and histochemical study of the influence of lipopolysaccharide extracted from *Fusobacterium nucleatum* on the periapical tissues in the monkey *Macaca fascicularis*. *Arch Oral Biol.* 1981; 26(7): 591-8.
32. Dahlén G. Culture-based analysis of endodontic infections. In: Fouad AF. *Endodontic microbiology.* Ames: Wiley-Blackwell; 2009. p.115.
33. Dayoub MB, Devine MJ. Endodontic dry-heat sterilizer effectiveness. *J Endod.* 1976; 2(11): 343-4.
34. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer Jr RJ *et al.* Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Environ Microbiol.* 2006; 72(4): 2837-48.
35. Dymock D, Weightman AJ, Scully C, Wade WG. Molecular Analysis of Microflora Associated with dentoalveolar abscesses. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(3): 537-42.

36. Engelhardt JP, Grun L, Dahl HJ. Factors affecting sterilization in glass bead sterilizers. *J Endod.* 1984; 10(10): 465-70.
37. Estrela C. Controle de infecção em Endodontia. In: *Ciência endodôntica*. São Paulo: Artes Médicas; 2004. v. 1. p. 267-313.
38. Eames WB, Bryington SQ, Suway NB. A comparison of eight ultrasonic cleaners. *Gen Dent.* 1982; 30(3): 242-5.
39. Fahid A, Taintor JF. The influence of file size, cleaning, and time on effectiveness of bead sterilizers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1984; 58(4): 443-5.
40. Farber PA, Seltzer S. Endodontic microbiology. 1. Etiology. *J Endod* 1988; 14(7): 363-71.
41. Ferreira RA. Barrando o invisível. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 1995; 49(6): 417-58.
42. Fortes LAR, Villela LC. Efeitos do laser dióxido de carbono (CO₂) sobre os tecidos dentários. *Rev biociênc.* 2000; 6(1): 29-34.
43. Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20(5): 289-95.
44. Fouad AF, Acosta AW. Periapical lesion progression and cytokine expression in an LPS hyporesponsive model. *Int Endo J.* 2001; 34(7): 506-13.
45. Fouad AF, Zerella J, Barry J, Spangberg LS. Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99(1):112-8.

46. Fukumori NTO. Determinação de endotoxina bacteriana (pirogênio) em radiofármacos pelo método de formação de gel. Validação. [Dissertação]. São Paulo: IPEN/CNEN-SP; 2008.
47. Gatti JJ, Dobeck JM, Smith C, White RR, Socransky SS, Skobe Z. Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA-DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol*. 2000; 16(5): 197–204.
48. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endo J*. 1994a; 27(6): 291-8.
49. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Positive and negative associations between bacterial species in root canals. *Microbios*. 1994b; 80(325): 231-43.
50. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Garrido FD, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. *J Endod*. 2002; 28(11): 758-61.
51. Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET., Sousa EL, Zaia AA., Ferraz CC. *et al.* Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas endodontalis, Prevotella intermedia and Prevotella nigrescens in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol*. 2005; 20(4): 211-5.
52. Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz C, *et al.* Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod*. 2006a; 32(10): 937-40.
53. Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endo J*. 1996; 29(4): 235-41.

54. Gomes BPFA, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod.* 2009; 35(10): 1350-3.
55. Gomes BPFA, Montagner F. O papel do diagnóstico molecular no estudo das infecções de origem endodôntica: conceitos, técnicas e aplicações. In: Ferrari PHP & Bombana AC. *A infecção endodôntica e sua resolução.* 2010. P São Paulo: Santos; 2010. p. 23-45.
56. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19(2): 71-6.
57. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, Zaia AA, Souza-Filho, FJ; FERRAZ, CCR. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod.* 2006b; 102(2): 247-53.
58. Griffiee MB, Patterson SS, Miller CH, Kafrawy AH, Newton CW. The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod* 1980; 50(5): 457-61.
59. Guandalini SL. Esterilização em odontologia. In: *Biossegurança em odontologia.* 2.ed. Curitiba: Odontex; 1999. p.74-97.
60. Gureckis KM, Burgess JO, Schwartz RS. Cutting effectiveness of diamond instruments subjected to cyclic sterilization methods. *J Prosthet Dent.* 1991; 66(6): 721-6.
61. Haapasalo M. *Bacteroides* spp. in dental root infections. *Endod Dent Traumatol.* 1989; 5(1): 1-10.

62. Hashioka K, Yamasaki M, Nakane A, Horiva N, Nakamura H. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. *J Endod.* 1992; 18(11): 558-61.
63. Hilt BR, Cunningham JC, Shen C, Richards N. Torsional properties of stainless-steel and nickel-titanium files after multiple autoclave sterilizations. *J Endod.* 2000; 26(2): 76-80.
64. Hooks TW, Adrian JC, Gross A, Bernier WE. Use of the carbon dioxide laser in sterilization of endodontic reamers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1980; 49(3): 263-5.
65. Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991; 71(4): 492-5.
66. Horiba N, Maekawa Y, Yamauchi Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Complement activation by lipopolysaccharides purified from Gram-negative bacteria isolated from infected root canals. *Oral Surg.* 1992; 74(5): 648-51.
67. Hurley JC. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8(2): 268-92.
68. Hurtt CA, Rossman LE. The sterilization of endodontic hand files. *J Endod* 1996; 22(6): 321-2.
69. Ito HO, Shuto T, Takada H, Koga T, Aida Y, Hirata M, Koga T. Lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* promote osteoclastic differentiation in vitro. *Arch Oral Biol.* 1996; 41(5): 439-44.

70. Iverson, GW, Von Fraunhofer JA, Herrmann, JW. The effects of various sterilization methods on the torsional strength of endodontic files. *J Endod.* 1985; 11(6): 266-8.
71. Jacinto RC. Análise microbiológica e suscetibilidade antimicrobiana de alguns microrganismos isolados de canais radiculares infectados associados às lesões periapicais. [Dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2002.
72. Jacinto RC. Relação da sintomatologia com a presença de microrganismos e endotoxinas em canais radiculares com necrose e suscetibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias estritas. [Tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2007.
73. Jacinto RC, Gomes BPF, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol.* 2005; 54(8): 777-83.
74. Johnson MA, Primack PD, Loushine RJ, Craft DW. Cleaning of endodontic files, Part I: The effect of bioburden on the sterilization of endodontic files. *J Endod.* 1997; 23(1): 32-4.
75. Jung IY, Choi B, Kum KY, Yoo YJ, Yoon TC, Lee SJ, Lee CY. Identification of oral spirochetes at the species level and their association with other bacteria in endodontic infections. *J Endod.* 2001; 92(3): 329-34.
76. Jung IY, Choi BK, Kum KY, Roh BD, Lee SJ, Lee CY, Park DS. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *J Endod.* 2000; 26(10): 599-604.

77. Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91(5): 587-93.
78. Ko HJ, Lim SS. Production of macrophage inflammatory protein (MIP) - 1 α and MIP-1 β by human polymorphonuclear neutrophils stimulated with *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *J Endod.* 2002; 28(11): 754-7.
79. Kuritani RH, McDonald NJ, Sydiskis RJ. Effect of sterilization on contaminated sponges. *J Endod.* 1993; 19(2): 68-70.
80. Lester KS, Mitchell PT. An evaluation by scanning electron microscopy of small dental cutting instruments through use and cleaning. *Aust Dent J.* 1990; 35(1): 1-13.
81. Letters S, Smith AJ, McHugh S, Bagg J. A study of visual and blood contamination on reprocessed endodontic files from general dental practice. *Br Dent J.* 2005; 199(8): 522-5.
82. Lipscomb IP, Sihota AK, Keevil CW. Comparative study of surgical instruments from sterile-service departments for presence of residual Gram-negative endotoxin and proteinaceous deposits. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(10): 3728-33.
83. Lopes HP, Siqueira Jr. JF. *Endodontia Biologia e técnica.* 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
84. Lopes HP, Siqueira Jr. JF. *Endodontia Biologia e técnica.* 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

85. Lourenço FR, Kaneko TM, Pinto TJA. Estimativa da incerteza em ensaio de detecção de endotoxina bacteriana pelo método de gelificação. *Braz J Pharm Sci* 2005; 41(4): 437-43.
86. Luderitz O, Galanos C, Rietschel ET. Endotoxin of Gram-negative bacteria. *Pharmacol Ther*. 1981; 15(3): 383-402.
87. Luper WD, Eichmiller FC, Doblecki W, Campbell D, Li SH. Effect of three sterilization techniques on finger pluggers. *J Endod*. 1991; 17(8): 361-3.
88. Machado RL. Despirogenização de soluções de imunoglobulina G humana: adsorção de endotoxinas em membrana de quitosana. [Dissertação]. Campinas: UNICAMP; 2003.
89. Madsen AM, Hansen VM, Nielsen SH, Olsen TT. Exposure to dust and endotoxin of employees in cucumber and tomato nurseries. *Ann Occup Hyg*. 2009; 53(2): 129-38.
90. Maitra SK, Nachum R, Pearson FC. Establishment of beta-hydroxy fatty acids as chemical marker molecules for bacterial endotoxin by gas chromatography-mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 1986; 52(3): 510-4
91. Makkar S, Nissan R, Wilkinson D, Sela M, Stevens R. *Porphyromonas endodontalis* and symptoms from teeth with endodontic infections. *J Endod* 1999; 25(4): 283.
92. Martinho FC. Análise microbiológica, quantificação de endotoxinas de dentes com infecções endodônticas primárias e suscetibilidade antimicrobiana [Dissertação]. Campinas: UNICAMP; 2007.

93. Martinho FC. Estudo microbiológico e de endotoxinas de canais radiculares com infecções endodônticas primárias e avaliação da antigenicidade do conteúdo endodôntico contra macrófagos na produção de citocinas pró-inflamatórias. [Tese]. Campinas: UNICAMP; 2011.
94. Martinho FC, Gomes, BPFA. Quantification of Endotoxins and Cultivable Bacteria in Root Canal Infection before and after Chemomechanical Preparation with 2.5% Sodium Hypochlorite. J. Endod. 2008; 34(3):268-72.
95. Medeiros PJ, Tinoco E, Uzeda M. Avaliação de quatro métodos para esterilização de instrumentos de Odontologia. Rev Bras Odontol. 1990; 47(2): 30-2.
96. Meurman J. Oral microbiota and cancer. J Oral Microbiol. 2010; 2: 5195- 61 [acesso 2010 Set 13]. Disponível em <http://www.journaloforalmicrobiology.net/index.php/jom/article/view/5195/5861>.
97. Mitchell BF, James GA, Nelson RC. The effect of autoclave sterilization on endodontic files. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1983; 55(2): 204-7.
98. Miyamoto T, Okano S, Kasai N. Inactivation of *Escherichia coli* endotoxin by soft hydrothermal processing. Appl Environ Microbiol. 2009; 75(15): 5058-63.
99. Molander A, Lundquist P, Papapanou PN, Dahlén G, Reit C. A protocol for polymerase chain reaction detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from the root canal. Int Endod J. 2002; 35(1): 1-6.
100. Möller AJR. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth: methodological studies. Odontol Tidskr. 1966; 74(5): 1-380.
101. Montagner F. Comunidades microbianas em canais radiculares e abscessos periapicais agudos e suscetibilidade de algumas bactérias anaeróbias estritas isoladas. [Tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2010.

102. Morrison A, Conrod S. Dental burs and endodontic files: are routine sterilization procedures effective? J Can Dent Assoc. 2009; 75(1): 39.
103. Morrison SW, Newton CW, Brown CE. The effects of steam sterilization and usage on cutting efficiency of endodontic instruments. J Endod. 1989; 15(9): 427-31.
104. Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. J Dent Res. 2002; 81(11): 761-6.
105. Murgel CA, Walton RE, Rittman B, Pécora JD. A comparison of techniques for cleaning endodontic files after usage: a quantitative scanning electron microscopic study. J Endod. 1990; 16(5): 214-7.
106. Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. Crit Rev Oral Biol Med. 2004; 15(6): 348-81.
107. Neal RG, Craig RG, Powers J M. Effect of sterilization and irrigants on the cutting ability of stainless steel files. J Endod. 1983; 9(3): 93-6.
108. Oliet S. Evaluation of methods for sterilizing root canal instruments. Oral Surg Med Oral Pathol. 1956; 9(6): 666-73.
109. Oliveira JCM, Siqueira Jr. JF, Alves GB, Hirata R Jr, Andrade AF. Detection of *Porphyromonas endodontalis* in infected root canals by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. J Endod. 2000; 26(12): 729-32.
110. Paiva JG, Antoniazzi JH. Endodontia: bases para a prática clínica. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas; 1988. p.161-233.
111. Palenick CJ, Golden LC. Effectiveness of two types of sterilizers on the contents of sharps containers. Am J Dent. 1994; 7(2): 98-102.

112. Palenik CJ, King TN, Newton CW, Miller CH, Koerber LG. A survey of sterilization practices in selected endodontic offices. *J Endod.* 1986; 12(5): 206-9.
113. Parashos P, Linsuwanont P, Messer HH. A cleaning protocol for rotary nickel-titanium endodontic instruments. *Aust Dent J.* 2004; 49(1): 20-7.
114. Pelt P, Zimmermann B, Ulbrich N, Bernimoulin, JP. Effects of lipopolysaccharide extracted from *Prevotella intermedia* on bone formation and on the release of osteolytic mediators by fetal mouse osteoblasts *in vitro*. *Arch Oral Biol.* 2002; 47(12): 859-66.
115. Perakaki K, Mellor AC, Qualtrough AJE. Comparison of an ultrasonic cleaner and a washer disinfectant in the cleaning of endodontic files. *J Hosp Infect.* 2007; 67(4): 355-9.
116. Perea EJ. La flora de la boca en la era de la biología molecular. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2004; 9 Suppl: S1-10.
117. Pileggi-Vinha P, Pécora JD. Comparação da eficácia de três técnicas de limpeza de brocas odontológicas. *Rev Bras Odontol.* 1994; 51(4): 18-23.
118. Pinheiro ET, Anderson MJ, Gomes BPFA, Drucker DB. Phenotypic and genotypic identification of enterococci isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21(3): 137–44.
119. Popovic J, Gasic J, Zivkovic S, Petrovic A, Radicevic G. Evaluation of biological debris on endodontic instruments after cleaning and sterilization procedures. *Int Endod J.* 2010; 43(4), 336–41.
120. Rabello SB, Godoy CVC, Santos FRW. Presença de bactérias em instrumentais e superfícies do ambiente clínico odontológico. *Rev Bras Odontol.* 2001; 58(3): 184-7.

121. Reams GJ, Baumgartner JC, Kulild JC. Practical application of infection control in endodontics. *J Endod.* 1995; 21(5): 281-4.
122. Rezende PR, Alves GB, Maradei-Pereira LMC, Vale TJJ, Pimenta ASC, Lemos JAR. Sensibilidade da técnica de reação em cadeia da polimerase para HIV-1 em relação à técnica de ensaio imunoenzimático. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2002; 24(1): 25-8.
123. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am.* 1992; 267(2): 54-61
124. Riggio MP, Aga H, Murray CA, Jackson MS, Lennon A, Hammersley N, Bagg J. Identification of bacteria associated with spreading odontogenic infections by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 103(5): 610-7.
125. Rôças IN. Polymerase Chain Reaction – PCR [Box 10-1]. In: Lopes HP, Siqueira Jr. JF. *Endodontia Biologia e técnica.* 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 267.
126. Rôças IN, Baumgartner JC, Xia T, Siqueira Jr. JF. Prevalence of selected bacterial named species and uncultivated phylotypes in endodontic abscesses from two geographic locations. *J Endod.* 2006; 32(12):1135-8.
127. Rôças IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira Jr. JF. Polymerase Chain Reaction Identification of Microorganisms in Previously Root-Filled Teeth in a South Korean Population. *J Endod.* 2004a; 30(7): 504-8.
128. Rôças IN, Siqueira Jr. JF. Identification of *Dialister pneumosintes* in acute periradicular abscesses of humans by Nested PCR. *Anaerobe.* 2002; 8: 75-8.
129. Rôças IN, Siqueira Jr. JF. Detection of novel oral species and phylotypes in symptomatic endodontic infections including abscesses. *FEMS Microbiol Lett.* 2005a; 250(2): 279-85.

130. Rôças IN, Siqueira Jr. JF. Occurrence of two newly named oral treponemes – *Treponema parvum* and *Treponema putidum* – in primary endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2005b; 20(6): 372–5.
131. Rôças IN, Siqueira Jr. JF. Species-directed 16S rRNA gene nested PCR detection of *Olsenella species* in association with endodontic diseases. *Lett Appl Microbiol*. 2005c; 41(1):12-6.
132. Rôças IN, Siqueira Jr. JF. Characterization of *Dialister* species in infected root canals. *J Endod*. 2006; 32(11): 1057-61.
133. Rôças IN, Siqueira Jr. JF. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkboard approach. *J Endod*. 2010; 36(1): 45-52.
134. Rôças IN, Siqueira Jr. JF, Aboim MCR, Rosado AS. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 98(6): 741-9.
135. Rôças IN, Siqueira Jr. JF, Andrade AF, Uzeda M. Oral treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR. *Int Endod J*. 2003; 36(1): 20-6.
136. Rôças IN, Siqueira Jr. JF, Arnaldo F.B. Andrade AFB, Milton de Uzeda M. Identification of selected putative oral pathogens in primary root canal infections associated with symptoms. *Anaerobe*. 2002; 8(4): 200–8.
137. Rolph HG, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, Mackenzie D, Coldero L, Bagg J. Molecular Identification of Microorganisms from Endodontic Infections. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(9): 3282-9.

138. Rueggeberg FA, Powers JM. Mechanical Properties of Endodontic Broaches and Effects of Bead Sterilization. *J Endod.* 1988; 14(3): 133-7.
139. Sabeti M, Simon JH, Slots J. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus are associated with symptomatic periapical pathosis. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18(5): 327-8.
140. Safieh-Garabedian B, Poole S, Haddad JJ, Massaad CA, Jabbur SJ, Saade NE. The role of the sympathetic efferents in endotoxin-induced localized inflammatory hyperalgesia and cytokine upregulation. *Neuropharmacology.* 2002; 42(6): 864–72.
141. Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira Jr. JF, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21(2): 112–22.
142. Sanchez E, Macdonald G. Decontaminating dental instruments: testing the effectiveness of selected methods. *J Am Dent Assoc.* 1995; 126(3): 359-62, 364-6.
143. Sassone L, Fidel R, Figueiredo L, Fidel S, Faveri M, Feres M. Evaluation of the microbiota of primary endodontic infections using checkerboard DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(6): 390-7
144. Schäfer E. Effect of sterilization on the cutting efficiency of PVD-coated nickel-titanium endodontic instruments. *Int Endod J.* 2002; 35(10): 867-72.
145. Seltzer S, Farber PA. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1994; 78(5): 634-45.
146. Silva ABS, Leonardo MR, Faccioli LH, Medeiros AI, Nelson-Filho P. Effect of different methods of sterilization on the inactivation of bacterial endotoxin (LPS) in endodontic files. *Braz J Microbiol.* 2007; 38(2): 270-2.

147. Silva ABS, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin *in vivo*. J Endod. 2002; 28(2): 94-8.
148. Siqueira Jr. JF, Rôças IN. *Dialister pneumosintes* can be a suspected endodontic pathogen. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002; 94(4): 494-8.
149. Siqueira Jr. JF, Rôças IN. A 16S rDNA-based nested PCR protocol to detect *Campylobacter gracilis* in oral infections. Pesqui Odontol Bras. 2003a; 17(2): 142-6.
150. Siqueira Jr. JF, Rôças IN. *Bacteroides forsythus* in primary endodontic infections as detected by Nested PCR. J Endod. 2003b; 29(6): 390-2.
151. Siqueira Jr. JF, Rôças IN. Positive and negative bacterial associations involving *Dialister pneumosintes* in primary endodontic infections. J Endod. 2003c; 29(7): 438-41.
152. Siqueira Jr. JF, Rôças IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. J Dent. 2003d; 31(5): 333-9.
153. Siqueira Jr. JF, Rôças IN. *Campylobacter gracilis* and *Campylobacter rectus* in primary endodontic infections. Int Endod J. 2003e; 36(3):174-80
154. Siqueira Jr. JF, Rôças IN. Nested PCR detection of *Centipeda periodontii* in primary endodontic infections. J Endod. 2004a; 30(3):135-7.
155. Siqueira Jr. JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction–based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004b; 97(1): 85-94.
156. Siqueira Jr. JF, Rôças I.N. Simultaneous detection of *Dialister pneumosintes* and *Filifactor alocis* in endodontic infections by 16S rDNA-directed multiplex PCR. J Endod. 2004c; 30(12): 851-4.

157. Siqueira Jr. JF, Rôças IN, Rosado AS. Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral Microbiol Immunol.* 2004d; 19(6): 363-70.
158. Siqueira Jr. JF, Rôças IN. Selected Endodontic Pathogens in the Apical Third of Infected Root Canals: A Molecular Investigation. *J Endod.* 2004e; 30(9): 638-43.
159. Siqueira Jr. JF, Rôças I.N. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(7): 3314-9.
160. Siqueira Jr. JF, Rôças IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J.* 2007; 18(4): 267-80.
161. Siqueira Jr. JF, Rôças IN. The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent Res.* 2009; 88(1): 61-5.
162. Siqueira Jr. JF, Rôças IN, Alves FR, Santos KR. Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: a molecular investigation. *J Endod.* 2004; 30(9): 638-43.
163. Siqueira Jr. JF, Rôças IN, Favieri A, Oliveira JCM, Santos KRN. Polymerase chain reaction detection of *Treponema denticola* in endodontic infections within root canals. *Int Endod J.* 2001a; 34(4): 280-4.
164. Siqueira Jr. JF, Rôças IN, Oliveira JC, Santos KR. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod.* 2001b; 27(9): 563-6.

165. Siqueira Jr. JF, Rôças IN, Oliveira JCM, Santos KRN. Detection of Putative Oral Pathogens in Acute Periradicular Abscesses by 16S rDNA-Directed Polymerase Chain Reaction. *J Endod.* 2001c; 27(3):164-7.
166. Siqueira Jr. JF, Rôças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001d; 92(4): 451-7.
167. Siqueira Jr. JF, Rôças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo P. *Actinomyces Species, Streptococci, and Enterococcus faecalis* in Primary Root Canal Infections. *J Endod.* 2002; 28(3): 168-72.
168. Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1995; 20 (Suppl 2): S304-7.
169. Spolidorio DMP, Spolidorio LC. Técnicas básicas de biologia molecular. In: Estrela C. Metodologia científica. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas; 2005.
170. Spolyar JL, Johnson CG, Head R, Porath L. Ultrasonic cold disinfection. *J Clin Orthod.* 1986; 20(12): 852-3.
171. Sundqvist G. Bacteriological Studies of Necrotic Dental Pulps [tese]. University of Umea; 1976.
172. Stach DJ, Cross-Poline GN, Newman SM, Tilliss TSI. Effect of repeated sterilization and ultrasonic cleaning on curet blades. *J Dent Hyg.* 1995; 69(1): 31-9.
173. Stubbs S, Park SF, Bishop PA, Lewis MAO. Direction of *Prevotella intermedia* and *P. nigrescens* in suppurative oral infection by amplification of 16S rRNA gene. *J Med Microbiol* 1999; 48(11): 1017-22.

174. Teixeira CS, Felipe MC, Felipe WT. The effect of application time of EDTA and NaOCl on intracanal smears layer removal: an SEM analysis. *Int Endod J.* 2005; 38(5): 285-90.
175. Tokuda M, Sakuta T, Fushuku A, Torii M, Nagaoka, S. Regulation of interleukin-6 expression in human dental pulp cell cultures stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide. *J Endod.* 2001; 27(4): 273-7.
176. Ueno A, Matsumoto H, Naraba H, Ikeda Y, Ushikub F, Matsuoka T *et al.* Major roles of prostanoid receptors IP and EP3 in endotoxin-induced enhancement of pain perception. *Biochemical Pharmacology.* 2001; 62(2): 157-60.
177. Vafaie NM, Dobeck JM, Warbington ML, Dibart S, Harris M, Skobe Z. DNA analysis of bacteria in symptomatic endodontically treated teeth. *J Endod.* 1999; 25(4): 290.
178. Van Eldik DA, Zilm OS, Rogers AH, Marin PD. Microbiological evaluation of endodontic files after cleaning and steam sterilization procedures. *Aus Dent J.* 2004a; 49(3): 122-7.
179. Van Eldik DA, Zilm OS, Rogers AH, Marin PD. A SEM evaluation of debris removal from endodontic files after cleaning and steam sterilization procedures. *Aus Dent J.* 2004b; 49(3): 128-35.
180. Venkatasubramanian R, Jayanthi, Das UM, Bhatnagar S. Comparison of the effectiveness of sterilizing endodontic files by 4 different methods: An in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2010; 28(1): 2-5.
181. Vianna ME, Horz HP, Gomes BPFA, Conrads G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20(4): 253–8.

182. Vianna ME. Microbiologia e tratamento das infecções endodônticas. [Tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2006.
183. Vianna ME, Conrads G, Gomes BPFA, Horz HP. Identification and quantification of *Archaea* involved in primary endodontic infections. J Clin Microbiol. 2006; 44(4): 1274-82.
184. Vianna ME, Conrads G, Gomes BPFA, Horz HP. Quantification and characterization of *Synergistes* in endodontic infections. Oral Microbiol Immunol. 2007; 22(4): 260–5.
185. Vieira BAH. Como utilizar a Câmara de Neubauer. [acesso 2011 jan 6]. Disponível em <http://starmedia.orbita.com/~bervieira>.
186. Villaseñor A, Hill SD, Seale NS. Comparison of two ultrasonic cleaning units for deterioration of cutting edges and debris removal on dental burs. Pediatr Dent. 1992; 14(5): 326-30.
187. Walker JT, Dickinson J, Sutton JM, Raven NDH, Marsh PD. Cleanability of dental instruments – implications of residual protein and risks from Creutzfeldt-Jakob disease. British Dental Journal. 2007; 203(7): 395-401.
188. Walmsley AD, Williams AR. Measurement of cavitation activity within ultrasonic baths. J Dent. 1991; 19(1): 62-6.
189. Wexler H, Oppenheim JD. Isolation, characterization, and biological properties of an endotoxin-like material from the Gram-positive organism *Listeria monocytogenes*. Infect Immun. 1979; 23(3): 845-57.
190. Windeler AS, Walter RG. The sporicidal activity of glass bead sterilizers. J Endod. 1975;1(8): 273-5.

191. Xia T, Baumgartner JC, David LL. Isolation and identification of *Prevotella tanneriae* from endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol*. 2000; 15(4): 273-5.
192. Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, Ogawa K, Toda T, Sagawa H. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canal of teeth with periapical pathosis. *J Endod*. 1987; 13(1): 24-8.
193. Young G, Turner S, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Bacterial DNA persists for extended periods after cell death. *J Endod*. 2007; 33(12): 1417-20.
194. Younis O. The effects of sterilization techniques on the properties of intracanal instruments. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1977; 43(1): 130-4.
195. Zettlemoyer TL, Goerig AC, Nagy WW, Grabow W. Effects of sterilization procedures on the cutting efficiency of stainless steel and carbon steel Gates Glidden drills. *J Endod*. 1989; 15(11): 522-5.
196. Zmener O, Spielberg C. Cleaning of endodontic instruments before use. *Endod Dent Traumatol*. 1995; 11(1): 10-4.

APÊNDICE I – Métodos de descontaminação de material endodôntico referidos na literatura consultada.

Tabela 8 - Métodos de descontaminação de material endodôntico referidos na literatura consultada.

Autor	Método	Característica
Windeler & Walter (1975)	Esterilizador de bolinhas de vidro	218° C, 60 s.
Dayoub & Devine (1976)	Esterilização por sal quente	424,4 ° F (218° C), 10 s.
	Esterilizador de bolinhas de vidro	424,4 ° F (218 ° C), 15s.
Neal <i>et al.</i> (1983)	Estufa	310° F (154,44 ° C) por 90 min.
	Autoclave	Vapor d'água, 15 psi, 270° F (132,22 ° C), 30 min.
	Esterilização por sal quente	475 ± 2 ° F (223,88 ° C), 60 s.
	Autoclave	Vapor d'água sob pressão, 30 psi, 127° C, 30 min.
Iverson <i>et al.</i> (1985)	Esterilizador de bolinhas de vidro	218° C, 20 s.
	Estufa de calor seco	171 ° C por 1 h.
	Esterilização a frio	Imersão por 30 min em solução germicida (álcool etílico, sabão, o-fenilfenol, o-benzil-p-clorofenol, álcool isopropílico e tetracetato de diaminoetileno tetrassódico), 30 min.
Palenik <i>et al.</i> (1986)	Autoclave	Não informado.
	Química Óxido de etileno	Solução alcalina de glutaraldeído (tempo não informado) Não informado.
Rueggeberg & Powers (1988)	Esterilizador de bolinhas de vidro	Duas exposições de 15 s a 238° C.
Morrison <i>et al.</i> (1989)	Autoclave	Vapor d'água sob pressão, 20 psi, 121°C, 15 min.

Continua

Continuação do Apêndice I - Métodos de descontaminação de material endodôntico referidos na literatura consultada.

Autor	Método	Característica
Zettlemyer <i>et al.</i> 1989)	Autoclave	Vapor d'água sob pressão, 20 psi, 121°C, 15 min.
	Esterilizador de bolinhas de vidro	218 ° C, 30 s.
Luper <i>et al.</i> (1991)	Estufa de calor seco	171°C, 1 h.
	Química	Solução alcalina de glutaraldeído a 2%, 11 h.
Bruce <i>et al.</i> (2000)	Autoclave	Vapor d'água, 48 psi, 135° C, 3 min.
	Estufa de calor seco	170° C ¹ , 1 h.
	Esterilizador de bolinhas de vidro	235 a 238 ° C, 15 s.
Lopes & Siqueira Jr. (2010)	zAutoclave	Vapor químico ("chemiclave"), 72,31% de etanol; 0,23% de formaldeído e 27,36% de ingredientes inertes, 20 psi, 132° C ³ (270° F), 30min.
		Vapor d'água, 35 psi, 132° C, 10 min.
Estrela (2004)	Autoclave	Vapor d'água, 1 atm ² , 121 a 127°C, 15 a 30 min.
		Vapor d'água, 2 atm, 132 a 134°C, 4 a 7 min.
Estrela (2004)	Estufa de calor seco	Vapor d'água, 15 psi, 121° C, 20 min.
		Automática – 132°C, 30 libras (psi), 3 a 6 min.
		160°C, 2 h.
		170°C, 1 h.

Continua

¹ Graus Celsius = (Graus em Farenheit - 32) ÷ 1,8.

² 1 atm= 14,7 psi.

Conclusão do Apêndice I - Métodos de descontaminação de material endodôntico referidos na literatura consultada.

Autor	Método	Característica
Hilt <i>et al.</i> (2000)	Autoclave	Vapor químico ("chemiclave"), 72,31% de etanol; 0,23% de formaldeído e 27,36% de ingredientes inertes, 20 psi, 132° C (270° F), 30min. Vapor d' água, 35 psi, 132° C, 10 min.
Schäfer (2002)	Autoclave	Vapor d' água, 2 bar, 134° C , 30 min.
Venkatasubramanian <i>et al.</i> (2010)	Laser CO ₂	Irradiação por 3 segundos por superfície (10 watts)
	Autoclave	Vapor d' água, 15 libras, 121°C, 30 min.
	Química	Glutaraldeído, 2,4%,12 h
	Esterilizador de bolinhas de vidro	240°C, 45 s.

APÊNDICE II - Métodos de monitoramento de processos de esterilização encontrados na literatura consultada.

Tabela 9 - Métodos de monitoramento de processos de esterilização encontrados na literatura consultada

Autor	Método de esterilização	Indicador biológico
Windeler & Walter (1975)	Esterilizador de bolinhas de vidro.	Esporos do <i>Bacillus subtilis</i>
Dayoub & Devine (1976)	Esterilização pelo sal quente.	<i>Bacillus subtilis niger</i>
Engelhardt <i>et al.</i> (1984)	Esterilizador de bolinhas de vidro.	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus faecalis</i>
Palenik <i>et al.</i> (1986)	Autoclave de vapor d'água, vapor químico, estufa, óxido de etileno.	Tiras contendo esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i> Tiras contendo esporos de <i>Bacillus subtilis globigii</i>
Venkatasubramanian <i>et al.</i> (2010)	Autoclave de vapor d'água, glutaraldeído, esterilizador de bolinhas de vidro	Tiras contendo <i>Bacillus stearothermophilus</i>

APÊNDICE III – Processamento laboratorial

O processamento laboratorial foi realizado, conforme já descrito por Martinho (2011).

Extração de DNA bacteriano

A extração do DNA foi realizada com o QIA amp DNA kit (QYAGEN, Valencia, Califórnia, EUA, Ref. 51306 – 250 reações), de acordo com as instruções do fabricante:

1. Remover 300 μ L da amostra, adicionando a um eppendorf de 1,5 mL;
2. Adicionar 180 μ L de ATL e 20 μ L de Proteinase K;
3. Agitar e incubar a 56°C por 2 horas;
4. Adicionar 200 μ L de AL;
5. Agitar e incubar a 70° C por 10 min em banho seco;
6. Adicionar 200 μ L de etanol puro;
7. Agitar e transferir para os tubos com filtros/colunas;
8. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min;
9. Transferir o filtro para o outro tubo vazio do kit;
10. Adicionar 500 μ L de AW1;
11. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min;

12. Transferir a coluna para outro tubo;
13. Adicionar 500 μL de AW2;
14. Centrifugar a 13000 rpm por 3 min;
15. Transferir o filtro para um eppendorf normal de 1,5 mL com tampa;
16. Adicionar 100 μL de AE e aguardar 3 minutos;
17. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min;
18. Armazenar o DNA extraído a -20°C ;

Após extração, a leitura da concentração de DNA presente nas amostras coletadas e ATCC foi realizada a 260 nm por espectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, DE, EUA).

Reação de PCR

A reação de PCR foi processada na quantidade de 25 μL de uma mistura de reagentes (Master Mix) contendo as quantidades abaixo para 1,5 μL do DNA da amostra, conforme Tabela 10:

Tabela 10 – Reagentes para reação de PCR

Reagente (Invitrogen® - São Paulo, Brasil)	Quantidade (μL)
1. Tampão (10 x Reaction <i>buffer</i>)	2,5 μL
2. DNTPs	0,5 μL
3. MgCl_2 (Invitrogen® - Life Technology do Brasil)	1,25 μL
4. H_2O MiliQ	17,625 μL
5. Primer Forward 100 μM	0,75 μL
6. Primer Reverse 100 μM	0,75 μL
7. <i>Taq Platinum</i>	0,125 μL

Foi escolhida a Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen® - São Paulo, Brasil) que não se degrada com o aumento gradativo da temperatura, podendo ser acrescentada diretamente na mistura (Mix) da reação, evitando a necessidade do *hot start*.

Preparo de soluções para PCR

Preparo DNTPs (Invitrogen® - São Paulo, Brasil):

Acrescentar 10 μL de cada (A,T,C,G) em 360 μL de água MiliQ estéril (100mM DNTPs Set, PCR Grade/ Invitrogen, Cat nº 10297117).

Preparo dos primers DNTPs (Invitrogen® - São Paulo, Brasil):

Quando o primer chega liofilizado, acrescentar água MiliQ (conforme exemplo abaixo). Esse volume dependerá de cada síntese. Deve-se verificar no rótulo do tubo ou primer, ou no documento que acompanha o produto, o valor indicativo da quantidade de nm (canto direito abaixo da OD). Esse valor será a quantidade de água que será utilizada para diluição do primer e assim levar a uma concentração de 1000 pMol (essa é a solução estoque). Para preparar a solução de uso, cuja concentração requerida é de 15 pMol, faz-se necessário uma diluição 1:40, ou seja, acrescentar 1 µL de primer estoque a 39 µL de água ultra pura/miliQ estéril.

Exemplo:

Solução estoque (1000 pMol)

- Se estiver escrito no rótulo do primer “28, 31 nm”
- Acrescenta-se “28,31 uL” de água miliQ estéril, agitando-se bem, centrifugando-se apenas para concentrar o líquido no fundo do tubo e armazenando a -20°C.

Solução de uso (25 pMol)

- Diluir 1:40 = 1uL do estoque + 39 uL de água MiliQ estéril

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$1000 \times 1\text{uL} = 25 \times ?$$

? = 40 (quer dizer que tomando-se 1uL da solução de estoque, para ter a solução final de uso a 25pMol, o volume total deve ser 40 uL, portanto deve ser acrescentado 39 uL de água)

- Se necessário preparar quantidade maior de primer, é só aumentar proporcionalmente.

Ex: 5 uL de estoque + 195 uL de água

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$1000 \times 5 \text{ uL} = 25 \times ?$$

? = 200 (para uma soluçãod e uso de 200 uL, para ter a solução de uso de 200 uL, deve-se tomar 5 uL do estoque + 195 uL de água).

Desenho dos primers – Oligo Perfect (Invitrogen® - São Paulo, Brasil):

1. Entrar no site www.pubmed.gov, procurando artigo que descreva o gene 16S da bactéria-alvo.
2. Como fazer isso: no **search**, procurar por **nucleotide**, nome da bactéria-alvo (Por ex, **P. endodontalis**) **16S** e Clicar em **search**.
3. Vários artigos vão aparecer. Escolhe-se o artigo com gene 16S da bactéria escolhida na forma ATCC/16S.
4. Aparecerá a sequência da bactéria (deve-se copiar).
5. Entrar no site google.com.br.
6. Digitar **Oligoperfect** e, dentre os resultados no Google, selecionar a página da Invitrogen.
7. Em **Sequence name** digitar novamente o nome da bactéria que estamos procurando.
8. Em **Application** escolher **PCR: detection**.
9. Em **Research name** digitar, por exemplo, Brenda.
10. Colar a sequência copiada em 6. (Remover os números da sequência).
11. Clicar em **Submit**.
12. Aparecerão especificações. Ex:

(**Primer size:** 12-20-27 / **Primer TM^oC** 57-60-63 / **Primer GC** 40-50-60 / **Product size** 300-500 / **Experimental conditions** 50-50 / **Region of analysis** 1-746 / Max number of primer to returns 5.

13. Clicar em **Submit**.

14. Aparecerão as sequências forward e reverse.

15. Entrar novamente no www.pubmed.gov.

16. Digitar **Blast (sequence analysis)**.

17. Clicar em **Nucleotides blast**.

18. Clicar em **Others**.

19. Copiar o primer (testar primeiro o forward, depois o reverse) obtido em 14 e colar.

20. Clicar em **Show results**.

21. Preferencialmente, deve aparecer somente a bactéria-alvo no resultado de Blast.

Obs: podem aparecer outras. Isto é aceitável, se a bactéria-alvo estiver figurando como 100% e as outras com menos porcentagem. Deverá ser desconsiderada esta sequência e testada outra, se houver várias espécies diferentes com alta porcentagem (principalmente as já descritas em canais), ou se a porcentagem de identidade da bactéria alvo não for alta.

22. Para determinar a temperatura do anelamento ideal, reações de PCR contendo primers espécie-específicos (Tabela 1) foram realizadas em um aparelho termociclador convencional e submetidas a vários gradientes de temperaturas (MJ96G, Biocycler, Curitiba, Santa Catarina, Brasil) utilizando amostras ATCC correspondentes como controle positivo, água MiliQ esterilizada como controle negativo e baseadas na literatura de suporte.

Eletoforese

As amostras após a reação PCR (produtos da amplificação) foram analisadas imediatamente por eletroforese. Foi utilizado gel de agarose a 1% (Invitrogen® - São Paulo, Brasil) em tampão de tris-borato EDTA pH 8,0 (TBE) e corado com brometo de etídeo (5ug/mL - Invitrogen® - São Paulo, Brasil).

Em cada gel foi incluído um padrão de peso molecular em múltiplos de de 100 bp (DNA ladder - Invitrogen® - São Paulo, Brasil). Após o término da eletroforese (60 volts por 40 minutos), as bandas foram observadas com auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta. A documentação fotográfica dos géis foi obtida com o sistema Image Master-VDS (Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra) e a captura das imagens foi realizada pelo programa LISCAP Image Capture Software.

Preparo de soluções para eletroforese (Invitrogen® - São Paulo, Brasil):

- Ladder (100 bp ou 1 kb - Invitrogen® - São Paulo, Brasil): diluir 1:15.
- Brometo de etídeo (10 mg/mL) (Invitrogen® - São Paulo, Brasil): dissolver 0,2g de brometo de etídeo em 20 mL de água destilada/ MiliQ. Manter em temperatura ambiente e proteger da luz. Obs: É possível adquirir solução pronta da Invitrogen.
- Syber Safe concentrado 10000 x (Invitrogen® - São Paulo, Brasil): é uma alternativa para o brometo. Não é cancerígeno, porém mais caro.
- Taq Platinum + Buffer + MgCl₂ (Invitrogen® - São Paulo, Brasil): já vem pronto para usar, sendo vendidos os 3 juntos.
- Loading Dye (Invitrogen® - São Paulo, Brasil): pronto para uso.

- EZ-Vision (Invitrogen® - São Paulo, Brasil): semelhante ao Loading Dye, mas apresenta um componente responsável pela fluorescência do DNA. Quando usado na eletroforese, não é necessário usar brometo de etídeo ou Syber Safe no gel de agarose.
- TBE 10X Buffer (Invitrogen® - São Paulo, Brasil): pegar 100 mL de TBE 10x, acrescentar 900 mL de H₂O destilada.

Realização da eletroforese

Gel pequeno (cuba de eletroforese de 12x12 cm):

- 0,63 g de agarose (0,7%) / 0,9 g de agarose (1%) / 1,8 g de agarose (2%)
- 90 mL de TAE 1X ou TBE 1X
- 2 µL de solução de brometo de etídeo (10 mg/mL) ou se for usar na Syber Safe. Colocar 9 µL para 90 mL de TAE.
-

Obs: no gel pequeno, utiliza-se 2 pentes de 20 poços (wells), considerando-se o primeiro poço de cada pente para o Ladder, o segundo para controle de DNA bacteriano (ATCC), sendo possível analisar até 36 amostras.

Gel pequeno (cuba de eletroforese de 25x20 cm):

1. Pesar em balança de precisão (usando copinho de café descartável), de acordo com a concentração do gel (0,7%, 1% ou 2%).
2. Misturar a agarose com 90 mL do tampão (TAE ou TBE) em Becker e aquecer em microondas até ficar transparente (aproximadamente 1 min. Deixa alguns segundos, remove para mexer, e volta ao microondas, até que as partículas desapareçam.
3. Passar conteúdo para o Becker contaminado com o brometo de etídeo e acrescentar 2uL de brometo de etídeo.

(bancada de baixo é contaminada. Na de cima não pode ter tido contato com o brometo)

4. Misturar e verter na bandeja.

Importante: encaixar bem as borrachas para vedar as extremidades e colocar o pente.

5. Observar se há bolhas para remover e esperar esfriar/endurecer (aproximadamente 30 min).
6. Remover as borrachas e pentes.
7. Levar a bandeja com gel para o interior da cuba e acrescentar tampão se necessário, até cobrir todo o gel.

Importante: o tampão da cuba deve ser o mesmo usado no gel (TAE ou TBE).

8. Aplicar 4 uL da amostra + 2 uL do corante (Loading Dye) em cada poço.

9. Fechar cuba e ligar fonte de eletroforese (+- 90 V/ +- 40 minutos). Observar no visula a posição do corante para ter noção de onde a banda está. Querendo acelerar a corrida, aumenta-se a voltagem.

Obs: no gel grande, utilizam-se 3 pentes de 40 poços, destinando-se o bacteriano (ATCC), sendo possível analisar 114 amostras.

Teste turbidimétrico cinético para quantificação de endotoxinas LAL (Pyrogen-5000, Lonza – Walkersville, MD, EUA)

1. Para realização do teste foi necessário:
2. Água Reagente LAL (Cambrex. □W50-640 ou equivalente);
3. Hidróxido de sódio 0.1 N ou Ácido clorídrico 0.1N, dissolvido em Água
4. Reagente LAL, para ajuste do pH da amostra, se necessário;
5. Tubos de vidro descartáveis para diluição isentos de endotoxina (13 x 100 mm, Cambrex # N207 ou equivalente);
6. Pipetas de medição embaladas individualmente;
7. Pipetas automáticas com baixa endotoxina, embaladas individualmente ou tipo prateleira;
8. Microplacas estéreis descartáveis.
9. Multipipetador de 8 canais;
10. Reservatório de reagente (Cambrex # 25-268 ou equivalente);
11. Leitor de microplacas (leitor KINETIC-QCL, Cambrex. # 25-141B; Leitor ELx808 IU, Cambrex # 25-315; Leitor ELx808 RIU, Cambrex # 25-315R);
12. Software WinKQCL® (Cambrex # 25-300; 25-301; 25-348 ou versão vigente);
13. Cronômetro e misturador Vortex.
14. Todo material utilizado estava apirogênico.

Padronização da curva-padrão:

Tabela 11 – Diluições para curva-padrão de endotoxinas

Concentração de Endotoxina (EU/ml)	Volume de Água Reagente LAL	Volume de Solução de Endotoxina adicionado à Água para Reagente LAL
10	0,9ml	0,1ml de 100 EU/ml solução
1	0,9ml	0,1ml de 10 EU/ml solução
0.10	0,9ml	0,1ml de 1 EU/ml solução
0.01	0,9ml	0,1ml de 0,10 EU/ml solução

1. Preparar uma solução contendo 10EU/ml de endotoxina por adição de 0,1ml de 100EU/ml endotoxina estoque em 0.9ml de água para reagente LAL. Essa solução deve ser vigorosamente agitada em vortex por pelo menos 1 minuto antes do procedimento.
2. Transferir 0,1ml da solução de endotoxina 10EU/ml em 0,9ml de água para reagente LAL para um recipiente adequado e rotular 1EU/ml. A solução deve ser vigorosamente agitada em Vortex por pelo menos 1 minuto antes do início do procedimento;
3. Transferir 0,1ml da solução de endotoxina 1EU/ml em 0,9ml de água para reagente LAL para um recipiente adequado e rotular 0,10EU/ml. Essa solução deve ser vigorosamente agitada em Vortex por pelo menos 1 minuto antes do procedimento.
4. Transferir 0.1 ml da solução de endotoxina 0,10EU/ml em 0,9ml de água para reagente LAL para um recipiente adequado e rotular 0,01 EU/ml. Essa

solução deve ser vigorosamente agitada em Vortex por pelo menos 1 minuto antes do início do procedimento.

5. O valor absoluto do coeficiente de correlação (r) da curva-padrão calculada deve ser ≥ 0.980 .

Extração de RNA total transcrição reversa e PCR

Protocolo de extração de RNA e dosagem em espectrofotômetro:

Obs: antes de começar, ligar centrífuga e colocar a 4°C e o banho seco a 55°C.

1. Aspirar meio de cultura da placa e lavar com 10 mL de PBS 1x.
2. Adicionar 1mL de TRIzol, agitar por 5 min e coletar em eppendorf.
3. Adicionar 200 μ L de clorofórmio para cada 1mL de TRIzol e agitar vigorosamente.
4. Aguardar 2 min.
5. Centrifugar 12.000 rpm por 15 min a 4°C.
6. Transferir sobrenadante (líquido incolor-clorofórmio RNA e DNA) para outro eppendorf.

Protocolo RT-PCR:

1. Remover as amostras do freezer – 80°C e deixar descongelar em bancada dentro do gelo.

2. Para 900mL (TRIzol + célula), acrescentar 180 mL de clorofórmio (Qhemis, catálogo: QHC028 IL).
3. Após acrescentar o clorofórmio, colocar os eppendorfs em rack e agitar forte contra outro rack.
4. Aguardar em bancada por 2 minutos.
5. Centrifugar a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 graus.
6. Após esta etapa, formam-se 3 fases, devendo-se ter cuidado na hora de remover a fase límpida (fase intermediária).
7. No novo eppendorf com a fase límpida, acrescentar 250 mL de isopropanol (Qhemis, catálogo: QHA011- 1L).
8. Agitar o eppendorf, apenas vertendo lentamente 4 vezes.
9. Incubar na bancada em temperatura ambiente por 10 minutos.
10. Centrifugar 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 graus.
11. Descartar o sobrenadante, vertendo o eppendorf, em seguida, verter o eppendorf em papel de filtro por 5 minutos e deixar na própria bancada.
12. Acrescentar 500mL de etanol 75% (não necessita ser DNase e RNase free); agitar em vortex 2 segundos.
13. Centrifugar 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 graus.
14. Verter o álcool e deixar o eppendorf secar na posição vertida em papel filtro na capela durante 1 hora.
15. Após secagem, acrescentar 20 mL de H₂O (DNase e RNase free – GIBCO; catálogo: 10977); incubar a 56°C durante 5 minutos (em banho seco).
16. Centrifugar a 12.000 rpm durante 15 segundos.
17. Em caso de armazenar, guardar em freezer a -80°C.
18. Para leitura da concentração de RNA extraído em Nano drop, utilizar 2mL.
 - Para um RNA puro, a leitura de A260/A280 deve estar em torno de 1,5 a 1,9.
 - Programar o Nano drop para nanograma/microlitro.

Após a dosagem da concentração de RNA de cada amostra, deve-se realizar o cálculo a seguir, para utilizar o kit RNAAqueous – 4PCR (catálogo: 1914-4).

19. O kit de cDNA aceita até 2 microgramas de RNA, como concentração final. Mas foi utilizado 1 micrograma de RNA.

Para o cálculo, deve-se realizar: $C1V1=C2V2$.

Exemplo: se o Nano drop acusar 500 ng/microlitros, e a concentração de uso for determinada em 1 micrograma de RNA; então, se 1000 ng = 1 micrograma, deve-se utilizar 2 microlitros do eppendorf contendo o RNA para a reação.

Exemplo: 468 ng/microlitro, ou seja 468 ng e 1 microlitro.

20. 10 mL é o volume final a ser utilizado na reação de cDNA.

Exemplo: se a conta no item 19 foi de 2mL de RNA, deve-se então acrescentar 8 mL de H₂O para a realização da reação final no eppendorf de 10 mL. (10-2=8).

Importante: nos casos em que a amostra apresentar dosagem muito baixa de RNA e com o cálculo não conseguir chegar à concentração de 1 micrograma para síntese do cDNA, deve-se excluir o volume de água da reação, ou seja, não colocar 3,2 mL de H₂O e, na reação final, acrescentar 6,8 mL do mix + 13,2 mL de amostra de RNA.

Preparo do mix para reação:

Se for preparar o mix para analisar 32 amostras, preparar no eppendorf volume correspondente para 35 amostras.

Volume do mix para cada reação (para 35 amostras é necessário multiplicar por 35 os volumes abaixo:

Mix:

- Buffer: 2mL
 - DNTP: 0,8 mL
 - Randon: 2 mL
 - Enzima multiscribe: 1 mL
 - H₂O: 3,2 mL
1. Importante: até adicionar a enzima pode agitar em vortex; manter todos os reagentes no Neb cool durante o preparo do mix.
 2. Após o preparo do mix, pegar eppendorf de 20 mL e enumerar de acordo com as amostras a serem analisadas.
 3. Acrescentar em cada eppendorf o volume de água calculado no item 20, em cada eppendorf.
 4. Acrescentar em cada eppendorf o volume equivalente ao cálculo do volume de RNA a ser utilizado (item 19).
 5. Programar no termociclador (Mycycler, Bio-Rad) o seguinte ciclo: 25°C – 10 min; 27°C - 120 min; 85°C – 5 min e 4°C ∞ (hold).
 6. Pares de primers específicos para IL-1β e para o gene GAPDH com seus respectivos ciclos estão apresentados na tabela 2. GAPDH foi utilizado como controle endógeno do RT-PCR por ser um gene constitutivo, cuja expressão não se altera.
 7. A reação de PCR foi realizada em termociclador (Mycycler, Bio-Rad) e os produtos da reação de PCR foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídeo. Para documentação e análise, foram obtidas imagens digitalizadas destes géis. A expressão do gene-alvo foi normalizada para a expressão do gene housekeeping (GAPDH).

APÊNDICE IV – Manual de dosagem de citocinas (Kit R&D System), conforme citado por Martinho (2011).

Duoset ELISA rat IL-1 β

Enquanto as amostras descongelam, fazer preparo dos reagentes.

Anticorpo de captura anti-rat IL-1 β :

O anticorpo de captura ((Part 840414, 1 vial) - 144 μ g/mL de anti-rat IL-1 β deve ser reconstituído com 1 mL de PBS. Após a reconstituição, estocar de 2 a 8°C por máximo de 60 dias ou alíquota e estoque de -20°C a -70°C em freezer por máximo de 6 meses. Diluir a concentração de trabalho de 0,8 μ g/mL em PBS.

Uso:

$$C1.V1=C2.V2$$

$$144.V1=0,8 \times 10.000 \mu\text{L}$$

$$V1= 55,56\mu\text{L do anticorpo de captura.}$$

Com um tubo contendo 10 mL de PBS, retira-se o volume de 55,56 μ L de PBS, ou seja, 10.000 μ L - 55,56 μ L.

Em seguida, insere-se neste mesmo tubo 55,56 μ L do anticorpo de captura, obtendo-se a solução estoque do anticorpo de captura diluído (q.s.p).

Faz 17 alíquotas de 55,56 μ L de anticorpo de captura.

Anticorpo de detecção anti-rat IL-1 β :

O anticorpo de detecção (Part 840415, 1 vial) - 63 μ g/mL de anti-rat IL-1 β biotilnado de cabra deve ser reconstituído com 1 mL do Reagent Diluent. Após a reconstituição, estocar de 2 a 8°C por máximo de 60 dias ou alíquota e estoque de -20°C a -70°C em freezer por máximo de 6 meses. Diluir a concentração de trabalho de 350 μ g/mL em Reagent Diluent (R&D System).

Uso:

$$C1.V1=C2.V2$$

$$63.000.V1=350 \times 10.000 \text{ (para uma placa)}$$

$$V1= 55,56\mu\text{L do anticorpo de detecção}$$

200 μ L de soro de cabra.

Com um tubo contendo 10 mL de Reagent Diluent (R&D System), retira-se o volume de 200 μ L (referente ao soro de cabra que será adicionado) de Reagent Diluent (R&D System), ou seja, 10.000 μ L – 200 μ L.

Em seguida, insere-se neste mesmo tubo 200 μ L do soro de cabra. Em seguida, deste mesmo tubo retira-se o volume de 55,56 μ L (referente ao anticorpo de detecção que será adicionado) e acrescenta-se este mesmo volume do anticorpo de detecção, obtendo-se a solução de estoque de anticorpo de detecção diluído (q.s.p).

Faz 17 alíquotas de 55,56 μ L de anticorpo de detecção.

Recombinante anti-rat IL-1 β :

O recombinante rat IL-1 β (Part 840416, 1 vial) - 63 μ g/mL deve ser reconstituído com 0,5 mL do Reagent Diluent (500 μ L RD). Permitir a padronização do local por um mínimo de 15 minutos, agitando gentilmente antes de fazer as diluições. Estocar o Standard reconstituído de 2 a 8 $^{\circ}$ C, por no máximo 60 dias ou alíquota e estocar a -70 $^{\circ}$ C em freezer por no máximo 6 meses. Em uma curva standard de 7 pontos, usa-se 2 diluições seriadas em Reagent Diluent, sendo recomendado um alto Standard de 4000pg/mL.

Uso:

$$C1.V1=C2.V2$$

$$100.000 \times V1 = 4000 \times 600$$

$$V1 = 24 \mu\text{L do Standard}$$

Com um tubo contendo 600 μ L de Reagent Diluent (R&D System), retira-se o volume de 24 μ L do Reagent Diluent (R&D System), ou seja, 600 μ L – 24 μ L do Standard e tm-se a solução estoque Standard diluído (q.s.p). Pegar o valor exato de 24 μ L.

Faz 15 alíquotas de 30 μ L do Standard.

Estreptovidina-HRP (Streptavidin-HRP):

A estreptovodina-HRP (Part 890803, 1 vial) – 1,0mL de estreptovidina conjugada a peroxidase de rabanete (horsedish-peroxidase). Estocar de 2 a 8°C, por no máximo 6 meses até o início do uso. NÃO COLOCAR NO FREEZER! Diluir a concentração de trabalho especificado no rótulo do frasco, usando 200µL de Reagent Diluent (ver soluções necessárias).

1µL de estreptovidina - 200µL Reagent Diluent vol. final.

X - 12000µL Reagent Diluent

X= 60µL de estreptavidina

Com um tubo contendo 12mL de Reagent Diluent, retira-se o volume de 60µL do Reagent Diluent. Em seguida, acrescenta-se, neste mesmo tubo, 60µL de estreptavidina e tem-se a solução estoque de estreptavidina duída (q.s.p) (p/ 1 placa).

Soluções necessárias

PBS:

137 mM NaCl, 2,7 mM KCL, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2 a 7,4, 0,2 µM filtrado.

8,02 g NaCl.

0,201g KCl.

2,9g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (2,9g).

0,21g KH_2PO_4 .

q.s.p 1 litro de água destilada – pH 7,2 a 7,4.

1. Preparar 1 dia antes no máximo e manter sempre em geladeira. O PBS deve ser sempre novo, pois pode interferir no resultado da leitura.

Wash Buffer (tampão de lavagem) (WB) diluído:

Wash Buffer (tampão de lavagem) (WB) diluído- 0,05% Tween 20 em PBS, pH 7,2 a 7,4 (R&D Systems Catalog# WA 126).

20mL de WB + 480mL de água destilada.

Reagent Diluent (RD) diluído:

Reagent Diluent (RD) diluído – 1% BSA em PBS, pH 7,2 a 7,4, 0,2 μm filtrado (R&D Systems Catalog # DY995). Qualidade do Bovine Serum Albumin (BSA) é crítica, sendo necessário utilizar de alta qualidade pois é crucial para o bom desenvolvimento do teste DuoSet ELISA.

1. Diluir 10x em água destilada; 5mL de Reagent Diluente concentrado em 45mL de água destilada (p/ 1 placa)

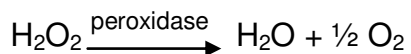
Substrate solution:

Substrate solution – 1:1 mistura de Color Reagent A (H₂O₂) e Color Reagent B (Tetramethylbenzidine) (R&D Systems Catalog # DY999).

Misturar V/V Solução A + Solução B

5,5mL de solução A + 5,5mL de solução B

Fazer no dia do uso



Reação diretamente proporcional aproximadamente 20 a 30 minutos de incubação.

Stop solution:

Stop solution – 2N H₂SO₄ (R&D Systems Catalog # DY994). Cuidado, é ácido. Proteja-se! Usa-se como está! (A reação ficará amarela).

Solução de estreptavidina diluída:

Solução de estreptavidina diluída - 60µL de estreptavidina em 11,40mL de Reagent Diluent. Fazer no dia do uso.

Protocolo Geral ELISA

Preparo da placa - Fase de sensibilização:

1. Adicionar 100µL do anticorpo de captura diluído, agitar gentilmente (virando de cima para baixo o eppendorf antes de inserir no poço), em cada poço. Selar a placa e incubar overnight em temperatura ambiente (25°C).
2. Aspirar de cada poço e descartar. Após, lavar com Wash Buffer (WB) diluído, repetindo o processo com um total de 3 lavagens. Para o descarte deve-se virar a placa com força, ou seja, fazendo um movimento de saque de vôlei *!(sic)*. Lavar com 300µL (pois com 400 transborda) de WB em cada vez e em cada poço. Realizar a remoção do total do líquido. Após a última lavagem, remover todo o resíduo do WB por aspiração ou invertendo a placa e batendo com muita força! *(sic)* contra um papel toalha absorvente limpo na bancada. Não deixar nenhum líquido na placa e nenhuma bolha. Verificar se houve formação de bolhas nos poços após o procedimento de secagem. Se houver bolhas, removê-las com a ponta de uma ponteira de pipeta com muito cuidado. Não tocar no fundo da placa e utiliza uma ponteira para cada poço. Não reutilizar ponteiras.

Preparo da placa - Fase de bloqueio:

3. Adicionar 300µL do Reagent Diluent diluído em cada poço, agitar gentilmente o RD (virando de cima para baixo o eppendorf), antes de inserir no poço. Após inserir, incubar em temperatura ambiente por no mínimo 1

hora (albumina bloqueando). Enquanto ocorre o bloqueio, fazer a diluição da curva padrão (standard).

4. Repetir a aspiração/lavagem (3x) como no item 2. As placas serão lidas com a adição da amostra.

Procedimento do teste:

1. Adicionar 100µL de amostras (devem ser agitadas gentilmente, virando de cima para baixo, antes de inserir nos poços) e Standards diluídos (agitar no vortex), em cada poço. Cobrir com a fita adesiva e incubar por 2 horas em temperatura ambiente. Após as 2 horas, deve-se descartar, vertendo ou aspirando.
2. Repetir a aspiração/lavagem (3x) como no item 2 do preparo da placa.
3. Adicionar 100µL do anticorpo de detecção diluído em cada poço. Cobrir com uma nova fita adesiva e incubar por 2 horas em temperatura ambiente. Após as 2 horas, verter a placa ou aspirar.
4. Repetir a aspiração/lavagem (3x) como no item 2 do preparo da placa.
5. Adicionar 100µL da solução de estreptavidina-HRP diluída em cada poço. Cobrir a placa e incubar por 20 minutos em temperatura ambiente. Evitar que a placa fique em contato direto com a luz. Embalar a placa em papel alumínio. De incolor ficará azul, durante o processo de revelação. Após os 20 minutos, descarta-se.
6. Repetir a aspiração/lavagem (3x) como no item 2 do preparo da placa.
7. Adicionar 100µL de Substrate solution (A+B) em cada poço. Incubar por 20 minutos em temperatura ambiente. Evitar que a placa fique em contato direto com a luz. Embalar a placa em papel alumínio. De incolor ficará azul, durante o processo de revelação. Após os 20 minutos, descarta-se.

8. Adicionar 50 μ L de Stop solution (cuidado! É necessário proteção desta substância, que é um ácido) em cada poço. Misturar gentilmente batendo a placa na mesa. A reação de azul ficará amarela imediatamente, variando com a concentração, de amarelo forte até mais claro. Está pronto para leitura. Os poços das amostras devem ficar com a coloração amarela mais clara que os poços da curva padrão (standard), pois as amostras devem ficar com valores dentro da curva para a leitura ELISA.
9. Determinar a densidade ótica de cada poço imediatamente, usando o leitor com 450 nm.
10. A correção é feita em 540 ou 570 nm.
11. Recomenda-se o uso do R&D systems Reagent Diluent ou o uso de Milipore BSA livre de protease.
12. Realizar o teste em duplicata para os Standards e amostras.
13. Evitar contaminação microbiana de reagentes e líquido de lavagem, pois pode interferir no resultado do teste.
14. Buffers contendo grande quantidade de proteína devem ser feitos sob condições estéreis e estocados a 2-8°C ou preparados diariamente conforme o uso. O gráfico produzido no leitor ELISA deve ser realizado em 4 parâmetros.

ANEXO I - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa Humana.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	
CERTIFICADO	
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Investigação de endotoxinas presentes sobre a superfície de limas endodônticas utilizadas in vivo", protocolo nº 103/2008, dos pesquisadores BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES e WANDERSON MIGUEL MAIA CHIESA, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 24/10/2008.</p>	
<p>The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "Investigation of endotoxin on used endodontic files", register number 103/2008, of BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES and WANDERSON MIGUEL MAIA CHIESA, 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 24/10/2008.</p>	
 Prof. Paulo Agustin Vargas Secretário CEP/FOP/UNICAMP	 Prof. Jacks Jorge Júnior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP
<p>Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</p>	